



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Caracterización fenotípica y genotípica de  
aislamientos colombianos de *Neisseria  
gonorrhoeae*, recuperados a través del  
programa nacional de vigilancia por  
laboratorio, 2013-2014.**

**Olga Marina Sanabria Cruz**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento Salud pública.

Bogotá, Colombia

2016



# **Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos colombianos de *Neisseria gonorrhoeae*, recuperados a través del programa nacional de vigilancia por laboratorio, 2013-2014.**

**Olga Marina Sanabria Cruz**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Salud Pública**

Directora:

MD. MSc Aura Lucia Leal Castro

Codirectora:

MSc Carolina Duarte Valderrama

Línea de Investigación:

Epidemiología Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento Salud pública.

Bogotá, Colombia

2016



*A tres maravillosas mujeres que hacen parte de mi vida:*

*Mi Madre y mis dos hijas.*



## Agradecimientos

A Dios † por estar siempre a mi lado mostrándome el camino para seguir adelante, por darme fortaleza y sabiduría para alcanzar la meta venciendo dudas y adversidades.

A mis hijas por su comprensión, apoyo y empuje para no desfallecer.

A la Doctora Aura Lucía Leal por sus consejos y ayuda en el desarrollo de este estudio.

A Carolina Duarte por su ayuda y su diligencia en la obtención de reactivos para hacer posible el desarrollo de la parte práctica.

A Eliana Parra por sus enseñanzas y asesoría en la elaboración de la PFGE y demás pruebas moleculares.

A Sandra Saavedra y Patricia Escandón por la estandarización de la PCR del gen *tbpB* y gen *porB*.

A mis estudiantes Julieth Buriticá y Angie Pájaro por su interés y apoyo en el desarrollo de las prácticas de laboratorio

A Adriana Bautista por su colaboración en el análisis de las secuencias.

A todos los demás compañeros del Laboratorio por su apoyo, consejos y enseñanzas

Al Instituto Nacional de Salud por el financiamiento de esta tesis

A la Universidad Nacional de Colombia por haberme brindado la oportunidad de cursar esta maestría. ▸





## Resumen

La gonorrea es una enfermedad de transmisión sexual la cual es ocasionada por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*. Esta infección representa un problema serio de salud pública global, debido la aparición, incremento y dispersión de cepas con resistencia a los antimicrobianos. Adicionalmente, existen otras problemáticas asociadas, como la falta de síntomas en algunas mujeres, el desconocimiento de la enfermedad, el tratamiento sindromico, y el sub-registro.

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) desarrolla desde el año 1983 un programa de vigilancia voluntaria por laboratorio de *N. gonorrhoeae*, en base a esto se realizó el presente estudio, con el objetivo de caracterizar fenotípica y genotípicamente los aislamientos de *N. gonorrhoeae*, enviados al INS por los Laboratorios de Salud Pública (LSP) durante el periodo 2013-2014.

Los aislamientos reportados durante el periodo de estudio, se recibieron de 19 entidades de salud del país, los cuales fueron confirmados mediante las pruebas fenotípicas, se determinó la sensibilidad antimicrobiana de acuerdo a los parámetros del Clinical Laboratory Standards Institute CLSI y la caracterización genotípica se realizó mediante las técnicas de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), Ng MAST y PCR para la identificación del gen TEM.

Se recibieron 246 aislamientos, pero solo fue posible aislar y confirmar la bacteria en 126 (58,53 %). Estos aislamientos provenían de Bogotá 62 (25,2 %), Antioquia 54 (21,9 %), Amazonas 47 (19,1 %) y Risaralda 33 (13,4 %). De los aislamientos recibidos, 188 (76,42 %) eran de hombres, 58 (23,57 %) de mujeres, 50 (20,33 %) eran de menores de 15 años, de los cuales 37 (63,79 %) se aislaron en niñas.

La resistencia a penicilina, tetraciclina y ciprofloxacina fue de 65,8 %, 42,8 % y 29,4 %, respectivamente. La multirresistencia se presentó en 14 (11,11 %) aislamientos. Se encontraron 13 fenotipos de resistencia de los cuales el más común fue *N. gonorrhoeae* productora de penicilinasa (PPNG) (34/126; 26.98%). La PFGE agrupó 110 aislamientos en 17 grupos, con 54 patrones diferentes; los 16 aislamientos restantes no relacionaron genéticamente. El grupo más común fue el A, con 19 (15,1 %) aislamientos, la mayor parte de estos presentaron el fenotipo de resistencia PPNG. La prueba de Ng-MAST reveló una gran diversidad en los 20 aislamientos secuenciados debido a que no se encontró ninguna secuencia tipo (ST) predominante.

En conclusión, los hallazgos del estudio sirven de línea base para el conocimiento de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* que circulan en nuestro país. La resistencia y la gran variabilidad de las cepas reflejan que enfrentamos un preocupante problema de salud pública, que requiere una estrategia multidisciplinaria que incluya educación, campañas de prevención y promoción, mejora en los métodos diagnósticos y determinación de los perfiles de sensibilidad antimicrobiana.

**Palabras clave:** *Neisseria gonorrhoeae*, Resistencia antimicrobiana, infecciones de transmisión sexual.

## Abstract

Gonorrhoea is a sexually transmitted infection caused by the bacterium *Neisseria gonorrhoeae*, this is a serious global public health problem, given increase in antimicrobial resistance. Asymptomatic women, ignorance of the disease, syndromic treatment and sub-register are additional problems to the disease.

In Colombia, the National Health Institute (INS, in Spanish) has developed, since 1983, a program for laboratory surveillance of *N. gonorrhoeae* with the voluntary participation of Public Health Laboratories (PHL) at the national level. The present study was conducted with the aim of characterizing phenotypically and genotypically the total number of *N. gonorrhoeae* isolates, received by the INS from PHL during the time period 2013-2014.

The isolates reported during the period of study were received from 19 PHL. For phenotypic typification, assays of antimicrobial susceptibility according to the parameters of the CLSI were performed. Genotypic characterization achieved through techniques such as Electrophoresis Pulsed Field Gel (PFGE), Multi-antigen sequence typing (NG-MAST) and TEM- gene amplification.

Out of a total of 246 isolates, we were able to identify the bacteria in 126 (58.53 %) cases. These isolates originated from Bogotá: 62 (25.2 %), Antioquia: 54 (21.9 %), Amazonas: 47 (19.1 %) and Risaralda: 33 (13.4 %). 188 (76.42 %) isolates were from men and 58 (23.57%) from women; 50 (20.33%) of them corresponded to children under 15 years of age and from these, 37 (63.79%) were female.

We found 65.8 % resistance to penicillin, 42.8 % to tetracycline, and 29.4% to ciprofloxacin. Multi-resistance occurred in 14 (11.11%) isolates, 13 showed resistance phenotypes, and the most common was penicillinase producing *N. gonorrhoeae* (PPNG) found in 34 (26.98%) isolates. The PFGE grouped 110 isolates in 17 clusters, with 54 different patterns, while 16 isolates were unrelated. The most common cluster was A with

19 (15.1%) isolates; most of these showed the PPNG resistance phenotype. Ng-MAST (Multi Antigen Sequence Typing) revealed a high genetic diversity in the 20 isolates sequenced as not predominant sequence type was found.

In conclusion, our findings serve as baseline for understanding *N. gonorrhoeae* isolates circulating in Colombia. Resistance and the high variability of strains represent serious public health problem, which requires a multidisciplinary strategy integrating education, prevention campaigns, improved diagnostic methods and determination of antimicrobial susceptibility profiles.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, antimicrobial resistance, sexually transmitted infections

# Contenido

	Pág
RESUMEN.....	IX
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVOS.....	9
<b>1. Capítulo 1. Marco teórico y conceptual .....</b>	<b>10</b>
1.1 Recuento histórico de la enfermedad gonocócica.....	10
1.2 Incidencia y prevalencia de la enfermedad gonocócica.....	12
1.2.1. Nivel mundial.....	12
1.2.2. Colombia.....	<a href="#">1543</a>
1.2.3. Transmisión y distribución de la gonorrea .....	16
1.3 Taxonomía.....	<a href="#">1744</a>
1.4 Generalidades del gonococo.....	<a href="#">1846</a>
1.5 Mecanismos de patogenicidad.....	<a href="#">2047</a>
1.6 Estructura antigénica.....	<a href="#">2018</a>
1.6.1 Proteína (Por).....	<a href="#">2149</a> I
1.6.2 Proteína (Opa).....	<a href="#">2149</a> II
1.6.3 Proteína III (Rmp).....	<a href="#">2249</a>
1.6.4 Lipooligosacáridos.....	<a href="#">2220</a>
1.6.5 Peptidoglucano.....	<a href="#">2220</a>
1.6.6 Proteasa IgA.....	<a href="#">2220</a>
1.6.7 TbpB.....	<a href="#">2320</a>
1.7 Diagnostico clínico.....	<a href="#">2320</a>
1.7.1 Infección gonococcica no complicada.....	<a href="#">2324</a>
1.7.2 Infección Extragenital .....	<a href="#">2324</a>
1.7.3 Enfermedad gonococcica complicada .....	<a href="#">2424</a>
1.8 Diagnóstico por laboratorio .....	<a href="#">2422</a>
1.8.1 Examen microscópico directo.....	<a href="#">2422</a>
1.8.2 Cultivo e Identificación de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	<a href="#">2422</a>
1.8.3 Prueba de oxidasa.....	<a href="#">2523</a>
1.8.4 Superoxol/Catalasa .....	<a href="#">2523</a>

1.8.5 Prueba de utilización de carbohidratos .....	<a href="#">2523</a>
1.8.6 API NH .....	<a href="#">2623</a>
1.8.7 GONOCHEK-II .....	<a href="#">2624</a>
1.9 Mecanismos de resistencia	
Antimicrobiana.....	<a href="#">2624</a>
1.9.1 Elementos móviles de resistencia adquirida.....	<a href="#">2725</a>
1.9.2 Tipos de mecanismos de resistencia .....	<a href="#">2826</a>
1.9.3 Penicilinas y cefalosporinas.....	<a href="#">3028</a>
1.9.4 Espectinomicina.....	<a href="#">3230</a>
1.9.5 Fluoroquinolonas.....	<a href="#">3230</a>
1.9.6 Tetraciclinas.....	<a href="#">3330</a>
1.9.7 Azitromicina.....	<a href="#">3331</a>
1.10 Epidemiología y métodos de tipificación molecular.....	<a href="#">3331</a>
1.10.1 Epidemiología de la resistencia antimicrobiana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	34
1.10.1.1 Factores que contribuyen a la propagación de la resistencia .....	35
1.10.1.2 Epidemiología de la propagación de la resistencia .....	36
1.10.1.3 Introducción y propagación por viajeros .....	37
<b>2. Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>39</b>
2.1 Aislamientos bacterianos .....	<a href="#">4139</a>
2.2 Pruebas Confirmatorias y de Sensibilidad antimicrobianas.....	39
2.3 Prueba de PFGE.....	<a href="#">4341</a>
2.4 Prueba de NG-MAST.....	<a href="#">4442</a>
2.5 Betalactamasa tipo TEM .....	<a href="#">4543</a>
2.5.1 PCR para identificar el gen TEM.....	<a href="#">4543</a>
2.6 Análisis Estadístico .....	<a href="#">4644</a>
<b>3. Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>45</b>
3.1 Datos demográficos .....	<a href="#">4745</a>
3.2 Susceptibilidad antimicrobiana.....	<a href="#">5048</a>
3.3 Caracterización genotípica .....	<a href="#">5755</a>
<b>4. Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>6361</b>
Conclusiones y recomendaciones.....	<a href="#">7169</a>

---

Conclusiones .....	<u>71</u> <del>69</del>
Recomendaciones .....	<u>72</u> <del>70</del>
<b>Bibliografía</b> .....	<u>75</u>
<u>73</u>	

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1-1.</b> Número de personas atendidas a las que se les diagnosticó infección gonocócica. Colombia 2009 – 2014.....	14
<b>Tabla 2-1.</b> Criterios de Interpretación según CLSI 2015.....	40
<b>Tabla 3-1.</b> Número de aislamientos enviados por los LSP durante los años 2013-2014.....	44
<b>Tabla 3-2.</b> Distribución de aislamientos de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> por grupos de edad y sexo.....	45
<b>Tabla 3-3.</b> Multiresistencia antimicrobiana de <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	53
<b>Tabla 3-4.</b> Distribución de la resistencia a los antimicrobianos y de las CIM 50 y CIM 90 de los aislamientos de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> estudiados durante el periodo 2013-2014.....	54
<b>Tabla 3-5.</b> Fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislamientos de Laboratorio de Salud Pública 2013-2014.....	55
<b>Tabla 3-6.</b> Distribución de fenotipos de resistencia, patrón PFGE y NG MAST de aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	59



## Lista de Figuras

<b>Figura 3-1.</b> Sensibilidad a penicilina <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	48
<b>Figura 3-2.</b> Sensibilidad a tetraciclina <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	49
<b>Figura 3-3.</b> Sensibilidad a ciprofloxacina <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	50
<b>Figura 3-4.</b> Sensibilidad a azitromicina <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	51
<b>Figura 3-5.</b> Sensibilidad a espectinomicina <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	52
<b>Figura 3-6.</b> Sensibilidad a ceftriaxona <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	53
<b>Figura 3-7.</b> Dendograma PFGE <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	56
<b>Figura 3-7.1</b> Dendograma PFGE <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	57
<b>Figura 3-7.2</b> Dendograma PFGE <i>N. gonorrhoeae</i> 2013-2014.....	58
<b>Figura 3-8.</b> Distribución ST de <i>N. gonorrhoeae</i> en Colombia.....	60



# Introducción

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son una de las principales causas de morbilidad, con consecuencias a nivel sanitario, social y un alto costo para el sistema de salud y para los pacientes. Las ITS corresponden a aquellas infecciones que se transmiten principalmente a través del contacto sexual. Estas infecciones son causadas por diferentes agentes etiológicos entre ellos *Neisseria gonorrhoeae*, patógeno común que afecta a nivel urogenital, ano rectal, faríngeo y conjuntival (1-5).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008 se produjeron alrededor de 106 millones de nuevos casos de gonorrea a nivel mundial y de acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), aproximadamente 700.000 ocurren en los Estados Unidos, y es la segunda infección de transmisión sexual (ITS) más frecuentemente reportada después de *C. trachomatis* (6,7).

La OMS ha diseñado un algoritmo como guía para la implementación del manejo sintromico de las ITS, el cual ha demostrado ser válido y factible especialmente en la descarga uretral en hombres y en úlceras genitales en hombres y mujeres. En cuanto al algoritmo para el manejo sintromico en las mujeres con dolor abdominal bajo, este es satisfactorio, sin embargo hay limitaciones en el algoritmo para el flujo vaginal, para el manejo de las infecciones por *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, especialmente en lugares de baja prevalencia y en las adolescentes, lo cual hace indispensable identificar los principales factores de riesgo asociados a las ITS (8).

A la fecha no se conoce la prevalencia real de las ITS en Colombia, ya sea por las limitaciones para realizar el diagnóstico, el desconocimiento de las enfermedades y la no obligatoriedad de la notificación del evento; esto complica el abordaje de estas enfermedades, ocasionando fallas en el tratamiento (9).

Según los datos reportados por la Encuesta Nacional de Demografía y Salud del 2010 para Colombia, 17% de las mujeres manifestó no conocer absolutamente nada sobre las ITS diferentes al VIH/Sida, 31% no conocer ningún síntoma en el hombre y 28% ningún síntoma en la mujer, lo cual significa que cerca de la mitad de la población encuestada no tiene información sobre estas infecciones (9).

Durante las pasadas tres décadas *N. gonorrhoeae* ha desarrollado resistencia a la mayoría de los antibióticos empleados para el tratamiento, entre ellos penicilina, tetraciclina y fluoroquinolonas; debido a esto se recomendó internacionalmente la utilización de cefalosporinas de tercera generación, sin embargo ya se reportaron fallas en el tratamiento con cefixima en países como Japón, Francia, Canadá, Noruega, Reino Unido entre otros y con ceftriaxona en Suecia, Austria y Australia (10,11,12).

En los datos de la vigilancia por laboratorio, en Colombia, durante el periodo de 1983-1993 se reportó la presencia de aislamientos productores de beta lactamasa en un 52%, así como una resistencia a penicilina y tetraciclina de 100% y 96% respectivamente (13,14). Adicionalmente en trabajos anteriores en Colombia, en el año 2000, 10 (59%) de los aislamientos presentaron resistencia a penicilina y en el 2009, 14 (56%); la resistencia a tetraciclina se presentó en 12 (71%) de los aislamientos en el año 2000 y 13 (52%) para 2009(15).

El 15 de julio de 2011 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) publicó una alerta epidemiológica ante la aparición de una cepa H041 de *N. gonorrhoeae*, que contiene mutaciones genéticas que la hace resistente a penicilina, ciprofloxacina, tetraciclina y también a cefalosporinas de tercera generación, pero es sensible a espectinomicina y de sensibilidad reducida a azitromicina. Ante esta situación la OPS recomendó fortalecer la vigilancia mediante la confirmación microbiológica del patógeno y el empleo de métodos de barrera para la prevención de las ITS(16) En la actualidad se ha informado de la aparición de otras 2 cepas de *N. gonorrhoeae* que presentan resistencia a las ceftriaxona pero son molecularmente diferentes, denominadas F89 y A8806 (12) .

Esta preocupación mundial llevó a que la OMS lanzara en 2012 un plan de acción global para el control de la propagación y el impacto de la resistencia antimicrobiana en *N.gonorrhoeae* cuyo objetivo es facilitar la detección temprana de cepas resistentes y combinarlo con una respuesta de salud pública para prevenir y tratar oportunamente las infecciones gonocócicas y mitigar el impacto de la resistencia a las cefalosporinas. Esta estrategia se logrará a través de la acción multisectorial proporcionando recomendaciones para la coordinación de la comunicación, la cooperación y los esfuerzos de promoción a nivel nacional, regional e internacional (17).

Teniendo en cuenta esta problemática se hace necesario fortalecer la vigilancia de las ITS producidas por este patógeno mediante la caracterización fenotípica y molecular lo que genera información útil para la generación de estrategias estatales y locales que permitan detectar de manera oportuna la presencia de las cepas de *N. gonorrhoeae* que presenten resistencia a todos los antibióticos disponibles; dichas estrategias asociadas con la implementación a corto, mediano y largo plazo de protocolos de vigilancia epidemiológica permitirán contener la propagación de este patógeno e implementar acciones de prevención y control tanto en población de riesgo como en la comunidad en general.

## **ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud Colombia desarrolla desde el año 1983 un programa de vigilancia voluntaria por laboratorio de *N. gonorrhoeae*, con el objetivo de realizar la confirmación de la identificación de los aislamientos enviados por los Laboratorios de Salud Pública (LSP) del país y determinar los patrones de sensibilidad antimicrobiana de este patógeno. Estos aislamientos vienen acompañados de datos demográficos de los pacientes, tales como procedencia, edad, sexo y fuente. Dentro del programa se realizan capacitaciones con el fin de mejorar el diagnóstico de este patógeno (18). De la misma manera participa en el control de calidad externo teniendo como laboratorio de referencia el GASP en Canadá, Programa de Vigilancia Antimicrobiana de Gonococo; programa en el cual Colombia ha participado activamente desde el año 1990. De dicho trabajo se han realizado dos publicaciones, la primera reúne los datos de 1990-1999 que muestra para los países suramericanos y el caribe una

variación de la resistencia cromosomal a penicilina entre 1.0% y 11% y una resistencia plasmídica entre 18% y 38,8%. Para tetraciclina la resistencia cromosomal varió entre 74% y 36% y la resistencia mediada por plásmidos entre 12 y 27,4%.

En Colombia al analizar 185 aislamientos durante 10 años de estudio se observó una frecuencia de aislamientos con resistencia plasmídica a penicilina (PPNG) mayor al 50% y a tetraciclina del 77%(19).

En una segunda fase entre el periodo 2000-2009 para los países Latinoamericanos y del Caribe se encontró una resistencia a ciprofloxacina del 11% y a penicilina de 28% con una disminución de los aislamientos PPNG (31% en el año 2000 y 20% en el 2009); la resistencia a tetraciclina fue 40%. En Colombia durante este periodo se estudiaron 134 aislamientos de los cuales 25% presentaron resistencia a ciprofloxacina, 57% a penicilina y 60% a tetraciclina, dos aislamientos presentaron una resistencia intermedia a espectinomicina y todos los aislamientos fueron sensibles a ceftriaxona(19).

Según las guías de tratamiento emitidas por la OMS en 2005, se recomendaba el tratamiento sintomático con la utilización como primera línea de ciprofloxacina 500 mg vía oral dosis única. Debido a la aparición de cepas resistentes la recomendación debió ser cambiada por ceftriaxona según las guías de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento emitidas por el Ministerio de Salud y protección Social 2013(20, 8).

En los datos de la vigilancia por laboratorio que lleva el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud Colombia, la resistencia a ciprofloxacina se informa por primera vez en el año 2007 con 2 aislamientos (9,5%) y se incrementó hasta un 14,8% en el año 2013. (Fig. I) (18).

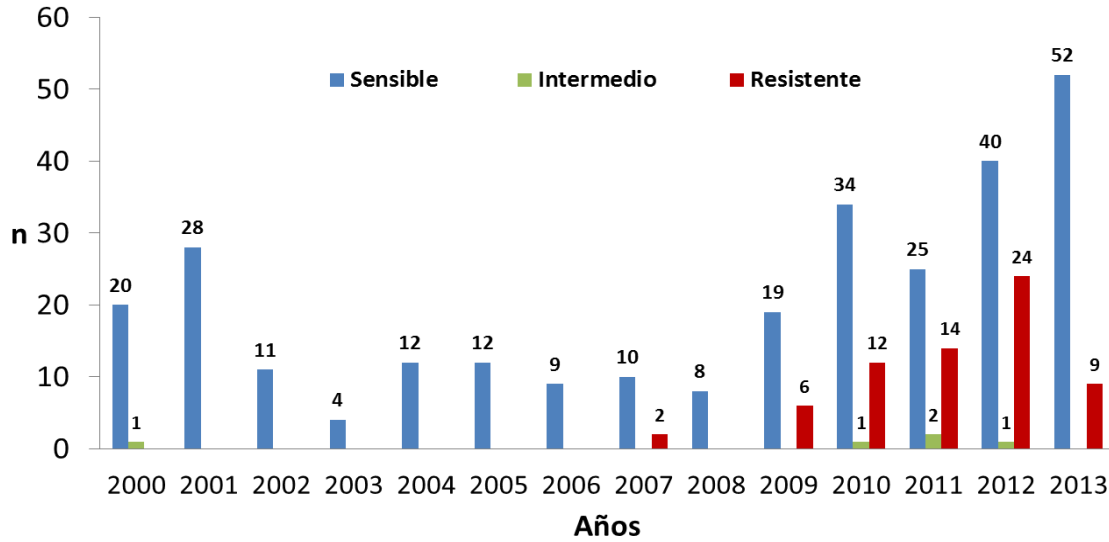


Fig.I *Neisseria gonorrhoeae*: distribución de aislamientos colombianos por años de vigilancia y susceptibilidad a ciprofloxacina 2000-2013.

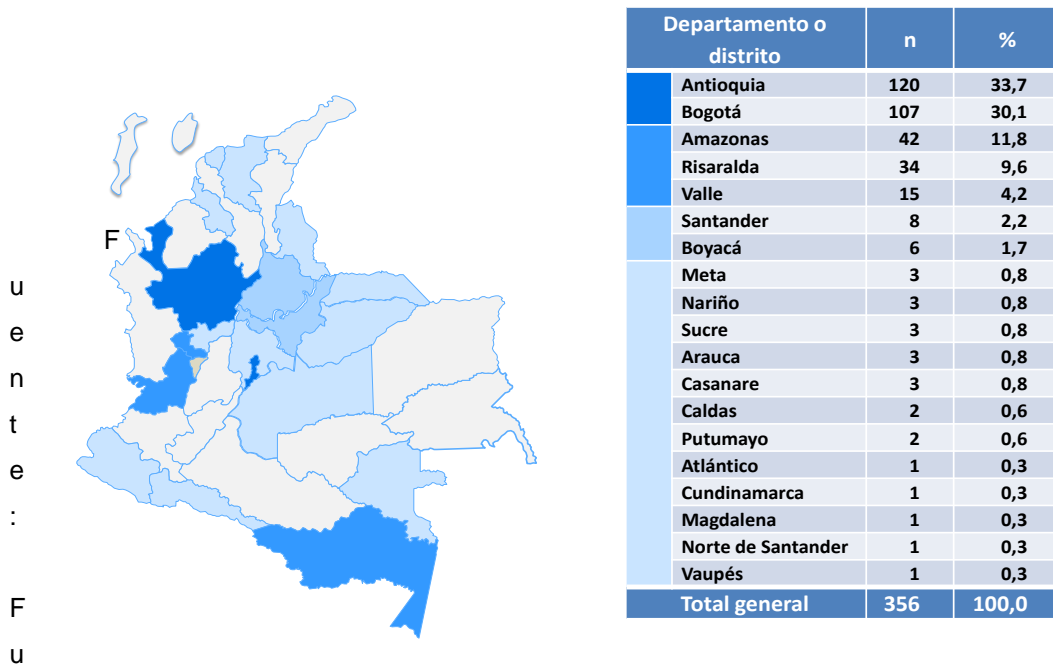
Fuente: Grupo de microbiología INS Colombia.

Sin embargo, se mantiene la recomendación del uso del tratamiento sintomático lo cual hace que se limite el cultivo del microorganismo y por lo tanto se desconozca el problema real de la resistencia en nuestro país. Si a esto le sumamos que es un microorganismo de requerimientos nutricionales especiales y por lo tanto de difícil crecimiento, lo cual dificulta que se recuperen todos los aislamientos enviados por los diferentes LSP, esto conlleva a que el problema sea subvalorado (de 660 aislamientos enviados durante el periodo 2000-2013 solo se recuperaron 356 (52%) (18). Este informe es una alerta que busca incrementar el número de aislamientos de *N. gonorrhoeae* para poder ser estudiados con más representatividad.

Otro aspecto importante es que no todos los LSP del país participan en la vigilancia, ya que los datos proceden principalmente de Antioquia, Bogotá, Amazonas, Risaralda y Valle; algunos departamentos envían aislamientos en menor cantidad y otros nunca

participan en la vigilancia, probablemente porque sus laboratorios no tienen la infraestructura para realizar los cultivos o no tienen estandarizada la técnica en su región. Fig II. (18).

Es de anotar que en aquellos departamentos que nunca han enviado aislamientos al INS hay un desconocimiento de la incidencia y del nivel de resistencia antimicrobiana que presenta este microorganismo, se observa falta de personal encargado del programa de *N. gonorrhoeae* y por lo tanto alta rotación de los profesionales lo que conlleva a un desconocimiento de la vigilancia por laboratorio y perdida en la continuidad del mismo.



Fuente: Grupo de Microbiología, INS Colombia

<http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%20C3%A9s-en-salud-publica/Microbiologia/Informe%20Web%20N%20%20gonorrhoeae%202015.pdf>

Fig II. *Neisseria gonorrhoeae*: Procedencia de los aislamientos remitidos al INS ,2000-2013. En la figura se observa una escala de colores que va desde el azul más intenso



para denotar los departamentos que enviaron mayor número de aislamientos, hasta el azul más tenue para los departamentos que enviaron un solo aislamiento.

Dentro de las funciones del programa de vigilancia está la capacitación a los diferentes laboratorios pertenecientes a la red nacional, hacia el año 2009 se ha incrementado viéndose reflejado en el aumento de aislamientos enviados por los LSP a partir de este año. Fig. III (18).

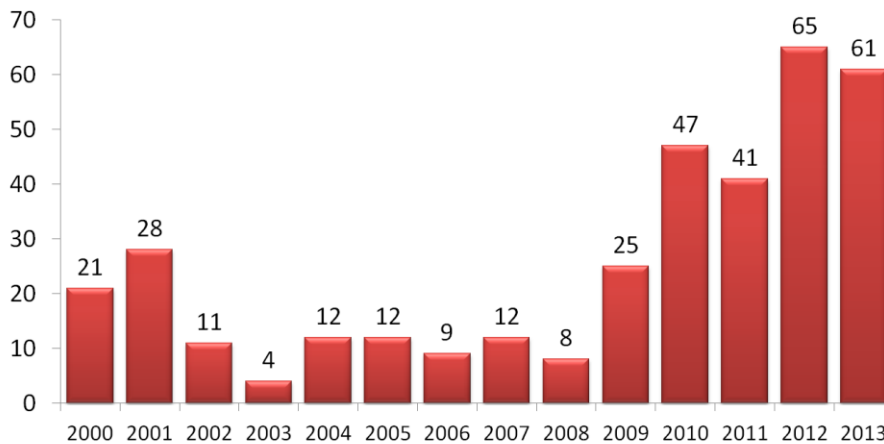


Fig. III. *Neisseria gonorrhoeae*: distribución de los aislamientos por año. 2000-2013 n = 356

Fuente: Grupo de microbiología, INS Colombia.

Uno de los avances más relevantes de los últimos años es el uso de tipificación molecular para predecir el perfil de resistencia antimicrobiana que tiene claros beneficios para la salud pública, ya que podría ayudar a la comprensión de la diseminación de la resistencia dentro de una población y facilitar el desarrollo de estrategias de intervención dirigidas, sobre todo si la asociación entre el tipo molecular y características epidemiológicas está bien definido. Además, si la predicción de la resistencia antimicrobiana es suficientemente fiable este enfoque podría tener un impacto directo sobre el manejo adecuado de los pacientes en los que no se ha realizado el cultivo y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. En países europeos se identificó el tipo de secuencia ST-1407, la cual muestra una fuerte asociación con la disminución de la

susceptibilidad a la cefixima, una de las opciones terapéuticas de primera línea. El fracaso del tratamiento con este antibiótico en los pacientes infectados por gonococos se ha documentado en el Reino Unido, Noruega y Austria. Todos estos fracasos pertenecían a ST-1407, al igual que un aislado en Francia que muestra una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 4 mg / L y 1-2 mg / L, para cefixima y ceftriaxona respectivamente. Por lo tanto, ST-1407 representa un importante problema de salud pública si continúa difundiéndose sin que se tomen medidas. ST-1407 fue predominante en Austria, Bélgica, Chipre, Dinamarca, Inglaterra y Gales, Hungría, Italia, Portugal, Rumania, Eslovaquia, Eslovenia, Países Bajos y España. Por el contrario, ST-1407 fue relativamente poco frecuente (<10%) en Francia, Irlanda, Malta y Suecia. ST-1407 parecía ser más prevalente en Europa oriental y meridional lo que puede sugerir una mayor difusión de esta cepa dentro de las redes sexuales específicas; ST-225 se observó en 19 de 21 países, fue predominante en Malta y Suecia y relativamente común en Dinamarca, Rumania, Eslovaquia y Suecia. Se observó ST-2992 en 14 países y fue predominante en Irlanda y Noruega, mientras que el ST-25 fue predominante en Alemania (21).

Gracias a la vigilancia llevada a cabo por el Instituto Nacional de Salud, se han obtenido datos que, aunque no representan la realidad del país, se pueden utilizar como punto de partida para seguir investigando. Los datos de incidencia son limitados y, no se cuenta con datos epidemiológicos relevantes tales como clones circulantes, relación genética, fenotipos de resistencia y tipos de secuencia encontrados en nuestra región. Por tal motivo este estudio busca conocer el comportamiento de las cepas en Colombia y dejar estandarizadas las técnicas para fortalecer la vigilancia molecular de *N. gonorrhoeae* para que pueda ser utilizada en la vigilancia rutinaria ya que es el primer estudio de caracterización genética para este microorganismo realizado en Colombia.





## Objetivo General

Caracterizar fenotípica y genotípicamente los aislamientos de *N. gonorrhoeae* recuperados en diferentes departamentos del país y enviados al INS bajo el marco del programa de vigilancia por laboratorio de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) durante el periodo 2013-2014.

## Objetivos específicos

- Plantear una línea de base sobre la frecuencia, distribución por año, edad, sexo y región geográfica de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* recibidos en el programa de vigilancia por laboratorio durante el periodo de estudio.
- Estimar los niveles de resistencia de los antimicrobianos usados para el tratamiento de las infecciones producidas por *N. gonorrhoeae* e identificar los fenotipos de resistencia que se presentan en nuestra población.
- Identificar grupos clonales y su relación con el fenotipo de resistencia antimicrobiana, y variables epidemiológicas como edad, sexo y región geográfica

# Capítulo 1. Marco teórico y conceptual

## 1.1 Recuento histórico de la enfermedad gonocócica

El origen de la gonorrea causada por *Neisseria gonorrhoeae* data desde la antigüedad. En la Biblia se relata la enfermedad que afectó a Sara mujer de Abraham y que quizá ocasionó la incapacidad de Sara para concebir hasta muy tardíamente. Así mismo en el libro de Levítico capítulo 15 se describe la enfermedad y se establecen algunas recomendaciones por considerarse impura la persona que lo sufre. Moisés no solamente describe la contagiosidad de la gonorrea, sino que además da normas para prevenir el contagio y la diseminación.

Hipócrates (del 460 al 355 antes de Cristo) hace una de las primeras descripciones científicas de la infección gonocócica. Disecó la uretra de los hombres que estaban infectados por este agente y notó la existencia de modificaciones en el tejido epitelial, a la vez que una secreción y la estenosis uretral característica de esta infección. Claudio Galeno, médico griego, introdujo el nombre gonorrea (130 d.E.C) (22). El término gonorrea deriva del griego gonos (semilla) y rhein (fluir) y se llama así por la semejanza con la descarga uretral purulenta característica de la infección, durante la eyaculación del semen.

En el año 1300 Jhon Ardeme, cirujano de Ricardo II y Enrique IV de Inglaterra fue el primero en utilizar el término purgación. El origen de esta palabra puede hacer referencia a la palabra francesa “clap plover”, que significa burdel y “clapier”, casa de prostitución(22, 23).

El regreso de Colón al Nuevo Mundo y la explosión de la sífilis en Europa Continental originó gran confusión pues los pacientes que padecían tanto la gonorrea como la sífilis llevó a muchos a creer que ambas enfermedades estaban relacionadas y que la gonorrea era un síntoma temprano de la sífilis.

Jhon Hunter fue uno de los que creyó que la gonorrea era un síntoma precoz. Para distinguir entre ambos procesos, se inoculó exudado purulento procedente de un enfermo con la infección gonocócica pero lamentablemente el donante padecía ambas

infecciones, contrajo sífilis y murió según algunos historiadores de un aneurisma sífilítico de la aorta.

Bell, en 1700, inoculó a estudiantes de medicina y fue capaz de determinar que sífilis y gonorrea eran entidades diferentes y en 1800 el médico Phillip Reicort, que practicaba la medicina en París, llevó a cabo más de 1000 estudios para demostrar esta teoría.

Albert Neisser, en 1879 describe el germen por primera vez al observar en los exudados rectales de adultos y en las secreciones oculares de niños con conjuntivitis purulenta, la presencia de diplococos arriñonados Gram negativos intracelulares(24).

En 1881 Listikov y Loeffler lograron cultivar el microorganismo y en 1964 Thayer y Martin proponen un nuevo medio para el cultivo de *N. gonorrhoeae* el cual modificaron en 1966(25).

## **1.2 Incidencia y prevalencia de la enfermedad gonocócica.**

### **1.2.1. Nivel mundial**

Los datos de prevalencia e incidencia para gonorrea están sujetos a sesgos y limitaciones y son variables dependiendo de si provienen de diagnóstico clínico o de laboratorio. Cuando se basa en el diagnóstico clínico es común que sea incorrecto ya que varios agentes infecciosos causan síntomas similares y cuando el informe se basa en el diagnóstico por laboratorio la sensibilidad y especificidad de la prueba utilizada afectan a la precisión del diagnóstico. Las infecciones no diagnosticadas son también un problema importante ya que sobretodo en las mujeres la infección por gonococo puede ser asintomática (26).

Otro problema es la notificación de la enfermedad, pues tan solo del 5-10% de los casos diagnosticados se informan. Las razones incluyen problemas de privacidad, estigmatización, fallas en los sistemas de información, la percepción por los pacientes y los profesionales y la falta general de interés por el evento.

Cuando la notificación se basa en la clínica no puede proporcionar datos completos si solo se incluye a instituciones públicas dejando de lado al sector privado y clínicas especializadas. Así mismo cuando la búsqueda se hace en grupos específicos de la población, “grupos centrales” en donde se concentra la enfermedad y cuyas tasas de incidencia y prevalencia no son representativas de la población general o del grupo de edad reproductiva (26).

Según las estimaciones de la OMS, en el 2008 se presentaron 106 millones de casos nuevos de gonorrea en adultos en todo el mundo. Estas cifras indican que la gonorrea es la infección de transmisión sexual (ITS) bacteriana de mayor prevalencia junto con la producida por *Chlamydia trachomatis* (también 106 millones de casos nuevos). En consecuencia, la gonorrea, sin olvidar sus complicaciones graves, produce una gran morbilidad, acarrea costos económicos sustanciales y sigue siendo una de las principales preocupaciones de salud pública en el mundo. Es extremadamente preocupante que la bacteria haya desarrollado resistencia frente a casi todos los antibióticos existentes para su tratamiento, y se teme que la gonorrea pueda llegar a no tener cura en determinadas circunstancias (27).

En 2008, según la OMS la mayor incidencia de la gonorrea se estimó en la región del Pacífico occidental (42,0 millones de casos), en el sur de Asia sudoriental (25,4 millones), en la región de África (21,1 millones) y en la región europea (3,4 millones de casos de gonorrea). La incidencia media (casos por cada 100.000 habitantes) más altas se presentaron en el Reino Unido (37,1), Letonia (24,4) e Irlanda (18,6), y las incidencias más bajas en Eslovenia (1,2) , Portugal (1,1), Polonia (0,8-0,9) y Luxemburgo (0,4) (28).

Del año 2007 al 2011, se presentó un aumento en la incidencia de gonorrea (19%) en la UE / EEE, sin embargo, en varios países el aumento de casos de gonorrea fue superior al 50%, por ejemplo, en Finlandia, Grecia, Irlanda, Luxemburgo, Portugal y Eslovaquia. Las personas de 25 a 34 años constituyeron el 30 a 33% de todos los pacientes de 2000 a 2011 y las menores de 25 años de edad el 43% en 2011. La incidencia de la gonorrea fue de 21,2 y 7,6 casos por 100.000 habitantes en varones y mujeres, respectivamente.(21). Esta incidencia, casi 3 veces mayor en los hombres en comparación con las mujeres en el año 2011, puede explicarse en parte porque la



infección es más sintomática en los hombres, lo que la hace más fácil de diagnosticar, y por la alta frecuencia de la infección en los hombres que tienen sexo con hombres (6,21,28).

Tanto en sífilis como en gonorrea, la incidencia de infección en España tuvo un marcado descenso en el periodo entre 1995 y 2002, hasta el punto que se consideraban prácticamente erradicadas, sin embargo, han vuelto a brotar en el último decenio (29,30). En el año 2002 se documentaron 833 casos de infección gonocócica aumentando en el 2010 a 1897 casos. En los últimos ocho años, las infecciones gonocócicas han aumentado casi un 135%, en este mismo país.

En 2013, se reportaron un total de 333,004 casos de gonorrea en los Estados Unidos, con una tasa de 106,1 casos por cada 100.000 habitantes (31).

Aunque la notificación de casos de gonorrea al área de vigilancia epidemiológica es útil para hallar las tendencias de la enfermedad, el número de casos de gonorrea reportados a los CDC se ve afectada por muchos factores: Los cambios en las prácticas de detección (por ejemplo, la detección de la clamidia con las pruebas que también detectan infecciones por *N. gonorrhoeae* o aumento de la infección en sitios anatómicos extra-genitales), el uso de pruebas de diagnóstico con mayor sensibilidad al cultivo (por ejemplo, el uso más amplio de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos [NAAT]), y los cambios en las prácticas de información que conlleva al aumento de casos por mejoras en el sistema de vigilancia epidemiológica. Al igual que con otras enfermedades de transmisión sexual, la notificación de casos de gonorrea a los CDC es incompleta. Por estas razones, los datos suplementarios sobre la prevalencia de la gonorrea en las personas examinadas en casos específicos son útiles en la evaluación de la carga de la enfermedad en las poblaciones seleccionadas para estudio. (6).

### **1.2.2. Colombia**

Aunque la información acerca de la incidencia de la enfermedad es limitada, según los datos proporcionados por el Sistema Integral de Información de la Protección Social (SISPRO) mediante los Registros Individuales de Prestación de Servicios de Salud

(RIPS) 2009-2014, la incidencia de enfermedad gonocócica para Colombia durante este periodo es de 32,07 por 100.000 habitantes (32).

En la tabla 1-1 se observa una tendencia a la disminución del número de casos reportados, en donde el diagnóstico principal es la infección gonocócica no especificada con 5.406 (36,6%) seguida de la infección gonocócica del tracto genitourinario inferior sin absceso peri uretral o de glándula accesoria con 5.114 (34,6%) casos. Son frecuentes también los diagnósticos de infección gonocócica del ojo y faringitis gonocócica con 8,79% y 8,43% respectivamente. Sin embargo, es de anotar que estos datos no reflejan la realidad del país ya que lo que se ha observado es un subregistro debido a que no todas las entidades informan este tipo de infecciones.

Tabla 1-1. Número de personas atendidas a las que se les diagnosticó infección gonocócica. Colombia 2009 – 2014.

DIAGNÓSTICO PRINCIPAL CIE10	2009	2010	2011	2012	2013	2014-06	Total general
<b>A540</b> - infección gonocócica del tracto genitourinario inferior sin absceso periuretral o de glándula accesoria	1.004	934	1.429	793	786	168	5.114
<b>A541</b> - infección gonocócica del tracto genitourinario inferior con absceso periuretral y de glándulas accesorias	78	70	87	77	80	18	410
<b>A542</b> - pelviperitonitis gonocócica y otras infecciones gonococicas genitourinarias	60	58	80	63	49	20	330
<b>A543</b> - infección gonocócica del ojo	472	428	184	128	70	15	1.297
<b>A544</b> - infección gonocócica del sistema osteomuscular	15	16	20	10	14	1	76
<b>A545</b> - faringitis gonocócica	559	145	155	180	167	39	1.245
<b>A546</b> - infección gonocócica del ano y del recto	35	26	31	27	26	8	153
<b>A548</b> - otras infecciones gonocócicas	125	117	136	147	166	32	723
<b>A549</b> - infección gonocócica, no especificada	1.091	925	988	1.072	1.104	226	5.406
<b>Total General</b>	<b>3.439</b>	<b>2.719</b>	<b>3.110</b>	<b>2.497</b>	<b>2.462</b>	<b>527</b>	<b>14.754</b>

Fuente: Ministerio de Salud y Protección Social. RIPS 2009 – 2014.

En el estudio infecciones de transmisión sexual en un grupo de alto riesgo de la ciudad de Montería, Colombia, en el año 2006, se encontró una prevalencia de *N. gonorrhoeae* del 21.7% en trabajadoras sexuales (33).

### **1.2.3. Transmisión y distribución de la gonorrea**

La dinámica de la transmisión de la gonorrea se ve afectada por factores organismo dependientes y organismo independientes.

Entre los factores organismo dependientes tenemos la infectividad y la virulencia que determinan su capacidad intrínseca para colonizar e infectar las superficies mucosas, los subtipos de las cepas se asocian con grupos de pacientes, por ejemplo, homosexuales, que pueden influir en los patrones de susceptibilidad a los antibióticos. (26)

En los factores organismo independientes se creó el concepto “grupos básicos” que son transmisores de alta frecuencia de gonorrea. Estos grupos pueden ser identificados por su ocupación (trabajadoras sexuales, camioneros) o por su orientación sexual (hombres homosexuales activos)

La transmisibilidad depende en cierta medida del subtipo de la cepa así como del inóculo infectante por lo tanto la transmisión genital es más eficiente del hombre a la mujer porque el número de microorganismos en la uretra masculina es más alto que en las secreciones vaginales. El inóculo infectante y por lo tanto la transmisibilidad se reduce con el tratamiento efectivo, el uso del condón y la disminución en el cambio de parejas (26).

### 1.3 Taxonomía

<b>Clase II</b>	$\beta$ proteobacteria
<b>Orden IV</b>	Neisseriales
<b>Familia I</b>	Neisseriaceae
<b>Genero I</b>	Neisseria
<b>Especie</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (34).

### 1.4 Generalidades del gonococo

*N. gonorrhoeae* es un diplococo Gram negativo cuyo tamaño oscila entre 0,6 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, siendo su tamaño promedio de aproximadamente 0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los cocos individuales tienen aspecto de riñón o de grano de café; cuando los microorganismos se presentan en pares los lados planos o cóncavos están adyacentes. Los microorganismos se visualizan al microscopio de luz como diplococos intracelulares, dentro de los polimorfonucleares neutrófilos, a veces en gran número. Esta apariencia contribuye a la identificación de una verdadera infección gonocócica (2,35).

*N. gonorrhoeae* carece de cápsula, de flagelos y de esporas, la superficie mas externa de su estructura está compuesta por fimbrias, en la membrana externa trilaminar están presentes las proteínas I, II y III y polisacáridos. *N. gonorrhoeae* contiene en su citoplasma varios plásmidos, 95% de las cepas poseen un plásmido pequeño de función desconocida, otros dos plásmidos contienen genes que codifican para la producción de  $\beta$  lactamasa causante de resistencia a la penicilina. Estos plásmidos son transmisibles de un gonococo a otro por conjugación (35).

El gonococo tiene una pared celular característica de las bacterias Gram negativas, los componentes de esta pared han sido estudiados lo que ha ayudado a explicar aspectos sobre la interacción huésped/parásito. La adhesión del microorganismo a la superficie epitelial, la capacidad de atravesarla y su reacción con los fagos están bajo la influencia

de la estructura de la pared celular incluyendo los pili, proteínas de membrana externa y lipooligosacáridos (23).

El gonococo se transmite de persona a persona por contacto sexual, produciendo infecciones del aparato genitourinario: uretritis en hombres y cervicitis en las mujeres. Produce infección urogenital asintomática en una minoría de hombres y por lo menos en el 50% de las mujeres (27). El sitio anatómico idóneo de toma de la muestra depende del sexo, la edad y el comportamiento sexual de la persona; de las manifestaciones clínicas de la infección y del método de la prueba diagnóstica, además de las características de desempeño (sensibilidad y especificidad) de dicha prueba. En la mujer, la principal localización a fin de recoger muestras para el cultivo y la microscopia es el conducto endocervical; para las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, es el conducto endocervical o la vagina. Otras localizaciones secundarias son la uretra, el recto y la orofaringe. En los hombres heterosexuales, las muestras para el cultivo y la microscopia deben recogerse de la uretra, y para la Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (PAAN), una muestra de orina. En los hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres y en las mujeres y hombres con signos clínicos indicativos o que practican el sexo oral o anal deben tomarse muestras, además, en el recto y la orofaringe (27).

No sobrevive por largos periodos de tiempo fuera de su huésped, ya que tiene requerimientos nutritivos y ambientales muy complejos. Crece bien entre las 18 y 24 horas de incubación en medios de cultivo suplementados con aminoácidos, azúcares y vitaminas como son Agar chocolate o agar Thayer Martin, a una atmósfera del 5-10% de CO<sub>2</sub> con temperaturas entre 35-37°C y un pH entre 7,2 y 7,6. El aislamiento primario debe realizarse en medio selectivo para inhibir la flora comensal y hongos, los cultivos no deben ser incubados por más de 48 horas debido a que algunas cepas pueden sufrir autólisis. Para las pruebas de confirmación o pruebas adicionales el microorganismo debe por lo menos dársele una resiembra en medio no selectivo (Agar Chocolate) ya que la mayoría de pruebas diagnósticas requieren cultivos puros e inóculos pesados (varias colonias del mismo microorganismo puro) (36).

La identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae* a partir de cultivo se realiza mediante la observación de diplococos Gram negativos en la coloración de Gram del aislamiento oxidasa positivo que creció en medio selectivo a partir de un sitio urogenital.

Para las pruebas confirmatorias existen varios métodos disponibles, incluyendo pruebas bioquímicas, serológicas, colorimétricas y de ácidos nucleicos, puede ser requerido más de un método para la confirmación(36).

## 1.5 Mecanismos de patogenicidad

Los primeros estudios acerca de la patogenicidad de *N. gonorrhoeae* no lograron reconocer cambios en los tipos de colonias (34). A finales de los años 60, Douglas Kellogg descubrió que los gonococos experimentan variación de fase durante el subcultivo (el cual consiste en que las cepas carentes de pilis (no patógenas) pueden expresarlos o incluso modificarlos, con una composición antigénica diferente a fin de evadir, en parte, la respuesta inmune del huésped). Luego demostró que los gonococos de colonias pequeñas tenían pili y eran virulentos, en tanto que los gonococos de colonias grandes no tenían pili y eran avirulentos. Se nombró colonia T1 y T2 a los tipos de colonias pequeñas, brillantes y densas típicas de los aislamientos recientes de casos de gonorrea y a las colonias grandes las llamó T3, T4 y T5, las cuales se caracterizaban por ser aplanadas granulosas y sin el brillo de los otros tipos de colonias observadas (34,37).

Se ha demostrado que la infección gonocócica ocurre en dos fases. Primero la adhesión a la mucosa y segundo la invasión de la célula epitelial. En la etapa inicial de la adhesión intervienen factores no específicos como: carga negativa de superficies, bacteria y célula huésped, pH e interacciones hidrofóbicas (23).

## 1.6 Estructura antigénica

Pilis o Fimbrias: Los pelos gonocócicos son serológicamente heterogéneos y están compuestos por agregados helicoidales de estructura tipo tubular. Tienen aproximadamente 7 nm de diámetro y 2  $\mu$ m de longitud. Cada subunidad tiene un peso molecular de 23.000 daltons, y están formados por unidades repetidas de pilina, una

proteína que contiene 159 aminoácidos. Incrementan la adhesión de *N. gonorrhoeae* a las células hospederas y la resistencia a la fagocitosis (38)

La molécula de pilina posee un grupo amino terminal que contiene un gran porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos. Las secuencias de aminoácidos cercanas a la porción media de la molécula se conservan; esta parte de la molécula sirve para la adhesión a las células hospederas y es menos importante en la respuesta inmunitaria. La secuencia de aminoácidos próxima al grupo carboxilo (región C) terminal es muy variable; esta porción de la molécula es más importante en la respuesta inmunitaria. Las modificaciones en los antígenos de pilina ocurren como resultado del reordenamiento cromosómico e introducción de nuevos genes al microorganismo por el mecanismo de transformación. Las pilinas de casi todas las cepas de *N. gonorrhoeae* son antigénicamente diferentes, y una sola cepa puede elaborar muchas variedades de pilina antigénicamente distintas (38)

Proteínas de la membrana Externa: Con su sigla en inglés (OMPs), son tres las proteínas que se encuentran en la membrana externa de *N. gonorrhoeae*.

### 1.6.1 Proteína I (Por)

Es una porina B, se extiende a través de la membrana celular del gonococo, es la más predominante, su peso molecular varía entre 36 y 39 K daltons, es antigénicamente variable y se presenta en trímeros para formar poros en la superficie a través de los cuales penetran algunos nutrientes a la célula. Las cepas de *N. gonorrhoeae* con Proteína I de alto peso molecular son más resistentes a los efectos bactericidas del suero. Es la más predominante de todas las OMP y está presente en todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae* por esta razón ha sido usada como candidato vacunal. La por B existe como dos alelos o dos formas de PI (PIA y PIB o WI y WII/III en la nomenclatura suiza, las cuales comparten un 80% de identidad.

### 1.6.2 Proteína II (Opa)

Es sensible al calor, su peso molecular varía entre 27 y 29,5 K daltons y aparece en la superficie externa de la membrana exterior de la pared celular. Esta proteína tiene como función la adherencia de los gonococos dentro de las colonias, así como su adhesión a

las células hospederas. La Opa se encuentra en las cepas cuyas colonias son opacas, pero puede o no estar presente en las colonias transparentes. Su presencia en las cepas también se asocia con la sensibilidad del gonococo a la actividad bactericida del suero (38)

### **1.6.3 Proteína III (Rmp)**

El gonococo puede evadir la actividad bactericida del suero mediante la expresión de una proteína modificable por reducción (Rmp), esta proteína, cuyo peso molecular es de aproximadamente 33 K daltons, persiste antigénicamente en todos los gonococos, forma complejos con la Proteína I para producir moléculas de porina gonocócica (poros sobre la superficie de la célula), y es el sitio principal de enlace de la IgG.

### **1.6.4 Lipooligosacáridos**

Son componentes importantes de superficie, relacionados con la tipificación, inmunogenicidad y patogenicidad de las cepas de *N. gonorrhoeae*, los cuales contienen lípido A, aunque el polisacárido central parece no tener cadenas laterales antigénicas específicas en algunas cepas de este microorganismo.

### **1.6.5 Peptidoglucano**

Es desprendido en forma de fragmentos por los gonococos durante su desarrollo, especialmente el peptidoglucano O-acetilado, responsable de inducir el sueño de ondas lentas, activar el sistema de complemento, inducir la fiebre y producir daño al epitelio, por ello, tal vez su influencia en la patogénesis de la gonorrea sea significativa.

### **1.6.6 Proteasa IgA1**

No constituye uno de los componentes de superficie del gonococo, sino la primera exoproteína descrita. La proteasa IgA1 es una enzima producida por las neisserias patógenas, su función es cortar la IgA1 a nivel de la bisagra, separando las regiones Fc y Fab lo que impide que este anticuerpo de la mucosa, marque la bacteria para su destrucción por fagocitosis. Por lo tanto, es considerada un determinante de virulencia.



### **1.6.7 TbpB**

(Del inglés iron-binding protein o proteína de unión a hierro), similar en peso molecular a la Por (Proteína I), se expresa cuando el suministro disponible de hierro es limitado, por ejemplo, durante la infección humana.

## **1.7 Diagnostico clínico**

*Neisseria gonorrhoeae* causa infección a nivel genital y extragenital, la infección genital puede ser asintomática o sintomática, son muchas y variadas las presentaciones clínicas:

### **1.7.1 Infección gonocócica no complicada**

Las formas más frecuentes son uretritis en el hombre y cervicitis en la mujer. En el hombre el periodo de incubación cursa entre 1 y 57 días, se observa secreción uretral purulenta y ardor al orinar, el 10% de los pacientes pueden ser asintomáticos. La mujer con cervicitis puede presentar secreción vaginal abundante y mucopurulenta, el periodo de incubación es difícil de determinar debido a la alta frecuencia de formas asintomáticas.

### **1.7.2 Infección Extragenital**

Puede presentarse en ano, oro faringe y conjuntiva ocular. La proctitis se asocia con dolor ano rectal, tenesmo y secreción rectal purulenta. La infección de la faringe es usualmente asintomática tanto en el hombre como en la mujer y desaparece espontáneamente en un periodo de 10 a 12 semanas. En las infecciones oftálmicas, la forma más común es la oftalmia neonatorum. La infección del ojo puede ocurrir también en el adulto y en ambos casos se observa un exudado de color amarillo-grisáceo que puede involucrar la córnea y causar perforación del globo ocular.

### **1.7.3 Enfermedad gonocócica complicada**

Las complicaciones más comunes ocurren en mujeres y en recién nacidos. En la mujer la enfermedad inflamatoria pélvica tiene múltiples presentaciones como endometritis, salpingitis, abscesos tubo-ováricos o peritonitis, causando embarazo ectópico y esterilidad.

La infección también puede convertirse en una infección gonocócica diseminada, más frecuente en la mujer con síntomas sistémicos, artritis infecciosa, erupción o lesiones cutáneas (23)

## **1.8 Diagnóstico por laboratorio**

Una buena toma de la muestra es indispensable para lograr un diagnóstico seguro, la selección del sitio de toma de muestra depende de los síntomas clínicos, práctica sexual del paciente, edad y sexo. Los sitios más frecuentes son la uretra en el hombre y el endocervix en la mujer.

### **1.8.1 Examen microscópico directo.**

El método de elección es la coloración de Gram. El diagnóstico de gonorrea puede ser hecho por este método cuando el paciente es masculino y sintomático (uretritis), a diferencia de los exudados endocervicales que siempre deben ser cultivados para el diagnóstico. Se observan diplococos Gram negativos.

### **1.8.2 Cultivo e Identificación de *Neisseria gonorrhoeae***

El cultivo tiene una alta especificidad, pero requiere de personal entrenado en el manejo de este tipo de microorganismos, los medios de cultivo utilizados medios exigen

requerimientos básicos como el suplemento de enriquecimiento (Isovitalex, Vitox, etc), que favorece la recuperación de *Neisseria gonorrhoeae* y el suplemento selectivo (VCNT) que inhibe el crecimiento de la flora acompañante. Debido a que los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son sumamente susceptibles a las condiciones ambientales adversas, las cepas deben ser incubadas a 35°C-36,5°C en una atmósfera húmeda, enriquecida con CO<sub>2</sub>. Puede hacerse un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* originalmente aislada en un medio selectivo por la morfología de las colonias, la observación de diplococos Gram negativos en parejas por coloración de Gram y una prueba de oxidasa positiva más una prueba bioquímica o enzimática (39).

### 1.8.3 Prueba de oxidasa

Utiliza el reactivo: *N,N',N'*-tetrametil-*p*-dihidroclofenilendiamina, para detectar la presencia de citocromo *c* en la cadena respiratoria de un microorganismo bacteriano; si el reactivo de oxidasa es catalizado, se torna color púrpura. Las especies de *Neisseria* dan reacción positiva a la oxidasa.

### 1.8.4 Superoxol/Catalasa

Usa 30% de peróxido de hidrógeno(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como reactivo. Las reacciones de superoxol con *N. gonorrhoeae* son típicamente explosivas(4+, muy fuertes) al contrario de las reacciones más débiles de la mayoría de las especies de *Neisseria* no gonocócicas.(39)

### 1.8.5 Prueba de utilización de carbohidratos

Un método tradicional para la identificación de *Neisseria gonorrhoeae* ha sido la capacidad del gonococo de producir ácido en un medio que contiene glucosa; la

disminución del pH se detecta por el cambio de color de un indicador de pH. Este patrón excepcional de utilización de los hidratos de carbono se observa al inocular cultivos puros en agar tripticasa de cisteína (ATC) que contienen glucosa, maltosa y sacarosa, respectivamente, con una concentración final de 1% a 2% e incubarlos durante 24 horas.

### **1.8.6 API NH**

Esta prueba utiliza varios substratos deshidratados que permiten la identificación de especies de *Neisseria*, *Haemophilus* y *Branhamella catarrhalis*. La cinta del API NH consta de 10 microtubos con sustancias deshidratadas lo que permite la realización de 12 estudios de identificación, incluyendo reacciones enzimáticas y de carbohidratos y un test de  $\beta$ -lactamasa. La actividad metabólica del microorganismo produce cambios de color durante la incubación y las reacciones se leen de acuerdo a la tabla proporcionada por el fabricante.

### **1.8.7 GONOCHEK-II**

Es una prueba independiente del crecimiento bacteriano, se usa para diferenciar especies de *Neisseria* basándose en su capacidad de hidrolizar 3 enzimas: prolina-aminopeptidasa (Pip) en *N. gonorrhoeae*, gamaglutamil-aminopeptidasa en *N. meningitidis* y beta-galactosidasa en *N. lactámica*, está compuesto por un tubo único con 3 substratos cromogénicos. La hidrólisis de esos substratos produce un color característico. El color producido depende de la enzima presente y por lo tanto indica la presencia de una de las especies de *Neisseria* (40).

## **1.9 Mecanismos de resistencia Antimicrobiana**

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico.

Se conoce como *resistencia natural* a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*. a las bencilpenicilinas y al trimetoprin sulfametoxazol y la resistencia de bacilos Gram negativos aeróbicos a clindamicina.

La *resistencia adquirida* aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, trasposones, integrones) (41).

### 1.9.1 Elementos móviles de resistencia adquirida

Los plásmidos y trasposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia. Los plásmidos son fragmentos de DNA bacteriano extracromosomal con longitud variable, algunos con capacidad para replicarse independiente de la maquinaria genética de que dispone la célula, lo que les da el apelativo de conjugativos y no conjugativos según esta capacidad.

*Neisseria gonorrhoeae* puede poseer varios tipos de plásmidos, entre ellos algunos directamente relacionados con la resistencia del microorganismo a diferentes agentes antimicrobianos.

Hasta hace algún tiempo *N. gonorrhoeae* era en extremo sensible a la acción de la penicilina; sin embargo, el microorganismo paulatinamente se hizo resistente mediante la producción de una betalactamasa (penicilinas) tipo TEM-1 codificada en un gen plasmídico presente en otro patógeno de transmisión sexual, *Haemophilus ducreyi* (agente causal de chancro blando o chancroide). La resistencia de alto nivel a tetraciclina, definida como la presencia de una CIM (concentración mínima inhibitoria, la cual es la mínima concentración de un antimicrobiano, en este caso de tetraciclina, necesaria para inhibir el crecimiento visible en un cultivo del microorganismo) mayor a 16 mg por litro, es mediada por un plásmido que se insertó en un elemento genético móvil, el transposón *tetM* (41,42).

Los transposones son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser traslocados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio; esto sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra, durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia.

Algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una resistencia a varios antibióticos (resistencia múltiple) (41)

### **1.9.2 Tipos de mecanismos de resistencia**

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico, a saber:

- Inactivación del antibiótico.
- Alteración del sitio blanco del antibiótico.
- Barreras de permeabilidad.

Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.

#### **▪ 1.9.2.1 Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química.**

El fenotipo de resistencia antibiótica por destrucción o modificación de la estructura química del antibiótico es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo esta función. Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las beta-lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Entre las enzimas que se encargan de la modificación de la estructura podemos mencionar a la cloranfenicol acetiltransferasa y también a las enzimas que modifican los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (43).

Sabemos que los antibióticos, B-lactámicos como penicilina, oxacilina, cefalosporinas, actúan inhibiendo la enzima D-alanil D-alanin carboxipeptidasa (PBPS) encargada de la síntesis de la pared. La B-lactamasa hidroliza el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo. Pueden clasificarse de acuerdo con su forma de producción en cuatro grupos:

- Por localización genética (cromosomas o plásmidos).
- Por exposición genética (constitutiva o inducida).
- Por producción primaria (dependiente de microorganismo).
- Por sustrato mayor (depende de la clase de antibiótico).

### ▪ 1.9.2.2 Barreras de permeabilidad

*Permeabilidad de la membrana externa:* claramente definida en los microorganismos Gram negativos que poseen una membrana lipídica externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de antibiótico.

*Permeabilidad de la membrana interna:* otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula. La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos.

*Porinas:* son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria. De la modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antibiótico.

*Eflujo activo:* es debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas. Se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. Confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol y  $\beta$ -lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario (41).

### ▪ 1.9.2.3 Alteración del sitio blanco

La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales.

En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal podemos mencionar los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas (43).

### 1.9.3 Penicilinas y cefalosporinas

Los sitios blanco para este grupo de antimicrobianos son las proteínas fijadoras de la penicilina (PBP) de la pared celular en el gonococo. Alteraciones en la PBP-1 y PBP-2 disminuyen la capacidad de las penicilinas para ligarse al sitio blanco, incrementado por lo tanto la resistencia intrínseca del microorganismo a estos agentes. La producción de la PBP-2 es codificada por el gen *penA*. Cambios en otros loci *mtr* y *penB* producen efectos acumulativos, las mutaciones en el locus *mtr* tienen como consecuencia un incremento de la resistencia a un amplio rango de antimicrobianos, a través de un sistema de bomba de eflujo, mientras que mutaciones en el locus *penB* alteran la permeabilidad de la pared celular. (23,42)

La resistencia a las penicilinas también ocurre por plásmidos, que codifican para la producción de una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM-1. Esta enzima hidroliza el anillo  $\beta$ -lactámico de antibióticos tipo penicilina convirtiéndolos en una forma no activa (44).

Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican según los sustratos sobre los que actúan, las sustancias capaces de inhibirlas y la similitud en sus secuencias de aminoácidos. Las clasificaciones más utilizadas son las de Ambler y la de Bush-Jacoby-Medeiros. La clasificación de Ambler distingue cuatro clases de  $\beta$ -lactamasas en función de sus secuencias aminoacídicas. Las de las clases A, C y D son serina  $\beta$ -lactamasas y las de clase B metalobetalactamasas dependientes de zinc. Por su parte, la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros separa las  $\beta$ -lactamasas en función de su perfil hidrolítico y de sus inhibidores y distingue cuatro categorías y múltiples subgrupos. Dentro del grupo 2



(penicilinas sensibles al ácido clavulánico) se encuentra el subgrupo 2be, que engloba a más de 200  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) derivadas de TEM (Temoneira), de SHV (Sulphydryl variable) o del tipo CTX-M (cefotaximasa), que se caracterizan por generar un nivel distinto de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, recuperable en presencia del ácido clavulánico. En agosto de 2009 las  $\beta$ -lactamasas derivadas de TEM alcanzaban ya la TEM-174 (según numeración consecutiva desde la TEM-1). La clasificación completa se encuentra en el sitio web: [www.lahey.org](http://www.lahey.org), y en el caso de las derivadas de SHV, la última reflejada era la SHV-127. Entre todas ellas se encuentran  $\beta$ -lactamasas de los subgrupos 2b (de amplio espectro), 2be (BLEE) y 2br (resistentes a inhibidores) (45)

El tipo TEM-1 es el que con más frecuencia se encuentra en bacterias Gram negativas. Más de 90% de las resistencias a ampicilina en *Escherichia coli* son debidas a la producción de TEM-1, y también en la resistencia a penicilinas que podemos observar en *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*, en aumento. A pesar de que las betalactamasas de tipo TEM se encuentran principalmente en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* se comienzan a encontrar cada vez con mayor en otros tipos de bacterias Gram negativas. La sustitución aminoacídica responsable del fenotipo BLEE permite el acceso a nuevos sustratos, pero la apertura del sitio activo para la entrada del betalactámico incrementa la susceptibilidad a inhibidores de la betalactamasa, como el ya mencionado ácido clavulánico. Las sustituciones simples en las posiciones 104, 164, 238 y 240 producen el fenotipo BLEE, pero se pueden encontrar muchas combinaciones de estas sustituciones para dar lugar a los más de 140 tipos de betalactamasas clase A que se han descrito, siendo las clases TEM-10, TEM-12 y TEM-26 las más comunes en los Estados Unidos, con ligeras diferencias en otros países. También es necesario destacar que, aunque los tipos TEM-1, TEM-2 y TEM-13 se encuentran con mucha frecuencia, no son BLEE, tan sólo betalactamasas comunes (46).

La actividad hidrolítica de TEM-1 y TEM-135 es similar, ambas betalactamasas son clasificadas como enzimas de amplio espectro (fenotipo 2b clasificación de Bush Jacoby)

hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de primera generación, ticarcilina, piperacilina. Estas enzimas se diferencian por un cambio de un nucleótido único.

Las cepas de gonococo con alto nivel de resistencia a la penicilina contienen tradicionalmente plásmidos con un gen bla TEM-1, que codifica para la Betalactamasa tipo TEM-1. Se han detectado varios plásmidos en *N. gonorrhoeae*, el asiático (7,426bp), africano (5.599 pb) de propagación mundial, el Toronto (5,153 bp), Rio (5,153 bp; posiblemente idéntico al Toronto), otros plásmidos son el Nimes, Nueva Zelanda y Johannesburgo.

#### **1.9.4 Espectinomicina**

La resistencia a la espectinomicina ocurre en un solo paso, un evento mediado cromosomalmente el cual resulta en un alto nivel de resistencia a este agente. La resistencia se debe a cambios ribosomales. La espectinomicina se une a la subunidad ribosomal 30S de la bacteria e inhibe la traducción de proteínas, lo que resulta en un efecto bacteriostático, interactúa con 16S rRNA y, durante la elongación del polipéptido, bloquea la translocación catalizada-EF-G de la peptidil-ARNt desde el sitio A al sitio P.

#### **1.9.5 Fluoroquinolonas**

Hay cuatro enzimas topoisomerasas que regulan el enrollamiento de las cadenas de nucleótidos para formar la doble cadena de ADN, y que regulan también el enrollamiento de la doble hélice sobre sí misma. De esta última función se encargan las topoisomerasas tipo II (DNA-girasa) y IV, cada una de las cuales está compuesta por dos subunidades: GyrA y GyrB en el primer caso, y ParC y ParE en el segundo. La resistencia a las fluoroquinolonas en *Neisseria gonorrhoeae* ocurre fundamentalmente por mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB* y *parC*, que condicionan cambios en la secuencia de aminoácidos en las subunidades GyrA y GyrB de la topoisomerasa II (ADN-girasa) y en la subunidad ParC de la topoisomerasa IV, lo cual conduce a una pobre afinidad del antibiótico por su blanco. Las mutaciones en *gyrB* tienen poca trascendencia.

### 1.9.6 Tetraciclinas

La resistencia a la tetraciclina tiene origen cromosomal y plasmídico, este último responsable de la resistencia de alto nivel. La resistencia cromosomal está ligada a alteraciones en el locus *mtr* y *penB* que también reducen la susceptibilidad a penicilina.

El alto nivel de resistencia a la tetraciclina en el gonococo (TRNG) es el resultado de la adquisición de un plásmido que porta el determinante *tet-M* del cual existen dos tipos, el holandés y el americano.

### 1.9.7 Azitromicina

La resistencia a azitromicina fue encontrada con la expresión del fenotipo *mtr*, también responsable de la resistencia a penicilina y tetraciclina. Las posibilidades de cambios ribosomales como mecanismos de resistencia a la azitromicina se han valorado (41).

## 1.10 Epidemiología y métodos de tipificación molecular

La epidemiología molecular tiene la capacidad de proveer información sobre la emergencia y diseminación de clones de *N. gonorrhoeae* con resistencia antimicrobiana, que podrían facilitar el manejo del paciente y establecer estrategias de intervención. Para ello se han desarrollado técnicas de tipificación molecular como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la secuencia multiantígeno de *Neisseria gonorrhoeae* NG-MAST, pruebas que son altamente discriminatorias, reproducibles, objetivas e intransferibles y se adapta bien a las aplicaciones con el objetivo de responder a las preguntas epidemiológicos a corto plazo (21, 47).

Inicialmente la búsqueda de poblaciones clónales se concentraba en determinar la epidemiología de aislamientos resistentes a antimicrobianos de uso común; los cuales se caracterizan por mantener su material genético, persistir en el tiempo y por estar en diversas áreas geográficas, en un país o internacionalmente consiguiendo así una dispersión mundial. Para comprender mejor este concepto, Tenover en 1995 definió los siguientes términos:

Aislamiento: es un término general para un cultivo puro de bacterias obtenidas mediante subcultivo a partir de una sola colonia sobre placas de agar con crecimiento primario, se presume que se derivan de un solo organismo, para las que no se dispone de información aparte de su género y especie.

Aislamientos epidemiológicamente relacionados: son cepas cultivadas a partir de muestras recogidas de pacientes, fómites, o el medio ambiente durante un período de tiempo y de un área bien definida que hace parte de una investigación epidemiológica que sugiere que los aislados se pueden derivar de una fuente común.

Aislamientos genéticamente relacionados (clones): son aislados que no se distinguen unos de otros por pruebas genéticas (por ejemplo, PFGE, electroforesis de enzimas multilocus, o ribotipaje) o que son tan similares que se presume que se derivan de un antepasado común.

Brote: es el aumento de la incidencia de una enfermedad infecciosa en un lugar específico durante un período determinado, que está por encima de la tasa de referencia para ese lugar.

Cepa: es un aislado o un grupo de cepas que se pueden distinguir de otros aislados del mismo género y especie por las características fenotípicas o genotípicas o ambos.

Cepas del brote: son cepas de la misma especie que son epidemiológicamente relacionados (por ejemplo, por el momento, el lugar y la fuente común de infección) y genéticamente relacionados (es decir, tienen genotipos indistinguibles).

Cepas endémicas: son aislados que se recuperan con frecuencia de pacientes infectados en un centro de atención médica particular o una comunidad y que son indistinguibles o estrechamente relacionados entre sí mediante métodos de caracterización, y la vinculación directa o epidemiológica puede ser demostrada.

Tabla 2. Criterios de interpretación de la prueba de PFGE, según Tenover, 1995

<b>Categoría</b>	<b>Evento genético: Mutación, Inserción o Delección</b>	<b>No. De fragmentos diferentes</b>	<b>Interpretación epidemiológica</b>
<b>Indistinguible</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Hace parte del brote</b>
<b>Estrechamente relacionado</b>	<b>1</b>	<b>2 a 3</b>	<b>Probablemente hace parte del brote</b>
<b>Posiblemente relacionado</b>	<b>2</b>	<b>4 a 6</b>	<b>Posiblemente hace parte del brote</b>
<b>No relacionado</b>	<b>≥3</b>	<b>≥7</b>	<b>No hace parte del brote</b>

Fuente: Tenover, 1995

El objetivo de los estudios de tipificación de cepa es proporcionar al laboratorio evidencia de que los aislamientos relacionados epidemiológicamente recogidos durante un brote de la enfermedad también está relacionados genéticamente y por lo tanto representan la misma cepa. Esta información es útil para comprender y controlar la propagación de la enfermedad en los hospitales y las comunidades.

PFGE se basa en la digestión de todo el genoma bacteriano (2.153.944 pb) por endonucleasas de restricción de corte infrecuente seguido por la separación de los fragmentos grandes de ADN resultantes en un gel de agarosa sometido a electroforesis de campo pulsado. Este método puede separar grandes fragmentos de ADN (de 5 a 10 Mbp) en pocas bandas para facilitar la comparación. Para la digestión del ADN genómico utiliza enzimas como *SpeI* y / o *BglII* que han demostrado ser altamente discriminatorias para *N. gonorrhoeae*. PFGE ha sido utilizado para definir las poblaciones de cepas gonocócicas en una región en particular, para identificar grupos de cepas circulantes,

incluyendo cepas resistentes a antibióticos y en las evaluaciones forenses. PFGE es un método particularmente útil para aumentar la discriminación entre los aislamientos en situaciones específicas, especialmente aquellos que involucran micro epidemiología (aislamientos que son recuperados en periodos cortos de tiempo, días meses o unos pocos años) PFGE es reproducible, y todos los aislados de *N. gonorrhoeae* son tipificable por este método. Las desventajas de PFGE incluyen la exigencia de un alto nivel de conocimientos técnicos y de interpretación, la cual es potencialmente subjetiva de patrones de bandas en geles y alto costo.

NG-MAST diferencia cepas sobre la base de la variación de secuencia en fragmentos de dos genes hipervariables, el gen porB (porina B) que codifica para una proteína de la membrana externa asociada con la virulencia de la bacteria, y la subunidad B de la proteína de unión a la transferencia de gen *tbpB* (proteína de unión de transferrina B, una lipoproteína de membrana externa, para la adquisición de hierro de la transferrina humana. NG-MAST es altamente discriminatoria, relativamente fácil de usar y tiene el apoyo de un acceso abierto, la base de datos en línea ([www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net)), lo que permite una fácil comparación de alelos, proporcionando asignación clara de nuevos alelos y tipos. A la fecha hay contenidos 13.513 ST en esta base de datos. Por estas razones, NG-MAST ha sido aceptado como el método actual de elección y ampliamente utilizado para investigar genotipos específicos de resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, para examinar las redes o contactos sexuales específicos y para investigar los fracasos del tratamiento (21, 47).

genómica de la población: el estudio de las poblaciones definidas de bacterias estrechamente relacionadas con fenotipos distintos mediante comparaciones de genomas individuales o partes de ellos. Esto requiere el aislamiento de una muestra representativa de una población, normalmente mediante el cultivo de las bacterias.

### **1.10.1 Epidemiología de la resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae*.**

El aumento de la resistencia a todos los antimicrobianos introducidos para el tratamiento de la gonorrea se ha observado desde hace muchas décadas. Por lo general las cepas de gonococo resistentes a un determinado antimicrobiano han surgido solo 10-20 años después de su introducción en el tratamiento.

En 1937 comenzaron a emplearse las sulfonamidas en el tratamiento de la enfermedad gonocócica, inicialmente curaban el 95% de los casos y menos del 10% mostraba resistencia "in vitro"; en pocos años se observó el fallo terapéutico en 80% de los pacientes (23).

En 1943 la penicilina se convirtió en el tratamiento de primera elección en la dosis inicial de 100.000 – 150.000 unidades, sin embargo el posterior fracaso en el tratamiento obligó a aumentar varias veces las dosis de penicilina, hasta que por último en 1976 dos cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinasas con alto nivel de resistencia a la penicilina, originarias de África y Asia fueron reportadas en los Estados Unidos de América y el Reino Unido; en 1980 también se describe la resistencia a penicilina mediada cromosómicamente (23).

En el año 1985 fueron reportados en los Estados Unidos aislamientos con alto nivel de resistencia a tetraciclina mediada por el gen tetM.

En 1990 aparecieron en Japón las cepas resistentes a fluoroquinolonas debido a mutaciones específicas en los genes *gyrA* y *Parc*, que codifican las enzimas ADN girasa y la topoisomerasa IV, la resistencia a ciprofloxacina y a otras fluoroquinolonas se extendió a nivel mundial, siendo retiradas en los años 2000 en Europa y en 2007 en Estados Unidos (23).

Después de esto las cefalosporinas de tercera generación inicialmente la ceftriaxona a una dosis de 125 mg intramuscular y la cefixima 400 mg vía oral fueron las opciones para

la primera línea, sin embargo, ya estaban reportados algunos casos de fracasos del tratamiento con cefixima en uretritis gonocócica en Japón en la década de 2000. En el año 2010 se informaron fracasos del tratamiento también en Noruega, Reino Unido, Austria y Francia. En la actualidad, los fracasos del tratamiento también se han verificado en Sudáfrica y Canadá. Cefixima fue retirada de los regímenes terapéuticos recomendados para la gonorrea en Japón en 2006, en 2012 en EEUU y Europa, se siguen presentando fracasos en el tratamiento con ceftriaxona en gonorrea faríngea en Australia, Europa y Japón (48).

Una directriz europea minuciosamente revisada y actualizada sobre el diagnóstico y tratamiento de la gonorrea fue aprobado en el año 2012 recomendando como tratamiento de primera línea ceftriaxona 500mg intramuscular junto con azitromicina 2 g vía oral para gonorrea no complicada(48). Posteriormente en el año 2013 en Colombia se revisó y se elaboró la nueva guía clínica que rige actualmente en nuestro país (8).

#### **1.10.1.1 Factores que contribuyen a la propagación de la resistencia**

No es casualidad que la resistencia antimicrobiana a *N. gonorrhoeae* haya aparecido en regiones en donde existe un sector informal de la salud y el uso de antibióticos no está bien controlado. Por estas razones la resistencia a las penicilinas se extendió desde el sur y el este de Asia; la resistencia a la espectinomicina parece estar relacionada con la disponibilidad de este antibiótico en la región en las décadas de 1980. Más recientemente, la resistencia a quinolonas ha surgido por el mismo motivo; la propagación del TRNG, en África y en otros lugares, es también una consecuencia evidente del uso y mal uso probable de las tetraciclinas por ser, fácilmente disponibles y económicos.

En un estudio, aproximadamente 75% de los asistentes a una clínica de ITS en Ghana se había auto-medicados antes de la presentación (49). Los antibióticos se han adquirido de una variedad de fuentes y se toman en dosis inadecuadas, a menudo como mezclas de diferentes agentes. Entre 70 y 95% de los gonococos examinado en esta clínica fueron resistentes a los antibióticos comúnmente disponibles. Además, los profesionales del sexo en Asia suministran a los clientes quinolonas orales como medio de profilaxis, y la



auto-prescripción de antibióticos profilácticos en las Filipinas fue un factor que contribuye a la aparición de resistencia a los antimicrobianos en ese país (50).

La carga de la enfermedad es desproporcionadamente alta en los países con menos capacidad para proporcionar el diagnóstico y el manejo apropiado, y los niveles de resistencia antimicrobiana son también más altos en estos países

#### **1.10.1.2 Epidemiología de la propagación de la resistencia**

*Neisseria gonorrhoeae* es un microorganismo patógeno no-clonal, altamente transformable, apto para la adquisición de ADN desde microorganismos estrechamente relacionados que comparten su hábitat. Esta habilidad del gonococo para adquirir ADN y su condición intrínseca de alta variabilidad genética conllevan regularmente a cambios en el fenotipo y genotipo del microorganismo (23,26).

Los factores que pueden estar implicados en la persistencia de determinadas clases de auxotipos A / S incluyen su capacidad de causar infección asintomática y su resistencia a los antibióticos. También se ha sugerido que factores del huésped, como los anticuerpos específicos para cada serotipo en las secreciones vaginales, pueden producir un nivel de inmunidad de grupo a los subtipos particulares, lo que resulta en la selección de nuevos subtipos (26).

Una cepa resistente se vuelve endémica una vez que hay una masa crítica de individuos infectados con la cepa; esto se asocia normalmente con la infección de transmisores fundamentales, tales como los trabajadores sexuales. Las cepas que no se introduzcan en transmisores principales es poco probable que persistan, Los trabajadores del sexo implicados son en general inmigrantes ilegales que utilizan condones con mucha menos frecuencia que sus contrapartes locales. El fenotipo NGRQ se limita a los pacientes y heterosexuales y no se encontró en población homosexual (26).

#### **1.10.1.3 Introducción y propagación por viajeros.**

La velocidad de desplazamiento actual facilita propagación de cepas de un país a otro durante la fase de incubación pre sintomática de la infección. Hay grupos transmisores de enfermedades de transmisión sexual entre los viajeros: las mujeres trabajadoras sexuales ambulantes, conductores de camiones de larga distancia, los marineros y los trabajadores migrantes.

Las diferencias socioeconómicas han provocado un aumento de los viajes por los profesionales del sexo y sus clientes (26).

Se requiere un programa integrado de educación, diagnóstico y tratamiento de las poblaciones de refugiados y migrantes para poder controlar las ITS en estos grupos.

## **2. Capítulo 2. Metodología**

### **2.1 Aislamientos bacterianos**

Se estudiaron los aislamientos enviados por los diferentes departamentos del país, dentro del programa de vigilancia por laboratorio de *N. gonorrhoeae* realizada por el Grupo de Microbiología del INS, en el periodo 2013-2014

Los aislamientos fueron recibidos en el medio de transporte AMIES con carbón activado, acompañados del formato de envío con los datos demográficos y las pruebas de identificación realizadas en la entidad de salud.

Los aislamientos fueron sembrados en Thayer Martin y agar chocolate, se incubaron a 35 °C por 24-48 horas en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 90%(2,39). A los aislamientos que se recuperaron se les realizaron las pruebas confirmatorias estandarizadas GASP-LAC (40).

### **2.2 Pruebas Confirmatorias y de Sensibilidad antimicrobianas.**

Para la confirmación se realizó la coloración de Gram, la prueba de oxidasa y la degradación de carbohidratos sin crecimiento según la metodología de Kellogg y Turner. La producción de beta lactamasa se realizó utilizando la cefinasa (nitrocefina, marca BBL) y la sensibilidad antimicrobiana por difusión (Kirby Bauer) y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a penicilina, tetraciclina, espectinomicina, ceftriaxona, ciprofloxacina y azitromicina, de acuerdo con los parámetros establecidos

por el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015) y como cepa control se utilizó *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (39, 51).

**Tabla 2-1.** Criterios de Interpretación según CLSI 2015

Antibiótico	Sensible µg/mL	Intermedio µg/mL	Resistente µg/mL
Penicilina	≤0,06	0,125-1,0	≥2,0
Tetraciclina	≤0,25	0,5-1,0	≥2,0
Espectinomicina	≤32	64	≥128
Ceftriaxona	≤1	-	-
Ciprofloxacina	≤0,06	0,125-0,5	≥1,0
Azitromicina	≤0,5	1.0*	≥2,0

\* Susceptibilidad crítica a la azitromicina.

Fuente: CLSI 2015

Fueron determinados los diferentes fenotipos de resistencia de los aislamientos de acuerdo con los criterios establecidos por Rice, la resistencia a penicilina mediada por plásmidos (PPNG) para los aislamientos productores de betalactamasa con una CIM  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  y un halo de inhibición  $\leq 19\text{mm}$ ; la resistencia cromosómica a penicilina (CMPR) para los aislamientos betalactamasa negativa con una CIM  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  y un halo de inhibición  $\leq 26\text{ mm}$ ; la resistencia plasmídica a tetraciclina (TRNG) para los aislamientos con CIM  $\geq 16\mu\text{g/mL}$  y un halo de inhibición  $\leq 19\text{ mm}$  y la resistencia cromosómica a tetraciclina (CMTR) para los aislamientos con una CIM  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  y halo de inhibición  $\leq 30\text{ mm}$ . Los aislamientos fueron considerados resistentes a ciprofloxacina cuando tenían una CIM  $\geq 1\mu\text{g/mL}$ , a espectinomicina con una CIM  $\geq 128\mu\text{g/mL}$  (resistencia cromosomal) y a azitromicina con una CIM  $\geq 2\mu\text{g/mL}$ ; los aislamientos fueron considerados sensibles a ceftriaxona cuando la CIM fue  $\leq 0,25\mu\text{g/mL}$  (51, 52).

Los aislamientos productores de penicilinas PPNG fueron confirmados por PCR convencional para la detección de la betalactamasa codificada por el gen TEM, posteriormente se escogieron 19 aislamientos (correspondientes a cada departamento

participante) de los que resultaron positivos para la presencia de banda marcaron banda con este iniciador para ser secuenciadas y determinar el tipo de TEM que está circulando en el país.

## 2.3 Prueba de PFGE

La caracterización molecular fue realizada mediante la prueba de electroforesis en gel de campo pulsado para ello inicialmente los aislamientos conservados en caldo tripticasa de soya con glicerina a  $-70^{\circ}\text{C}$  se recuperaron en agar Thayer Martin o agar chocolate, a partir de este crecimiento se llevó a cabo la elaboración de los bloques de agarosa (Agarosa de rápida resolución al 1%, SeaKem) en el cual se embebieron las cepas después de ser ajustadas a una transmitancia del 20% en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm; se adicionó proteinasa K para la lisis celular luego de varios lavados con agua, fueron almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$  en búffer TE.

La restricción de DNA fue realizada utilizando la enzima Spe I (Promega) a una concentración de 10U/ $\mu\text{l}$  por cada aislamiento. Los bloques se sembraron en geles de agarosa de resolución rápida al 1.0% preparada con buffer de TBE 0,5X pH 8,5, utilizando como marcador de peso molecular "Lambda Ladder PFGE Marker" (21,53).

Los fragmentos de restricción se separaron por PFGE utilizando el equipo de electroforesis CHEFF-II (Bio-Rad) y fueron coloreados con bromuro de etidio (10 mg/ml) que luego de ser lavados con agua destilada, se transfirió el gel a un sistema de imagen para ser fotografiado (fotodocumentador Bio-Rad).

Los patrones de bandas obtenidos por PFGE fueron analizados con el programa Gel compar II 6.5, utilizando el coeficiente de Dice, el método de algoritmo de emparejamiento por pares con base en promedios aritméticos (UPGMA), una optimización del 1% y una tolerancia de 1,5%. Los patrones se clasificaron dentro de un grupo clonal con menos de cuatro diferencias entre sí y con una relación genética en el dendograma de  $\geq 85\%$ .

Del dendograma realizado a partir de la PFGE, se seleccionaron (10%) 20 aislamientos representativos de los fenotipos de resistencia encontrados, para determinar la secuencia tipo (ST), por la técnica de NG-MAST.

## 2.4 Prueba de NG-MAST.

Para la prueba de NG-MAST primero se realizó la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) por calentamiento a 95°C durante 10 minutos de la suspensión de la bacteria en agua destilada estéril, se centrifugó a 3000 gravedades por 3 minutos y el sobrenadante fue conservado a -20°C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los fragmentos *porB* y *tbpB* se realizaron según lo descrito por Martin y colaboradores (54). Los iniciadores para *porB* fueron utilizados para la amplificación de fragmentos de 737 pb sentido 5´ CAA GAA GAC CTC GGC AA 3´ y antisentido 5´ CCG ACA ACC ACT TGG T 3´ y para *tbpB* fueron diseñadas por el uso de secuencias conservadas y la amplificación de un fragmento de 589 pb sentido: 5´CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC ´3 y antisentido 5´ TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG ´3 , la amplificación del gen *por*, fue hecho en un volumen total de 50 µl, cada PCR contenía 50 pmol de cada iniciador, 2,5 U de taq polimerasa (Quiagen), 2 µl de ADN, 0,2 mmol/L de cada dNTP y agua para ajustar un volumen de 50 µl.

El perfil de amplificación utilizado fue el siguiente un ciclo inicial de denaturación por 4 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C con una extensión final de 10 minutos a 72°C y un enfriamiento a 4°C. Para la amplificación del gen *tbpB* se utilizaron las mismas condiciones, pero la temperatura de anillamiento fue de 69°C. (54)

Los productos de la PCR se corrieron por electroforesis convencional en geles de agarosa (Ultra pure, Invitrogen) al 1,2% con bromuro de etidio (0,4 µg/ml) a 100 voltios por una hora, finalmente se tomó una fotografía utilizando el fotodocumentador (Bio-Rad), para comprobar la calidad de las bandas y posteriormente ser enviado para

determinar las secuencias de nucleótidos en cada una de las cadenas (sentido y antisentido)

En el análisis bioinformático (Geneious R7.1.3) de las secuencias se compararon los alineamientos de cada una de las cadenas (sentido y antisentido), luego se realizó el consenso de los controles de la base de datos centralizada de las NG-MAST de las secuencias correspondientes a los dos genes *porB* y *tbpB*. Seguido a esto se tomó una de las cadenas sentido o antisentido y se comparó con la secuencia consenso control de la base de datos para realizar el corte acorde a la longitud, 490bp para el gen *porB* y 390pb para el gen *tbpB*. Posteriormente, las secuencias de los genes fueron remitidas a la base de datos de NG-MAST( [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net)), consultada en noviembre de 2015 para obtener el perfil alélico y la ST.

## 2.5 Betalactamasa tipo TEM

### 2.5.1 PCR para identificar el gen TEM

Para realizar esta técnica se seleccionaron los aislamientos resistentes a penicilina (83) luego se les hizo extracción de ADN por ebullición (calentamiento a 95°C durante 10 minutos de la suspensión de la bacteria en agua destilada estéril, se centrifugó a 3000 gravedades por 3 minutos y el sobrenadante fue conservado a -20°C). La realización de la PCR se hizo según el protocolo descrito por Monstein y colaboradores usando el primer sentido 5'TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA'3 y el antisentido 5'ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT'3 para el gen TEM, utilizados para la amplificación de fragmentos de 445 pb, en un volumen de 50 µl en el cual cada PCR contenía 1.5 µl de buffer 1X, 2.4 µl de iniciador sentido y 0.37 µl de iniciador antisentido, 0.15 U de taq polimerasa (Quiagen), 6 µl de ADN, 0,37 mmol/L de cada dNTP y agua para ajustar un volumen de 50 µl; Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de denaturación por 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C con una extensión final de 10 minutos a 72°C y un enfriamiento a 4°C. (55).

Los productos de la PCR se corrieron por electroforesis convencional en geles de agarosa (Ultra pure, Invitrogen) al 1,2% con bromuro de etidio (0,4 µg/ml) a 100 voltios

por una hora, finalmente se tomó una fotografía utilizando el fotodocumentador (Bio-Rad), se enviaron para secuenciar, las secuencias del gen fueron analizadas en el programa BLAST (56) con el fin de determinar el tipo de TEM.

## 2.6 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos como asociaciones y frecuencias se utilizó el programa estadístico Epiinfo 7.0 (57).

Se realizó análisis univariado para establecer las frecuencias de distribución para las siguientes variables:

-Procedencia, en la que se incluyeron los diferentes LSP de cada departamento y Distrito que enviaron aislamientos.

-Sexo

-Edad. Para el análisis de la edad se establecieron los siguientes grupos en años:

(1-4), (5-9), (10-14), (15-24), (25-34), (35-44), (45-54) y (55-64).

-Sensibilidad antimicrobiana, a penicilina, tetraciclina, espectinomicina, ceftriaxona, ciprofloxacina y azitromicina, utilizando las categorías sensibles, intermedio y resistente

-Fenotipos de resistencia: PPNG, CMTR, TRNG, CMPR, QRNG, los aislamientos que no clasificaron como resistentes fueron denominados SENSIBLES.

-Patrones establecidos mediante la prueba de PFGE. Los cuales fueron establecidos por el autor, según la frecuencia presentada

-Secuencia Tipo o ST según la base de datos [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net).



## **3. Capítulo 3. Resultados**

### **3.1 Datos demográficos**

Durante los años 2013 y 2014 se recibieron 246 aislamientos enviados por 19 entidades de salud del país. Los laboratorios que más enviaron aislamientos fueron los de Bogotá 62 (25,2%), Antioquia 54 (21,9%), Amazonas 47 (19,1) y Risaralda 33 (13,4%). En la tabla 3-1, se encuentra la distribución por departamento remitente y la tasa de ataque donde Amazonas presentó la tasa mayor con 61,65 por 100.000 habitantes.

En el periodo de estudio se recibieron 246 aislamientos de los cuales 118 (48%) corresponden al año 2013 y 128 (52%) corresponden al año 2014; de los 246 aislamientos recibidos fueron recuperados 144 (58,5%), los 102 restantes no fueron viables o estaban contaminados y no se lograron recuperar.

En la tabla 3-2 se observa la distribución por grupos de edad y sexo; 188 (76,42%) aislamientos eran de hombres, 58 (23,57%) de mujeres; 50 (20,33%) aislamientos eran de menores de 15 años y de estos 37 (63,79%) eran de mujeres; 37 (74%) del total de los menores de 15 años eran niños y niñas entre 1 y 9 años de edad. Al comparar el grupo de menores de 15 años por sexo, se encontró una proporción de hombre a mujer de 1:2,8 con diferencia significativa ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 3-1.** Número de aislamientos enviados por los LSP durante los años 2013-2014.

Región	n recuperados	n enviados	%	Población	*Tasa
Bogotá	35	62	25,2	7.878.783	0,79
Antioquia	26	54	21,95	6.456.299	0,84
Amazonas	37	47	19,11	76.243	<b>61,65</b>
Risaralda	15	33	13,41	951.953	3,47
Bolívar	0	8	3,25	2.097.161	0,38
Santander	0	8	3,25	2.061.079	0,39
Arauca	5	7	2,85	262.315	2,67
Sucre	3	5	2,03	851.515	0,59
Valle	2	4	1,63	4.613.684	0,09
N.Santander	0	4	1,63	1.355.787	0,3
Boyacá	1	3	1,22	1.276.407	0,24
Cesar	1	2	0,81	1.028.890	0,19
Meta	1	2	0,81	961.334	0,21
Atlántico	0	2	0,81	2.460.863	0,08
Cauca	0	1	0,41	1.379.169	0,07
Choco	0	1	0,41	500.093	0,2
Guajira	0	1	0,41	957.797	0,1
Casanare	0	1	0,41	356.479	0,28
Putumayo	0	1	0,41	345.204	0,29
<b>Total</b>	<b>126</b>	<b>246</b>	<b>100</b>	<b>48.203.405</b>	<b>0,51</b>

\*Tasa de ataque por 100.000 habitantes.

En Amazonas 12 (25,53%) aislamientos fueron recuperados de pacientes menores de 15 años, en Antioquia 12 (22,22%), en Bogotá 9 (14,51%), en Bolívar 6 (75%), en Sucre 4 (80%); los otros 7 (14%) de este grupo de edad eran de los 6 departamentos restantes.

**Tabla 3-2.** Distribución de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* por grupos de edad y sexo.

Grupos de edad en años	Sexo				Total	
	Masculino		Femenino			
	n	%	n	%	n	%
1 a 4	0	0	16	27,59	16	6,50
5 a 9	3	1,60	18	31,03	21	8,54
10 a 14	10	5,32	3	5,17	13	5,28
<b>Subtotal &lt;15</b>	<b>13</b>	<b>6,91</b>	<b>37</b>	<b>63,79</b>	<b>50</b>	<b>20,33</b>
15 a 24	79	42,02	7	12,07	86	34,96
25 a 34	48	25,53	3	5,17	51	20,73
35 a 44	15	7,98	1	1,72	16	6,50
45 a 54	8	4,26	2	3,45	10	4,07
55 a 64	3	1,60	4	6,90	7	2,85
Sin dato*	22	11,70	4	6,90	26	10,57
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100</b>	<b>58</b>	<b>100</b>	<b>246</b>	<b>100</b>

Al analizar los 4 laboratorios de salud pública del país (LSP) que enviaron aislamientos con más frecuencia se encontró mayor número de mujeres con *Neisseria gonorrhoeae* en el departamento de Antioquia 20/53 comparado con Risaralda 1/33 y Bogotá 7/62 con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0,0001$ ; el número de aislamientos procedentes de hombres del departamento de Risaralda 32/33 comparado con Amazonas 37/47 fue mayor ( $p < 0,0001$ )

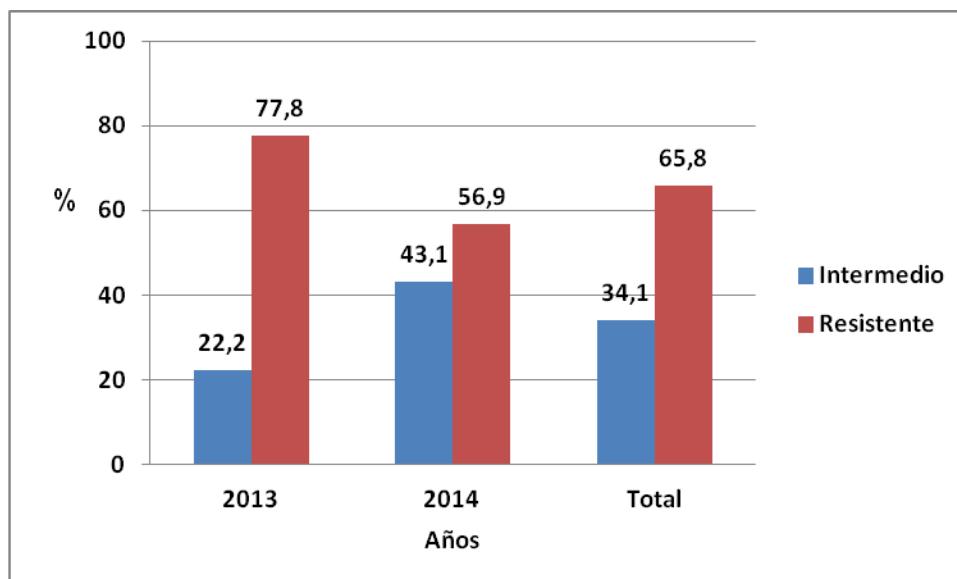
De los 246 que tenían dato de fuente, 184 (74,80%) eran de secreción uretral, 53 (21,54%) de flujo vaginal, 2 (0,81%) de secreción de cérvix, 2 (0,81%) de secreción conjuntival, y de hemocultivo 1 (0,40%), 4 (1,62%) no tenían dato de fuente; de los 50 aislamientos de menores de 15 años, 36 (72%) eran de flujo vaginal, 13 (26%) de secreción uretral, 1 (2%) de conjuntiva.

De los 246 aislamientos recibidos fueron viables 144, para un promedio de recuperación del 58,53%, con un rango de 42.36% para el 2013 y del 57,63% para el año 2014. De los 144 aislamientos se realizó el montaje de sensibilidad antimicrobiana y pruebas moleculares a 126, ya que 18 cepas no presentaron un crecimiento óptimo en el momento del montaje.

### 3.2 Sensibilidad antimicrobiana

De los 126 aislamientos recuperados (es decir que al realizar el cultivo sobre las placas de agar se observa crecimiento de colonias puras del microorganismo) 81 (64,28%) fueron productores de beta lactamasa y 83 (65.87%) presentaron resistencia a la penicilina. La distribución de la producción de beta lactamasa por sitio de procedencia fue: Bogotá 23/35, Antioquia 21/26, Amazonas 18/37, Risaralda 8/15, Arauca 4/5 y otros departamentos 7/8.

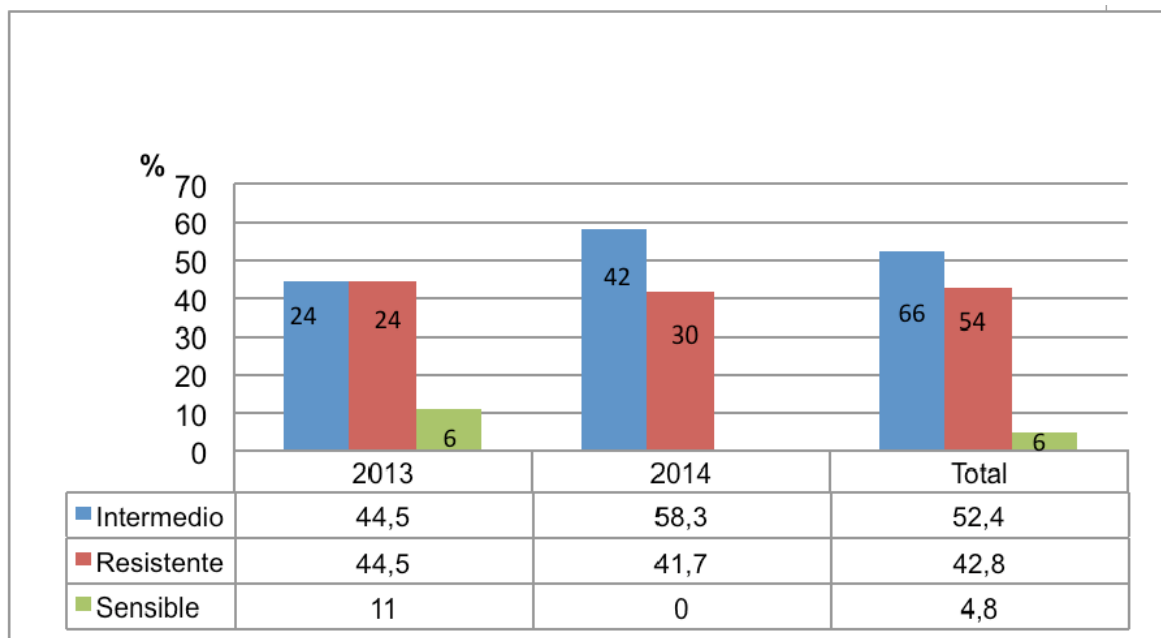
**Figura 3-1.** Sensibilidad a penicilina *N. gonorrhoeae* 2013-2014. n=126



En la figura 3-1 se observa un nivel de resistencia alto a penicilina del 65,87%, además se evidencia un aumento significativo de la resistencia intermedia de 22,2% en 2013 al 43,1 en el año 2014 y no se presentó ningún aislamiento sensible.

El análisis por departamento mostró que la resistencia a penicilina procedía principalmente de Bogotá, Antioquia y Amazonas, el mayor número de aislamientos resistentes fueron provenientes de Bogotá. Sin embargo al analizar la resistencia a penicilina se encontró que la proporción de los aislamientos de Antioquia presentan mas resistencia a este antibiótico 21/26, a diferencia de Amazonas que mostró mayor número de aislamientos con una resistencia intermedia, p=0.03.

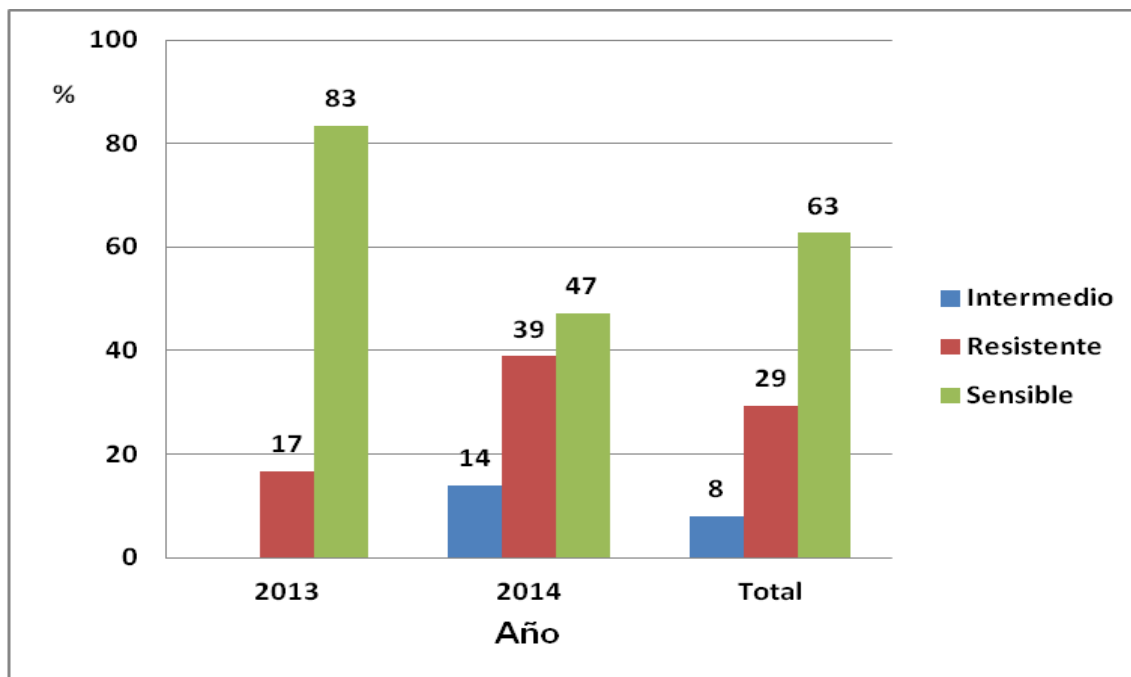
**Figura 3-2.** Sensibilidad a tetraciclina *N. gonorrhoeae* 2013-2014. n=126



En la figura 3-2 se observa que en el 2014 se presentó un aumento de los aislamientos con resistencia intermedia y no se presentó ningún aislamiento sensible a este antibiótico. La resistencia total a tetraciclina se presentó en 54 (42.85%) de los aislamientos recuperados.

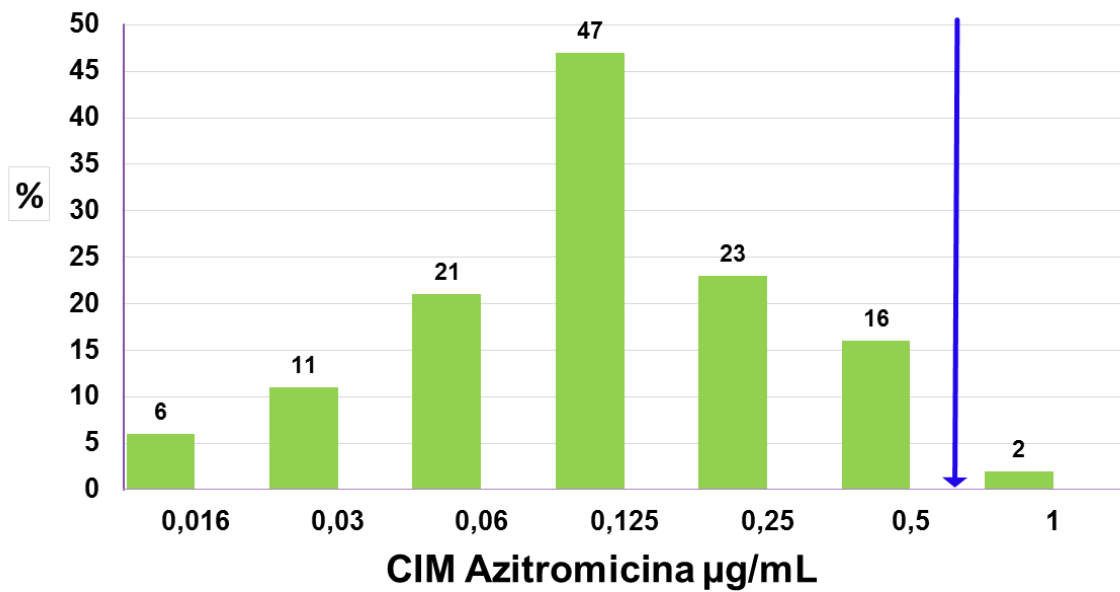
Al realizar el análisis de la resistencia a tetraciclina, Bogotá mostró mayor número de aislamientos resistentes a diferencia de Amazonas ya que este presenta más resistencia intermedia a dicho antibiótico con  $p=0,001$ .

**Figura 3-3.** Sensibilidad a ciprofloxacina *N. gonorrhoeae* 2013-2014.  $n=126$



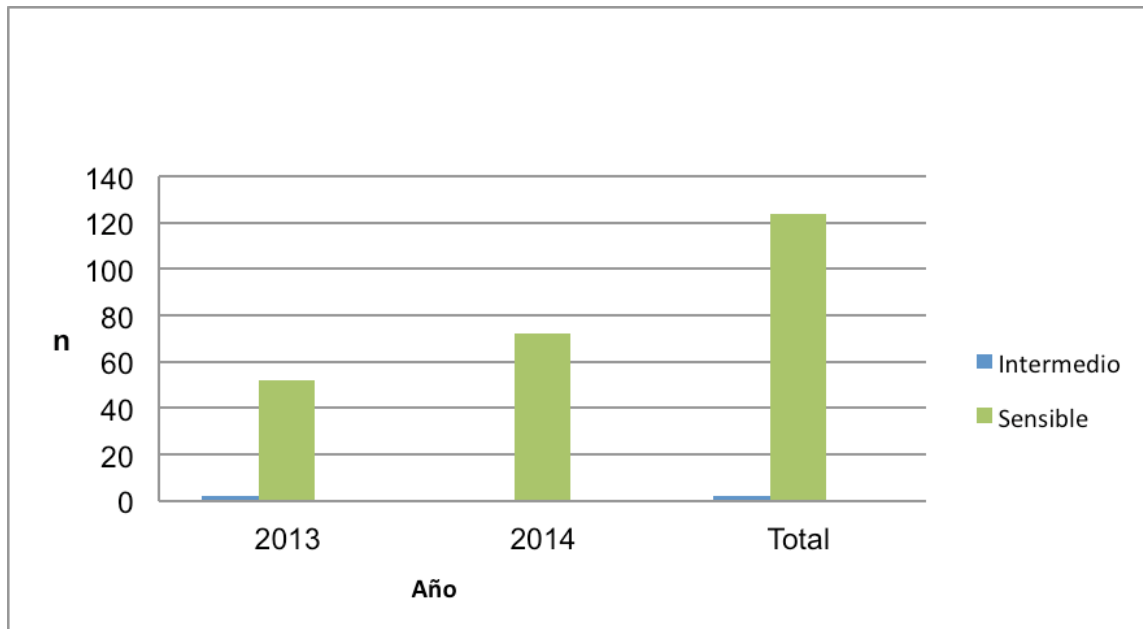
Para Ciprofloxacina se encontró un aumento significativo ( $p=0,002$ ) en el número de aislamientos resistentes durante el periodo de estudio, (Figura 3-3).

La resistencia a ciprofloxacina se presentó en 37 (29,3%) aislamientos de los cuales 18 procedían de Bogotá (48,6%), seguido de Antioquia y Risaralda con 5 (13,51%) aislamientos cada uno. Amazonas presenta el mayor número de aislamientos (24/79) sensibles a este antimicrobiano, lo cual representa una sensibilidad del 65% a este antimicrobiano, en el departamento (24/37).

**Figura 3-4.** Distribución de CIM a Azitromicina *N. gonorrhoeae* 2013-2014. n=126

De los aislamientos estudiados, 2 (1.5%) presentaron una concentración crítica a azitromicina CIM= 1µ/ml pertenecientes a Bogotá y Antioquia del año 2014 y los restantes fueron sensibles (figura.3-4.) La CIM 50/90 fue 0.125/0.5µg/ml.

**Figura 3-5.** Sensibilidad a Espectinomicina *N. gonorrhoeae* 2013-2014.

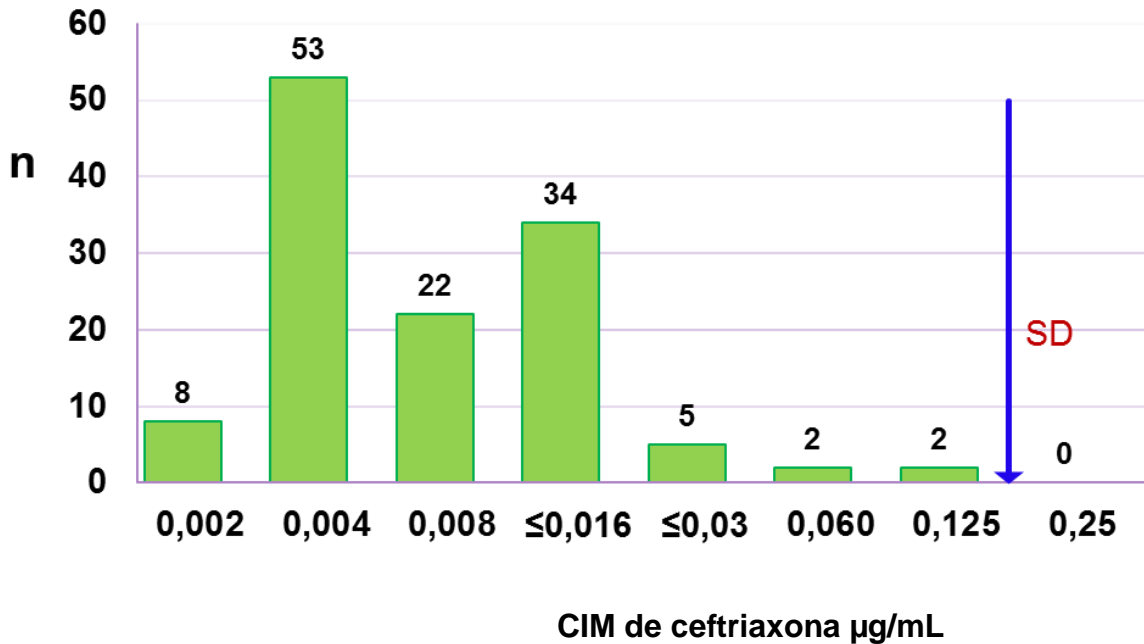


En el periodo de estudio no se presentaron aislamientos con resistencia a espectinomicina y tan solo un aislamiento fue Intermedio en el año 2013 con una CIM de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Todos los aislamientos estudiados fueron sensibles a ceftriaxona, lo que indica que en la actualidad no circulan en Colombia las cepas H041, F89 y A8806. (Figura 3-6). La CIM 90 encontrada para este antimicrobiano fue 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sin embargo 2 aislamientos (1.6%) se encuentran en 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concentración límite para pasar a la categoría de sensibilidad disminuida a ceftriaxona.



**Figura 3-6.** Distribución de la sensibilidad a ceftriaxona *N. gonorrhoeae* 2013-2014.n=126



SD: Sensibilidad Disminuída

La multiresistencia se presentó en 14 (11,11%) aislamientos, dada por la resistencia a penicilina, tetraciclina y ciprofloxacina. (Tabla 3-3).

Todos los aislamientos multiresistentes procedían de hombres entre las edades de 20 a 46 años, de los 14 aislamientos multiresistentes 10 (71,42%) eran de Bogotá, 3(21,42%) eran de Risaralda y 1(7,14%) de Amazonas. 12 aislamientos habían sido recuperados en el año 2014 y tan solo dos en el año 2013.

**Tabla 3-3.** Multiresistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* 2013-2014.

CIPROFLOXACINA (n)	TETRACICLINA (n)			Total
	I	R	S	
I		1		1
R	12	14		26
S	27	23	6	56
Total	39	38	6	83

**Tabla 3-4.** Distribución de la resistencia a los antimicrobianos y de las CIM 50 y CIM 90 de los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* estudiados durante el periodo 2013-2014.

Antibiótico	n (%)			CIM (µg/mL)	
	S	I	R	50	90
Penicilina	0	43 (34,2)	83 (65,8)	4	32
Tetraciclina	6 (4,8)	66 (52,4)	54 (42,8)	0,5	32
Espectinomicina	125 (99,2)	1 (0,8)	0	16	32
Ceftriaxona	126 (100)	0	0	0,004	0,016
Ciprofloxacina	79 (62,7)	10 (7,9)	37 (29,4)	0,004	8
Azitromicina	124 (98,4)	2*(1,6)	0	0,125	0,5

S, sensible; I, Intermedio; R, resistente.

\* Concentración crítica.

En la tabla 3-4. Se encuentra la distribución de la sensibilidad a los antimicrobianos estudiados y las CIM 50/90 de cada uno de ellos. Para penicilina se encontró que la CIM 50/90 fue 4/32 µg/ml.

En los 126 aislamientos estudiados se encontraron 13 fenotipos de resistencia diferentes; de los cuales el más común fue PPNG en 33 (26.19%) provenientes de seis de los diez departamentos estudiados resaltando a Amazonas con 16 (47%) aislamientos, PPNG/TRNG/QRNG en 14 (11,11%), PPNG/CMTR en 13 aislamientos (10,31%), PPNG/QRNG en 11 (8,73%), el fenotipo sensible se presentó en 22 (17,46%) aislamientos, provenientes con mayor frecuencia de Amazonas 13 (59%). (Tabla 3-5).

Al analizar los fenotipos de resistencia por departamento, se observó que Amazonas contiene dos fenotipos representativos en su vigilancia PPNG y Sensible en un 43% y 35% respectivamente; además el fenotipo PP/TRNG/QRNG caracterizado por agrupar aislamientos multiresistentes se presentó con mayor frecuencia en Bogotá con 8/11 (22,9%) aislamientos y tan solo 1 en Amazonas.

En el análisis por año del fenotipo de resistencia se observa un aumento significativo del fenotipo PP/TRNG/QRNG del año 2013 (9,09%) al 2014 (90,91%) con un p=0,000

**Tabla 3-5.** Fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislamientos de Laboratorio de Salud Pública 2013-2014.

FENOTIPO RES	Antioquia	Bogotá	Boyacá	Cesar	Meta	Risaralda	Sucre	Valle	Arauca	Amazonas	Total
CMPR/QRNG										1	1
CMTR	2	1				1		1		2	7
CMTR/QRNG		1									1
PP/TRNG	1	3				3			1		8
PP/TRNG/QRNG		10				3				1	14
PPNG	7	6					1	1	2	16	33
PPNG/CMTR	8	1	1	1		1				1	13
PPNG/QRNG	4	3				1	2		1		11
QRNG	1	3			1				1	1	7
SENSIBLE	3	3				3				13	22
TRNG		1				2				2	5
TRNG/CMPR		1									1
TRNG/QRNG		2				1					3
Total general	26	35	1	1	1	15	3	2	5	37	126

### 3.3 Caracterización genotípica

#### 3.3.1 gen *bla*TEM.

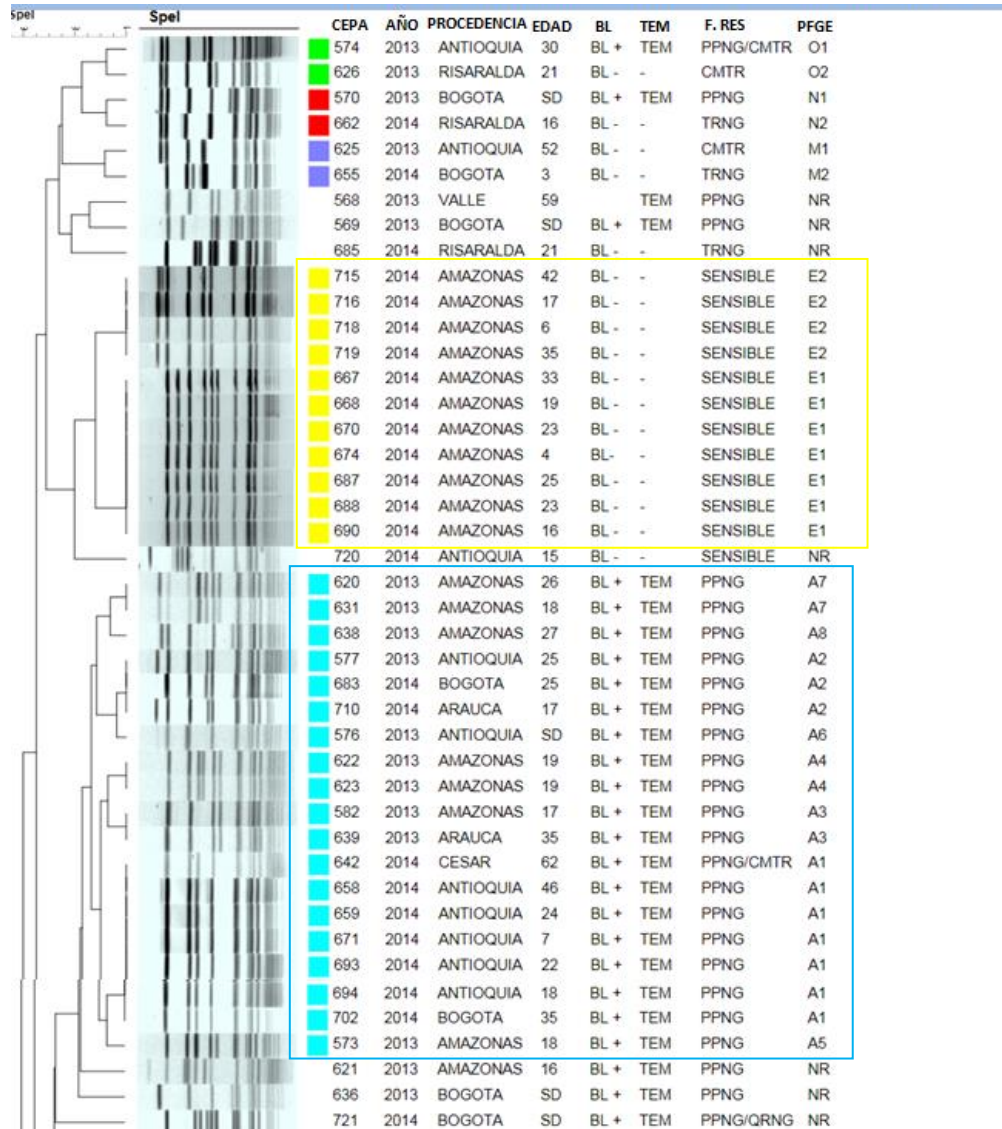
Se identificaron 83 aislamientos resistentes a penicilina a los cuales se les realizó PCR convencional para la detección del gen *bla*TEM con el fin de confirmar el tipo de beta-lactamasa, encontrando que todas poseían el gen. Acorde a esto se seleccionaron 19 aislamientos para secuenciar el gen *bla*TEM de los cuales 17 fueron TEM-1 los 2 restantes fueron TEM-135.

#### 3.3.2 Prueba PFGE.

Mediante la PFGE realizada a los 126 aislamientos de los diferentes departamentos, 110 se agruparon en 17 “clusters” con 54 patrones diferentes de la A hasta la Q y 16 restantes fueron no relacionados (NR) con una similitud  $\geq 85\%$ . El clúster más común fue el A con 19 (15,1%) aislamientos distribuidos en 8 (A1-A8) patrones, la mayor parte de estos presentaron el fenotipo de resistencia PPNG (18/19) asociado a aislamientos productores de penicilinasa encontrados en 5 de los 10 departamentos analizados,

seguido del clúster B con 13 (10,3%) aislamientos representados en 6 (B1-B6) patrones la mayoría con resistencia PPNG/CMTR (9/13), gran parte de estos procedían de Antioquia (8), y el clúster C con 12 (9.5%) aislamientos agrupados en 3 (C1-C3) patrones los cuales presentan resistencia a PP/TRNG/QRNG en su mayoría, aportados principalmente por Bogotá (7/12).

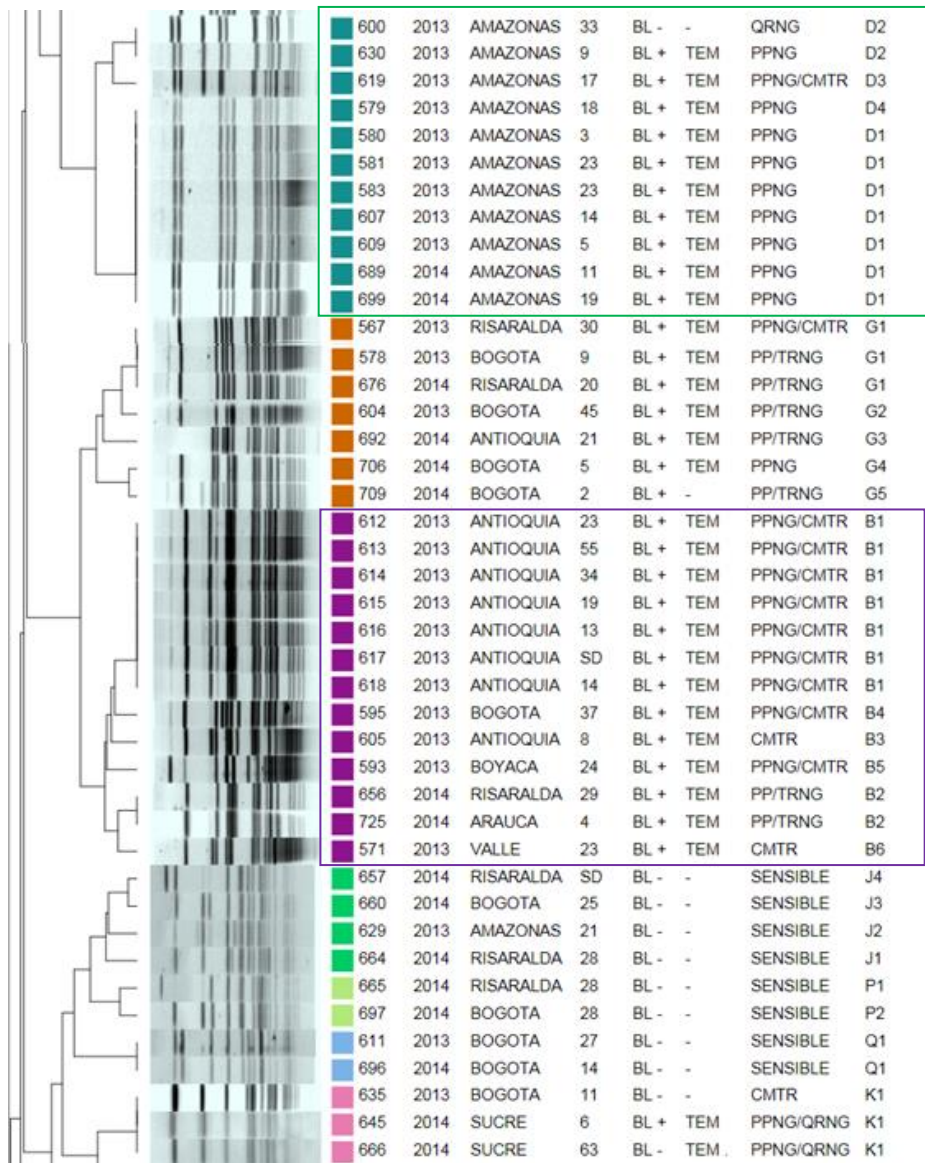
**Figura 3-7.** Dendograma PFGE *Neisseria gonorrhoeae* 2013-2014.



En la figura 3-7 se observan dos clúster representativos A y E, el clúster A conformado por 8 patrones y 19 aislamientos todos productores de Beta-lactamasa, el clúster E se

conforma por 2 patrones al que corresponden los aislamientos sensibles provenientes de Amazonas.

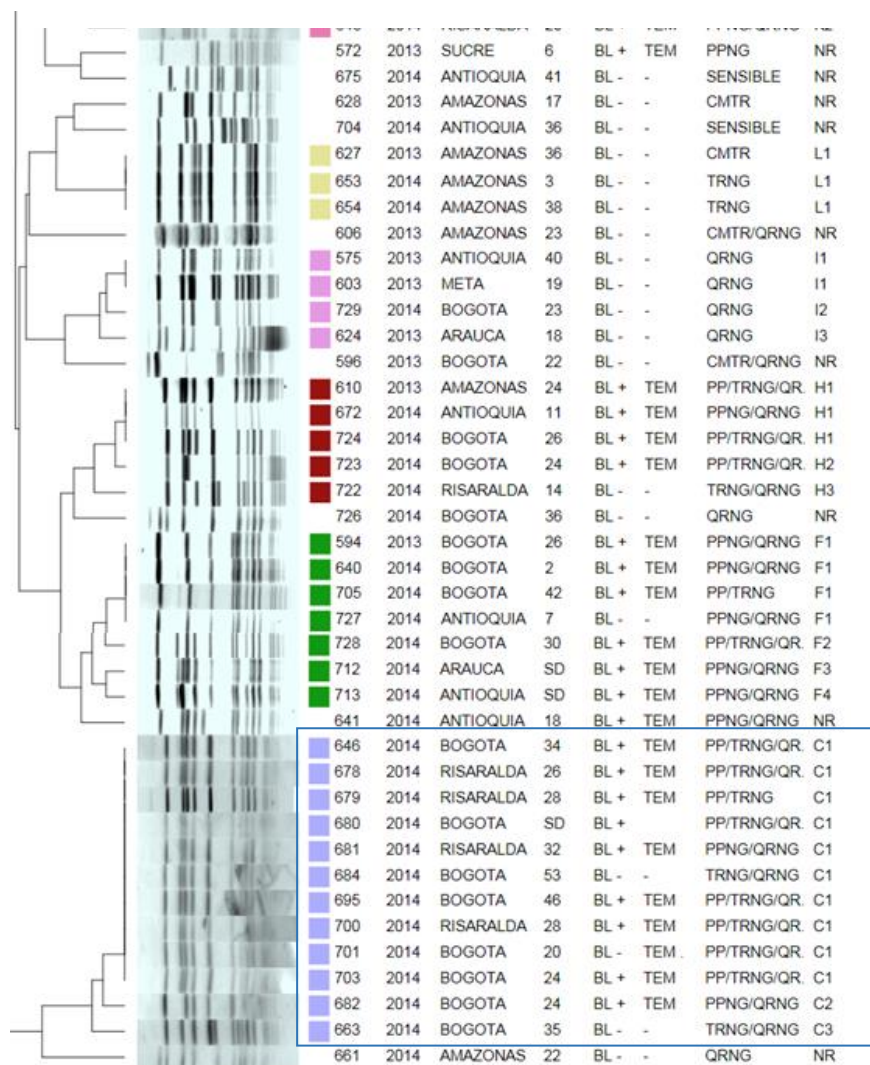
**Figura 3-7.1.** Dendograma PFGE *Neisseria gonorrhoeae* 2013-2014.



En la figura 3-7.1 se observa el clúster D conformado por 4 patrones, productores de Beta-lactamasa y procedentes de Amazonas en su totalidad, además se observa el

clúster B conformado por 6 patrones productores de Beta-lactamasa, en su mayoría procedentes de Antioquia y del año 2013.

**Figura 3-7.2.** Dendograma PFGE *Neisseria gonorrhoeae* 2013-2014.



En la figura 3-7.2 se observa el clúster C agrupado en tres patrones al cual pertenecen es su mayoría aislamientos multiresistentes procedentes de Bogotá y Risaralda del año 2014.

La prueba de Ng-MAST reveló una alta diversidad en los 20 aislamientos analizados por secuenciación debido a que no se encontró ningún ST predominante en los siete STs encontrados en este estudio y reportados por otros autores en África y Reino Unido, los 13 STs restantes fueron Nuevos; de los 7 aislamientos secuenciados de Amazonas 6 presentaron STs Nuevos.

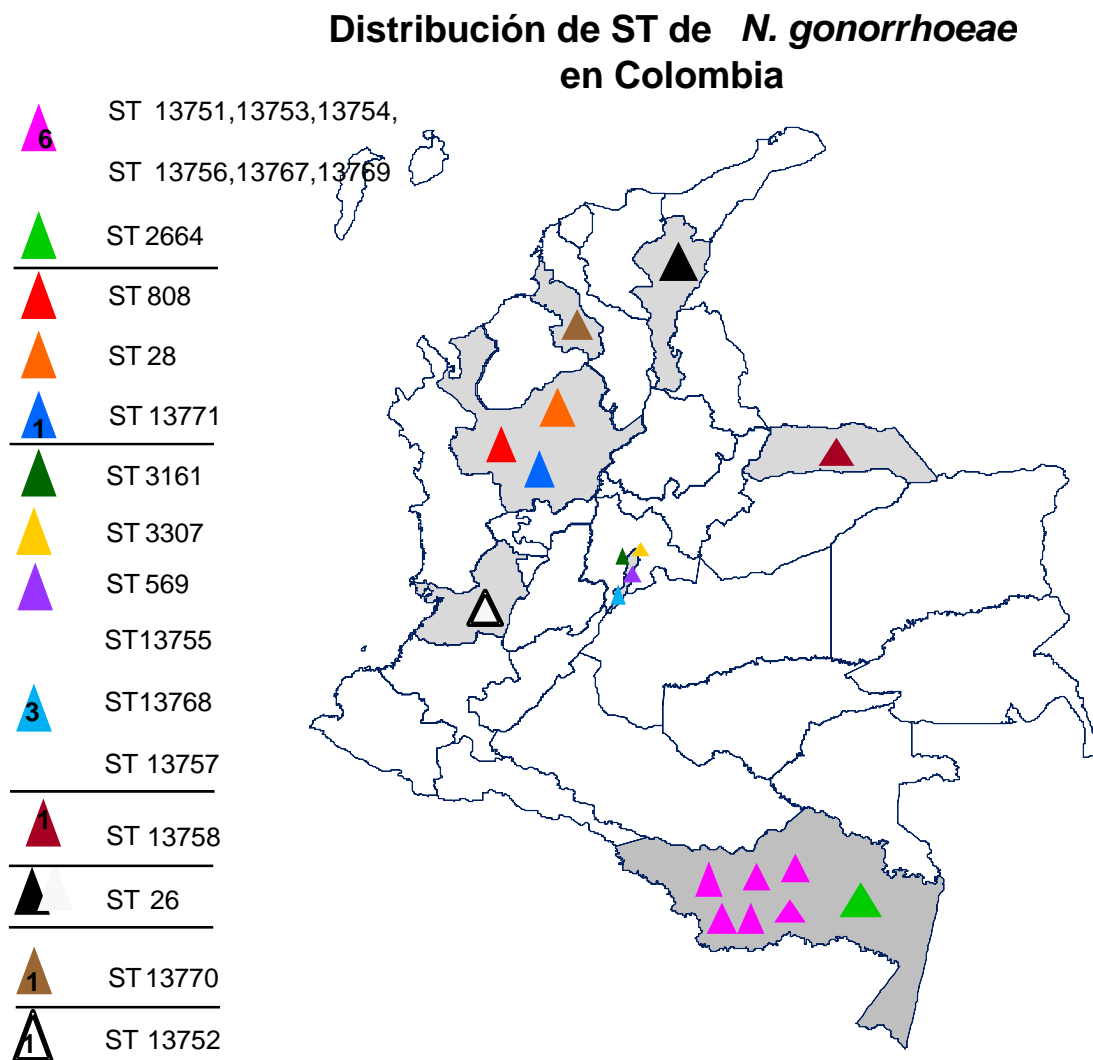
Adicionalmente, se identificaron 10 alelos del gen *porB* diferentes. El alelo 19 del gen *porB* fue encontrado en dos aislamientos pertenecientes al patrón de PFGE idéntico a A1 procedentes de Antioquia y Cesar; 9/20 aislamientos mostraron nuevos alelos para el gen *porB*. En cuanto al gen *tbpB* se encontró que 3 aislamientos tenían el alelo 60 los cuales procedían de Bogotá y presentaban una alta resistencia a penicilina, tetraciclina y ciprofloxacina. (Tabla 3-6)

**Tabla 3-6.** Distribución de fenotipos de resistencia, patrón PFGE y NG MAST de aislamientos de *N. gonorrhoeae* 2013-2014.

Aislamiento	Procedencia	Fenotipo de resistencia	Patrón PFGE	Por B	tbpB	ST	País donde se ha reportado
688	Amazonas	SENSIBLE	E1	1664	4	2664	Sur Africa
689	Amazonas	PPNG	D1	7950	2352	13767	Colombia
620	Amazonas	PPNG	A7	7939	2349	13753	Colombia
629	Amazonas	SENSIBLE	J2	7940	29	13754	Colombia
606	Amazonas	CMTR/QRNG	NR	4836	620	13751	Colombia
715	Amazonas	SENSIBLE	E2	7945	18	13769	Colombia
653	Amazonas	TRNG	L1	7942	2350	13756	Colombia
616	Antioquia	PPNG/CMTR	B1	542	61	808	Reino Unido
658	Antioquia	PPNG	A1	19	4	28	Reino Unido
692	Antioquia	PP/TRNG	G3	119	189	13771	Colombia
710	Arauca	PPNG	A2	7944	24	13758	Colombia
703	Bogotá	PP/TRNG/QRNG	C1	785	60	3611	No reportado
729	Bogotá	QRNG	I2	30	743	3307	No reportado
640	Bogotá	PPNG/QRNG	F1	7941	165	13755	Colombia
709	Bogotá	PP/TRNG	G5	90	27	569	Reino Unido
728	Bogotá	PP/TRNG/QRNG	F2	7946	60	13768	Colombia
663	Bogotá	TRNG/QRNG	C3	7943	60	13757	Colombia
642	César	PPNG/CMTR	A1	19	24	26	Reino Unido
645	Sucre	PPNG/QRNG	K1	5571	165	13770	Colombia
571	Valle	CMTR	B6	7938	27	13752	Colombia

En la figura 3-9 se observa la distribución de los STs en Colombia, Amazonas (6), Bogotá (1) y Antioquia (3) presentaron el mayor número de STs nuevos, adicionalmente estos departamentos representan 6/7 STs reportados en la literatura por otros autores en Reino Unido y África.

**Figura 3-8.** Distribución ST de *N. gonorrhoeae* en Colombia.





## 4. Capítulo 4. Discusión

Debido a que en nuestro país está establecido el manejo sindrómico para el tratamiento de las ITS, no se cultivan la totalidad de las muestras sospechosas de infección gonocócica y esto se ve reflejado en el bajo número de aislamientos enviados durante la vigilancia con una recuperación del 58,5% de los aislamientos, debido a la poca viabilidad de *N. gonorrhoeae* en los medios de transporte. Además, *N. gonorrhoeae* es un microorganismo de difícil crecimiento y necesita medios de cultivo y atmósferas de incubación específicas para su recuperación, lo que hace poco accesible el cultivo para todos los laboratorios.

El tratamiento sindrómico es dirigido a una comunidad, no es individual, por lo tanto, necesita del conocimiento acerca de los patrones de susceptibilidad en la región, que paradójicamente se conocen con la realización de las pruebas de sensibilidad mediante el cultivo. Este desconocimiento amenaza la resistencia y las fallas en el tratamiento. adicionalmente con este tipo de tratamiento se dejan de lado todos los pacientes asintomáticos favoreciendo la diseminación de la enfermedad y aumentando el riesgo para contraer otras ITS en especial VIH.

Estos factores ocasionan el desconocimiento de la carga real de la enfermedad gonocócica, la incidencia y prevalencia sujetos a sesgos y limitaciones de acuerdo al tipo de diagnóstico utilizado. Si es clínico puede ser erróneo debido a la similitud en los síntomas de varias patologías de transmisión sexual, si el diagnóstico es por laboratorio depende del tipo de prueba utilizada, si se realiza cultivo éste puede ser afectado por la labilidad del microorganismo o si se utilizan pruebas moleculares se podría detectar mayor número de pacientes, pero no permitiría realizar las pruebas de susceptibilidad.

De acuerdo con los datos del Registro Individual de Prestación de Servicios de Salud (RIPS) del año 2009 a junio de 2014, en Colombia se atendieron 14.754 personas por

infección gonocócica y en ese mismo período se recibieron aproximadamente 351(2,3%) aislamientos de *N. gonorrhoeae* en el programa de vigilancia del INS. De acuerdo con esta información, es importante desarrollar estrategias para que cada vez se realice un mayor número de cultivos para el diagnóstico de este patógeno y así poder mejorar la vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana (32).

Es de resaltar el significativo número de aislamientos recuperados a partir de niños y niñas menores de 15 años de edad, así como también la alta tasa (61,65 x 100.000) de Amazonas, comparado con Antioquia y Bogotá con tasas de 0,84 y 0,79 x por 100.000 habitantes respectivamente; esto puede deberse al hecho de que sea una región limítrofe con población de Brasil y Perú y al buen manejo del programa de vigilancia en el LSP de Amazonas de esa región.

En los datos de la vigilancia por laboratorio, en Colombia, durante el periodo de 1983-1993 se reportó la presencia de aislamientos productores de beta lactamasa en un 52%, así como una resistencia a penicilina y tetraciclina del 100% y 96% respectivamente (13,14), lo cual confirma que la resistencia a estos antimicrobianos se estableció en nuestro país previamente a los años 80. En este análisis ningún aislamiento fue sensible a la penicilina lo que significa que definitivamente no se debe utilizar como tratamiento lo cual concuerda con la literatura reportada.

En países latinoamericanos como Argentina, Chile, Perú y Uruguay se ha mantenido la sensibilidad antimicrobiana a la espectinomicina, al igual que en este análisis y a diferencia de lo reportado en Noruega en donde se halló un aislamiento con altos niveles de resistencia a la espectinomicina CIM >1.024 µg/mL (58).

En India se reportaron cepas con susceptibilidad disminuída a la ceftriaxona del 1,3%, 1,7% y 5,5% durante los años 2002, 2004 y 2006 respectivamente, al igual que en Suecia, Austria y Australia, donde se han identificado las cepas de *N. gonorrhoeae* caracterizadas como H041, F89 y A8806, que presentan resistencia no sólo a ceftriaxona, sino a penicilina G, a ciprofloxacina, azitromicina (menos la A8806) y son sensibles a espectinomicina. Este tipo de aislamientos no fueron encontrados en los 126 aislamientos estudiados en esta vigilancia (59).

Las fallas de tratamiento con cefalosporinas de tercera generación fueron reportadas inicialmente en el año 2007 con cefixime en Japón y posteriormente con ceftriaxona de pacientes con gonorrea en faringe, el reporte de estos fracasos de tratamiento se da en países desarrollados quizá porque la vigilancia es mejor llevada, pero se prevé que será tan solo cuestión de tiempo para que los gonococos plenamente resistentes se propaguen a nivel internacional convirtiéndose en una enfermedad intratable con mayor prevalencia de complicaciones graves como las infecciones neonatales o infección gonocócica diseminada. El aumento de la resistencia aumenta el costo para la sociedad debido a infecciones prolongadas y mayor número de pacientes con complicaciones como la infertilidad entre otras. Para buscar una salida a este inconveniente mundial la OMS en el año 2012 puso en marcha el plan de acción global para la detección temprana de cepas resistentes emergentes y buscar una oportuna respuesta de salud pública para prevenir y tratar la enfermedad gonocócica. En nuestro país podríamos empezar por mejorar la vigilancia, a través de la búsqueda de estas cepas resistentes, tal vez abordando grupos o poblaciones blanco mediante estudios centinelas en trabajadoras sexuales y hombres que tienen sexo con hombres, ya que estas cepas han sido halladas inicialmente en estos pacientes, para actuar oportunamente evitando la propagación (17, 60).

De acuerdo con la revisión bibliográfica, esta es la primera vez que en Colombia se realiza la detección de betalactamasa tipo TEM en aislamientos de *N. gonorrhoeae* PPNG, encontrándose una amplia circulación de TEM-1 frente a TEM-135 al igual que en un estudio de Inglaterra (61). TEM-135 ha sido reportada en diferentes áreas geográficas a nivel mundial (61 - 63). En este estudio los aislamientos de portadores de TEM-135 presentaron valores de resistencia a penicilina mayores que los aislamientos con TEM-1. Cabe destacar que las enzimas TEM se encuentran codificadas en plásmidos lo cual facilita su diseminación. Adicionalmente un cambio en la cadena de aminoácidos de estas enzimas puede cambiar el espectro de actividad haciendo que evolucionen de enzimas TEM de amplio espectro a enzimas TEM de espectro extendido lo cual es preocupante porque se puede generar resistencia a cefalosporinas de espectro extendido que pueden ser consideradas dentro del tratamientos de elección para cepas PPNG (61).

Este es el primer estudio de caracterización genotípica para *Neisseria gonorrhoeae*, hecho en Colombia, en donde se utiliza técnicas moleculares como PFGE y NG-MAST, por lo tanto son los primeros datos obtenidos que si bien no reflejan la realidad del país, si nos proporciona información relacionada con los perfiles de resistencia ante la emergencia mundial, tipo de clones circulantes y la relación genética, estableciendo una línea de base para posteriores estudios, y plantear la posibilidad de establecer una vigilancia nacional molecular activa en Colombia, al quedar estandarizadas las diferentes técnicas en el laboratorio nacional de referencia.

En Italia se encontró un porcentaje de multiresistencia de 10,2% el cual mostró un perfil de PFGE idéntico y todas las cepas contenían el ST 661. En este estudio se evidenció una multiresistencia similar de 11,11% sin embargo la PFGE los agrupó en 3 clúster C, F y H y no se encontró un ST común (64).

Algunos estudios han evidenciado la asociación entre el fenotipo de resistencia y el NG-MAST (65) otros por el contrario no lo han encontrado al igual que en este estudio (66), sin embargo, es de anotar que no todos los aislamientos fueron probados con el NG-MAST y posiblemente el bajo número probado no es suficiente para lograr establecer esta asociación.

El mayor número de ST nuevos fue establecido en Amazonas, el departamento con la mayor tasa de ataque (61,65 x 100.000) al cual pertenecían el mayor número de aislamientos del patrón sensible y tan solo se encontró 1 aislamiento con multiresistencia, esto quizá pueda deberse al alto porcentaje de población indígena a los que se les dificulta la interacción con las ciudades principales y lo hacen con otras comunidades y regiones de restricción geográfica y que solo ellos frecuentan.

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

encontrarse ningún ST predominante sin embargo es necesario analizar la totalidad de los datos obtenidos, estos mismos resultados han sido reportados previamente en países como Australia (66).

Aunque en Colombia existe una vigilancia por laboratorio desde hace más de dos décadas gracias a la cual se ha podido realizar este estudio, se hace necesario fortalecer los laboratorios de salud pública y demás instituciones que conforman la red nacional de laboratorios en cuanto a mejorar los métodos diagnósticos, así como crear alternativas para el óptimo transporte de los aislamientos, asegurando su viabilidad hasta su recuperación en el laboratorio de referencia.

El aumento en el número de casos de gonorrea ocurridos en viajeros, refugiados y migrantes ha sido reportado por varios autores, El 28% de casos de gonococia en España se detectaron en inmigrantes procedentes de áreas con altos niveles de resistencia a macrólidos (30%) y cefalosporinas (20%) suponiendo un peligro de diseminación de cepas de *N. gonorrhoeae* de difícil tratamiento (67). Aunque en Colombia no hay datos específicos sobre los casos presentados en este tipo de población, cuando se revisaron las cifras de Migración Colombia se encontró que el fenómeno de la inmigración ilegal está disparado, especialmente de asiáticos, y que Colombia se consolida como un país de tránsito para estos ciudadanos, como ocurre también para Bangladesh y Nepal. Migrantes viajan desde Asia o Europa hacia Brasil, país que no les exige visado. Desde allí, empiezan a viajar en una travesía hasta Ecuador o Venezuela para ingresar a Colombia por Ipiales o La Guajira.

Es así como hoy en día viven en Colombia extranjeros en condición de refugiados, es decir, de personas que huyen de su país de nacionalidad o residencia a causa de un temor fundado de ser perseguidas por motivos de raza, religión, nacionalidad, opinión política o pertenencia a un determinado grupo social.

Durante el año 2010 128.655 personas dejaron España y cada año se marchan medio millón de personas huyendo de la crisis que golpea este país con tasas de desempleo estimadas en 22,7 para el año 2011; se estima que 500.000 ciudadanos venezolanos

salen cada año en busca de seguridad política, económica y jurídica algunos de los cuales también llegan a Colombia huyendo de la inflación (25,4%)

La entidad que se encarga de atenderlas es la Oficina de las Naciones Unidas para los Refugiados, Acnur, en cuyas dependencias hay registros de refugiados de todas partes del mundo. Desde perseguidos durante la Segunda Guerra Mundial hasta quienes huyen del régimen cubano. A muchos de ellos se los encuentra cada vez que, por algún motivo, debe acudir a las oficinas de Acnur en Bogotá. En Colombia trabaja en cooperación con la Cancillería y el Secretariado Nacional de Pastoral Social. Por su carácter de organismo internacional y por mandato de la Convención de 1951 sobre el estatuto de los refugiados, tiene un rol de supervisión sobre esta materia (68).

En Colombia más de 3 millones de personas han sido desplazadas por el conflicto armado interno, con un evidente impacto en todos los ámbitos sociales. El desplazamiento forzado por la violencia constituye el factor más importante en la migración interna, con una cifra acumulada de 4.667.942 de personas desplazadas. Se estima que 3.378.345 colombianos residen en el exterior, especialmente en Estados Unidos (35%), España (23%) y Venezuela (19%) (69).

A pesar de un alto grado de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud, en Colombia persisten barreras para el uso pleno del derecho a la atención de salud por parte de las poblaciones rurales dispersas, con menor instrucción, indígenas y personas en situación de desplazamiento forzado. La Ley 1438 de 2011 ofrece la oportunidad de hacer más equitativo el sistema de salud y retoma la atención primaria como estrategia nacional.

Sin duda todos estos eventos facilitan la transmisión de la infección y por lo tanto de cepas probablemente multirresistentes. Por lo tanto, se requiere un programa integrado de educación, diagnóstico y tratamiento de las poblaciones de refugiados y migrantes para el control de enfermedades de transmisión sexual en estos grupos. No hay suficiente conciencia de los riesgos de infección por enfermedades de transmisión sexual entre los médicos que trabajan en atención al viajero. La mayoría de los programas para los viajeros se dirigen al SIDA. Se necesita un nuevo enfoque para promover la salud

---

sexual en los viajeros, a través de la educación sobre el comportamiento seguro, así como una conciencia sobre la responsabilidad por parte del paciente (26).

Es necesario incrementar la gestión por parte del Estado, en las políticas públicas, para desarrollar estrategias para mejorar el diagnóstico y la vigilancia de la gonorrea, como la integración entre los programas de vigilancia epidemiológica y vigilancia por laboratorio a nivel nacional, lo que permitiría obtener una información más robusta para la toma de decisiones.





# Conclusiones y recomendaciones

## Conclusiones

La vigilancia por laboratorio de las ITS en Colombia está limitada a tan solo algunas regiones que son las que participan activamente con el envío de los aislamientos al laboratorio de referencia. Adicionalmente se observa un bajo número de cultivos y una baja recuperación de estos debido a su labilidad y problemas con el tiempo de transporte.

*Neisseria gonorrhoeae* afecta principalmente hombres entre 15 y 34 años de edad, sin embargo, en las mujeres se encontró una afectación representativa en las niñas entre 1 y 9 años.

En este estudio no se encontró ningún aislamiento sensible a penicilina y la sensibilidad a tetraciclina fue tan solo de (4,8%). En cuanto a ciprofloxacina apareció la resistencia en el año 2006 según la vigilancia por laboratorio y para nuestro periodo de estudio esta alcanza una resistencia del 29%. El 11,11% de los aislamientos fueron resistentes a estos tres medicamentos. Para los otros tres antimicrobianos estudiados (Azitromicina, Espectinomina y Ceftriaxona) no se encontró resistencia, lo cual sugiere que se debe seguir con la vigilancia y realizar búsquedas quizá en poblaciones de riesgo. El fenotipo más frecuente fue el PPNG con un 26,98% encontrado en 6 departamentos, sin embargo 9 de los 10 departamentos presentaron aislamientos productores de Betalactamasa combinados con otro tipo de fenotipo.

La prueba de PFGE agrupó los 126 aislamientos en 17 clústers, siendo el más común el A con 19 cepas la mayoría productoras de penicilinas y circulantes en la mitad de los departamentos participantes.

Los aislamientos probados por la técnica de NG- MAST no mostraron clonalidad, No se encontró asociación entre estas dos técnicas talvez por el bajo número de aislamientos estudiados mediante NG-MAST. El 65% de los ST no han sido reportados aún en la base de datos global, la mayoría encontrados en Amazonas.

Como podemos concluir, estamos frente a un gran problema de salud pública y este estudio tan solo refleja la punta del iceberg en cuanto al desconocimiento real del problema por infra diagnóstico, multiresistencia lo cual para lograr controlar se requiere de una estrategia compleja multidisciplinaria integrando educación, campañas de prevención y promoción de prácticas sexuales más seguras, mejora en los métodos diagnósticos basados en las pruebas de sensibilidad, tratamiento oportuno y eficaz asegurando la disponibilidad de los medicamentos y una vigilancia nacional de *Neisseria gonorrhoeae*, concertada con organismos nacionales e internacionales con la participación de los servicios nacionales de salud públicos, privados y la comunidad de investigación.

## **Recomendaciones**

Fortalecer la vigilancia nacional, ampliando la cobertura a los departamentos que aún no participan.

Desde el laboratorio de referencia garantizar la calidad del diagnóstico y de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, mediante la capacitación continua a los profesionales de los laboratorios departamentales y pruebas de control de calidad directas e indirectas.

Elaborar informes de laboratorio, clínicos y epidemiológicos sobre la vigilancia de la resistencia de éste patógeno asegurando la comunicación de los resultados al clínico y a las personas que prescriben antimicrobianos.

Emitir recomendaciones a los pacientes, la comunidad en general y personas que prescriben y dispensan antimicrobianos para contener la resistencia de *N. gonorrhoeae* en nuestra región.

Declarar prioridad nacional la contención de la resistencia a los antimicrobianos, con políticas de salud claras, compromiso de entender, detener la problemática y designar autoridades y responsabilidades con la creación de un grupo intersectorial nacional, que disponga de recursos y que se exija la receta médica para obtener medicamentos antimicrobianos.

Elaborar y Actualizar constantemente las pautas nacionales sobre el uso adecuado de antibióticos, la guía de tratamiento de ITS debe ser revisada anualmente para ser ajustada según los datos proporcionados por la vigilancia nacional.

Establecer medidas para lograr vigilar los departamentos que carecen de información, con el planteamiento de sitios centinela o regionales que actúen como centros de recolección de aislamientos, o laboratorios de referencia los cuales luego envíen los aislamientos al nivel nacional.

Realizar un estudio más robusto en el departamento de Amazonas, debido a los importantes hallazgos obtenidos en el presente estudio para lograr establecer la situación real de la región.

Elaborar un protocolo de vigilancia epidemiológica para establecer las acciones claras asegurando que se realice el seguimiento a las fallas de tratamiento y a las reinfecciones con el fin de evitar la propagación especialmente de las cepas resistentes.

Elaborar un sistema de detección oportuna ante la aparición de los aislamientos con susceptibilidad disminuída o resistencia a cefalosporinas de tercera generación y tener un plan de acción para lograr la contención inmediata y así evitar la propagación de estas cepas.

Establecer medidas para que la información llegue a toda la población mediante panfletos, hoja informativa o volante en donde se describa claramente el problema

principalmente de la resistencia antimicrobiana producida por este microorganismo y se establezcan las medidas de control.

Emitir una circular por parte del Instituto Nacional de Salud en conjunto con el Ministerio de Protección Social dirigida a Secretarios de Salud Departamentales y Distritales, Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud y Entidades Administradoras de Planes de Beneficios, en donde se establezca un lineamiento nacional para el fortalecimiento del control de la resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en donde se inste a los profesionales de la salud a hacer un uso racional de los antibióticos, fortalecer las acciones de promoción del uso adecuado del condón y prevención de las infecciones de transmisión sexual, asegurar que se utilicen las guías de práctica clínica vigentes, promover el cultivo en todos los casos de fallas de tratamiento y establecer unos sitios centinelas con el fin de conocer la incidencia real de la enfermedad y continuar con estudios moleculares y de susceptibilidad antimicrobiana.

En investigaciones futuras se hace necesario procesar mediante la técnica de NG-MAST la totalidad de los aislamientos debido a la alta variabilidad de los genes para lograr establecer el ST circulante en el país.

## Bibliografía

1. Mayor M, Roett M y Uduhiri K. Diagnosis and Management of gonococcal infections. *American Family Physician*. 2012;86:931-8.
2. Elías J, Frosch M, Vogel U. *Neisseria*. En K. C. Versalovic J, Carrol K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D. Manual of Clinical Microbiology 10th edition. Washington: Society for microbiology. 2011; 1: 559-73.
3. Martinez M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual (ITS). *Infectio*. 2009;26:529-39.
4. Hammerschlag M. Chlamydial and Gonococcal infections in infants and children. *Clinical Infection Diseases*. 2011;S3:S99-S102.
5. Santander E, Salvo A, Schillcrot F, Mendoza M, Amigo M, Garcia M, et. al. . Normas de manejo y tratamiento de Infecciones de Transmisión sexual (ITS) Ministerio de salud Chile. 2008: 9-111.
6. WHO. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. 2012. disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf).
7. Workowski KA, Berman S., Center for Disease Control and Prevention (CDC) Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010 (published correction appears in *MMWR Recomm Rep*. 2011; 60(1):18 ). *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-12):1-110.
8. Gaitán HG, Rodríguez AE, Arévalo I, Angel E, López HE, Estrada JS. Guía de práctica clínica para el manejo sintromico de los pacientes con infecciones de transmisión sexual y otras infecciones del tracto genital - 2013. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2013;64:126-77.

9. Ojeda G, . Ordoñez, M. Ochoa, L. Infecciones de transmisión sexual (ITS). Encuesta Nacional de Demografía y Salud en Colombia. 2010:331-8.
10. Unemo M, Nicholas R. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoeae. *Future Microbiol.* 2012;7:1-22.
11. Rui-xin Y, Yuepin Y, Guan-qun W., Shao-chun Ch, Bing-jie Z, Xiu-qin D, Yan H, Qi L, Guo-yi Z, Xiangsheng Ch. Worldwide susceptibility rates of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to cefixime and cefpodoxime: A systematic review and Meta-Analysis. *PLOS ONE.* 2014;9:1-10.
12. Manzano S, Lacroix L. A new multidrug resistant strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. *The New England journal of medicine.* 2014;371:1850-55.
13. Vela M, Vargas C. Determinación de la betalactamasa en cepas de *Neisseria gonorrhoeae*. *Biomédica.* 1994;14:16-21.
14. Vargas C, Sanabria O. Susceptibilidad de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* a la penicilina y a la tetraciclina. *Biomédica.* 1996;212-6.
15. Starnino S, GASP-LAC Working Group, Galarza P, Trigoso M, Schwartz A, Maldonado A, Sanabria O et.al. Retrospective analysis of antimicrobial susceptibility trends (2000-2009) in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from countries in Latin America and the Caribbean shows evolving resistance to ciprofloxacin, azithromycin and decreased susceptibility to ceftriaxone. *Sex Transm Dis.* 2012;39:13-21.
16. OPS. Alerta epidemiológica resistencia *Neisseria gonorrhoeae* multiresistente. 15 de Julio de 2011. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=14024&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=14024&lang=es).
17. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Disponible en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/>
18. Instituto Nacional de Salud Colombia, exámenes de interés en salud pública, estadísticas *Neisseria gonorrhoeae*. Disponible en:

- <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/exámenes-de-inter%20C3%A9s-en-salud-publica/Microbiología/ITS%20microbiologia%20Ng%20junio%202014.pdf>
19. Dillon J, Ruben M, Li H, Borthagaray G, Marquez C, Fiorito S et. al. Challenges in the control of gonorrhoeae in south América and the Caribbean: Monitoring the development of resistance to antibiotics. *Sexually Transmitted Diseases*. 2006;33:87-95.
  20. OMS. Organización Mundial de la Salud. Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. 2005. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43188/1/9243546260\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43188/1/9243546260_spa.pdf).
  21. European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* – results from a pilot study 2010–2011. Stockholm: ECDC; 2012. Stockholm, October 2012 ISBN 978-92-9193-389-1 doi 10.2900/63359. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/201211109-Molecular-typing-gonorrhoea.pdf>.
  22. Lugones M, Molinet I, Quintana Y, Vázquez M. Sífilis y gonorrea; parte de su historia. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, octubre-diciembre. 1995.
  23. Sosa J. Estudio de la resistencia a los Antimicrobianos y Caracterización Molecular en Cepas de *Neisseria gonorrhoeae* Aisladas en Cuba. 2002. Disponible en: [http://tesis.repo.sld.cu/21/1/jorge\\_sosa.pdf](http://tesis.repo.sld.cu/21/1/jorge_sosa.pdf).
  24. Dans P. Gonococcal anogenital infections. *Clin Obstet Gynecol* 1975;10:24-32.
  25. Henderson R. Enfermedades venéreas: un problema de salud nacional. *Clin Obstet Gynecol*. 1975:211-21.
  26. Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. WHO/CDS/CSR/2001.3. (en línea) 2001: Disponible en URL: [http://www.who.int/emc-documents/antimicrobial\\_resistance/whocdscsrdrs20013c.html](http://www.who.int/emc-documents/antimicrobial_resistance/whocdscsrdrs20013c.html).
  27. Unemo M, Ballard R, Ison C, Lewis D , Ndowa F , Peeling R. Diagnostico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, 2013. ISBN 978 92 4 350584 8 . Disponible en:

[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=28913&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=28913&lang=es).

28. Serwin A, Koper M y Unemo M. Gonorrhoea in 21st Century- International and polish situation. *Przegl Epidemiol.* 2014;68:39-44.
29. Díez M, Díez A. Infecciones de transmisión sexual: Epidemiología y control. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. *Rev. Esp. Sanid. Penit.* 2011; 13: 58-66
30. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Infecciones de transmisión sexual: Diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Madrid, 2011.
31. Centers for Disease Control and Prevention. *Sexually Transmitted Disease Surveillance 2013*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2014.
32. Ministerio de Salud y Protección Social. RIPS 2009 – 2011. [https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio\\_vih/documentos/monitoreo\\_evaluacion/1\\_vigilancia\\_salud\\_publica/a\\_sit](https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio_vih/documentos/monitoreo_evaluacion/1_vigilancia_salud_publica/a_sit) . Consultado: septiembre 26 de 2015.
33. Alvis N, Mattar S , Garcia J , Conde E, Diaz A. Infecciones de Transmisión Sexual en un Grupo de Alto Riesgo de la Ciudad de Montería, Colombia. *Rev. salud pública* 2007;1:86-96.
34. Koneman E. Diagnostico Microbiologico. In: 2008 MP, editor. 6a ed2008. p. 541-80.
35. Pardi G, Perez MF, Pacheco A, Henning M. Algunas Consideraciones sobre *Neisseria gonorrhoeae*. *Acta Odontologica de Venezuela.* 2004;42. ISSN 0001-6365.
36. Ng LK, Martin I. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Canadian Journal Infect Dis Med Microbiol.* 2005;16:15-24.
37. Salyers A., Whitt D. Bacterial Pathogenesis A molecular approach, second edition.2002: 441-447.
38. Brooks GF. Microbiología médica: Jawetz, Melnick y Adelberg: McGrawHill; 2013.



39. Knapp JS. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. . Organización Mundial de la Salud, Centro para el control y la prevención de enfermedades. 2004:69-109.
40. Dillon J. Manual para el Laboratorio Identificación de *Neisseria gonorrhoeae* y análisis de su susceptibilidad a los antibióticos. Centro coordinador GASP LAC. 2012;2.
41. Sussmann O, Mattos L, Restrepo A. Resistencia bacteriana. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>.
42. Sparling P, Sarubi F, Blackman E. . Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.*1975;124:740-9.
43. Pérez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev. Med. MD* 2013;4:186-91.
44. Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*.. WHO/CDS/CSR/2001.3. (en línea) 2001: Disponible en URL:[http://www.who.int/emc-documents/antimicrobial\\_resistance/whocdscsrdrs20013c.html](http://www.who.int/emc-documents/antimicrobial_resistance/whocdscsrdrs20013c.html).
45. Bradford P. 2001. "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." *Clin Microbiol Rev.* 2001; 48:933-51.
46. Jacoby A, Muñoz L. (2005). «mechanisms of disease: The New beta-Lactamases». *N Engl J Med.* **352** (4): 380–391. doi:10.1056/NEJMra041359. PMID 15673804.
47. Chisholm S, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole M, Ison C, Van de Laar M. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill.* 2013;18(3): pii=20358. Available online: [http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx? ArticleId=20358](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20358).

48. Bignell C, Unemo, M. On behalf of the European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. 2013;24:85-92.
49. Adu-Sarkodie YA. Antimicrobial self-medication in patients attending a sexually transmitted diseases clinic. *Int J STD AIDS* 1997;8:456–458.
50. Klausner JD et al. Correlates of gonococcal infection and of antimicrobial resistant *Neisseria gonorrhoeae* among female sex workers, republic of the Philippines, 1996–1997. *J Infect Dis* 1999; 179:729–733.
51. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. . 2015: M100-S21. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute 2015.
52. Rice R, Knapp J. Antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* strain representing five distinct resistance phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother* 1994;38:155-58.
53. Unemo M and Dillon J Review and International Recommendation of Methods for Typing *Neisseria gonorrhoeae* Isolates and Their Implications for Improved Knowledge of Gonococcal Epidemiology, Treatment, and Biology. *Clinical microbiology reviews*, July 2011, p. 447–458.
54. Martin I, Ison C, Aanensen D, Fenton K and Spratt B. 2004. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* 189:1497–1505.
55. Monstein H, Ostholm, B., Nilsson, V. Multiplex PCR amplification assay for the detection of SHV, TEM and CTX-M genes in Enterobacteriaceae. Journal Compilation. 2007.
56. Base de Datos estándar para nucleótidos, secuencias similares. TEM [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).
57. CDC. Center for Disease Control and Prevention. USA Epi Info™ 713 2014.
58. Unemo M, Golparian D, Skogen V, Olsen A, Moi H, Syversen G et al. *Neisseria gonorrhoeae* strain with high-level resistance to Spectinomycin due to a novel

- resistance mechanism (mutated ribosomal protein S5) verified in Norway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57:1057-61.
59. Bala M, Ray K, Gupta S, Muralidhar S y Jain R. Changing trends of antimicrobial susceptibility patterns of *Neisseria gonorrhoeae* in India and the emergence of ceftriaxone less susceptible *N. gonorrhoeae* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60:582-86.
60. Antimicrobial resistance global report on surveillance 2014. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf).
61. Cole MJ, Unemo M, Grigorjev V, Quaye N, Woodford N. Genetic diversity of blaTEM alleles, antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological characteristics of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(12):3238-43.
62. Gianecini R, Oviedo C, Littvik A, Mendez E, Piccoli L, Montibello S, Galarza P. Identification of TEM-135  $\beta$ -lactamase in *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying African and Toronto plasmids in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):717-20.
63. Chen SC, Yin YP, Dai XQ, Yu RX, Han Y, Sun HH, Ohnishi M, Unemo M, Chen XS. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their bla(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. *Sex Transm Dis*. 2013; 40(11):872-6.
64. Carannante A, Renna G, Conte D, Ghisetti V, Et al; Changing Antimicrobial Resistance Profiles among *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Italy, 2003 to 2012, *Journals Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58: 5871-5876.
65. Thakur S, Levett P, Horsman G, Dillon J. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Saskatchewan, Canada: utility of NG-MAST in predicting antimicrobial susceptibility regionally. *Sex Transm Infect* 2014; 90:297–302.

66. O'Reilly L, Goire N, Fisk R and Speers D. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* using multi-antigen sequence typing and pulse-field gel electrophoresis in highly endemic Western Australian populations, *BMC, Infectious Diseases*. (2015); 15:272.
67. Galán J, Moreno A, Baquero F. Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Rev Esp Salud Pública* 2014; 88:829-837.
68. Gutiérrez E. Un refugio llamado Colombia. Disponible en:  
<http://www.elespectador.com/noticias/elmundo/un-refugio-llamado-colombia-articulo-354038>.
69. Valero M, Tanner M. Globalización y Salud. El caso de las enfermedades tropicales y olvidadas. *Rev.MVZ Córdoba* 13(1):1252-1264. 2008. Disponible en:  
<http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-131/V13N1A15.pdf>.