

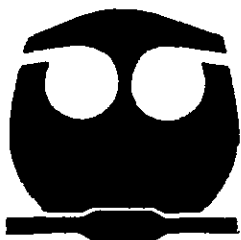


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ETIOLOGIA, PATOLOGIA Y DIAGNOSTICO
DE LABORATORIO DE LA GONORREA

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION**
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
CLAUDIA SOCORRO ESTRADA IBARRA



MEXICO, D. F.



1999

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

275004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

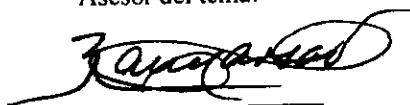
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Profa. MARÍA DEL CARMEN CORTÉS DECUIR
Vocal:	Profa. MARÍA ELSA ESCUDERO GARCÍA
Secretario:	Profr. RAÚL GARZA VELASCO
Primer suplente:	Profr. EDUARDO BONILLA ESPINOSA
Segundo suplente:	Profa. RUTH EDITH MARTÍN FUENTES

El tema se desarrolló en la Biblioteca de las Facultades de Química y de Medicina de la UNAM, así como en diversas bibliotecas del Sector Salud.

Asesor del tema:



QFB. Raúl Garza Velasco

Sustentante:



Claudia Socorro Estrada Ibarra

A MIS PADRES: GRACIELA Y MARIO

Porque me enseñaron a ser libre, independiente
y responsable en mis éxitos y fracasos.
Porque no escatimaron esfuerzos para darme la mejor educación.
Porque han sido y serán siempre camino y vida a seguir.
Con el más grande y eterno agradecimiento les dedico este trabajo.

A MI ESPOSO: VÍCTOR

Porque su confianza y comprensión me ayudan a superar mis tropiezos.
Porque su amor y aliento me impulsan a alcanzar mis metas.
Porque ha sabido compartir conmigo la alegría de vivir.
Con mucho cariño te dedico este trabajo.

A MIS ABUELITOS

Por su calidad humana, la cual mantuvo la llama
encendida que me motivó para concretar este logro.

A MIS AMIGOS: ANDREA, ARITZAÍ, ÉRIKA, MARCOS, MARI, MONSERRAT Y VERÓNICA

Por el camino que juntos hemos recorrido, gracias al
cual conocimos el valor de la amistad.

Expreso todo mi agradecimiento a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Por la oportunidad que me brindó, al cobijarme, abrirme las puertas del conocimiento y privilegiarme con el orgullo de ser universitaria.

Agradezco la inmensa ayuda y el apoyo que me brindó mi asesor de tesis, **profesor RAÚL GARZA VELASCO**, quien me impulsó en todo momento para lograr la culminación de esta tesis. Mil gracias porque, con la realización de este trabajo, me queda una valiosa experiencia.

Agradezco a las Profesoras:

María del Carmen Cortés Decuir
María Elsa Escudero García

Por su apoyo incondicional y sus invaluable aportaciones.

CLAUDIA ESTRADA IBARRA.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>Neisseria</i>	
i. Especies principales	5
ii. Microscopía	6
iii. Cultivo	6
iv. Pruebas de identificación	11
II. ENTIDADES CLÍNICAS ASOCIADAS A LA GONORREA	
i. Patología	16
ii. Tratamiento	22
III. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>N. gonorrhoeae</i>	
i. Adherencia e invasividad	25
ii. Antígenos superficiales hipervariables	31
iii. El LOS y la resistencia al suero	36
iv. Neutralización de anticuerpos	42
v. Interacción con las células fagocitarias	45
vi. Procuración de hierro	48
vii. La búsqueda de vacunas eficaces	50
IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA GONORREA	
i. Diagnóstico microbiológico	54
ii. Diagnóstico por PCR	60
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INTRODUCCIÓN

Sin lugar a dudas y aún cuando representa una afección común cuyo tratamiento es relativamente sencillo y barato, la gonorrea continúa siendo una de las más frecuentes enfermedades de transmisión sexual.

Una parte de las personas que la adquieren en forma sintomática suelen buscar inmediatamente la curación y hasta suspenden su actividad sexual hasta que lo logran; no obstante, en estos casos el problema radica en que numerosos individuos no presentan signos y síntomas característicos: cerca de la tercera parte de las mujeres infectadas y el 10 % de los varones son asintomáticos, por lo que todos ellos ignoran su condición y continúan fungiendo como focos infecciosos, a menos de que se enteren de que alguna de sus parejas sexuales ha contraído el padecimiento en forma clínica.

En los estratos socio-económicos menos favorecidos, la situación es aún más crítica: la escasa gravedad y molestia de los cuadros, sumadas a la ignorancia, el desinterés, el hacinamiento y otros factores adicionales, garantizan la

permanencia y el progreso tanto de las entidades clínicas implicadas como de su tenaz agente etiológico.

Ante ese panorama, el mejor antídoto podría ser la educación y la elaboración de vacunas eficaces; empero, la pobreza representa el principal obstáculo y los esfuerzos masivos tendientes a diseñar vacunas han enfrentado toda una serie de desventajas, ya que el agente causal ha desarrollado notables estrategias que evaden la respuesta inmune; de hecho, el gonococo posee la capacidad de aparecer como parte de los tejidos humanos -para evitar que el sistema inmunológico lo reconozca como extraño-, e inclusive, modifica constantemente sus antígenos superficiales, provocando que las respuestas inducidas resulten inútiles.

Sin embargo, la necesidad de encontrar una vacuna efectiva continúa vigente, porque la cantidad de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a diversos antibióticos (tetraciclinas, β -lactaminas y otros) aumenta día con día, obligando a que se establezcan regímenes terapéuticos más costosos -lo cual resulta contrario a la actual disminución de los presupuestos- que también podrían alcanzar la obsolescencia en el corto plazo.

Hasta el momento, se han detectado dos tipos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos: uno reside en un gen cromosómico que codifica para la síntesis de una proteína que se une temporalmente a la penicilina y, el otro, en un plásmido que origina la producción de β -lactamasas. Por su parte, la resistencia a las tetraciclinas también se asocia a un plásmido cuya expresión genera la protección de los ribosomas microbianos.

Desafortunadamente, los casos de resistencia suelen relacionarse con epidemias, por lo que su adecuado combate requeriría que los equipos de salud se desplazaran hasta las regiones afectadas, para localizar a todos los enfermos y a sus parejas sexuales, y administrarles el tratamiento apropiado; sólo de esta manera se evitaría que los individuos involucrados siguieran fungiendo como diseminadores de las cepas resistentes.

OBJETIVOS

- Describir las características microscópicas, culturales y bioquímicas asociadas a la identificación de *Neisseria gonorrhoeae* en el laboratorio clínico.
- Señalar las diversas afecciones ocasionadas por el gonococo en el humano, subrayando los avances logrados en la determinación de los factores y mecanismos de patogenicidad del agente causal.
- Describir los fundamentos de las principales metodologías relacionadas con el diagnóstico de laboratorio de la gonorrea.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Neisseria*

i. Especies principales

El género *Neisseria* forma parte de la familia *Neisseriaceae*, y sus especies principales son: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. catarrhalis*, *N. flava*, *N. subflava*, *N. perflava* y *N. flavescens* (44, 59).

Cabe mencionar que las cuatro especies citadas en último término son las únicas cuyas colonias presentan pigmentos no hidrosolubles que van desde el amarillo hasta el naranja; por su parte, *Neisseria catarrhalis* ha estado sujeta a toda una serie de cambios taxonómicos y, en la actualidad, pertenece al género *Moraxella*. No obstante, debido a que las características microbiológicas de *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* coinciden plenamente con las del género *Neisseria*, continúa estudiándose junto con los miembros de este último, considerándosele uno más de ellos (44).

Finalmente, *N. sicca*, *N. flava*, *N. subflava*, *N. perflava*, *M. catarrhalis* y *N. lactamica* forman parte de la flora habitual de vías respiratorias altas y, la última

de ellas, también integra la flora vaginal de mujeres sanas, lo cual no debe pasar inadvertido, porque su observación al microscopio puede sugerir erróneamente la presencia de gonococos (21, 59).

ii. Microscopía

Las neisserias se consideran cocos Gram negativos (aunque algunas cepas tienden a resistir la decoloración con alcohol-acetona); se agrupan en pares, miden entre 0.6 y 1 μ y presentan sus lados adyacentes aplanados, lo cual hace que se les describa en la literatura como estructuras que semejan riñones; son inmóviles, no esporulados y sólo *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* presentan cápsula -de polisacáridos-, si bien algunos autores continúan afirmando que los gonococos no son capsulados (44, 59, 79).

iii. Cultivo

En cuanto a su cultivo, dentro del mismo género se observan algunas diferencias: en tanto que la mayoría de las especies pueden desarrollar en medios sencillos -como la gelosa nutritiva-, el gonococo y el meningococo son muy exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales; de hecho, se considera que sólo cerca del 50 % de las cepas de *N. gonorrhoeae* desarrolla en

gelosa sangre y que 65 % lo hace en gelosa chocolate. Por tal motivo, el medio más adecuado para lograr el primoaislamiento de gonococos y meningococos es el Thayer Martin modificado -el cual contiene hemoglobina, vancomicina, colistín, nistatín, trimetoprim y polienriquecimiento-, aunque también se mencionan otros muy similares como el New York City, el Martin Lester y el Catlin Scholer, entre algunos otros (42).

El Thayer Martin está conformado de la siguiente manera: una base adecuada + hemoglobina + polienriquecimiento + VCN (44, 59).

Las bases más convenientes son el medio Hinton Mueller (que también se emplea para realizar antibiogramas) y la base GC (base para preparar gelosa chocolate). Los componentes principales de dichas bases son las peptonas, los extractos de levadura o carne, el agar, un amortiguador de fosfatos y el almidón; este último tiene como finalidad atrapar las trazas de metales pesados contenidos en el medio, los cuales son tóxicos para gonococos y/o meningococos (21, 44).

En relación con la hemoglobina (Hb), ésta resulta indispensable para que dichos microorganismos sinteticen los grupos "hemo" de sus citocromos. La Hb puede

adicionarse a la base mediante dos mecanismos diferentes: cuando se dispone de Hb purificada, ésta se adiciona a la base antes de la esterilización, a una concentración final de 2 %. Sin embargo, si sólo se cuenta con sangre completa, ésta se agrega después de la esterilización, en una proporción de 2 a 3 % -en relación a la base- y cuando la temperatura de esta última haya descendido hasta 80°C (44).

Cabe subrayar que la base junto con la Hb constituyen lo que se conoce como gelosa chocolate. Por lo que se refiere al polienriquecimiento, el más utilizado es el que produce la casa BBL, denominado IsoVitaleX, mismo que viene en condiciones estériles y, por ello, se adiciona cuando la temperatura de la base ha disminuido hasta 45 a 50°C, buscando que su concentración final sea de 1 al 2 % en el medio. Los componentes de dicho polienriquecimiento son los siguientes: adenina, guanina, tiamina, ácido p-amino benzoico (PABA), vitamina B12, glutamina, cistina, cisteína, NAD^+ , cocarboxilasa, dextrosa y nitrato férrico (21).

Finalmente, el VCN es una mezcla de tres antibióticos: Vancomicina (para inhibir el desarrollo de cocos y bacilos Gram positivos, así como el de las neisserias diferentes al gonococo y al meningococo), Colistín (para evitar el

crecimiento de bacilos Gram negativos) y Nistatin (que impide la reproducción de *Candida albicans* y la de muchos otros hongos que pudieran estar presentes en las muestras). Este complejo de antibióticos se agrega al medio en una concentración final de 2 %, inmediatamente antes o después de adicionar el polienriquecimiento (44).

Aunque la mayoría de las cepas (92 a 93 %) de los gonococos y meningococos desarrollan en Thayer Martin o sus equivalentes, algunas no llegan a hacerlo, dado que resultan sensibles a la vancomicina. Por tal motivo, se recomienda sembrar las muestras tanto en dicho medio como en gelosa chocolate (con IsoVitaleX o sin él) (44).

Cabe mencionar que cuando las muestras patológicas no se pueden procesar de inmediato, deben sembrarse en medios de transporte, entre los cuales destaca el Transgrow, cuya composición es prácticamente la misma que la del Thayer Martin y la única diferencia importante radica en que el primero se envasa en tubo, de manera que quede en pico de flauta y con 5 a 10 % de CO₂ (44, 59).

Por lo que se refiere a las condiciones de incubación de las neisserias, todas sus especies son aerobias estrictas y sus colonias aparecen en 24 h. Sin embargo, es

preciso hacer notar que los gonococos y meningococos requieren de hasta 48 h y de que exista una atmósfera de entre 5 y 10 % de CO₂. Esta última puede generarse mediante el método de la vela o a través de la reacción entre el ácido cítrico y el bicarbonato sódico en medio acuoso. De cualquier manera, dicha atmósfera tiene como finalidad estimular la síntesis de ácidos grasos durante la fase *lag* y, con el segundo método, además se logra conferir una humedad adecuada al cultivo (21, 44).

Una vez transcurrida la incubación, la detección presuntiva de estos microorganismos no representa mayores problemas, ya que el diámetro de sus colonias varía entre 1 y 2 mm y éstas son grisáceas -excepto en el caso del grupo *flava* que presenta los pigmentos antes mencionados-, convexas, de bordes regulares y consistencia butirácea (59).

iv. Pruebas de identificación

Detección del género *Neisseria*. En general, las neisserias y *M. catarrhalis* pueden diferenciarse fácilmente de otras especies que integran la familia *Neisseriaceae*, ya que el hecho de que sean diplococos Gram negativos resulta suficiente para no confundirlas con bacterias relacionadas (como el género *Acinetobacter*) o con otras especies de *Moraxella*. No obstante, en el caso de *M.*

catarrhalis también son útiles las pruebas de la citocromo oxidasa, la de utilización de glucosa, y su incapacidad para desarrollar en agar Mc Conkey (consultar la tabla 1) (28).

Tabla 1. Diferenciación entre *Neisseria sp*, *M. catarrhalis* y los miembros restantes de la Familia *Neisseriaceae* (21).

Microorganismo	Morfología	Ox	Glu	McC
<i>Neisseria sp</i>	Diplococos Gram -	+	+	-
<i>M. catarrhalis</i>	Diplococos Gram -	+	-	-
Otras moraxelas	Cocobacilos Gram -	+	-	+
<i>Acinetobacter sp</i>	Cocobacilos Gram -	-	-	+

CLAVE: Ox= Oxidasa, Glu= Glucosa, McC= Capacidad para desarrollar en agar Mc Conkey.

Como puede deducirse de la tabla 1, la observación de un frotis al Gram y la realización de la prueba de las oxidasas, suelen ser suficientes para detectar la presencia de neisserias, incluida la especie *N. catarrhalis* (*Moraxella catarrhalis*) (44).

La prueba de la citocromo oxidasa, también conocida como prueba de las oxidasas, consiste en detectar si el microorganismo analizado posee una citocromo oxidasa capaz de oxidar compuestos aminados tales como el

clorhidrato de N,N-dimetil p-fenilendiamina y la forma tetrametilada del mismo compuesto (57).

Dichos sustratos deben ser de preparación reciente y se emplean en solución acuosa al 1 %. Dado que la citocromo oxidasa es una ectoenzima, es necesario que el sustrato seleccionado se ponga en contacto con la colonia, ya sea depositando una gota de la solución sobre esta última, o bien, impregnando un trozo de papel filtro con el compuesto aminado antes de frotarle una asada del microorganismo (57).

En cualquier caso, la prueba se considera como positiva cuando, 1 a 3 minutos más tarde, se observa un color marrón que después se torna negro -ya sea en la propia colonia humedecida con la solución o en la asada depositada sobre el papel filtro- (57).

Las siguientes son algunas otras consideraciones relevantes acerca de esta prueba (21):

- Las colonias que manifiestan la coloración negra no deben seleccionarse para continuar el estudio, debido a que el indofenol -mismo que representa el

producto de la oxidación total del sustrato y cuya coloración es precisamente la que se detecta sobre la colonia- puede haber oxidado los sistemas enzimáticos del microorganismo, provocándole la muerte (57).

- La adición de α -naftol al sustrato incrementa la sensibilidad y rapidez de la prueba, ya que la oxidación de este último se realiza en un paso único. No obstante, en este caso, la colonia o la asada manifestarán una coloración azul muy oscuro (indofenol azul) en vez de la negra a que se hizo referencia anteriormente (21, 57).
- Las colonias oxidasa negativa no cambiarán su color original (57).
- La prueba de las oxidasas no es específica para estos microorganismos; de hecho, también resulta positiva para *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter sp*, *Vibrio sp* y algunas otras especies (57).

Diferenciación de especie. Una vez que se ha establecido que el microorganismo pertenece al género *Neisseria*, se procede a diferenciar la especie correspondiente (44). Para ello, es necesario recurrir a las pruebas mencionadas en la tabla 2.

Dicha tabla 2 subraya el hecho de que estos microorganismos son oxidasa positiva y las columnas restantes hacen referencia a las pruebas más empleadas para diferenciar a las principales especies. En este sentido, destacan las de oxidación de cinco carbohidratos, mismos que deben adicionarse al 1 % en el medio base adecuado: CTA (cistina-tripticase-agar); este último es semisólido y se distribuye en tubos de 13 x 100, sembrándose mediante picaduras poco profundas (debido a que las neisserias son aerobias estrictas y no desarrollarían en el fondo) (44, 59).

Una vez inoculado el CTA, se incuba a 35°C durante 48 h y se llevan a cabo las lecturas, considerándose como positivos aquellos tubos que muestren un vire a amarillo. Esto último se debe a que la oxidación de un carbohidrato también produce acidez y ésta es detectada por el vire del rojo de fenol contenido en el medio (21, 44).

Cabe mencionar que en la actualidad también se distribuyen comercialmente los equipos para poder identificar gonococos y meningococos, mediante reacciones de coaglutinación (38).

Tabla 2. Pruebas de diferenciación entre las principales especies de *Neisseria* (44).

ESPECIE	Ox	G	M	L	S	F	MTM	GNu	PIG
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>N. lactamicus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>N. sicca</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>N. flavescens</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>N. subflava</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>N. perflava</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>M. catarrhalis</i>	+	-	-	-	-	-	V	+	-

CLAVE: Ox= Oxidasa, G= Glucosa, M= Maltosa, L= Lactosa, S= Sacarosa, F= Fructosa, MTM= Desarrollo en Thayer Martin, GNu= Desarrollo en gelosa nutritiva, Pig= Pigmentación, V= Variable.

II. ENTIDADES CLÍNICAS ASOCIADAS A LA GONORREA

i. Patología

La gonorrea es la segunda enfermedad más frecuente entre las de transmisión sexual (sólo superada por la clamidiasis genital) y, de acuerdo con lo que establecen los sociólogos, entre las causas que determinan su elevada incidencia, destacan: el aumento de la promiscuidad, la ignorancia y la existencia/utilización de los anticonceptivos orales, aunque otro factor relevante es el gran número de individuos asintomáticos (principalmente entre el sexo femenino), quienes diseminan al microorganismo entre la población (16, 61, 66).

Sin lugar a dudas, la frecuencia de este padecimiento se relaciona con la edad de las personas, siendo el grupo más afectado el de 19 a 24 años, seguido por el de 14 a 18, después el de 25 a 30 y, finalmente, el de "otras edades" (59).

Cabe mencionar que el gonococo es muy sensible a las condiciones climatológicas externas y a la desecación (por lo cual se transmite casi

totalmente por contacto directo) y suele aparecer, en las preparaciones teñidas, dentro de numerosos neutrófilos (en forma intraleucocitaria), cuando los cuadros patológicos implicados cursan en forma aguda (39).

Es conveniente subrayar que la gonorrea tiene un período de incubación de 3 a 4 días (y hasta de 1 semana en algunos casos) y que las entidades clínicas más frecuentes asociadas a dicha enfermedad son: en el varón, la uretritis aguda (con alrededor de 15 % de casos asintomáticos), que se caracteriza por disuria (dificultad para orinar), sensación de micción frecuente y de ardor al orinar, y por la aparición de secreciones uretrales grisáceas que drenan en forma espontánea o previo masaje prostático y, en cuanto a la mujer, la vagino-cervicitis (con 40 a 60 % de casos asintomáticos) (16, 73), en la que también pueden estar presentes las sensaciones de micción frecuente y de ardor al orinar, con dolor abdominal, fiebre y secreción vaginal (1, 3, 8). El diagrama 1 muestra las más frecuentes rutas de transmisión del gonococo.

Evidentemente, en los casos de falta de tratamiento o cuando éste no es adecuado y oportuno, la uretritis y la vagino-cervicitis pueden derivar en otras entidades clínicas, de acuerdo con lo señalado en los diagramas 2 y 3 (16, 41).

Diagrama 1. Principales vías de transmisión de *N. gonorrhoeae*. (41).

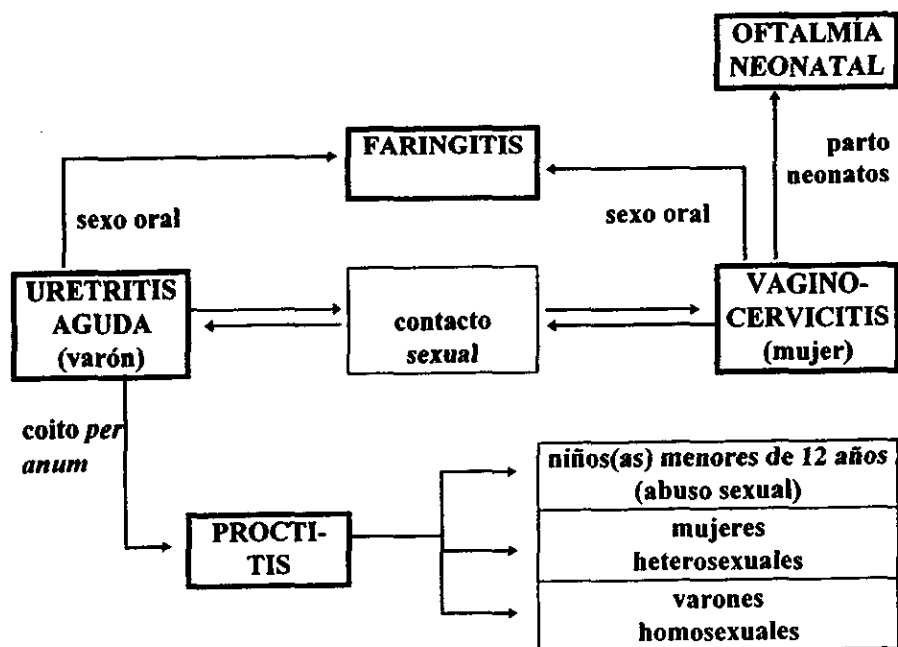
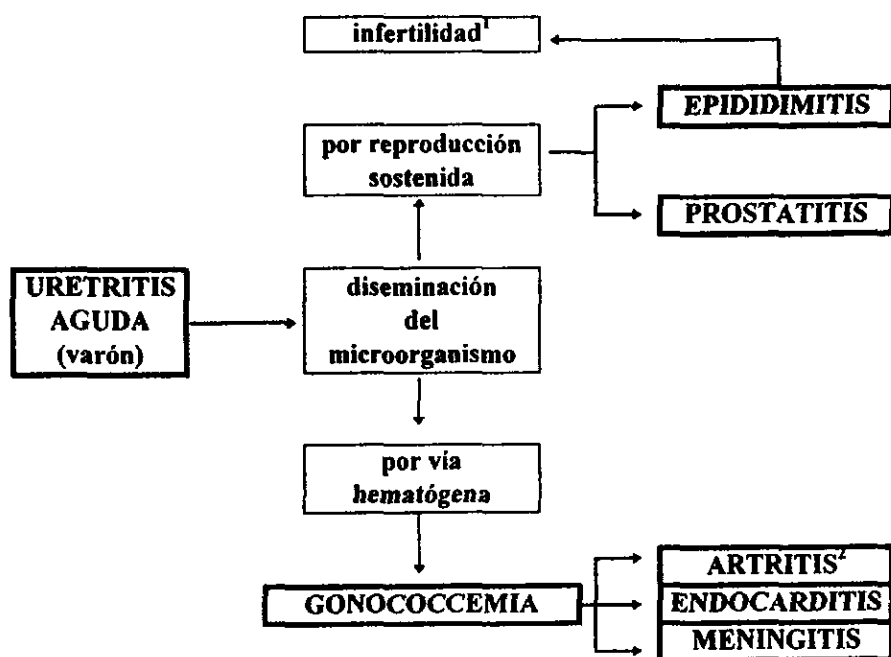
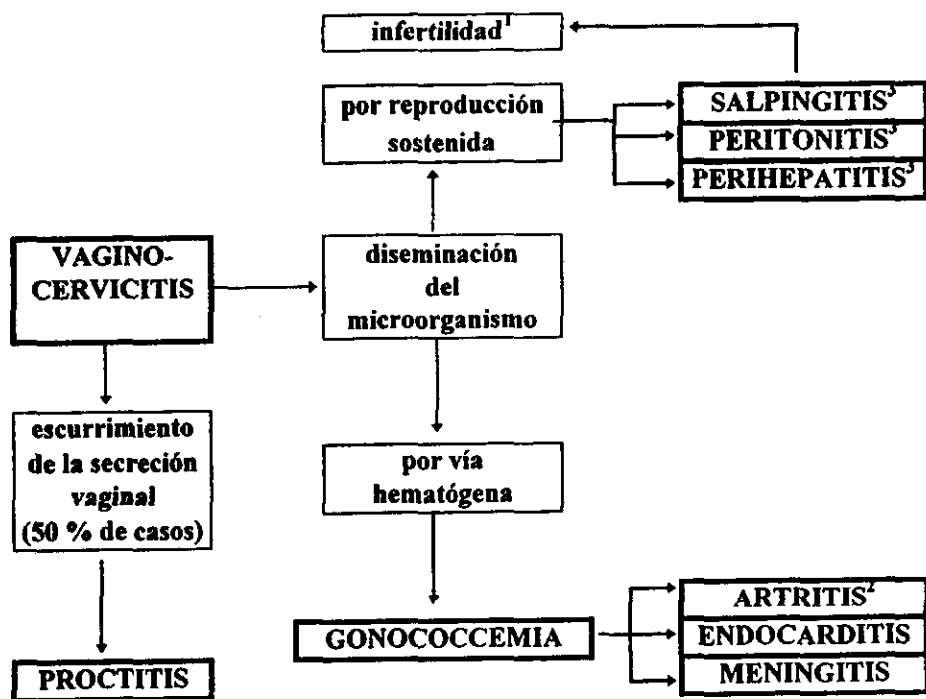


Diagrama 2. Diseminación de *N. gonorrhoeae*, a partir de los genitales masculinos, cuando no se aplica el tratamiento adecuado oportunamente (53).



CLAVE: ¹ = Por estenosis del epidídimo; ² = La artritis es el cuadro que sucede con mayor frecuencia a la gonococcemia (de hecho, la endocarditis y meningitis gonocócicas son raras).

Diagrama 3. Diseminación de *N. gonorrhoeae*, a partir de vagina y cérvix, cuando no se aplica el tratamiento adecuado oportunamente (53).



CLAVE: ¹ = Por estenosis del oviducto; ² = La artritis es el cuadro que sucede con mayor frecuencia a la gonococcemia (de hecho, la endocarditis y meningitis gonocócicas son raras); ³ = Si además de la salpingitis aparecen la peritonitis y/o la perihepatitis, el cuadro se conoce con el nombre de enfermedad inflamatoria pelviana (EIP).

En relación con los diagramas 2 y 3, es preciso tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- La salpingitis (inflamación de las trompas de Falopio) y la epididimitis (inflamación del epidídimo) suelen resolverse por fibrosis, en cuyo caso las y los pacientes pueden quedar infértiles (3, 41, 63).
- Cuando el microorganismo ocasiona gonococcemia y alguna(s) otra(s) entidad(es) clínica(s) derivada(s) de la antes mencionada, el cuadro se denomina infección gonocócica diseminada o IGD. En este sentido, se ha observado que ello sólo puede ocurrir cuando las cepas implicadas pertenecen a un biotipo auxótrofo para arginina, hipoxantina y uracilo (14, 33, 44).
- Cuando en la mujer se presentan salpingitis y peritonitis y/o perihepatitis, se asigna el nombre de enfermedad inflamatoria pelviana o EIP a dicho cuadro (41, 51).

ii. Tratamiento

En los años recientes, el agente causal de la gonorrea ha venido manifestando una creciente resistencia a numerosos antimicrobianos, con base en genes cromosómicos y plasmídicos que codifican para la síntesis de productos que inactivan a las penicilinas y tetraciclinas (2, 44, 72).

Por tal razón, actualmente los Centros de Control de Enfermedades de los E.U.A. recomiendan el empleo de cefalosporinas de amplio espectro y de nuevas fluoroquinolonas. Sin embargo, aunque la tetraciclina no es muy eficaz contra los gonococos, aún se sugiere combinarla con alguna de las antes mencionadas, a fin de continuar combatiendo a *Chlamydia trachomatis*, cuya presencia en los pacientes suele sumarse a la de *N. gonorrhoeae* (65).

Para los casos comunes, se acepta que el laboratorio sólo efectúe pruebas de susceptibilidad *in vitro*, con las cuales se defina si la cepa aislada resulta sensible a la penicilina, tetraciclina o espectinomicina; empero, es más adecuado que, cuando se cuente con los recursos necesarios el análisis abarque una o más cefalosporinas (incluida la cefoxitina) y al menos una fluoroquinolona, principalmente si el paciente involucrado se encuentra afectado por alguna de las entidades gonocócicas sistémicas (EIP e IGD) (44).

Cabe señalar que el hecho de que otras especies bacterianas han empezado a mostrar resistencia a diversas cefalosporinas y a las nuevas fluoroquinolonas, debe promover que los laboratorios establezcan programas permanentes que se dirijan a determinar la eventual resistencia del gonococo a estos antimicrobianos; únicamente de esta manera se estará en condiciones de impedir que las próximas epidemias lleguen a alcanzar mayores dimensiones que las actuales, las cuales ya de por sí son muy extensas y difíciles de controlar (65).

III. FACTORES DE VIRULENCIA DE *N. gonorrhoeae*

El gonococo es un patógeno primario del ser humano y no infecta a los animales, a menos de que sea administrado por rutas no naturales, tales como la vía parenteral; por tal motivo, los estudios *in vivo* que incluyen el empleo de cepas mutantes deben realizarse en voluntarios humanos (32, 48). En cuanto a las líneas celulares que se utilizan, destaca la de Chang, proveniente del epitelio conjuntival, aunque también se han llegado a emplear las células tumorales de próstata y cérvix (1, 68), e inclusive, los polimorfonucleares (PMN's) y la serie monocito-macrófago, sobre todo cuando se pretende analizar el destino del microorganismo dentro de los fagocitos (45). Asimismo, se ha trabajado con ratones a los que implantan cámaras dentro de las cuales son inyectadas las bacterias -para observar los efectos de las fases sistémicas del padecimiento- y con tejidos de trompas de Falopio, como modelo para determinar las características de la colonización del oviducto (30).

La investigación sobre factores gonocócicos de virulencia ha representado todo un desafío para los expertos: aunque la transformación genética de *N. gonorrhoeae* ocurre de manera natural (62, 68), el sistema del microorganismo

discrimina y descarta DNA ajeno, por lo que no es posible la recepción de genes clonados en otras especies (*E. coli* u otras); análogamente, algunos transposones, tales como el Tn916 y Tn1545, pueden integrarse al cromosoma del microorganismo, pero ello no se da casualmente; además, la ruptura y la sustitución génicas son posibles, pero resultan bastante más complicadas que en otras bacterias (7, 80).

La tabla 3 resume los principales factores de virulencia detectados en los gonococos.

i. Adherencia e invasividad

Una de las primeras etapas del proceso infectivo relacionado con los gonococos consiste en la colonización de la superficie mucosa (generalmente genital), en la cual, como consecuencia, aparecen numerosos PMN's (3, 39, 48). En este sentido, la descarga purulenta contiene a dichas células y una parte de ellas manifiesta en su interior la presencia de microorganismos; sin embargo, aún no se ha logrado establecer con plena certeza si estos últimos están siendo destruidos o si pueden sobrevivir intraleucocitariamente; sin embargo, los análisis microscópicos indican que una fracción muere y, la restante, aparenta permanecer viable (1).

Tabla 3. Principales factores de virulencia de *N. gonorrhoeae* (44, 59).

Factor	Características y/o localización	Contribución a la virulencia
Pilina	Pili PilE = principal proteína constitutiva de la pilina PilC = proteína implicada en la maduración de la pilina	Adhesión inicial a las células epiteliales. Experimenta variaciones antigénicas que inutilizan a los anticuerpos originales.
P.II (Opa)	Proteína de membrana externa	Adhesión íntima a las células epiteliales. Promueve la invasión intracelular y la formación de microcolonias
P.I	Porina de membrana externa que produce 2 variantes de fase: P.IA = forma antigénica encontrada en las cepas más invasivas P.IB = forma antigénica detectada en las cepas que generan infección localizada	Interfiere la fagocitosis, impidiendo la fusión fagolisosomal y/o reduciendo la carga oxidativa del contenido lisosomal.
LOS	Lipo-oligosacárido de la pared celular	Promueve la unión entre bacteria y bacteria para formar microcolonias. Induce el proceso inflamatorio y dispara la liberación de $TNF\alpha$, el cual daña las trampas de Falopio
P.III	Porina de la membrana externa	Los anticuerpos dirigidos contra ella bloquean el paso de otros con acción bactericida, inducidos por P.I y el LOS.
IgA hidrolasa	Enzima extracelular	Hidroliza a los anticuerpos de la clase IgA, permitiendo la liberación del microorganismo.
Tbp1 y Tbp2	Receptores para transferrina humana	Procuración de hierro
Lbp	Receptor para lactoferrina humana	Procuración de hierro

Como algunos otros patógenos, *N. gonorrhoeae* se adhiere a diversos cultivos tisulares y penetra en las células implicadas provocando rearrreglos en la estructura de la actina superficial presente en estas últimas (29, 30, 60).

En primer lugar, el microorganismo se fija a la superficie de las células epiteliales por medio del *pili*, los cuales son del tipo IV (N-metilfenilalanina), están constituidos por subunidades de pilina PilE y podrían contener en la punta otras proteínas adhesivas (24, 26, 48, 74); otra estructura proteica, conocida como PilC, desempeña algún papel relevante en la afinación de cada *pilus*; inicialmente, se pensó que participaba en el traslado y ensamble, porque las mutantes PilC⁻ carecían de *pili* completos, no obstante, recientemente se observó que otras mutantes PilC⁺ tampoco se adherían a las células epiteliales pero sí a los eritrocitos, lo que sugirió que la proteína PilC se localiza en la punta de la fibrilla y podría determinar la especificidad de unión a ciertas células del hospedador (40, 73).

Al parecer, después del enlace inicial, el segundo estadio del proceso de infección involucra uniones aún más íntimas entre el agente etiológico y las células “blanco”; particularmente, las proteínas microbianas P.II (también denominadas Opa -debido a la opacidad que confieren a las colonias-) son

importantes protagonistas en esta etapa, ya que las cepas carentes de dicho componente no se adhieren a las células epiteliales y, por lo tanto, tampoco las invaden; sin embargo, es preciso mencionar que se han detectado aislamientos de *E. coli* productoras de P.II. incapaces de provocar su internalización (30, 45, 60).

Adicionalmente, las Opa median otro relevante tipo de unión en *N. gonorrhoeae*: la que permite enlazar unas células bacterianas a otras que se han logrado fijar previamente sobre la superficie tisular, para dar lugar a microcolonias. Es decir, las P.II de las primeras se enlazan a los azúcares expuestos que forman parte del lipo-oligosacárido (LOS) de las segundas, lo que refuerza la colonización inicial del tejido “blanco”; empero, se ha comprobado que la penetración a las células de los cultivos de tejidos implica a bacterias individuales y no a las microcolonias (1).

Por su parte, la membrana externa del microorganismo contiene a la porina P.I, cuya función primaria consiste en formar poros a través de los cuales difunden nutrientes de bajo peso molecular hacia el citoplasma bacteriano (63).

No obstante, esa porina también podría influir para que el invasor sobreviva dentro de los fagocitos, habida cuenta de que la adición de P.I purificada a los cultivos de tejidos (15), promueve los siguientes fenómenos:

- La inserción de la porina en la membrana celular, con lo cual se forman poros que suelen conducir al colapso de esta última (58).
- La reacción entre P.I y la proteína calmodulina (*atrapadora de calcio*) de la célula eucariote; esto parece afectar la capacidad de los fagocitos para matar a los microorganismos engullidos, ya sea limitando la acción oxidativa del contenido lisosomal, o bien, impidiendo la fusión fagolisosomal (15).

Estas acciones de P.I podrían explicar el hecho de que parte de los gonococos intraleucocitarios muera y que la restante sobreviva. Por otro lado, también es interesante el hallazgo de que existen dos formas alélicas de P.I, la P.IA y la P.IB. y de que mientras la primera aparece en las cepas que provocan las formas sistémicas de la gonorrea, la segunda caracteriza a las que ocasionan infecciones localizadas (15,58).

Finalmente, es necesario tomar en cuenta que numerosas cepas de gonococos producen y liberan IgA hidrolasas (4).

En este sentido, las especies bacterianas que pretenden colonizar las superficies mucosas enfrentan el riesgo de quedar inmovilizadas en la capa de mucina, cuyo poder atrapador reside en su consistencia pero, además, en su contenido de anticuerpos de la clase IgA secretoria¹ (IgAs); estas moléculas diméricas se encuentran fijadas a la mucina por su fracción Fc, por lo que sus Fab libres funcionan como elementos “pegajosos” a los que, previa reacción inmuno-específica, se fijan los microorganismos vía sus determinantes antigénicos (consultar la figura 1) (36, 52).

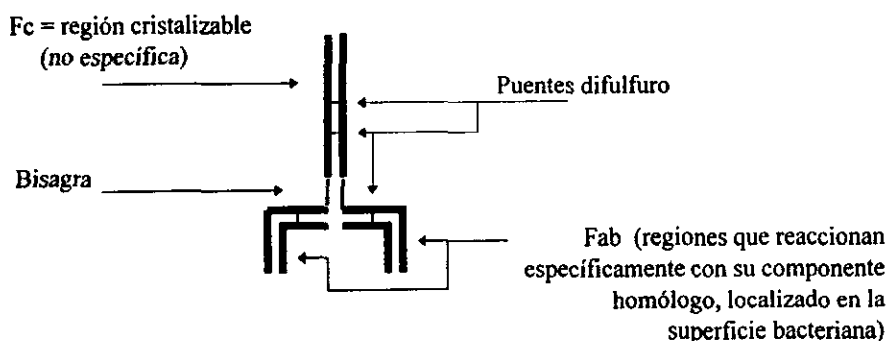
En contraparte, la estrategia bacteriana correspondiente consiste en producir IgA hidrolasa², que escinde a la inmunoglobulina -a nivel de la bisagra-, con lo cual la célula bacteriana implicada se puede separar de la mucina, junto con los fragmentos del anticuerpo que se han adsorbido a su superficie y dejando el Fc ligado al moco. *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* figuran entre las especies que sintetizan IgA hidrolasa con mayor regularidad. Es preciso mencionar que este tipo de enzimas sólo exhibe su capacidad hidrolítica

¹ Los anticuerpos se dividen en 5 clases: IgA, IgG, IgM, IgE e IgD, siendo las 3 primeras las que participan más consistentemente en la defensa del organismo del hospedador; la IgA es la que predomina en las mucosas y, las 2 siguientes, en la sangre, en la linfa y en los órganos internos.

² Los gonococos producen al menos 2 tipos de IgA hidrolasa; uno de ellos escinde a la IgA al nivel de las uniones prolina-serina y, el otro, en las uniones prolina-treonina.

sobre el isotipo IgA1, pero éste es el que predomina en casi todas las superficies mucosas (4, 36, 52).

Figura 1. Esquema simplificado de un anticuerpo³.



ii. Antígenos superficiales hipervariables

La base fundamental para desarrollar vacunas contra la gonorrea contempla el uso de antígenos bacterianos de superficie, tales como la pilina o la proteína P.II, ya que ambos inducen una respuesta de IgAs que podría impedir la

³ Los anticuerpos son proteínas (inmunoglobulinas) integradas por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas entre sí por puentes disulfuro.

adherencia del microorganismo al epitelio mucoso y, por ende, la colonización bacteriana (18).

Sin embargo, las evidencias cuestionan dicho planteamiento: los individuos que han curado recientemente de la enfermedad pueden volver a infectarse en posteriores contactos con el agente causal, pues aunque el padecimiento sí induce eficazmente la respuesta inmune, el gonococo regula la variación de sus antígenos superficiales, haciendo obsoletos los anticuerpos originales (64, 66, 74).

A este respecto, se ha comprobado que en cuanto a los *pili*, el agente causal cuenta con un repertorio muy completo de variantes antigénicas y que, en el caso de las invasinas P.II, la gama de posibilidades también es importante (9, 40).

Evidentemente, esta clase de transformaciones fenotípicas tiene por objeto evadir la respuesta de anticuerpos del hospedador y de incrementar las probabilidades de unión, obedeciendo a los cambios ambientales a los que se exponen, tanto dentro del organismo al que parasitan como al interactuar con los fagocitos profesionales (9).

Variaciones relativas a los *pili*. Las variantes detectadas en la composición fimbrial de *N. gonorrhoeae* son numerosas y muy diversas; de hecho, sólo algunas regiones de la pilina (en particular la porción amino-terminal), se conservan con cierta regularidad; es decir que, muchas otras zonas (conocidas como mc -por microcassettes-) difieren de una a otra copia, tanto a nivel del DNA como -lógicamente- al de la secuencia de los aminoácidos involucrados. En el gonococo, la expresión del gen *pilE* es controlado durante la transcripción, merced a un sistema regulatorio de dos componentes: PilB actúa como el sensor que fosforila a PilA, a fin de que ésta desempeñe su papel como activador transcripcional. Mientras la señal que activa a PilB permanece aún desconocida, PilA parece interactuar con la RNA polimerasa σ^{54} , la cual transcribe los genes asociados a las condiciones de carencia de nitrógeno (25, 26, 48).

Por otra parte, los *pili* sintetizados pueden ser ensamblados sobre la superficie bacteriana (como ocurre en las cepas Pil⁺) o transportados hasta el medio ambiente (cepas Pil⁻); a los cambios de Pil⁺ a Pil⁻ y viceversa, se les denomina variaciones de fase y éstas tienen lugar debido a que existen dos posibles sitios de corte (P⁺ y P^S) en la nueva proteína: las PilE cortadas en P⁺ sí se ensamblan

(redituando la variante Pil⁺), mientras que las escindidas en el sitio P^S son secretadas (cepas Pil⁻) (7, 75).

Un segundo tipo de variación de fase también surge a partir de la producción de una forma carente de PilE que no es ensamblada a los *pili* (5). Para comprender el mecanismo de esta última, es importante saber que aunque existen copias múltiples del gen dispersas a lo largo del cromosoma, en realidad sólo una de ellas (y ocasionalmente dos) cuenta(n) con un promotor y puede(n) expresarse; éstas(s) última(s) se denomina(n) *pilE* (E de “expresión”), mientras que las restantes se conocen como *pilS* (S de “silenciosa”). De esta manera, las eventuales recombinaciones entre las regiones homólogas de *pilE* y *pilS* pueden redituvar variaciones antigénicas, pero las que ocurren entre segmentos diferentes suelen originar formas de PilE más largas que las normales, las cuales no son procesadas ni incorporadas a los *pili*, por lo que las células bacterianas implicadas resultan Pil⁻ (40, 79).

El tercer mecanismo de variación de fase implica a otro gen de pilina: *pilC*, cuyo producto proteico participa en el adecuado ensamble y en la maduración de los *pili*. Al principio de la región genómica que codifica para PilC se encuentra una larga cadena de residuos de guanina (G), que se puede modificar durante la

síntesis de DNA (particularmente cuando aparecen segmentos mal colocados); en estos casos, también tienen lugar diversas mutaciones que generan cepas Pil⁻ (40, 73).

En cualquier caso, se ha logrado determinar que las variaciones antigénicas y/o de fase ocurren sólo en una pequeña parte (10^{-2} a 10^{-4}) de la población bacteriana que se reproduce, y que basta con que algunas de las células gonocócicas no sean reconocidas por los anticuerpos anti-pilina, para que éstas escasas variantes pronto representen la forma dominante en crecimiento. En otras palabras, la estrategia de *N. gonorrhoeae* es la de producir toda una colección de variantes antigénicas y/o de fase, ya que es muy probable que al menos una de ellas llegue a sobrevivir (75).

Variaciones asociadas a la P.II. La mayoría de las cepas gonocócicas cuenta con múltiples copias (al menos 11 ó 12) del gen que codifica para P.II; dichas copias difieren en forma primaria en dos regiones hipervariables (HV1 y HV2) y, por lo tanto, los eventos recombinantes que impliquen a algunas de ellas darán lugar a variaciones antigénicas de la mencionada proteína. Adicionalmente, tal como sucede en el caso de la pilina, también se pueden originar variaciones de fase P.II⁺ y P.II⁻, cuando existen segmentos mal

colocados que modifican la cantidad de bases repetidas en ciertos segmentos del DNA; es decir que, así como el número de residuos G determina si PilC es escindida antes o después de que la estructura proteica se haya completado (redituando células bacterianas $PilC^+$ o $PilC^-$), el número de secuencias CTCTT (citosina-timina-citocina-timina-timina) en la porción terminal del gen influye para producir variantes $P.II^+$ o $P.II^-$ (20).

iii. El lipo-oligosacárido (LOS) y la resistencia al suero

Los lipopolisacáridos (LPS) que componen la pared celular de las bacterias Gram negativas presentan actividad endotóxica y (37), por lo general, se encuentran constituidas por tres regiones:

- El lípido A
- El núcleo polisacárido
- El polisacárido O, también denominado antígeno somático O

Lípido A. Éste conforma la región lipídica del LPS, se encuentra embebido en la membrana externa y contiene disacáridos fosforilados de β 1-6 D-glucosamina, unidos a ácidos grasos tales como el láurico, palmítico, mirístico y β -hidroxi-mirístico (53).

El lípido A corresponde prácticamente a la región tóxica de la molécula, ya que estimula la liberación de proteínas bioactivas del hospedero, entre las que destacan las citocinas (53).

Núcleo polisacárido. Corresponde a un núcleo interno ligado al lípido A y, a otro, externo, unido al polisacárido O; su estructura básica está conformada por hexosas sustituidas lateralmente con otros azúcares, etanolamina y fosfatos, así como por el ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octanoico (KDO); esta región, junto con el polisacárido O, constituye la porción hidrofílica del LPS (44).

Polisacárido O. Se encuentra ligado al núcleo polisacárido y consta de unidades repetidas de azúcares (3'-5'), siendo las más frecuentes las de manosa, fucosa, ramnosa y galactosamina; además, constituye la región de mayor antigenicidad y variabilidad del LPS y llega a representar una adhesina útil para la bacteria (44).

De hecho, la proteína CD14, presente en la membrana plasmática de la línea monocito-macrófago, funge como "receptora" del LPS y de la proteína conocida como "proteína unida al LPS" (LBP); los complejos CD14-LPS-LBP actúan

como mediadores del reconocimiento celular y de diversas respuestas celulares contra el lípido A. En este sentido, la interacción del LPS con su receptor CD14 da lugar a tres importantes eventos lesivos asociados a las endotoxinas (20, 44):

- La producción de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α y el factor activador de plaquetas) por parte de los monocitos, macrófagos y algunas otras células; dichas citocinas estimulan la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. La IL-1 provoca la temperatura por sí misma o estimula la liberación de prostaglandinas y, por su parte, la IL-6, la IL-8, el TNF- α y el factor activador de plaquetas, dañan las células endoteliales y trastornan su función normal (67).
- La activación del complemento, en donde los componentes C3a y C5a actúan sobre el tejido endotelial; particularmente, C5a estimula la migración de polimorfonucleares a los vasos sanguíneos y dañan seriamente las paredes del endotelio, a través de enzimas lisosomales (67).
- La activación de la cascada de la coagulación, a partir de la cual se forman numerosos coágulos que obstruyen la circulación; el fenómeno se conoce como coagulación intravascular diseminada (CID) (67).

En resumen, la combinación de los tres eventos anteriores conduce al shock séptico, también denominado *colapso del sistema circulatorio*, después de que se presentan algunos signos previos tales como fiebre, vómito, sofocación, hipotensión y aumento de la permeabilidad vascular y del ritmo cardíaco (44).

Por lo que se refiere a *N. gonorrhoeae*, al parecer, diversos síntomas de la gonorrea están relacionados con el LPS microbiano, ampliamente conocido como lipo-oligosacárido (LOS) en esta especie; esta molécula es capaz de inducir una intensa respuesta inflamatoria por parte del organismo del hospedador (9, 37).

Ciertamente, la activación del complemento, las interacciones ocurridas durante el englobamiento fagocitario del invasor y la destrucción de los fagocitos, contribuyen de manera decisiva a la formación de la descarga purulenta característica del padecimiento; no obstante, es el LOS gonocócico el que provoca la cuantiosa producción del factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) que, a la postre, representa la causa principal de los severos daños localizados en las trompas de Falopio (9, 32, 35, 37).

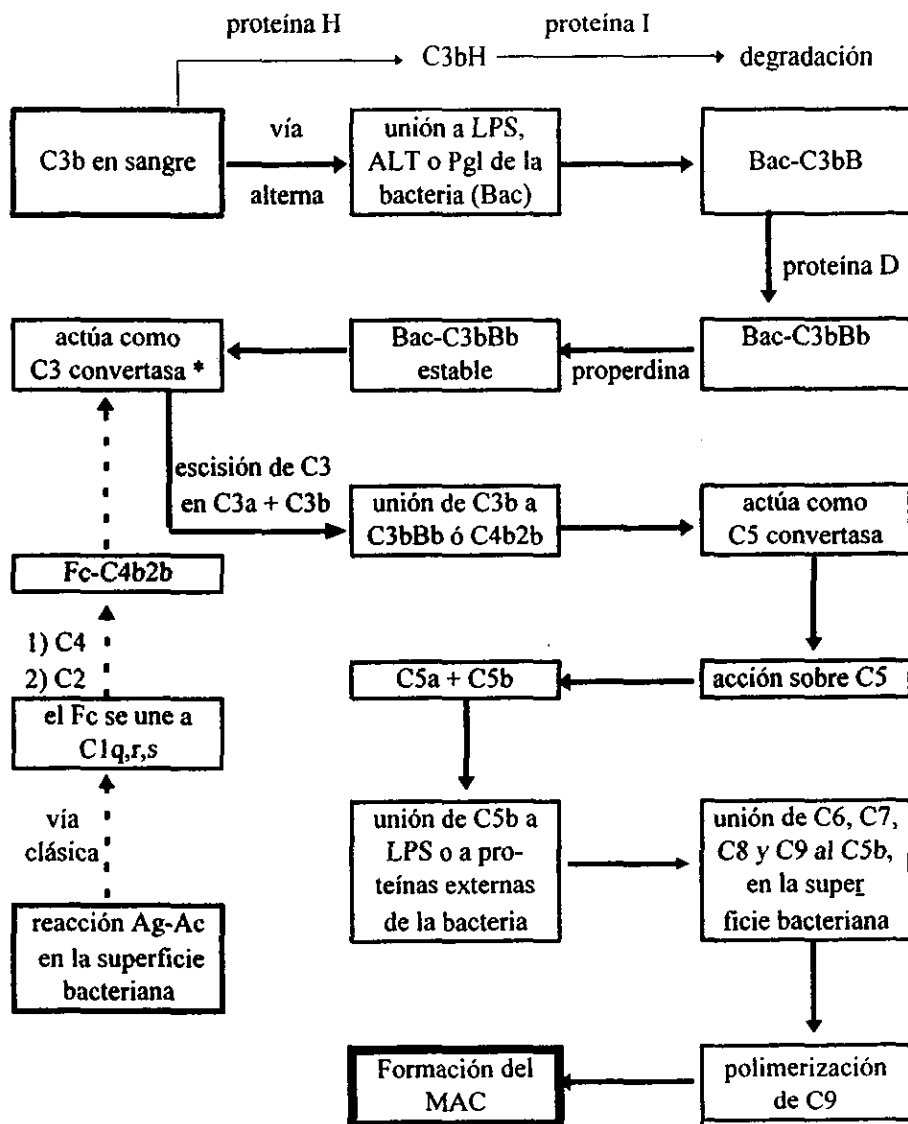
Independientemente de las lesiones que se le atribuyen, el LOS desempeña una función trascendental en las cepas que generan cuadros patológicos diseminados: les confiere resistencia a la acción bactericida del suero (18).

En este contexto, es oportuno recordar que uno de los principales “blancos” del complemento en las bacterias Gram negativas es precisamente el LPS (LOS en *N. gonorrhoeae*), ya que éste funge como receptor de C3b y de C5b (consultar el diagrama 4); por lo tanto, ciertos ajustes bacterianos que se concentran en dicha región pueden afectar la eficacia del complemento (37).

En concreto, la acción anticomplementaria del LOS gonocócico se basa fundamentalmente en lo siguiente:

- Los residuos de galactosa presentes en el LOS forman enlaces covalentes con el ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) presente en la sangre humana; de esta manera, el LOS queda recubierto por un azúcar -producido por el propio hospedador- que impide la función de los componentes del complemento y, por lo tanto, la formación del MAC (18, 50, 55, 56).

Diagrama 4. Principales eventos asociados a la activación del complemento (67).



CLAVES: LPS = lipopolisacáridos; ALT = ácidos lipoteicoicos; Pgl = peptidoglicano; * = la activación del complemento por las vías clásica y alterna es compartida a partir de la formación de sus respectivas C3 convertasas; MAC = complejo de ataque a la membrana.

- Los polisacáridos presentes en el LOS llegan a elongarse, por lo que las moléculas del MAC que se produzcan sobre las extensiones no entrarán en contacto con la membrana externa del microorganismo y, por ende, tampoco podrán afectar su continuidad e integridad (9).

iv. Neutralización de anticuerpos

Los anticuerpos son producidos y liberados por las células plasmáticas las cuales, a su vez, *corresponden a linfocitos B maduros* (23).

Cuando un agente microbiano penetra al organismo del hospedador, se expone a entrar en contacto con macrófagos o con una parte de los linfocitos B que es capaz de sintetizar anticuerpos dirigidos contra alguna de sus determinantes antigénicas. En tal contexto, el microorganismo es inactivado y procesado, y sus epítomos son trasladados hasta la superficie de dichas células⁴ -merced al desplazamiento de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)⁵-, para ser presentados a los linfocitos T cooperadores (11).

⁴ Por tal razón, macrófagos y linfocitos B se consideran “células presentadoras de antígeno”; los epítomos microbianos de naturaleza polisacárida, lipopolisacárida o predominantemente lipídica sólo son presentados por los linfocitos B.

⁵ El MHC de clase II soporta epítomos pertenecientes a parásitos extracelulares y el MHC de clase I realiza la misma función cuando se trata de patógenos capaces de reproducirse intracelularmente; en este último caso, también participan linfocitos T

Como consecuencia de los eventos anteriores, los linfocitos T cooperadores se dividen y liberan linfocinas que amplían la información sobre las determinantes antigénicas del agente invasor, activando específicamente a las clonas de linfocitos B que producen anticuerpos contra alguno de los epítomos implicados (47).

Finalmente, una porción de dicha clona permanecerá como “células de memoria” que podrán iniciar el proceso -junto con otros macrófagos- en episodios futuros y, la restante, evolucionará a células plasmáticas formadoras del anticuerpo requerido (47).

Es conveniente precisar que los anticuerpos de la clase IgG pueden actuar como opsoninas, neutralizan toxinas y activan el complemento; los IgM sólo hacen esto último y, los IgA, incrementan la adhesividad de la mucina; por ello, las dos primeras predominan en los tejidos, la sangre, la linfa y otros líquidos internos, mientras la tercera sólo abunda en los epitelios mucosos y en la leche materna (54).

citotóxicos que destruyen a las células hospedadoras en cuyo interior se reproduce o replica el invasor.

Por otro lado, algunas bacterias patógenas son capaces de evadir la acción de los anticuerpos, a través de diversos mecanismos; entre los más conocidos, se cuentan: **a)** la modificación de la estructura de importantes proteínas superficiales, incluidas las de la membrana externa y las que constituyen sus *pili* (variación antigénica); **b)** la síntesis de sustancias de envoltura que semejan a otras localizadas en los tejidos del hospedador (como en el caso de las cápsulas conformadas por los ácidos siálico o hialurónico); y **c)** El recubrimiento microbiano con azúcares o proteínas producidos por el organismo al cual colonizan (43).

Por lo que se refiere específicamente a *N. gonorrhoeae*, los anticuerpos dirigidos contra la P.I y el LOS (no unido a ácido siálico) suelen resultar bactericidas con mayor regularidad que los que reaccionan con otros componentes gonocócicos de superficie; aparentemente, lo anterior se debe a las diferentes capacidades de los diversos complejos antígeno-anticuerpo para activar el complemento y promover la formación del MAC (18,32).

En este sentido, cabe señalar que la porina P.III, la cual abunda en la superficie bacteriana de *N. gonorrhoeae*, es un excelente inmunógeno pero los complejos antígeno-anticuerpo de los que forma parte no favorecen la formación del MAC.

Por tal motivo, P.III actúa como protectora de P.I y del LOS, ya que al adsorber grandes cantidades de anticuerpos dirigidos contra ella, estos últimos limitan el paso de los que estaban destinados a reaccionar con P.I y el LOS y todo el proceso se traduce en la sobrevivencia del *microorganismo* (66).

v. Interacción con las células fagocitarias

La fagocitosis representa uno de los principales mecanismos de defensa con que cuenta el hospedador y depende de la eficacia de los fagocitos profesionales: los neutrófilos PMN's y las células pertenecientes a la serie monocito-macrófago (45). Los fagocitos poseen la capacidad de desplazarse por quimiotaxis hasta los tejidos en los que se ubica el agente invasor, para: a) englobarlo (mediante la emisión de pseudópodos fagocitarios y la previa reacción entre las superficies de ambos protagonistas); b) encerrarlo en sus fagosomas; y c) provocar su muerte a través de las hidrolasas, el H_2O_2 y los iones superóxido (O_2^-) contenidos dentro de los lisosomas (23).

Entre los signos que caracterizan a la gonorrea, se cuentan la presencia de gran número de PMN's -varios de los cuales contienen numerosos gonococos en su interior- y la naturaleza viscosa de las secreciones purulentas (35); dicha viscosidad se asocia a la lisis de los abundantes PMN's, ya que este fenómeno

se traduce en la acumulación del DNA liberado. Por obvio, la destrucción de esta clase de leucocitos puede ser provocada por los gonococos aunque, además, tiene su origen en la corta vida media de los propios PMN's (43, 46).

De acuerdo con lo anterior, la sobrevivencia de *N. gonorrhoeae* a la acción de los PMN's se basa en su capacidad para: a) limitar el reclutamiento de estos últimos; b) evitar el englobamiento; c) persistir dentro del fagosoma leucocitario (impidiendo la fusión fagolisosomal y/o neutralizando el poder oxidante del contenido lisosomal) (39).

Para interferir el reclutamiento leucocitario, el microorganismo emplea al menos una estrategia detectada durante el estudio de las infecciones asintomáticas; en éstas, se observó que el número de gonococos y PMN's era pequeño, aunque inicialmente no se logró definir con certeza si esta clase de leucocitos no llegaba a ser abundante debido a la escasés de bacterias, o bien, a que éstas contaban con algún mecanismo que impidiera la acumulación de PMN's; sin embargo, con el tiempo se logró establecer que ciertas cepas no promueven eficazmente la activación del complemento y que, por ende, no provocan que se alcancen concentraciones importantes del agente quimiotáctico C5a en el tejido afectado (43).

En cuanto a los mecanismos gonocócicos que evitan el englobamiento, se ha determinado lo siguiente:

- Buena parte de las cepas sintetizan material capsular que impide la reacción directa entre los componentes superficiales de la bacteria y de los fagocitos (43).
- Las cepas cuyo LOS se ha unido al ácido siálico del hospedador, oponen resistencia a ser opsonizadas por el péptido C3b. A este respecto, cabe recordar que el proceso fagocitario adquiere mayor eficacia cuando participan las opsoninas (sustancias que lo facilitan y potencian) y que, de éstas, el organismo del hospedador elabora al menos dos clases: el citado péptido C3b, cuya acción es inespecífica porque reconoce a cualquier microorganismo, y los anticuerpos IgG; ambas clases de opsoninas desempeñan su relevante función, merced a que pueden unirse muy estrechamente a la superficie del invasor y a que, además, cuentan con numerosos receptores localizados en la membrana de los fagocitos (55, 56, 71).

Finalmente, el hallazgo de que sólo algunos de los numerosos PMN's contienen gonococos intracelularmente, sugiere que dichos leucocitos sólo son capaces de

fagocitar a este microorganismo, cuando se encuentran en determinado estadio de su desarrollo (45).

vi. Procuración de hierro

Como es sabido, el hierro representa un elemento indispensable para el crecimiento bacteriano, pero sus concentraciones son particularmente bajas dentro del organismo humano, en donde prácticamente casi todo se encuentra ligado a transferrina, ferritina, lactoferrina y hemina (49, 78).

De acuerdo con ello, la sobrevivencia bacteriana depende de la capacidad de cada especie para captar hierro libre o enlazado a otras moléculas (76); en este aspecto, se han detectado tres posibles mecanismos: uno implica la síntesis de sideróforos o “proteínas extracelulares de batalla” que, además de unirse al metal, cuentan con receptores propios en la célula del microorganismo (6); en el segundo, otros receptores superficiales de hierro fijan a este último, aunque se encuentre ligado a sideróforos sintetizados y liberados por otras especies microbianas, e inclusive, a transferrina o a lactoferrina (12, 48, 49); finalmente, el tercero parece involucrar la producción de exotoxinas que destruyen a las células del hospedador -incluidos los eritrocitos- para que éstas liberen sus reservas del metal: varios estudios efectuados *in vitro* han evidenciado que este

tipo de toxinas sólo se llega a sintetizar cuando el microorganismo desarrolla en medios carentes de hierro (13, 77).

N. gonorrhoeae puede adquirir el metal directamente de la transferrina y la lactoferrina humanas, ya que cuenta con receptores separados para cada una. No obstante, sólo se ha logrado identificar al receptor para la primera: TonB, correspondiente a una proteína ubicada en la membrana externa (78).

Es importante señalar que, aunque se sabe que *E. coli* posee una proteína homóloga, la cual actúa como sideróforo, lo cierto es que aún se desconoce si la TonB gonocócica desempeña el mismo papel. Empero, dicha proteína es sintetizada en cantidades más elevadas cuando el microorganismo desarrolla bajo condiciones carentes del metal (78).

Adicionalmente, estudios más recientes sugieren que *N. gonorrhoeae* también podría obtener hierro, a partir de la hemoglobina y de otros grupos “heme”, aunque ello aún se encuentra en estudio (12, 78).

vii. La búsqueda de vacunas eficaces

Si bien las vacunas empezaron a aparecer desde la primera mitad del siglo XX, la carencia del sustento científico necesario para su diseño, motivó que las aportaciones de la gran mayoría de ellas⁶ resultaran nulas o muy limitadas; de hecho, la única que alcanzó la efectividad deseada fue la ampliamente conocida como “triple” (ya que protege a la población contra el tétanos, la tosferina y la difteria) (20, 31).

Es decir que, realmente, en esa época sólo se conocían los fundamentos primarios -aún vigentes- de la producción vacunal; tales bases se resumen en las siguientes aseveraciones:

- Por lo general, cuando un agente infeccioso se establece por vez primera en el organismo del hospedador, transcurren hasta 2 semanas para que los anticuerpos dirigidos en su contra alcancen concentraciones protectoras (46).
- En contraste, un segundo contacto con el mismo agresor llega a generar respuestas inmunológicas considerables en tan sólo 1 ó 2 días (46).

⁶ Incluidas las elaboradas contra neumonía, meningitis, cólera, fiebre tifoidea, diarrea infantil, gonorrea, sífilis y sepsis bacteriana

- Por lo tanto, el papel concreto de una vacuna, es el de sustituir la primera exposición (2).

Evidentemente, en los años recientes se han logrado definir los requerimientos mínimos para que las vacunas cumplan estrictamente su finalidad en los seres humanos: deben inducir una respuesta inmune *basta y específica*, *ser accesibles* desde el punto de vista económico, administrarse, almacenarse y trasladarse con cierta facilidad, así como resultar muy seguras, en el sentido de no originar efectos tóxicos ni signos de las enfermedades contra las cuales se desea conferir protección (20).

Ante tal panorama, el estudio de los factores bacterianos de virulencia ha adquirido una importancia capital. Por citar 3 ejemplos:

- El descubrimiento de que la adherencia representa uno de los pasos determinantes en el proceso infectivo ha conducido a investigar si las adhesinas de los agentes causales pueden significarse como eficaces componentes vacunales; en consecuencia, tales organelos -purificados- están siendo probados como inmunógenos para prevenir el cólera y la tosferina (17, 34).

- El hallazgo de que la cápsula bacteriana posee propiedades antifagocitarias ha estimulado la preparación de vacunas experimentales, integradas por polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* (agente etiológico de la neumonía neumocócica) y de *Haemophilus influenzae* (principal causante de la meningitis infantil), para tratar de establecer si los anticuerpos inducidos facilitan la erradicación de dichos microorganismos capsulados por parte de los macrófagos y neutrófilos (22, 34).
- Las observaciones en el sentido de que *Neisseria gonorrhoeae* y algunas otras especies pueden modificar rápidamente sus antígenos de superficie, ha prevenido a los diseñadores de vacunas sobre la necesidad de elegir correctamente los inmunógenos bacterianos; la desafortunada elección de algún componente microbiano que sufriera variaciones *in vivo*, dejaría sin utilidad a los anticuerpos inducidos por la estructura original (52, 63).

Por lo que se refiere al diseño de vacunas que pudieran brindar protección contra la gonorrea, recientemente se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los *pili* parecen no ser viables candidatos para producir vacunas, ya que:

= Aunque presentan regiones antigénicas variables y conservadas, estas últimas se encuentran enmascaradas por las primeras y los anticuerpos dirigidos contra cualquiera de ellas resultarían prácticamente inútiles (58).

= P.I no varía en una misma cepa, pero sí entre una y otra cepas. Sin embargo, continúa siendo considerada como probable componente vacunal, debido a que contiene regiones expuestas que se conservan en ambas variantes P.IA y P.IB (15, 52, 58, 63).

2. Otras estructuras gonocócicas tampoco redituarian resultados óptimos.

Por ejemplo, PBP3 es una proteína de membrana externa, asociada al peptidoglicano, que es capaz de fijar a las penicilinas y cuya estructura parece conservarse intacta en la gran mayoría de las cepas gonocócicas. No obstante, diversos autores cuestionan su utilidad como componente de las vacunas, esgrimiendo que si PBP3 fuera una proteína bien expuesta y actuara como inmunógeno potente, los individuos que han curado de gonorrea no volverían a contraer la enfermedad (20).

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA GONORREA

En el laboratorio, el diagnóstico de la gonorrea se realiza con mayor frecuencia mediante metodologías microbiológicas comunes tendientes a aislar colonias puras del microorganismo, para identificarlas secuencialmente mediante pruebas bioquímicas y/o inmunológicas. Sin embargo, ya también se cuenta con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual, dada su rapidez y especificidad, representa la herramienta más confiable. A continuación se describen los fundamentos asociados a ambas clases de técnicas (38).

i. Diagnóstico microbiológico

Por lo regular, se acepta que el tracto genital femenino se divide en 2 regiones: la inferior o externa, constituida por vulva, vagina y cérvix y, la superior o interna, en donde se localizan el útero, las trompas de Falopio y los ovarios (27).

Dicha clasificación no sólo resulta útil desde el punto de vista anatómico sino que, además, permite establecer algunas diferencias referentes a la etiología de los padecimientos que se presentan en ambas regiones; en este sentido, puede afirmarse que las afecciones infecciosas de la zona inferior se deben

comúnmente a microorganismos de transmisión sexual, en tanto que las de la superior son ocasionadas con mayor frecuencia por los integrantes de la flora habitual, los cuales llegan a desplazarse a partir del tracto inferior, aprovechando diversas irregularidades que favorecen esta situación (21, 44).

Lo antes mencionado determina que, en condiciones de salud, los integrantes de la flora genital femenina sólo colonizan la región inferior, destacando la constancia de los estreptococos del grupo *Viridans*, los estafilococos coagulasa negativa (ECN), *Neisseria lactamica*, *Veillonella sp*, *Streptococcus agalactiae*, los difteroides, *Mycobacterium smegmatis*, el bacilo de Döderlein (*Lactobacillus sp*), *Candida albicans* y, dada la cercanía del recto, los estreptococos del grupo D (*Enterococcus sp*), algunas especies de *Pseudomonas* -principalmente *P. aeruginosa*- y ciertas enterobacterias. No obstante, la observación de los 3 últimos se restringe a personas que muestran menores cuidados respecto a sus hábitos de higiene (70).

Cabe señalar que la frecuencia de estos microorganismos es más elevada en las mujeres sexualmente activas y que a ellos se pueden incorporar otros, en función del número de parejas sexuales, del empleo de anticonceptivos orales

y de numerosos factores más que pueden variar la integridad de las mucosas y el pH vaginal (44).

Por lo que se refiere a *N. gonorrhoeae*, el diagnóstico se lleva a cabo mediante la detección del microorganismo en las secreciones o los raspados uretrales o endocervicales; en este sentido, deben recolectarse por lo menos 2 muestras de cada paciente: una de ellas para realizar una extensión teñida al Gram y, la otra, para intentar el cultivo, sembrando -mediante rotación del hisopo sobre la superficie del medio- en el Thayer Martin modificado (MTM) y en una gelosa chocolate. La razón de que se empleen los 2 medios radica en que algunas cepas de gonococos resultan sensibles a la vancomicina -contenida en el MTM- (28).

Previa incubación durante 48 h a 35°C, en atmósfera de 5 a 10 % de CO₂, se localizan las colonias cuya morfología resulta sospechosa -pequeñas, grisáceas de bordes regulares- y se resiembran 6 a 10 de ellas en otra placa única de gelosa chocolate, para propagarlas durante otras 24 a 48 h y que el crecimiento de cada una resulte suficiente para llevar a cabo los frotis al Gram -buscando los característicos diplococos Gram negativos-, pruebas de las oxidasas -dado que este género es uno de los relativamente pocos que la dan positiva- y, en caso de que ambos procedimientos confirmen la presencia de *Neisseria*, se puedan

tomar 5 asadas para sembrar tubos de CTA con glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y fructosa, respectivamente. El diagnóstico se establecerá si alguna de las colonias propagadas oxida únicamente la glucosa; no obstante, las reacciones de coaglutinación podrán reiterar el resultado (28, 72).

Con base en lo señalado anteriormente, cada laboratorio clínico diseña su propio protocolo, considerando los recursos con que cuenta. Por lo regular, dado que los síntomas de la gonorrea pueden sugerir diversas etiologías, la gran mayoría de los infectólogos recolectan 4 muestras (44):

- En cuanto a la primera, el hisopo se introduce en un tubo con 1.5 a 2 ml de solución salina isotónica (SSI) y se incuba a 37°C, antes de buscar la presencia de *Trichomonas vaginalis*, colocando una gota en un portaobjetos y, sobre ella, un cubreobjetos, antes de revisarla con los objetivos 10X y 40X (21).
- Con la segunda se prepara un frotis al Gram, rotando el hisopo sobre el portaobjetos y se revisa a inmersión para investigar si existen *Neisserias* intracelulares. Cabe señalar que, en caso de detectarse las estructuras correspondientes, esta preparación tendrá características más significativas si

la muestra procede de un varón, ya que en la vagina se encuentran microorganismos de la flora habitual, incluyendo a *N. lactamica*, que comparten características microscópicas con el gonococo (21, 53).

- Con la tercera se lleva a cabo las siembras en el MTM y la gelosa chocolate (44).
- Finalmente, con la última se intentan los cultivos en las placas de manitol-sal agar o alguno de sus equivalentes (S110, etc.), EMB o Mac Conkey y Biggy, para detectar en ellos la presencia de *S. aureus*, enterobacterias o *P. aeruginosa* y *C. albicans*, respectivamente (21).

Cabe destacar que algunas de las consideraciones más importantes sobre la recolección de las muestras son:

= El paciente no debe encontrarse bajo tratamiento antimicrobiano, dado que es posible que pequeñas cantidades de antibióticos -presentes en los especímenes- inhiban el desarrollo *in vitro* del agente etiológico (53).

- = Cuando se sospecha de gonorrea, debe muestrearse la zona endocervical, ya que en ésta se encuentra el microorganismo. Aunque *N. gonorrhoeae* también afecta la vagina, ésta contiene un gran número de integrantes de la flora habitual, los cuales pueden enmascarar el crecimiento de dicha especie en las placas de cultivo (21, 53).

- = El empleo del espejo vaginal resulta muy importante para recolectar la muestra directamente de las zonas en las que se detectan las lesiones. No obstante, es conveniente que no se utilicen lubricantes que puedan interferir el desarrollo de los microorganismos (21).

- = Los hisopos más adecuados son los de alginato de calcio y de poliéster, ya que los de algodón, manifiestan toxicidad para algunos agentes etiológicos (53).

- = Cuando las muestras no puedan ser procesadas inmediatamente después de su recolección, es necesario preservar su representatividad y ello sólo se logra depositándolas en medios de transporte tales como el Amies y el Stuart y manteniéndolas a temperatura ambiente. Si se sospecha de gonorrea, dichos medios pueden sustituirse por el Transgrow, el cual sí debe incubarse a 35°C (44, 53).

ii. Diagnóstico por PCR

Fundamento del método

La amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) corresponde a un proceso enzimático ejecutado por alguna DNA polimerasa; esta clase de enzimas cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de DNA a elongar (el iniciador) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) entrante (10).

La elección de cada nucleótido a incorporar está determinada por el DNA molde, al que el iniciador se ha unido previamente por complementariedad de bases (10).

La amplificación del DNA se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales presenta 3 etapas distintivas de temperatura⁷ (consultar la figura 2).

- (1) Desnaturalización del DNA molde -entre los 94° y 96°C-.
- (2) Alineamiento de los iniciadores al molde -entre los 42° y 60°C-.
- (3) Extensión (elongación) de los iniciadores por la DNA polimerasa -entre los 60° y 72°C-.

⁷ Cada etapa dura apenas entre uno y algunos minutos, por lo cual casi resulta indispensable que el laboratorio cuente con un termociclador; éste permite programar las temperaturas y la duración de los diversos periodos. para todo el proceso.

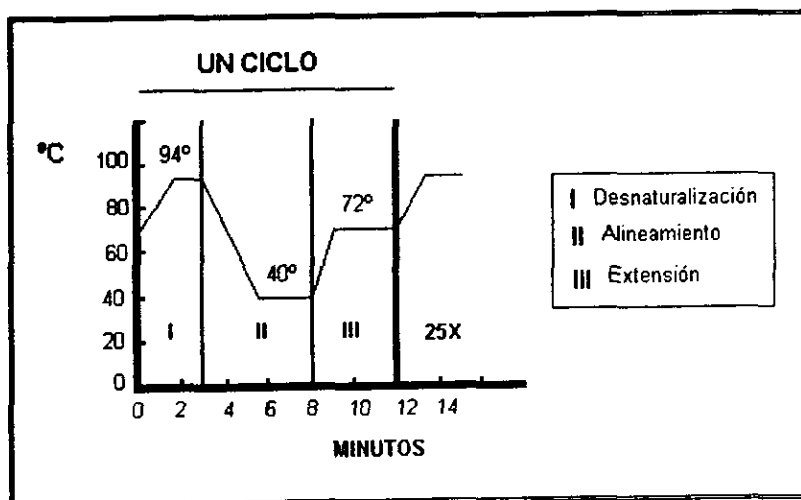
La reacción de amplificación contempla la participación de dos iniciadores (*primers* o cebadores), que se hibridan (se unen por complementariedad de bases) a cadenas opuestas del segmento “blanco”; cada iniciador se orienta de forma tal que la elongación se lleva a cabo a partir de su extremo 3'-OH, a través de la zona delimitada entre ambos iniciadores y hasta la región homóloga al “otro iniciador” (44). Como cada producto de la amplificación incluye la *secuencia complementaria a la del “otro iniciador”*, prácticamente todos los productos de cada reacción sirven de molde para el siguiente ciclo de la PCR (38).

En la primera etapa del ciclo de la PCR, se provoca la *desnaturalización del DNA molde*, entre los 94° y 96°C. En la segunda etapa, la mezcla de reacción se somete a la temperatura óptima de alineamiento entre el iniciador y su molde (42° a 60°C). Finalmente, en la tercera etapa, la temperatura se modifica a 72°C, que es ligeramente inferior a la óptima de una DNA polimerasa termoestable. De esta manera, los iniciadores se elongarán hasta producir nuevas hebras de DNA, incorporando los dNTP's que correspondan -por complementariedad-, a través de la participación de la enzima (28, 44).

Evidentemente, la hibridación inespecífica de los iniciadores puede conducir a la acumulación de productos inespecíficos o a la ausencia de amplificación (16).

Cabe señalar que la reacción concluye cuando la cantidad de enzima se reduce hasta niveles insuficientes (por la inactivación térmica ocurrida después de cada paso de desnaturalización), pero también gravita el hecho de que la efectividad del alineamiento de los iniciadores va decreciendo paulatinamente (al irse disminuyendo su concentración e incrementando en forma exponencial el número de secuencias "blanco") (79).

Figura 2. Programa de temperaturas de un termociclador de PCR (44).



Principales componentes de la PCR

Secuencia "blanco". Dado que una molécula de DNA bacteriano suele ser relativamente larga, en realidad se busca evidenciar una parte de aquélla cuya secuencia de bases resulte representativa (específica) de la especie en cuestión; en este sentido, es conveniente tomar en cuenta que una secuencia "blanco" óptima presenta una longitud de 150 a 500 pares de bases (bp), aunque segmentos mayores también son susceptibles de amplificarse en forma efectiva (28).

Puesto que la PCR es capaz de detectar mínimas cantidades de DNA, es indispensable evitar cualquier riesgo de contaminación con ácidos nucleicos provenientes de ensayos anteriores (38).

Iniciadores de la amplificación (*primers*). Los iniciadores son oligonucleótidos que, en condiciones ideales, deben presentar una composición y longitud (de 15 a 25 bp) semejantes, a fin de que sus respectivas temperaturas de fusión (T_m , la temperatura a la cual sólo el 50 % del iniciador está separado del DNA molde) sean similares (16, 44).

La temperatura de fusión (T_m), utilizada para la fase de alineamiento, se calcula con base en el contenido total de GC⁸ y AT⁹ del iniciador correspondiente, mediante la fórmula: $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$ (28).

Los iniciadores no deben ser complementarios entre sí, para evitar la formación de estructuras secundarias; asimismo, es preferible que no presenten series de 3 o más G's o C's en el extremo 3' y que su contenido de GC sea similar al del DNA molde (79).

La formación de estructuras secundarias que presentan la forma de “pasador de cabello” (*hairpin*), debidas a hibridaciones intramoleculares ocurridas en algún iniciador, así como la producción de DNA de doble cadena debida a uniones interiniciadores, representan dos de las principales causas de aparición de productos secundarios (inespecíficos), cuyo peso molecular es generalmente bajo (28).

Dichos “dímeros” pueden fungir por sí mismos como moldes y competir con el DNA “blanco” tanto por la enzima, como por los dNTPs y por los iniciadores, lo

⁸ G = guanina y C = citosina.

⁹ A = adenina y T = timina.

que puede derivar en rendimientos escasos de los productos de amplificación deseados (28, 44).

Por lo regular, los iniciadores se utilizan en niveles de 0.1 a 0.5 μM , ya que concentraciones mayores suelen promover uniones inadecuadas al DNA molde, provocando la acumulación de productos inespecíficos (38).

El diseño de iniciadores suele basarse en el empleo de programas comerciales que identifican características críticas de diseño y permiten al investigador encontrar algún par de iniciadores con propiedades conocidas y predictivas. De hecho, aportan datos tales como el tamaño esperado del producto, la temperatura óptima de alineamiento, así como el peso molecular, la localización y secuencia de cada iniciador (16, 28).

En el caso de *Neisseria gonorrhoeae* se utilizan como cebadores dos moléculas de 20 oligonucleótidos, conocidos como HO1 y HO3, cuyas respectivas secuencias son complementarias de la que conforma al gen cromosómico *cpg B* (28).

DNA Polimerasa I termoestable. Los protocolos originales de la PCR se desarrollaron contemplando el empleo del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (DNA pol I) de *Escherichia coli*; sin embargo, tal enzima no es termoestable y la mayor parte de ella resultaba inactivada durante la fase de desnaturalización, lo que obligaba a añadir otras cantidades antes de que ocurriera la siguiente etapa de alineamiento. Dicha limitación, sumada a la baja temperatura requerida para la elongación, daba lugar a reacciones de baja eficiencia y especificidad (44).

En ese contexto, el reemplazo de la enzima Klenow por una serie de DNA polimerasas termoestables ha venido a representar uno de los avances técnicos de mayor importancia para la PCR. La primera y más utilizada de tales enzimas es la *Taq* DNA polimerasa I (*Taq* pol I), producida por la bacteria termófila Gram-negativa *Thermus aquaticus*. Cabe señalar que el gen estructural que codifica para la síntesis de dicha enzima se ha logrado clonar y secuenciar en forma óptima, por lo cual actualmente no existen razones de peso para prescindir de ella (44).

La *Taq* pol I altamente purificada tiene una temperatura óptima de 70 a 80°C con una $V_{\max}$ próxima a los 180 nucleótidos/segundo/molécula de enzima

(nt/s), cifra que supera notablemente a los 16 a 20 nt/s de la *E. coli* DNA pol Y (28).

La concentración a la cual se utiliza la *Taq* pol I es de 1.0 a 2.5 unidades, ya que cuando aquélla es muy elevada se pueden acumular productos inespecíficos y, en contraste, cuando es muy baja, suele obtenerse una cantidad insuficiente del producto deseado (28).

Desoxirribonucleótidos. La síntesis de DNA requiere de desoxirribonucleótidos trifosfatados libres (dNTPs); la concentración de cada uno de ellos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) en la PCR debe ser 200 μ M, para lograr una especificidad óptima. En todo caso, es conveniente que los cuatro dNTPs se utilicen en concentraciones aproximadas, a fin de reducir los errores en la incorporación (44, 79).

En un volumen de reacción de 100 μ L, basta una concentración 20 μ M de cada uno de los dNTPs, para sintetizar 2.6 μ g de una secuencia “blanco” de 400-bp (16).

Otros componentes. Uno de los participantes “secundarios” más importantes de la PCR es el ión Mg^{2+} , ya que su participación influye en lo relativo al alineamiento de los iniciadores, a la temperatura de fusión del DNA y a la actividad enzimática de la *Taq* DNA pol I; su proporción óptima en la mezcla de reacción fluctúa entre 0.5 y 4.0 mM. Evidentemente, la presencia de EDTA o de otros agentes quelantes puede disminuir la concentración de este componente (38).

Por otra parte, la solución amortiguadora recomendada para la PCR es la de Tris-Cl, 10 a 50 mM a pH 8.3 a 8.9. Ésta proporciona un adecuado medio de reacción que incrementa la especificidad y el rendimiento de los productos de amplificación (28).

Cuando el DNA molde se encuentra mezclado con numerosas estructuras secundarias, es oportuno incorporar urea, formamida o dimetilsulfóxido al 1 a 10 %; finalmente, la adición de albúmina o glicerol incrementa el rendimiento de la reacción de amplificación cuando se trata de fragmentos de DNA molde mayores de 2.5 kbp (38).

Identificación del DNA amplificado

Una de las principales decisiones de quienes emplean la PCR consiste en seleccionar un método adecuado para detectar el producto amplificado dado que, entre los que se encuentran disponibles, existen diferencias muy significativas en términos de sensibilidad, especificidad, confiabilidad, dificultad y costo (16).

Como el producto primario de la PCR es una molécula dúplex de DNA lineal, de longitud y secuencia definidas, el método de detección ideal debe permitir una determinación precisa del tamaño y de la pureza del producto amplificado (38).

En este sentido, existen técnicas que se basan en el uso de simples geles de agarosa hasta las que contemplan la secuenciación del DNA. A continuación se mencionan tres de las que se emplean con mayor frecuencia:

Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. El corrimiento electroforético de los productos de la PCR representa el método empleado más frecuentemente en los laboratorios, ya que aporta resultados relativamente confiables, con una sensibilidad de 1.0 a 5.0 ng de DNA (44).

El procesamiento simultáneo de marcadores de peso molecular y de controles positivos provenientes de microorganismos caracterizados con anterioridad, permite realizar las comparaciones correspondientes y, consecuentemente, establecer la procedencia del DNA amplificado por PCR (44).

Evidentemente, el uso de geles de agarosa a los que se ha incorporado un tinte fluorescente como bromuro de etidio -el cual se intercala entre las bases apiladas del DNA- facilita las lecturas con sólo exponer las placas correspondientes a la luz U.V. Las terminales de la fuente de poder deben conectarse de tal manera que el DNA emigre hacia el ánodo; una vez concluido el corrimiento, el sistema se puede fotografiar, colocándolo en un transiluminador U.V., utilizando filtros rojo o naranja y película de blanco y negro (44).

Southern blot. Esta metodología representa una herramienta muy efectiva para establecer el origen del DNA presente en una muestra clínica. Una vez que se ha llevado a cabo la separación de los productos de la PCR -mediante electroforesis en gel-, se puede identificar un fragmento específico del DNA, previa transferencia de los diversos segmentos a una membrana de *nylon* o nitrocelulosa; posteriormente, la secuencia “blanco” se identifica vía su hibridación con una sonda (segmento monocatenario de DNA, de 18 a 50

nucleótidos de largo, proveniente de algún microorganismo plenamente identificado), marcada con algún elemento radioactivo. Después del lavado de la membrana, las dobles cadenas de DNA (constituidas por la sonda marcada y el DNA “problema”), permanecerán unidas a dicho soporte, en tanto que las moléculas monocatenarias se habrán eliminado. El revelado correspondiente se logra mediante la exposición de la membrana a una película de rayos-X (44).

Fragmentos polimórficos de restricción con longitudes variables (RFLP).

Otra metodología relacionada con el uso de sondas para identificar especies bacterianas, consiste en el denominado “fragmentos polimórficos de restricción con longitudes variables” (16, 28).

La mayoría de los genomas microbianos posee regiones que presentan una variabilidad muy evidente, lo que determina que, en ciertas partes del DNA, las secuencias de los oligonucleótidos varíen no sólo entre una y otra especie bacterianas, sino también, de una cepa a otra (79).

Esta variabilidad puede ser demostrada cuando el DNA cromosómico es purificado y se fragmenta en varios segmentos, vía la acción de endonucleasas de restricción, las cuales cortan el DNA en regiones muy específicas, que

presentan una determinada secuencia de bases nitrogenadas (consultar la tabla 4) (38).

Una vez digerido el DNA con la enzima de restricción en turno, los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa¹⁰; la distancia recorrida en el gel por cualquiera de los segmentos del DNA, puede relacionarse con marcadores de peso molecular (44).

Tabla 4. Secuencias de reconocimiento¹¹ de algunas enzimas de restricción (28).

Microorganismo	Nombre de la enzima	Secuencia de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	G↓AATTC
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRII</i>	↓CCAGG (secuencia no palindrómica)
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>HindII</i>	GTPy↓PuAC
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>HindIII</i>	AAG↓CTT
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>BsuRI</i>	GG↓CC
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	T↓CGA

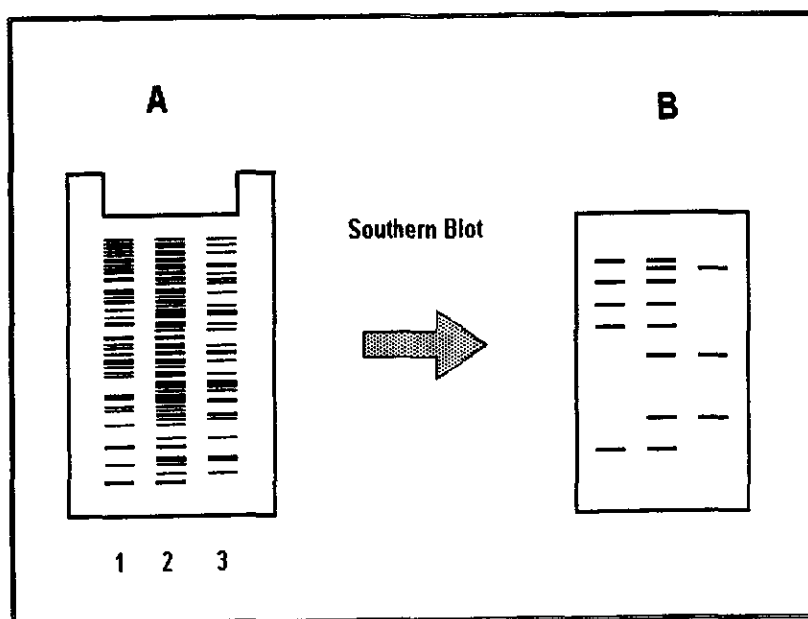
CLAVE: Las flechas indican el sitio en que ocurre el ataque enzimático en cada caso. Pu=cualquier purina. Py=cualquier pirimidina; A=adenina; T=timina; G=guanina; C=citosina. Sólo se muestra la secuencia en dirección 5'→3'.

¹⁰ Los diferentes tamaños de los fragmentos obtenidos (origen de la denominación de "polimorfismo") dependen plenamente de la ubicación y cantidad de las secuencias que funcionan como sitios de reconocimiento/corte para la(s) enzima(s) utilizada(s).

¹¹ La secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción suele presentar entre 4 y 6 nucleótidos de largo; en una molécula de DNA, generalmente se encuentra un número limitado de fragmentos con dicha secuencia.

Cuando el DNA de dos cepas diferentes es digerido por la misma enzima de restricción, y a continuación sus respectivos productos se separan mediante electroforesis, generalmente es fácil establecer diferencias entre ambos conjuntos de bandas. Sin embargo, ocasionalmente dichas diferencias pueden ser muy pequeñas, en cuyo caso se puede recurrir al análisis por *Southern-blot* (consultar la figura 3) (44).

Figura 3. Mapa de restricción obtenido mediante RFLP.



CONCLUSIONES

1. *Neisseria gonorrhoeae* presenta forma de diplococos Gram negativos y sus requerimientos nutricionales determinan el empleo de medios selectivos muy enriquecidos, tales como el Thayer Martin modificado, para lograr su aislamiento en el laboratorio.
2. El gonococo puede ser diferenciado del resto de las especies del género *Neisseria* mediante pruebas de oxidación de carbohidratos, reacciones de coagulación y a través de la PCR.
3. Las diversas entidades clínicas asociadas a la gonorrea son: la vaginocervicitis, uretritis, faringitis, proctitis y la oftalmía neonatal; sin embargo, a falta del tratamiento oportuno, pueden sobrevenir cuadros de mayor gravedad, entre los que destacan la gonococcemia, artritis, endocarditis, meningitis -causados por cepas auxótrofas a arginina, hipoxantina y uracilo-, así como la epididimitis (en el varón) o la salpingitis, peritonitis y

perihepatitis (en la mujer); la epididimitis y la salpingitis suelen resolverse por fibrosis, provocando infertilidad en el(la) paciente.

4. La creciente aparición de cepas resistentes a las penicilinas y tetraciclinas ha conducido al empleo de nuevos regímenes terapéuticos basados en el empleo de espectinomicina, fluoroquinolonas de reciente producción y cefalosporinas de amplio espectro (destacando la cefoxitina), cuya selección debe fundamentarse en la realización de pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

5. *Neisseria gonorrhoeae* cuenta con diversos factores de virulencia que le confieren patogenicidad; los principales son: sus adhesinas (los *pili* y la proteína P.II), la porina P.I, el lipo-oligosacárido (LOS), la porina P.III, la IgA hidrolasa y los receptores proteicos de la transferrina y lactoferrina humanas. Los *pili* promueven la adhesión inicial a las células epiteliales y sufren constantes variaciones antigénicas que originan la obsolescencia de los anticuerpos; la P.II actúa como invasina; la P.I funge como agresina; el LOS es anticomplementario e induce el proceso inflamatorio; la P.III es muy inmunógena y capta numerosos anticuerpos anti-P.III que impiden la reacción de los anticuerpos “bactericidas” anti-LOS y anti-P.I; la IgA hidrolasa escinde a los anticuerpos de la clase IgA secretoria, liberando al

microorganismo; finalmente, los receptores de transferrina y lactoferrina permiten que el microorganismo obtenga hierro.

6. El diagnóstico de laboratorio de la gonorrea se realiza generalmente mediante metodologías microbiológicas que implican el aislamiento del gonococo y su secuencial identificación bioquímica y/o inmunológica; sin embargo, dada su rapidez y confiabilidad, resultaría muy positivo que un mayor número de laboratorios también incorporara a la PCR. Ésta se basa en la amplificación de segmentos de DNA específicos del agente etiológico, los cuales posteriormente se identifican por una simple electroforesis, por *Southern blot* o por RFLP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apicella M.A., Ketterer M., Lee F.N., Zhou D., Rice P.A. and Blake M.S.: The pathogenesis of gonococcal urethritis in men: confocal and immunoelectron microscopic analysis of urethral exudates from men infected with *Neisseria gonorrhoeae*, *J Infect Dis*, 1996; 173: 636-646.
2. Arko R.J., Smith S. and Chen C.Y.: *Neisseria gonorrhoeae*: vaginal clearance and its correlation with resistance to infection in subcutaneous chambers in orally immunized estradiol-primed mice, *Vaccine*, 1997; 15(12): 1344-1348.
3. Arvidson C.G., Kirkpatrick R., Witkamp M.T., Larson J.A., Schipper C.A., Waldbeser L.S., O'Gaora P., Cooper M. and So M.: *Neisseria gonorrhoeae* mutants altered in toxicity to human fallopian tubes and molecular characterization of the genetic locus involved, *Infect Immun*, 1999; 67(2): 643-652.
4. Ayala P., Lin L., Hopper S., Fukuda M. and So M.: Infection of epithelial cells by pathogenic *Neisseriae* reduces the levels of multiple lysosomal constituents, *Infect Immun*, 1998; 66(10): 5001-5007.
5. Bäckman M., Källström H. and Jonsson A.: The phase-variable pilus-associated protein PilC is commonly expressed in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*, and shows sequence variability among strains, *Microbiol*, 1998; 144(1): 149-156.
6. Biswas D.G., Anderson E.J., Chen C., Cornelissen N.C. and Sparling F.P.: Identification and functional characterization of the *Neisseria gonorrhoeae* *lbpB* gene product, *Infect Immun*, 1999; 67(1): 455-459.
7. Boyle-Vavra S. and Seifert S.H.: Uptake-sequence-independent DNA transformation exists in *Neisseria gonorrhoeae*, *Microbiol*, 1996; 142(12): 2839-2845.
8. Brodine S.K., Shafer M., Shaffer R.A., Boyer C.B., Putnam S.D., Wignall F.S., Thomas R.J., Bales B. and Schachter J.: Asymptomatic sexually transmitted disease prevalence in four military populations: application of DNA amplification assays for *Chlamydia* and gonorrhea screening, *J Infect Dis*, 1998; 178: 1202-1204.

9. Burch C.L., Danaher R.J. and Stein D.C.: Antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*: production of multiple lipooligosaccharides, J Bacteriol, 1997; 179(3): 982-986.
10. Carrino J.J. and Lee H.H.: Nucleic acid amplification methods, J Microbiol Methods, 1995; 23: 3-20.
11. Casadevall A.: Antibody-mediated protection against intracellular pathogens, Trends Microbiol, 1998; 6(3): 102-106.
12. Chen C., Elkins C. and Sparling P.F.: Phase variation of hemoglobin utilization in *Neisseria gonorrhoeae*, Infect Immun, 1998; 66(3): 987-993.
13. Chen C., Sparling P.F., Lewis L.A., Dyer D.W. and Elkins C.: Identification and purification of a hemoglobin-binding outer membrane protein from *Neisseria gonorrhoeae*, Infect Immun, 1996; 64(12): 5008-5014.
14. Cohen M.S., Cannon J.G., Jerse A.E., Charniga L.M., Isbey S.F. and Whicker L.G.: Human experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: rationale, methods, and implications for the biology of infection and vaccine development, 1994; 169: 532-537.
15. Cooke S.J., De la Paz H., Poh C., Ison C.A. and Heckels J.E.: Variation within serovars of *Neisseria gonorrhoeae* detected by structural analysis of outer-membrane protein PIB and by pulsed-field gel electrophoresis, Microbiol, 1997; 143(10): 1415-1422.
16. Crotchfelt K.A., Welsh L.E., DeBonville D., Rosenstrauss M. and Quinn T.C.: Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by a coamplification PCR assay, J Clin Microbiol, 1997; 35(6): 1536-1540.
17. Dalton H.M. and March P.E.: Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling, Curr Opin Biotechnol, 1998; 9(3): 252-255.
18. De la Paz H., Cooke S.J. and Heckels J.E.: Effect of sialylation of lipopolysaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* on recognition and complement-mediated killing by monoclonal antibodies directed against different outer-membrane antigens, Microbiol, 1995; 141(7): 913-920.

19. Ellison R.T.: The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria, *Adv Exp Med Biol*, 1994; 357: 71-90.
20. Escobar G.A., Valdespino G.J. y Sepúlveda A.J.:
VACUNAS, CIENCIA Y SALUD
Secretaría de Salud, 1a. edición
México, 1992.
21. Finegold S.M. and Baron E.J.:
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
Editorial Médica Panamericana, 7a. edición
Buenos Aires, 1993.
22. Finlay B.B. and Falkow S.: Common themes in microbial pathogenicity revisited, *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997; 61(2): 136-169.
23. Flores S.: Mecanismos de resistencia del huésped en Microbiología y Parasitología Médica, 2a. edición, Tay Z.J., Gutiérrez Q.M., Rodríguez Q.A., López M.R. and Romero C.R., Méndez editores, México, 1.117-1.146.
24. Forest K.T., Bernstein S.L., Getzoff E.D., So M., Tribbick G., Geysen H.M., Deal C.D. and Tainer J.: Assembly and antigenicity of the *Neisseria gonorrhoeae* pilus mapped with antibodies, *Infect Immun*, 1996; 64(2): 644-652.
25. Fyfe J.M. and Davies J.K.: An at-rich tract containing an integration host factor-binding domain and two up-like elements enhances transcription from the *pilEp1* promoter of *Neisseria gonorrhoeae*, *J Bacteriol*, 1998; 180(8): 2152-2159.
26. Fyfe J.M., Carrick C.S. and Davies J.K.: The *pilE* gene of *Neisseria gonorrhoeae* MS11 is transcribed from a σ^{70} promoter during growth in vitro, *J Bacteriol*, 1995; 177(13): 3781-3787.
27. García M.L., Ocaña C.A. y Cuellar G.A.:
SISTEMA UROGENITAL
Editorial Limusa, 1a. edición
México, 1993.

28. García R. C., Sosa P.J., Llanes C.R., Valdivia R.A., Guzmán H.D., Gutiérrez G.O. y Gutiérrez R.Y.: Identificación de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), *Enf Infec y Microbiol*, 1998; 18(5): 191-197.
29. Giardina P.C., Williams R., Lubaroff D. and Apicella M.A.: *Neisseria gonorrhoeae* induces focal polymerization of actin in primary human urethral epithelium, *Infect Immun*, 1998; 66(7): 3416-3419.
30. Grassmé H.C., Ireland R.M. and van Putten J.M.: Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton, *Infect Immun*, 1996; 64(5): 1621-1630.
31. Griffiths E.: Environmental regulation of bacterial virulence-implications for vaccine design and production, *Tibtech*, 1991; 9: 309-315.
32. Gulati S., McQuillen D.P., Mandrell R.E., Jani D.B. and Rice P.A.: Immunogenicity of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope 2C7, widely expressed in vivo with no immunochemical similarity to human glycosphingolipids, *J Infect Dis*, 1996; 174: 1223-1237.
33. Gutjahr T.S., O'Rourke M., Ison A.C. and Spratt G.B.: Arginine, hypoxanthine, uracil-requiring isolates of *Neisseria gonorrhoeae* are a clonal lineage within a non-clonal population, *Microbiol*, 1997; 143(6): 633-640.
34. Hacker J., Blum-Oehler G., Muhldorfer Y. and Tschäpe H.: Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution, *Mol Microbiol*, 1997; 4(6): 1089-1097.
35. Hauck R.C., Lorenzen D., Saas J. and Meyer T.F.: An in vitro-differentiated human cell line as a model system to study the interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with phagocytic cells, *Infect Immun*, 1997; 65(5): 1863-1869.
36. Hedges S.R., Mayo M.S., Kallman L., Mestecky J., Hook III E.W. and Russell M.W.: Evaluation of immunoglobulin A1 (IgA1) protease and IgA1 protease-inhibitory activity in human female genital infection with *Neisseria gonorrhoeae*, *Infect Immun*, 1998; 66(12): 5826-5832.
37. Held T.K., Weihua X., Yuan L., Kalvakolanu D.V. and Cross A.S.: Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two

- distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1, *Infect Immun*, 1999; 67(1): 206-212.
38. Herrmann B., Nyström T. and Wessel H.: Detection of *Neisseria gonorrhoeae* from air-dried genital samples by single-tube nested PCR, *J Clin Microbiol*, 1996; 32(10): 2548-2551.
 39. Johnson S.R., Steiner B.M. and Perkins G.H.: Cloning and characterization of the catalase gene of *Neisseria gonorrhoeae*: use of the gonococcus as a host organism for recombinant DNA, *Infect Immun*, 1996; 64(7): 2627-2634.
 40. Jonsson A., Rahman M. and Normark S.: Pilus biogenesis gene, pilC, of *Neisseria gonorrhoeae*: pilC1 and pilC2 are each part of a larger duplication of the gonococcal genome and share upstream and downstream homologous sequences with opa and pil loci, *Microbiol*, 1995; 141(10): 2367-2377.
 41. Kacena K.A., Quinn S.B., Hartman S.C., Quinn T.C. and Gaydos C.A.: Pooling of urine samples for screening for *Neisseria gonorrhoeae* by ligase chain reaction: accuracy and application, *J Clin Microbiol*, 1998; 36(12): 3624-3628.
 42. Kehl S.C., Georgakas K., Swain G.R., Sedmak G., Gradus S., Singh A. and Foildy S.: Evaluation of the abbot LCx assay for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical swab specimens from females, *J Clin Microbiol*, 1998; 36(12): 3549-3551.
 43. Keisari Y., Kabha K., Nissimov L., Schlepper-Schafer J. and Ofek Y.: Phagocyte-bacteria interactions, *Adv Dent Res*, 1997; 11(1): 43-49.
 44. Knapp J.S. and Rice R.J.: *Neisseria* and *Branhamella* in *Manual of Clinical Microbiology*, 6th edition, Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C. and Tenover R.H., American Society for Microbiology, Washington, 1995, 282-298.
 45. Knepper B., Heuer Y., Meyer T.F. and van Putten J.M.: Differential response of human monocytes to *Neisseria gonorrhoeae* variants expressing pili and opacity proteins, *Infect Immun*, 1997; 65(10): 4122-4129.

46. Kotwal G.J.: Microorganism and their interaction with the immune system. *J Leukoc Biol*, 1997; 62(4): 415-429.
47. Lamm M.E.: Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense, *Am J Physiol*, 1998; 274(4): 614-617.
48. Larribe M., Taha M., Topilko A. and Marchal C.: Control of *Neisseria gonorrhoeae* pilin gene expression by environmental factors: involvement of the *pilA/pilB* regulatory genes, *Microbiol*, 1997; 143(9): 1757-1764.
49. Lee B.C. and Levesque S.: A monoclonal antibody directed against the 97-kilodalton gonococcal hemin-binding protein inhibits hemin utilization by *Neisseria gonorrhoeae*, *Infect Immun*, 1997; 65(7): 2970-2974.
50. Levin J.C. and Stein D.C.: Cloning, complementation, and characterization of an *rfaE* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*, *J Bacteriol*, 1996; 178(15): 4571-4575.
51. Lin J.L., Donegan P., Heeren T.C., Greenberg M., Flaherty E.E., Haivanis R., Su X., Dean D., Newhall W.J., Knapp J.S., Sarafian S.K., Rice R.J., Morse S.A. and Rice P.A.: Transmission of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among men with urethritis and their female sex partners, 1998; 178: 1707-1712.
52. Lomholt H., Lind I. and Kilian M.: *Neisseria gonorrhoeae* IgA1 proteases share epitopes recognized by neutralizing antibodies, *Vaccine*, 1995; 13(13): 1212-1218.
53. Mandell G.L., Bennett J.E. and Dolin R.:
ENFERMEDADES INFECCIOSAS. Principios y prácticas.
Editorial Médica Panamericana, 4a. edición
Buenos Aires, 1997.
54. Marcotte H. and Lavoie M.C.: Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A, *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998; 62(1): 71-109.
55. McGree D.J., Chen G. and Rest R.F.: Expression of sialyltransferase is not required for interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with human epithelial cells and human neutrophils, *Infect Immun*, 1996; 64(10): 4129-4136.

56. McGree D.J., Rest R.F.: Regulation of gonococcal sialyltransferase, lipooligosaccharide, and serum resistance by glucose, pyruvate, and lactate, *Infect Immun*, 1996; 64(11): 4630-4637.
57. McFaddin J.F.:
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA
Editorial Médica Panamericana, 3a. edición.
Buenos Aires, 1990.
58. Mee B.J., Thomas H., Cooke S.J., Lambden P.R. and Heckels J.E.: Structural comparison and epitope analysis of outer-membrane protein PIA from strains of *Neisseria gonorrhoeae* with differing serovar specificities, *Journal of General Microbiol*, 1993; 139 (12): 2613-2620.
59. Mendiola G.J.: *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae* en Microbiología y Parasitología Médica, 2a. edición, Tay Z.J., Gutiérrez Q.M., Rodríguez Q.A., López M.R. and Romero C.R., Méndez editores, México, 1.214-1.229.
60. Merz A.J. and So M.: Attachment of piliated, Opa⁻ and Opa⁺ gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated proteins, *Infect Immun*, 1997; 65(10): 4341-4349.
61. Náder E.G., Mondragón V.J. y Conde C.G.: Empleo de la biología molecular para la caracterización epidemiológica de *Neisseria gonorrhoeae*, *Salud Pública de México*, 1992; 34(3): 292-300.
62. O'Rourke M. and Spratt B.G.: Further evidence for the non-clonal population structure of *Neisseria gonorrhoeae*: extensive genetic diversity within isolates of the same electrophoretic type, *Microbiol*, 1994; 140(6): 1285-1290.
63. Parmar M.M., Blake M.S. and Madden T.D.: Biophysical and antigenic characterization of gonococcal protein I incorporated into liposomes, *Vaccine*, 1997; 15(15): 1641-1651.
64. Petering H., Hammerschmidt S., Frosch M., van Putten J.M., Ison C.A. and Robertson B.D.: Genes associated with the meningococcal capsule complex

- are also found in *Neisseria gonorrhoeae*, J Bacteriol, 1996, 178(11): 3342-3345.
65. Phanucharas J.P. and Gorby G.L.: Differential intracellular efficacies of ciprofloxacin and cefixime against *Neisseria gonorrhoeae* in human fallopian tube organ culture, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997; 41(7): 1547-1551.
 66. Plummer F.A., Chubb H., Simonsen J.N., Bosire M., Slaney L., Maclean I., Ndinya-Achola J.O., Waiyaki P. and Brunham R.C.: Antibody to Rmp (outer membrane protein 3) increases susceptibility to gonococcal infection, J Clin Invest, 1993; 91(1): 339-343.
 67. Roitt, I.M.:
INMUNOLOGÍA
Salvat, 3a. edición.
España, 1993.
 68. Rudel T., Facius D., Barten R., Scheuerpflug I., Nonnenmacher E. and Meyer T.F.: Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*, Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92: 7986-7990.
 69. Rudel T., Scheuerpflug I. and Meyer T.F.: *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin, Nature, 1995; 373(26): 357-359.
 70. Ruiz S.D.: Relación Huésped-parásito en Microbiología y Parasitología Médica, 2a. edición, Tay Z.J., Gutiérrez Q.M., Rodríguez Q.A., López M.R. and Romero C.R., Méndez editores, México, 1.83-1.106.
 71. Sakamoto M., Fujisawa Y. and Nishioka K.: Physiologic role of the complement system in host defense, disease and malnutrition, Nutrition, 1998; 14(4): 391-398.
 72. Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B.I. and Suera H.:
MECANISMOS DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Editorial Médica Panamericana, 2a. edición
Buenos Aires, 1993.
 73. Scheuerpflug I., Rudel T., Ryll R., Pandit J. and Meyer T.F.: Roles of PilC and Pile proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and

- Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells, *Infect Immun*, 1999; 67(2): 834-843.
74. Seifert H.S., Wright C.J., Jerse A.E., Cohen M.S. and Cannon J.G.: Multiple gonococcal pilin antigenic variants are produced during experimental human infections, *J Clin Invest*, 1994; 93(6).
 75. Serkin C.D. and Seifert H.S.: Frequency of pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*, *J Bacteriol*, 1998; 180(7): 1955-1958.
 76. Stojiljkovic I., Larson J., Hwa X., Anic S. and So M.: HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation, *J Bacteriol*, 1996; 178(15): 4670-4678.
 77. Thomas C.E. and Sparling P.F.: Isolation and analysis of a *fur* mutant of *Neisseria gonorrhoeae*, *J Bacteriol*, 1996; 178(14): 4224-4232.
 78. Turner P.C., Thomas C.E., Elkins C., Clary S. and Sparling P.F.: *Neisseria gonorrhoeae* heme biosynthetic mutants utilize heme and hemoglobin as a heme source but fail to grow within epithelial cells, *Infect and Immun*, 1998; 66(11): 5215-5223.
 79. Wright C.J., Jerse A.E., Cohen M.S., Cannon J.G. and Seifert H.S.: Nonrepresentative PCR amplification of variable gene sequences in clinical specimens, containing dilute, complex mixtures of microorganisms, *J Clin Microbiol*, 1994; 32(1): 464-468.
 80. Zhou D., Stephens D.S., Gibson B.W., Engstrom J.J., McAllister C.F., Lee F.N. and Apicella M.A.: Lipooligosaccharide biosynthesis in pathogenic *Neisseria*, *J Biol Chem*, 1994; 269(15): 11162-11169.