

Bioquimia

Volumen 27
Volume

Número 3
Number

Septiembre 2002
September

Artículo:

Susceptibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Susceptibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba

Carmen A. Llorente¹, Jorge Sosa^{*2}, Rafael Llanes², Julia Pérez³, Jonatan Hernandez³

¹Hospital Gineco-Obstétrico Ramón Glez Coro, Ciudad de la Habana, Cuba. ²Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Ciudad de la Habana, Cuba.

³Instituto Superior de Ciencias Médicas, Ciudad de la Habana Cuba, Instituto Finlay, Ciudad de la Habana.

*Sobretiros: Laboratorio de Neisserias Patógenas, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 537 33 60 51, e-mail: sosa@ipk.sld.cu.
Recibido: 14/09/01 Aceptado: 7/08/02

Resumen

Se estudiaron 37 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en diferentes provincias de Cuba; se analizó el perfil plasmídico en 37 aislamientos y en 34 se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a diferentes antimicrobianos (penicilina, tetraciclina, espectinomicina, cefuroxima, ciprofloxacina, cefotaxima y ceftriaxona). El 65.63% de las cepas estudiadas resultaron resistentes a la penicilina (CIM $\geq 2 \mu\text{g/mL}$) y el 59.37% a la tetraciclina (CIM $\geq 2 \mu\text{g/mL}$). Todas las cepas fueron sensibles a las cefalosporinas, espectinomicina y la ciprofloxacina. Se encontraron 19 cepas PPNG (59.37%), 3 TRNG (9.38%) y una mostró resistencia cromosomal a la tetraciclina. Se aislaron los plásmidos de 3.2 Mda y 4.4 Mda, en 15 y 4 cepas respectivamente. En 3 cepas se encontró el plásmido de 25.2 Mda. El plásmido de 24.5 Mda se asoció significativamente con el plásmido de 3.2 Mda ($p=6.412 \times 10^{-3}$), siendo el perfil plasmídico predominante el 2.6/3.2/24.5 Mda con 13 cepas. El 16.21 % de las cepas resultó libre de plásmidos. La determinación del perfil plasmídico constituyó una herramienta útil en la caracterización de cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, contribuyendo al conocimiento de la resistencia antimicrobiana de las cepas que circulan en Cuba.

Palabras clave: *Neisseria gonorrhoeae*, plásmidos y susceptibilidad antimicrobiana

Abstract

Thirty-seven strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from several province of Cuba were studied; the plasmid profile was analysed in 37 isolates and minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in 34 strains for several antimicrobial drugs (penicillin, tetracycline, spectinomycin, cefuroxime, ciprofloxacin, cefotaxime and ceftriaxone). The 65.63% were resistant to the penicillin (MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$) and 59.37% to the tetracycline (MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$). All the strains were sensitive to cephalosporins studied, spectinomycin and ciprofloxacin. Of the 32 strains 19 were PPNG (59.37%), 3 TRNG (9.38%) and only 1 showed chromosomal resistance to tetracycline. The plasmids of 3.2 Mda and 4.4 Mda were isolated from 15 and 4 strains respectively. In 3 strains was found the 25.2 Mda plasmid. The 24.5 Mda plasmid was significantly associated with the 3.2 Mda plasmid ($p=6.412 \times 10^{-3}$), being predominant the 2.6/3.2/24.5 Mda plasmid profile (13 strains). In six strains (16.21%) was not possible find plasmids. A high incidence of strains with high level of resistance to penicillin was demonstrated. The determination of the plasmid profile constituted an useful tool in the characterization of strains of *Neisseria gonorrhoeae*, contributing to knowledge of the phenomenon of the antimicrobial resistance of strains circulating in Cuba.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, plasmids, antimicrobial susceptibility.

Introducción

Neisseria gonorrhoeae ha demostrado una gran adaptación a la presión evolutiva impuesta por la farmacoterapia en los últimos 50 años. En 1937 las sulfonamidas, curaban el 95% de los casos, en pocos años hubo fallo clínico en el 80% de los pacientes. En 1943, los aislamientos eran uniformemente sensibles a la penicilina G, ya a fines de la década del 50 se detectó en Europa un aumento de la resistencia a este antimicrobiano. Antes de 1955 el 0.6% de las cepas requerían más de 0.03 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina para inhibir su crecimiento y en 1969 esta cifra se elevó al 65%. Por lo anteriormente expuesto se incrementó la dosis terapéutica hasta 4 800 000 U/día (dosis actual), ante la cual aparecieron nuevos reportes de fracasos al tratamiento. De manera similar ya en 1972 el tratamiento de la

gonorrea con una monodosis de tetraciclina o sus análogos no era efectivo. Cepas resistentes a la espectinomicina se han reportado desde 1973.^{1,2,3}

La resistencia genética de *Neisseria gonorrhoeae* es cromosómica o plasmídica. La aparición de plásmidos que codifican para la producción de enzimas β -lactamasa en *Neisseria gonorrhoeae*, prevista en 1975, se reportó simultáneamente en Reino Unido y E.U. en 1976 encontrándose dos plásmidos de resistencia con una talla molecular de 3,2 MDa (tipo africano) y 4,4-4,7 MDa (tipo asiático) respectivamente. Desde entonces se han descrito otros 6 plásmidos de resistencia para la penicilina: el de 2.9 MDa (variedad Río), el de 3.05 MDa (variedad Toronto), el de 4.0 MDa (tipo Nimes), el de 6.0 MDa (variedad Nueva Zelandia) y los más recientemente reportados,

en 1997, el de 3.9 Mda y el de 2.2 Mda.^{4,5,6,7} En 1982 se identifica en una cepa de *N. gonorrhoeae* el plásmido conjugativo de 25.2 Mda el cual porta el determinante *tet-M* de alto nivel de resistencia para la tetraciclina. La resistencia plasmídica está mundialmente difundida, alcanzando niveles endémicos en muchas regiones, las cepas con esta resistencia tienen además el peligro de la transmisión horizontal de esta característica biológica.^{5,7,8,9}

En Cuba ha habido un incremento del número de casos de gonorrea, desde 130 en 1960 hasta más de 23200 en 1999.¹⁰ En Cuba rige un Programa de Control y Prevención de la Enfermedad Gonocócica por más de tres décadas, donde se norma como drogas para el tratamiento de esta infección a la penicilina y la tetraciclina. Además, en nuestro país hay escasos estudios publicados de la sensibilidad antimicrobiana por el método de concentración inhibitoria mínima (CIM)^{11,12} y sólo un estudio anterior de perfil plasmídico de 6 cepas aisladas en adultos jóvenes con conjuntivitis.¹³ En este estudio nos propusimos determinar la susceptibilidad antimicrobiana y perfil plasmídico en cepas de *N. gonorrhoeae* con el fin de contribuir al conocimiento de la resistencia antimicrobiana de este agente en Cuba.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se estudiaron 37 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas de diferentes provincias de Cuba (30 pertenecientes al año 1995 y 7 al año 1997), las cuales fueron enviadas al Laboratorio de Referencia Nacional de Neisserias Patógenas; se recibieron en el medio de transporte y conservación de gonococos TCG. Para la identificación de las cepas se subcultivaron en el medio de agar chocolate base GC (BioCen) enriquecido con Isovitalex (Oxoid) al 1% (v/v). Las placas fueron incubadas entre 18 y 24 horas a 36°C, en atmósfera de 5% de CO₂ y posteriormente se realizaron las siguientes pruebas: coloración de Gram, prueba de Oxidasa por el método de Kovacs, prueba de superoxol (catalasa con peróxido de hidrógeno al 30%), así como la prueba de degradación de hidratos de carbono (base de agar CTA (Oxoid) con 1% de glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y fructosa)¹⁴; se conservaron en caldo Triptona Soya con glicerol al 20 % a -70°C hasta su procesamiento. Para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana se utilizaron las cepas controles: *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226, WHO III, WHO V y WHO VII. Para el análisis del perfil plasmídico se emplearon las cepas controles C3- *Neisseria gonorrhoeae* (Libre de plásmidos, utilizada también como control negativo en la prueba de β -lactamasa), GC-182 - *Neisseria gonorrhoeae* (plásmidos 2.6, 4.5, 24.5 Mda) y GC-3976- *Neisseria gonorrhoeae* (2.6, 3.2, 25.2 Mda), la cual se utilizó también como control positivo para la prueba producción de β -lactamasa.

Susceptibilidad antimicrobiana

La técnica de CIM en dilución en agar se realizó según lo recomendado por el Comité Nacional de Normas para el Laboratorio Clínico

(NCCLS), M100S9.¹⁵ Se emplearon los antimicrobianos penicilina (Wyeth-Ayer St Canada Inc., St-Laurent, QC), tetraciclina (tetraciclina (Pfizer Canada Inc., Pte Claire, QC), espectinomicina (Upjohn Co. of Canada, Don Mills, ON), ciprofloxacina (Bayer Inc., Etobicoke, ON), cefuroxima (Hoffman-LaRoche, Mississauga, ON), cefotaxima (Hoffman-LaRoche, Mississauga, ON), y ceftriaxona (Hoffman-LaRoche, Mississauga, ON).

Producción de β -lactamasa

Se utilizó el método de la Cefalosporina cromógena (Cefinase, BBL, England), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción del ADN plasmídico

Para la extracción del ADN plasmídico se usó el método descrito en Protocols and Application Guide (Promega).¹⁶ La electroforesis se realizó en una cámara submarina (HOEFER Scientific Instruments) usando un portagel de 20 por 25cm. Como fuente de voltaje se usó un equipo BioRad modelo 200/2.0. La agarosa (ADN/ARN, LKB 2206-105) se preparó al 0.8% en tampón Tris-acetato pH 8.0 (con bromuro de etidio al 5%), el cual se usó también como solución de corrida para la Electroforesis. De cada muestra se aplicaron 20 μ L por pocillo y la corrida se efectuó a 50 voltios durante 3 horas. Se utilizó el marcador de corrida fago Lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Promega), del cual se aplicó 1 μ L en tres μ L de volumen total.

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba *z* para la comparación de proporciones, en el análisis de la diferencia de frecuencias de asociación del plásmido conjugativo de 24.5 Mda, con los de resistencia a la penicilina.

Resultados

Susceptibilidad frente a los antimicrobianos

Se determinó la CIM en 34 cepas, 28 correspondientes al año 1995 y el resto a 1997. Dos aislamientos del año 1995 no fueron estudiados para los fármacos penicilina, tetraciclina y cefuroxima al aparecer como contaminadas en el ensayo para dichos antimicrobianos. Los resultados por criterios de susceptibilidad frente a cada antimicrobiano se exponen en la Cuadro 1.

La penicilina y la tetraciclina fueron los antimicrobianos frente a los cuales la sensibilidad de las cepas fue menor. En el caso de la penicilina el 65.63% de las cepas fueron resistentes, el 28.13% mostró sensibilidad intermedia, siendo completamente sensibles sólo el 6.25% de las mismas. Frente a la tetraciclina el 59.37% de las cepas fueron resistentes, el 21.87% tuvo sensibilidad intermedia y las sensibles abarcaron solamente el 18.76% del total. El 64.7 % del total de cepas estudiadas mostraron ser sensibles a

Cuadro 1. Distribución de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* según criterios de susceptibilidad antimicrobiana.

Antimicrobianos	Criterios		
	Resistente	Intermedia	Sensible
Penicilina n=32	21	9	2
Tetraciclina n=32	19	7	6
Espectinomicina n=34	0	12	22
Cefuroxima n=32	0	0	32
Ciprofloxacina n=34	0	0	34
Cefotaxima n=34	0	0	34
Ceftriaxona n=34	0	0	34

Cuadro 3. Distribución y frecuencia relativas de plásmidos en cepas de *Neisseria gonorrhoeae*.

Plásmido (MDa)	No. cepas	%
2.6	29	40.85
24.5	18	25.35
3.2	15	21.13
25.2	3	7.04
4.4	4	5.63

espectinomicina, no se detectaron cepas resistentes a este fármaco, ni a la ciprofloxacina, ni las cefalosporinas estudiadas.

Multiresistencia: Las 19 cepas con resistencia a más de un antimicrobiano solamente involucraron a la penicilina y la tetraciclina para un 59.37%.

Los valores de CIM para la penicilina y la tetraciclina de 32 cepas y la producción de β -lactamasa permitió clasificarlas como se describe en la Cuadro 2.

Se observó un predominio de las cepas PPNG que representaron más de la mitad del universo de las cepas estudiadas. Mientras que la incidencia de cepas CMRNGt fue muy baja.

Perfil plasmídico: Se le realizó extracción y análisis del ADN plasmídico a las 37 cepas de estudio. En 31 cepas fue posible detectar alguna clase de plásmido, lo que representó el 83.78% del

Cuadro 2. Clasificación de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* por grupos.

GRUPO	No. de cepas	%
PPNG	19	59.37
TRNG	3	9.38
CMRNGt	1	3.12
Susceptibles	9	28.13
TOTAL	32	100.00

PPNG: *Neisseria gonorrhoeae* productora de penicilinas. **TRNG:** *Neisseria gonorrhoeae* con alto nivel de resistencia a la tetraciclina (CIM \geq 16 mg/L). **CMRNGt:** *Neisseria gonorrhoeae* con resistencia cromosómica a la tetraciclina. ⁶

Cuadro 4. Distribución de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* según perfil plasmídico.

Perfil plasmídico (MDa)	No. cepas	%
2.6/3.2/24.5	13	35.13
2.6	5	13.51
2.6/25.2	3	8.11
2.6/4.4/24.5	3	8.11
2.6/24.5	2	5.41
2.6/3.2	2	5.41
24.5	2	5.41
2.6/4.4	1	2.7
Libre de plásmidos	6	16.21
TOTAL	37	100.00

total de las mismas. En la Cuadro 3 se muestra la distribución y frecuencia relativas de los plásmidos encontrados.

Tres tipos de plásmidos fueron hallados, el críptico (2.6 MDa), conjugativo (24.5 MDa) y de resistencia, dos variantes para la penicilina, el Africano (3.2-3.4 MDa) y el Asiático (4.4 MDa). En tres cepas se encontró una banda por encima del ADN cromosomal y los valores de CIM obtenidos en estas cepas para la tetraciclina fueron todos superiores a 16 μ g/mL; pudiéndose plantear presuntivamente que dicha banda corresponde al plásmido conjugativo de 25.2 MDa, portador del determinante *tet-M* que confiere un alto nivel de resistencia frente a este antimicrobiano. Los resultados de la distribución de las cepas, según los perfiles plasmídicos encontrados se muestran en la Cuadro 4.

La combinación de plásmidos más frecuente fue la del plásmido críptico (2.6 MDa), el plásmido Africano (3.2 MDa) y el conjugativo de 24.5 MDa; este perfil representó el 59.09% de las cepas con

resistencia mediada por plásmidos. La asociación del plásmido de 24.5 MDa con el plásmido de 3.2 MDa fue significativamente mayor que con el de 4.4 MDa ($p=6.412 \times 10^{-3}$).

Los perfiles plasmídicos hallados en nuestro estudio se muestran en la siguiente figura:

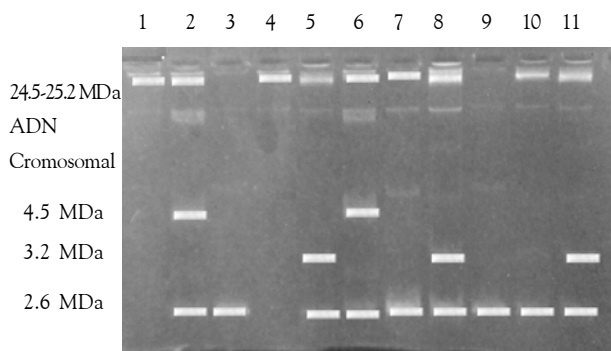


Figura 1. Algunos de los perfiles plasmídicos encontrados. Pocillo 1: cepa control libre de plásmidos C3. Pocillo 2: cepa control 182. Pocillos 3-10: cepas silvestres. Pocillo 11: cepa control 3976.

Discusión

El Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisserias* Patógenas (Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí") recibe un volumen reducido de cepas en comparación con el número de casos notificados de la enfermedad a las autoridades de salud, lo cual impide obtener resultados representativos de la circulación del microorganismo y susceptibilidad antimicrobiana en el país. Este trabajo aporta información sobre el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana por el método de dilución en agar y a su vez sobre el contenido plasmídico en aislamientos de gonococos desde diferentes provincias del país, permitiendo de esta forma conocer elementos genéticos responsables de la resistencia a la penicilina.

La resistencia a la penicilina fue tan alta como el 65.63% de las cepas estudiadas, siendo entre éstas el mecanismo plasmídico el predominante. El porcentaje de cepas PPNG (59.37) encontrado en nuestras cepas de estudio se asemeja a los reportados en Singapur¹⁷, donde esta clase de aislamiento ocupó el 35%, en Filipinas¹⁸ 30-70%, Rwanda¹⁹ 70.5% y Malawi²⁰ 36%, quedando por encima de lo encontrado en países de Europa²¹ y América Latina²² y por debajo de otros estudios realizados en África²³. Respecto a la evolución de esta resistencia en nuestro medio, en 1986 se detecta en Cuba la primera cepa productora de β -lactamasa (C Almanza, 1986, comunicación personal) y en 1989 24 cepas cubanas fueron estudiadas por Dillon (1990, Comunicación personal, Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual, Ottawa) encontrándose

que la cifra de cepas PPNG ocupó el 37.5%; nuestros resultados (59.37%) reflejan un incremento del 21.88%. En Taiwan hubo un dramático incremento de aislamientos PPNG a partir de 1976 (alrededor del 5%) hasta 1985 (50%), observándose una estabilidad en valores de 52-62% durante 1985 hasta 1990, aún después de haber puesto fin a la penicilina como droga de lección en la profilaxis y tratamiento de la gonorrea.²⁴ En otros países, como Estados Unidos, aunque la proporción de cepas con altos niveles de resistencia a la penicilina no es tan elevada, sin embargo se han reportado epidemias locales por este tipo de cepas.²⁵ Llama la atención la no detección en nuestro trabajo de cepas con resistencia a la penicilina de tipo cromosómico, este hecho ha sido reportado también por otros autores²⁶ y pudiera estar en relación con que en nuestro estudio no están representadas todas las posibles variantes de las cepas circulantes. La detección de los niveles de resistencia cromosómica frente a la penicilina es un elemento que tiene gran importancia en el conocimiento y control de la enfermedad gonocócica, hay autores que han planteado que existe un alto grado de correlación entre estos niveles y el aumento de los valores de CIM frente a la ceftriaxona, por lo que el comportamiento ascendente de los niveles de resistencia frente a la penicilina, pudieran alertar sobre la aparición de cepas menos sensibles frente a esta cefalosporina, que en estos momentos muestra gran efectividad terapéutica.²⁷ Está descrita una asociación entre las CIM de cepas resistencia cromosomal a la penicilina y la tetraciclina y cepas exhibiendo una susceptibilidad disminuida a la ceftriaxona.²⁸

No sólo se ha incrementado la proporción de cepas resistentes a la tetraciclina, sino también los valores de CIMs. En 1989, el 29.17% de las cepas estudiadas fueron resistentes a la tetraciclina, pero ninguna cepa presentó una CIM mayor de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (Dillon, 1990, comunicación personal, Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual, Ottawa) mientras que en estudios posteriores,¹² ya se encuentran cepas con CIM $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$. En el presente trabajo ya aparecen cepas con CIM $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ para este antimicrobiano. Este fenómeno de resistencia a la tetraciclina es también frecuente y ha sido previamente reportado.⁸

El hecho de que más del 60% de las cepas del presente estudio hayan sido resistentes a la penicilina y la tetraciclina respectivamente y que más del 50% lo fueran a los dos antibióticos, apoya y demuestra la causa de los fracasos terapéuticos frecuentes en nuestro medio, según observación personal, frente a la aplicación de esquemas de tratamiento basados en estos fármacos.

Coincidimos con otros autores nacionales, que han planteado la hipótesis de que en nuestro país la circulación de cepas con altos niveles de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina es endémica, hecho también encontrado en estudios regionales, como en Jamaica.²⁹

El perfil plasmídico que predominó en el estudio fue 2.6/3.2/24.5. Es interesante tan alta prevalencia de este perfil plasmídico, el cual desde su primer reporte hecho por Dillon en 1981³⁰ se ha aislado de manera creciente en Europa.³¹ En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se detectó esta asociación de plásmidos en 6 cepas aisladas de la conjuntiva de adultos jóvenes.¹³

Los dos plásmidos de resistencia a la penicilina encontrados (3.2 y 4.4 MDa), son los plásmidos más difundidos de manera general en el mundo,²³ coexistiendo y siendo la causa de altos niveles de resistencia para ese antimicrobiano en muchos países.³ Comparando los plásmidos encontrados en el presente trabajo con los del estudio de las cepas cubanas en 1989, (Dillon, 1990, comunicación personal, Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual, Ottawa) vemos que fueron los mismos tipos encontrados y en proporción semejante. En la presente investigación el plásmido de 3.2 aportó el 78.95% del alto nivel de resistencia (entre las cepas PPNG); en el estudio realizado por Dillon en aquel momento (1989), el plásmido Asiático ocupó el 77.7% entre las cepas PPNG. Sin embargo, con la resistencia plasmídica a la tetraciclina resultó ser muy diferente, el plásmido de 25.2 MDa se detectó en 3 aislamientos del presente estudio mientras que en el de 1989 las CIMs para este antibiótico no superaron el valor de 4 µL/mL. Este hallazgo sugiere la necesidad de confirmación por métodos moleculares de la clase de determinante *tet-M* en nuestras cepas con alto nivel de resistencia a la tetraciclina para posteriores estudios.

La resistencia del gonococo a la espectinomicina se ha reportado en varios países, esta se ha visto asociada o no a la resistencia frente a otros antibióticos, incluso en algunos lugares estas cepas han sido la causa de brotes de infección gonocócica;³² la resistencia a esta droga tampoco ha sido reportada anteriormente en nuestro medio.

Aunque todas las cepas analizadas fueron sensibles a la ciprofloxacina, la susceptibilidad a esta droga debe mantenerse bajo estricta vigilancia, teniendo en cuenta que ya existen regiones en Cuba en las que se ensayan estudios de eficacia de ciprofloxacina de fabricación nacional en el tratamiento de la gonorrea y que existe el primer reporte de la primera cepa resistente a esta droga en nuestro medio;³³ se ha reportado por numerosos autores niveles importantes de resistencia del gonococo a las fluoroquinolonas, por ejemplo en Hawai se ha observado un incremento considerable de cepas de gonococo con significativa resistencia a la ciprofloxacina (CipR; CIMs > or = 1 µ/mL) desde el año 1998.³⁴ Cuando examinamos la historia de la adaptación al medio de esta bacteria, es llamativo que la velocidad de la aparición de resistencia frente a este antimicrobiano, ha sido mucho mayor que la que ha desarrollado frente a otros antibióticos como la penicilina y la tetraciclina.²⁵ La sensibilidad general de nuestras cepas a las cefalosporinas,

coincide con otros reportes.³⁵ Se demuestra la presencia y se caracterizan elementos genéticos causantes de este problema en las cepas estudiadas, y se incorpora una herramienta más en la caracterización de la *Neisseria gonorrhoeae* que circulan en nuestro medio y apoya la idea de una urgente intervención en la política de tratamiento de la enfermedad gonocócica en Cuba.

Referencias

- Kampmeier RH. Introduction of sulfonamide therapy for gonorrhoea. *Sex Trans Dis* 1983; 10:81-4.
- Wiesner PJ, Holmes KK, Sparling PF. Single doses of methacycline and doxycycline for gonorrhoea: a cooperative study of the frequency and cause of treatment failure. *J Infect Dis* 1973;127:461-6.
- Inga L. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis* 1997;24 (Suppl): S93-7.
- Falkow S, Elwell LP, de Graaf J. A possible model for the development of plasmid-mediated penicillin resistance in the gonococcus. In: Catterall RD, Nicols CS. Editors. Sexually Transmitted Diseases: proceedings of a conference sponsored jointly by the Royal Society Medicine and Royal Society Medicine Foundation Inc, I Winpole St. London WIM SAL Jun 23-25, 1975. London Academic Press 1976:120-3.
- Roberts MC. Plasmid of *Neisseria gonorrhoeae* and Other *Neisseria* Species. *Clin Microbiol Rev* 1989; Apr (Suppl):S18-S23.
- Knapp J S, Mesola VP, Neal SW, Wi TE, Tuazon C, Manalastas R, et al. Molecular epidemiology, in 1994, of *Neisseria gonorrhoeae* in Manila and Cebu City, Republic of the Philippines. *Sex Transm Dis* 1997; 24:1-7.
- Pillay M, Chenia NY, Hoosen AA, Pillay B, Pillay D. A novel β-lactamase plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *Med Sci Res* 1997; 25: 435-6.
- Knapp JS, Zenilman JM, Biddle GH, Perkins WE, DeWitt ML, Thomas ML, et al. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high level resistance to tetracycline. *J Infect Dis* 1987; 155: 819-22.
- Dillon JR, Yeung K-H. Beta-lactamase plasmids and chromosomally mediated antibiotic resistance in pathogenic *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev* 1989; suppl 2: S125-S133.
- MINSAP. Serie cronológica. Reporte de casos de Gonorrea. 1999.
- Delgado C, Romero F, Saez N, Sotolongo F. Sensibilidad *in vitro* del gonococo a la penicilina. *Rev Cub Hig Epidemiol* 1981;27(3):2601-2611.
- Llanes R, Sosa J, Martínez I, Llop A, Palma S, Valdés EA, et al. Antimicrobial susceptibility of 42 *N. gonorrhoeae* strains isolated from 1995 in Cuba. Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference 1996 Sept.8-13, Baltimore, Maryland, USA, 1996; 51-52.
- Sosa J, Llanes R, Rodríguez W, Gutiérrez Y, Guzmán D. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from patients with conjunctivitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95: 853-854.
- Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. 6th ed. Washington DC: Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology; 1995.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standard M100-S9. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Ninth informational supplement; Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999.
- Protocols and Applications Guide. Promega Corporation. Second Edition. WI. USA. 1991.
- Chan RK, Thirumoorthy T. A decade of PPNG in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 1987;16:639-44.
- Clendennen TE, Hames CS, Kees ES. *In vitro* antibiotic susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Philipines. *Antimicrob Chemother* 1992;36:277-282.
- Van Dyck E, Karita E, Abdellati et al. Antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Kigali, Rwanda, and trends of resistance between 1986 and 2000. *Sex Transm Dis* 2001; 28(9):539-45.
- Finland C, Robertsons H. Susceptibility of strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Malawi. *Arch Vener Dis* 1992; 35:245-8.
- Ison CA. A one-year survey of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients attending an East London genitourinary medicine clinic:

- antibiotic susceptibility patterns and patients' characteristics. *Genitourin Med* 1995 Feb;71(1):13-7.
22. Fiorito S, Galarza P, Pagarno I, et al. Antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Argentina. Abstract 0143 Abstract monograph of the twelfth meeting of the international society for STD research, Seville, 1997.
 23. Desai PJ, Morrinson JA, Fleming AF. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Ndola, Zambia. *Transact Royal Soc Trop Med Hyg.* 1990;84:131.
 24. Chu ML, Ho LJ, Lin HC, Wu YC. Epidemiology of penicillin-resistance *Neisseria* in Taiwan, 1960-1990. *Clin Infect Dis* 1992;14:450-457.
 25. Centers for Disease Control. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* United States, 1988 and 1989. *MMWR* 1990;39:284-7.
 26. Hudson BJ, van der Meijden WI, Lupiwa T, Howard P, Tabua T, Tapsall JW, et al. A survey of sexually transmitted diseases in five STD clinics in Papua New Guinea. *N G Med J* 1994;37(3):152-60.
 27. William L, Whittington AB, Knapp JS. Trends in Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to Antimicrobial Agents in United States. *Sex Transm Dis* 1988;15(4):202-10.
 28. Moodley P, Pillay C, Goga R, Kharsany AB, Sturm AW. Evolution in the trends of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Durban over a 5 year period: impact of the introduction of syndromic management. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(6):853-9
 29. Knapp JS, Brathwaite AR, Hinds A, Duncan W, Rice RJ. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Kingston, Jamaica. *Sex Transm Dis* 1995 May-Jun;22(3):155-9.
 30. Dillon JR, Pauze M. Appearance in Canada of *Neisseria gonorrhoeae* strains with a 3.2 megadalton penicillin-producing plasmid and 24.5 megadalton transfer plasmid. *Lancet* 1981;ii:700.
 31. Schipper AM. Further spread of plasmid among different auxotypes of penicillinase-producing gonococci. *The Lancet* 1982;20(2):445.
 32. Centers for Disease Control. Spectinomycin-resistant β -lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae*-England. *MMWR* 1982;31:495-6.
 33. Llanes R, Sosa J, Guzmán D, Gutiérrez Y, Llop A, Ricardo O. *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ciprofloxacin. First report in Cuba. *Sex Transm Dis* 2001;28(2):82-83.
 34. Trees DL, Sandul AL, Neal SW, Higa H, Knapp JS. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* exhibiting decreased susceptibility and resistance to ciprofloxacin in Hawaii, 1991-1999 *Sex Transm Dis* 2001; 28(6):309-14.
 35. Takai K, Koyama Y, Kojima H, Oshi M, Kawab K. Consecutive annual changes in minimum inhibitory concentration in clinically isolated *Neisseria gonorrhoeae* strains. *Hinyokika Kyo* 1995 Apr;41(4):279-87.

