



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**UNA PERSPECTIVA EVOLUTIVA DE LA RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS EN *NEISSERIA GONORRHOEAE***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I Ó L O G O)

P R E S E N T A:

CARLOS ENRIQUE ESTRADA MOEDANO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RICARDO NOGUERA SOLANO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD MX, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Estrada
Moedano
Carlos Enrique
52642869
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
302148873

1. Datos del tutor

Dr
Ricardo
Noguera
Solano

2. Datos del sinodal 1

Dr
Arturo Carlos II
Becerra Bracho

3. Datos del sinodal 2

Dr
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 3

Dra
María de los Ángeles
Cancino
Rodezno

5. Dr

Juan Manuel
Rodríguez
Caso

6. Datos del trabajo escrito

Una perspectiva evolutiva de la resistencia a antimicrobianos en *Neisseria gonorrhoeae*
58 p
2017

A mi familia y amigos

“Twenty years from now you will be more disappointed by the things that you didn’t do than by the ones you did do. So throw off the bowlines. Sail away from the safe harbor. Catch the trade winds in your sails. Explore. Dream. Discover.”

– Mark Twain

Agradecimientos

Finalmente ha llegado el momento de dar este gran paso en vida e iniciar una nueva etapa en mi vida, cada persona en mi vida ha sido clave para llegar hasta donde estoy ahora, gracias a todos.

A ti Ferdi, por impulsarme a seguir adelante y no rendirme, tenías razón, al final valió la pena. Aunque nuestros caminos han tomado diferentes direcciones siempre te llevaré en el corazón, gracias por todo.

A mi mamá, porque sin tu apoyo jamás hubiera llegado hasta donde estoy hoy, gracias por confiar en mi.

A mi papá, es un pequeño triunfo que me hace creer que pronto llegaré muy lejos. Gracias por escucharme y ser incondicional.

A mi hermana Karina, la mejor hermana que el universo me pudo haber dado, siempre has estado a mi lado en los momentos importantes, siempre te llevo en mi corazón.

A mi hermano Erik, tal vez el tiempo nos ha distanciado, aún creo que existe un ser increíble dentro de ti, has sido fuente de inspiración en nuestra familia. Retoma el timón de tu barco, navega capitán!

Romina, sigue creciendo, eres una niña inteligente y llena de habilidades, sé que llegarás muy lejos.

Santiago, eres un gran niño, el orgullo de tu papá, gracias por esas conversaciones tan interesantes, estoy seguro que tendrás mucho éxito en tu vida.

Regina, ve por sus sueños.

Monserrat, fuiste un gran apoyo, siempre confiando en mi y escuchándome. Te pido perdón por fallarte como amigo, sabes que te quiero y espero algún día recuperar tu amistad.

Ricardo, mi tutor, sé que me ha tomado años finalmente llegar hasta aquí, gracias por tu apoyo y paciencia, has sido clave en mi educación y mi salvador cuando ya venía salida.

Josh, thank you for always being there to support me. I feel blessed with your friendship.

Oliver, I would not have achieved this without you. You were right, in the end it's worth the effort. Thank you for always being a great friend.

To you David, my love, I would not have got to where I am, hadn't you believed in me the way you have. Thank you for being the man you are, I would not be here without you. This is the start of a great new chapter in our lives. I love you.

Tabla de contenidos

Tabla de contenidos.....	V
Síntesis.....	VI
Introducción	1
Capítulo 1: Agente etiológico, manifestaciones clínicas y detección.....	4
Capítulo 2: Historia de antibióticos usados para el tratamiento de <i>N. gonorrhoeae</i>	7
Capítulo 3: Genética de la resistencia a antibióticos	18
Capítulo 4: Mecanismos de resistencia a antibióticos	25
Capítulo 5: Evolución de la resistencia a antibióticos.....	31
Conclusiones.....	38
Referencias.....	43

Síntesis

Neisseria gonorrhoeae es la segunda infección de transmisión sexual bacteriana más prevalente a nivel mundial de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. *N. gonorrhoeae* está clasificada por *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) como una súper bacteria por ser resistente a todos los antibióticos disponibles clínicamente para su tratamiento, desde penicilina hasta cefalosporinas de tercera generación. Dada la naturaleza única de *N. gonorrhoeae* como patógeno obligado con el humano y su evolución a la resistencia; es importante una revisión bibliográfica de su resistencia a antibióticos con una perspectiva evolutiva. Una fractura profunda entre la evolución y la medicina ha prevenido que la medicina haga uso de la biología evolutiva. La comprensión de los procesos que contribuyen a la evolución y selección de la resistencia permitirá un mejor manejo y desarrollo de nuevos antibióticos. En esta tesis se hace una revisión de los avances en la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae*, describiendo los mecanismos evolutivos que prevalecen en la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* y analizando sus implicaciones a nivel de salud pública. Tal vez no hay mejor ejemplo de la noción darwiniana de selección natural como la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae*. La resistencia a antibióticos ha probado ser inevitable. Los movimientos de genes horizontal y verticalmente en las poblaciones bacterianas no respetan frontera. Las bacterias viven en ambientes dominados por moléculas pequeñas, y han evolucionado mecanismos específicos. Los avances en la comprensión de la evolución de resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae*, permitirán a los médicos tomar decisiones más acertadas en los tratamientos. Los avances en biología molecular permitirán analizar las cepas que infectan a los pacientes para conocer su susceptibilidad a antibióticos y dar tratamientos personalizados, lo que

ayudará a predecir los elementos de resistencia antibiótica y alargará la eficacia de futuros antibióticos usados para el tratamiento de *N. gonorrhoeae*.

Introducción

La gonorrea es la segunda infección bacteriana de transmisión sexual con mayor prevalencia a nivel mundial (Magnus Unemo & Jensen, 2017; Magnus Unemo & Shafer, 2014). Cepas de *N. gonorrhoeae* con baja susceptibilidad a la última línea de tratamiento empírica (cefalosporinas de tercera generación en combinación con azitromicina) se han reportado en Asia, Europa y Norte América (England, 2016; Fifer et al., 2016); convirtiendo a ésta infección de transmisión sexual en un importante problema de salud pública debido al alto índice de infección a nivel mundial y a la posible amenaza de convertirse en una infección sin tratamiento en un futuro cercano (Centers for Disease Control and Prevention, 2012; Suay-García & Pérez-Gracia, 2017). En el 2012 fue clasificada como una súper bacteria por *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) por ser resistente a todos los antibióticos usados clínicamente para el tratamiento de la gonorrea (Suay-García & Pérez-Gracia, 2017; Magnus Unemo & Shafer, 2011).

Después de que *N. gonorrhoeae* mostrará resistencia a penicilina, 40 años después de su introducción (Patel et al., 2011), cuando la concentración inhibitoria mínima (MIC por sus siglas en inglés *Minimum Inhibitory Concentration*)¹ comenzó a aumentar fue necesaria la introducción de otros antibióticos. La evolución de la resistencia a cada uno de los antibióticos usados para tratar la gonorrea ha surgido después de su introducción en la clínica (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). En los últimos 70-80 años, las opciones de tratamientos han disminuido rápidamente, debido a la evolución de la resistencia a todos los antibióticos previamente usados o considerados como primera línea de tratamiento: penicilinas, tetraciclinas, espectinomocinas, cefalosporinas,

¹ **Concentración inhibitoria mínima** es la concentración más baja a la que un antibiótico previene el crecimiento de bacteriano después de sub-cultivo a un medio sin antibiótico. MIC son consideradas el estándar de oro para determinar la susceptibilidad de organismos a antibióticos (Andrews, 2006).

anfenicoles, sulfonamidas y combinaciones de trimetoprima, macrólidos y fluoroquinolonas (Workowski, Berman, & Douglas Jr., 2008).

Durante la última década se han reportado cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación, ceftriaxona y cefixima, las últimas opciones disponibles para el tratamiento de monoterapia, con casos reportados en Japón, Noruega, Austria y Reino Unido (Suay-García & Pérez-Gracia, 2017; M. Unemo, Golparian, Stary, & Eigentler, 2011; M. Unemo, Golparian, Syversen, Vestrheim, & Moi, 2010).

La resistencia a antibióticos no es nueva, pero sí el número de bacterias patógenas que afectan a humanos resistentes a antibióticos, las locaciones geográficas afectadas por resistencia a fármacos, y el aumento al número de antibióticos en un mismo organismo está comenzando a aumentar como no se había visto antes.

Está documentado que la acumulación de mutaciones genéticas genera la mayoría de estas variaciones (Eyre-Walker & Keightley, 2007; Futuyama, 2013; Rodríguez-Rojas, Rodríguez-Beltrán, Couce, & Blázquez, 2013).

En esta tesis se utilizan los conceptos fundamentales de variación genética y selección natural para explicar la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae*, se describen los mecanismos moleculares que favorecen la resistencia y se analizan las implicaciones que tiene la resistencia a antibióticos de *N. gonorrhoeae* en salud pública y en el desarrollo de nuevos fármacos.

La naturaleza global de la gonorrea, el uso descontrolado de antibióticos en algunas regiones del mundo, pobre control y monitoreo de resistencia antimicrobiana, tratamientos fallidos, lenta actualización de las normas de tratamiento en la mayoría de las regiones geográficas, y la extraordinaria capacidad de los gonococos de transferencia

horizontal y vertical de genes, ha resultado en una presión selectiva en *N. gonorrhoeae* (Magnus Unemo & Nicholas, 2012).

En esta tesis se sintetizan y analizan los últimos descubrimientos y reportes de la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* con una perspectiva evolutiva.

Capítulo 1: Agente etiológico, manifestaciones clínicas y detección

La gonorrea y sus manifestaciones clínicas relacionadas son causadas por la infección causada por la bacteria gram-negativa *Neisseria gonorrhoeae* (Bignell et al., 2013). La infección generalmente involucra la invasión de la columna epitelial de la uretra, endocérvix, recto, faringe y conjuntiva, aunque generalmente sólo queda localizada a los sitios iniciales de infección. Cuando la infección es asintomática o no es tratada adecuadamente puede ascender a la parte superior de los genitales y causar enfermedad inflamatoria pélvica en mujeres y epididimitis o prostatitis en hombres (G. Hughes et al., 2014). En mujeres puede causar complicaciones como infertilidad de origen tubárico o embarazos ectópicos (Tsevat, Wiesenfeld, Parks, & Peipert, 2017).

La transmisión es a través de la inoculación directa de secreciones infectadas, contacto genital-genital, genital-anorectal, oro-genital u oro-anal o por transmisión madre-hijo en el nacimiento – transmisión vertical – (Bignell et al., 2013). La infección es sintomática en la mayoría de los hombres (>90%) y aproximadamente en la mitad de las infecciones en mujeres (G. Hughes et al., 2014). Se ha reportado que la infección por gonorrea aumenta la carga viral de VIH en el tracto genital, facilitando la transmisión de VIH (Lewis, 2010; Tsevat et al., 2017).

Los datos de la incidencia de gonorrea a nivel mundial no muestran el número real de casos debido al pobre seguimiento, bajo reporte de nuevos casos y diagnósticos sub-óptimos en algunas regiones geográficas; así como la privacidad de datos del paciente (Bignell et al., 2013). Se ha reportado una incidencia tres veces mayor en hombres que en mujeres, mostrando la mayor proporción de síntomas en hombres, así como un mayor índice de infección en hombres que tienen sexo con hombres (Kirkcaldy et al., 2013). La

mayor incidencia de gonorrea es en adultos jóvenes, entre 15 a 29 años, y en algunos países hay una desproporción de la infección en grupos étnicos minoritarios y en hombres que tienen sexo con hombres (Bignell et al., 2013).

La infección por *N. gonorrhoeae* puede ser detectada con pruebas de amplificación de ácidos nucleicos o por cultivos celulares de muestras de origen genital, recto, faringe o secreciones oculares (Bignell et al., 2013). La prueba por amplificación de ácidos nucleicos es más rápida, tiene mayor sensibilidad y especificidad que la prueba por cultivos celulares. Sin embargo, la prueba por amplificación de ácidos nucleicos es más costosa. La prueba por amplificación de ácidos nucleicos es la prueba-diagnóstico de elección si se hace un diagnóstico dentro de las primeras 48 horas después de la exposición a *N. gonorrhoeae* (L.-K. Ng & Martin, 2005; Pogany et al., 2015). En casos donde se sospecha la falla del tratamiento o ésta está documentada, los médicos deben realizar prueba por amplificación de ácidos nucleicos y cultivo celular, ya que las pruebas sin cultivo no proporcionan resultados de susceptibilidad a antibióticos.

N. gonorrhoeae también puede ser detectada por microscopía de frotis de tejidos afectados para facilitar un diagnóstico rápido en pacientes sintomáticos. Ninguna prueba ofrece una sensibilidad y especificidad del 100% (Bignell et al., 2013; L.-K. Ng & Martin, 2005).

El control de la gonorrea depende totalmente de un tratamiento apropiado, así como de esfuerzos generalizados para la prevención, uso de métodos de diagnóstico efectivos, procesos de notificación a parejas sexuales y vigilancia epidemiológica. Actualmente, la única opción de tratamiento es la terapia con antibióticos, no hay vacuna para prevenir la infección.

N. gonorrhoeae puede modular la expresión, o el carácter químico de sus componentes de superficie por variación de fase, o por variación antigénica. Generalmente, la fase variación es una consecuencia del desplazamiento del marco de lectura dentro de un gen que lleva a el cambio aleatorio entre los estados de encendido o apagado, mientras la variación antigénica lleva a cambios en la composición química de algunos componentes estructurales. Es así, que cada célula gonococal puede expresar diferencialmente distintos antígenos de superficie, en varias formas químicas, lo que impide el reconocimiento por los anticuerpos del hospedero y ayuda a explicar la falta de vacunas eficientes contra *N. gonorrhoeae* (Hill, Masters, & Wachter, 2016).

Las opciones de tratamiento con antibióticos han disminuido a lo largo del tiempo debido a la evolución de la resistencia a antibióticos. Considerando el alto número de casos anuales estimados 106 millones de casos de gonorrea en adultos a nivel mundial (Bignell et al., 2013), la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* tiene implicaciones considerables en el presupuesto dedicado a la salud pues la resistencia a antibióticos amenaza nuestra habilidad para curar esta infección y prevenir secuelas de salud severas.

Capítulo 2: Historia de antibióticos usados para el tratamiento de *N. gonorrhoeae*

Selman Waksman fue el primero en usar la palabra antibiótico como un sustantivo en 1941 para describir cualquier molécula pequeña sintetizada por un microorganismo que antagoniza el crecimiento de otros microorganismos (Clardy, Fischbach, & Currie, 2009), mientras que la Organización Mundial de la Salud describe a los antibióticos como fármacos usados para tratar o prevenir infecciones bacterianas (World Health Organization, 2017). En esta tesis se usa la palabra *antibiótico* para referirse a moléculas que inhiben el crecimiento bacteriano, pues el término antimicrobiano se usa de forma más amplia para referirse a compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos (parásitos, virus, hongos y bacterias).

Los antibióticos han sido descritos como una de las formas más exitosas de quimioterapia en la historia de la medicina; desde su descubrimiento han ayudado a salvar millones de vidas (Fig. 1) (Davies & Davies, 2010); además de que han jugado un papel muy importante en el control de infecciones que han sido causa de morbilidad y mortalidad en la historia de la humanidad, como tuberculosis y cólera (Aminov, 2010). A pesar de que los antibióticos han sido exitosos en la eliminación de infecciones, algunas bacterias han evolucionado resistencia a todos los antibióticos usados para su tratamiento, como es el caso de *N. gonorrhoeae*.

La era de los antibióticos, desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 (Morse, 2009), se ha visto retada continuamente por bacterias resistentes a ellos. Las diferentes variables que actualmente predicen el nivel de resistencia en una comunidad son el mal uso de antibióticos que inducen a la selección y la propagación de bacterias

resistentes como resultado de un pobre control de infección y la intrusión de otras cepas resistentes al antibiótico, en donde la transferencia horizontal de genes juega un papel importante.

Una definición aceptada de resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* es cuando la prevalencia de resistencia es mayor a 5%; un tratamiento eficaz tiene una tasa de cura igual o mayor al 95% (Easmon et al., 1984; Handsfield, McCutchan, Corey, & Ronald, 1992; McCutchan, Adler, & Berrie, 1982).

La tasa de mortalidad causada por enfermedades infecciosas bajó drásticamente en el siglo XX después de la introducción de los antibióticos. Sin embargo, en 1980s y 1990s las muertes causadas por enfermedades infecciosas comenzaron a aumentar debido a la resistencia a antibióticos (Fig.1)

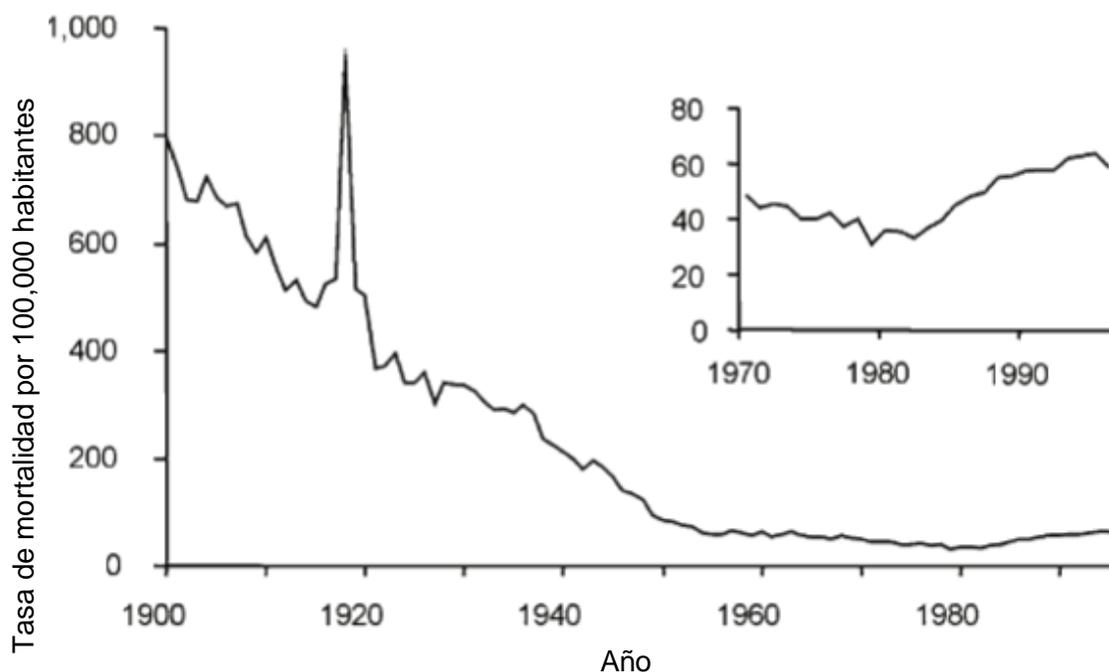


Figura 1. Niveles de mortalidad por cada 100,000 habitantes en Estados Unidos causados por enfermedades infecciosas. Modificado de (J. M. Hughes, 2001).

En *N. gonorrhoeae* se ha visto que después de la introducción de un nuevo antibiótico para su tratamiento, *N. gonorrhoeae* obtiene resistencia después de una o dos décadas (Suay-García & Pérez-Gracia, 2017; Magnus Unemo & Shafer, 2011)(Fig.2). Los gonococos presentan la mayoría de los mecanismos de resistencia a antibióticos más conocidos; inactivación de fármacos, alteración de blancos de antibióticos, incremento en la exportación e importación de moléculas (Lind, 1997; Magnus Unemo & Shafer, 2014)

La historia del desarrollo de la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* cubre varias décadas (Fig. 2) y presenta un tema recurrente que generalmente comienza con las señales de un incremento gradual de la concentración inhibitoria mínima en cada uno de los casos.

Los primeros reportes de resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* fueron publicados en 1947 (Dunlop, 1947), Dunlop describe la baja susceptibilidad de las sulfonamidas, primer agente antimicrobiano usado para el tratamiento contra la gonorrea, que con el paso de los años se propagó a todo el mundo (Suay-García & Pérez-Gracia 2017). Posteriormente, las sulfonamidas fueron reemplazadas por penicilina y tetraciclina, esta última usada en pacientes alérgicos a la penicilina.

A mediados de 1980 se reportó una baja susceptibilidad a estos antibióticos, y a principios de 1990 el escenario parecía prometedor con la introducción de tratamientos de dosis única de administración oral, tales como las fluoroquinolonas (principalmente ciprofloxacina y ofloxacina) y cefalosporinas orales de tercera generación (ceftriaxona y cefixima, siendo esta última más eficiente). Sin embargo, una década más tarde la susceptibilidad a las fluoroquinolonas bajo, y dejó de ser la primera línea de tratamiento empírico para la gonorrea en la región del Pacífico-Asia en la década de 1990, y subsecuentemente en Estados Unidos, Europa y algunas partes de África (Suay-García & Pérez-Gracia, 2017; J. Tapsall, Ndowa, Lewis, & Unemo, 2009; Workowski et al., 2008).

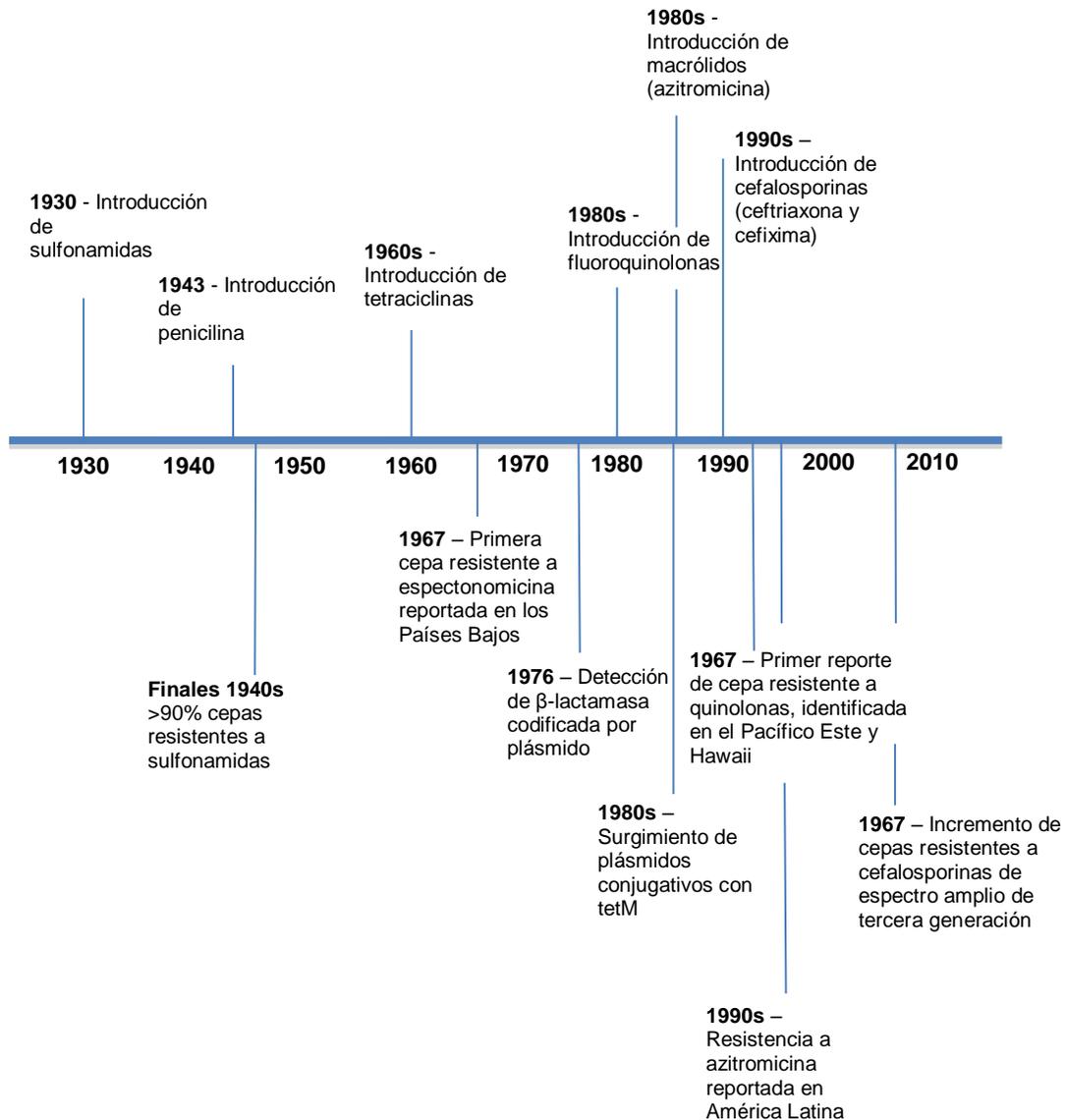


Figura 2. Línea de tiempo representando la introducción y primeros reportes de resistencia de todos los tratamientos usados contra gonorrea. Modificado de (Suay-García & Pérez-Gracia, 2017).

Así, desde principios del año 2000, las cefalosporinas de tercera generación (cefixima y ceftriaxona) han sido la única clase de antibióticos recomendados como

primera línea empírica de tratamiento. Actualmente, Centers for Disease Control and Prevention recomienda la combinación de ceftriaxona y azitromicina (macrólidos) para su tratamiento (Centers for Disease Control and Prevention, 2015). En los últimos años se han registrado casos de cepas resistentes a cefixima y ceftriaxona, ambas cefalosporinas de tercera generación (Lewis, 2010; Suay-García & Pérez-Gracia, 2017; Magnus Unemo & Jensen, 2017), lo que ha convertido a la gonorrea en un problema de salud público (Fig. 3).

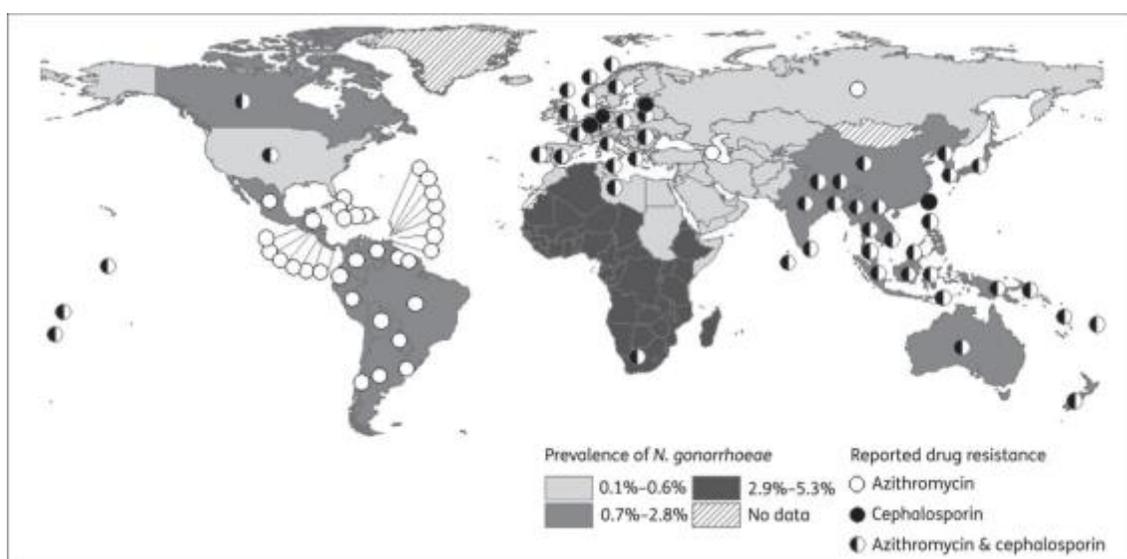


Figura 3. Prevalencia global de gonorrea y resistencia a antibióticos reportada. La prevalencia mostrada en esta figura, son estimaciones de la Organización Mundial de la Salud a nivel mundial, usando un gradiente sombreado. Los países que han reportado casos susceptibles a azitromicina son mostrados con un círculo blanco, los países que han reportado casos susceptibles a cefalosporinas son mostrados con un círculo negro, los países que han reportado susceptibilidad a azitromicina y cefalosporinas son mostrados con un círculo con una mitad en negro y la otra mitad en blanco. Los países marcados con interlineado no fueron incluidos en los datos de prevalencia de la Organización Mundial de la Salud. Fuente Buono et al. (2015).

Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron el primer antibiótico usado para el tratamiento de la gonorrea. El descubrimiento de las sulfonamidas en 1935 por el patólogo alemán Gerhard Domagk y su introducción para el tratamiento de infecciones por estreptococos, indujo a probar la sulfanilamida para el tratamiento de la gonorrea en 1937, obteniendo resultados exitosos

(Kampmeier, 1983; Lewis, 2010). A partir de 1940 se probaron otros derivados de sulfanilamida, sulfopiradina y sulfathiazol. En 1942 el comité del *American Neisserian Medical Society* publicó: "...hoy día el fármaco excepcional para el tratamiento de la gonorrea es el sulfathiazol" y se aceptó públicamente que la sulfanilamida no tenía la misma eficacia, además de que el sulfathiazol era más tolerado (Garvin, 1941; Magnus Unemo & Shafer, 2014). Charles H Moore reportó en 1941 la eficacia de sulfanilamida, sulfopiradina y sulfathiazol para el tratamiento de gonorrea, con porcentajes de cura de 58.9%, 88.3% y 91.3%, respectivamente (Garvin, 1941), aunque el tratamiento con sulfonamidas nunca tuvo un éxito de cura del 100%.

En 1944 los porcentajes de cura con sulfonamidas disminuyeron; un médico oficial de la campaña italiana reportó: "...desde la invasión de los países latinos, la gonorrea se ha hecho difícil de curar con los métodos de quimioterapia disponibles... son necesarios métodos adyuvantes en un alto porcentaje de los casos" (Kampmeier, 1983). En 1947 Dunlop trató a 205 hombres con gonorrea usando sulfathiazol y encontró una tasa de cura de 14.1 por ciento (Dunlop, 1947), por los siguientes 40 años la penicilina fue el antibiótico recomendado para tratar la gonorrea (Workowski et al., 2008).

Penicilina

En 1930, un año después de que Alexander Fleming descubriera la penicilina (American Chemical Society International Historic Chemical Landmarks., 1999), el microbiólogo inglés Cecil Paine usó un extracto crudo del hongo que produce la penicilina, *Penicillium notatum*, para curar oftalmia por gonococo en un infante (Lewis, 2010; Wainwright & Swant, 1986). Sin embargo, tuvieron que pasar algunos años antes de que la penicilina fuera usada terapéuticamente para tratar la gonorrea. Los primeros reportes del uso de la penicilina en casos resistentes a sulfonamida fueron en 1943, con un 100% de casos curados en algunos ensayos, posteriormente fue usada como tratamiento estándar contra

la gonorrea, usando 50,000 unidades de penicilina (Lewis, 2010; Van Slyke, Arnold, & Buchholtz, 1943; Workowski et al., 2008) suplantando a las sulfonamidas como primera línea de tratamiento (Magnus Unemo & Shafer, 2014).

Sin embargo, las concentraciones de inhibición media de penicilina para el tratamiento de gonorrea comenzaron a aumentar, en 1946 se reportaron cuatro casos resistentes a altas dosis de penicilina, entre 0.6-1.6m de unidades (Martin, Lester, Price, & Schmale, 1970; Reyn, Korner, & Bentzon, 1958); en 1961 se reportaron casos de cepas con poca sensibilidad a la penicilina en Inglaterra, Alemania y Dinamarca y en 1965 las autoridades de salud pública de Estados Unidos recomendaron doblar la concentración de penicilina usada para tratar la gonorrea (Thayer et al., 1961).

El surgimiento de cepas de *N. gonorrhoeae* que productoras de beta-lactamasa² se reportó por primera vez en Inglaterra (Percival et al., 1976; Phillips, 1976) y Estados Unidos (Ashford, Golash, & Hemming, 1976) en 1976; y se recomendó el uso de agentes estables a penicilasa cuando la prevalencia de cepas de *N. gonorrhoeae* excediera 5% (Easmon et al., 1984; McCutchan et al., 1982), además en Estado Unidos la CDC recomendó el aumento de concentración de penicilina a 4.8 m de unidades de penicilina en 1974, un aumento de 960% de 1946 a 1974 (Workowski et al., 2008)

En el hospital St Mary's en Londres se reportó en 1984 el aumento de casos de *N. gonorrhoeae* con producción de penicilasa de <0.5% en 1978 a 6.5% en 1982 y en enero de 1983 se introdujo la espectinomicina, antibiótico que ya estaba siendo usado para tratar pacientes alérgicos a la penicilina, como primera línea de tratamiento en mujeres y hombres en este mismo hospital (Easmon et al., 1984). Sin embargo, en 1982 se

²La expresión de **β -lactamasa** es el mecanismo más prevalente de resistencia a la familia de antibióticos de la familia de β -lactámicos, que incluye penicilinas y cefalosporinas.

publicaron casos de cepas de *N. gonorrhoeae* con producción de penicilasa³ resistentes a espectinomicina (Thin, Barlow, Eykyn, & Phillips, 1983), y se recomendó el uso de cefotaxima (cefalosporina) para el tratamiento de cepas de *N. gonorrhoeae* con producción de penicilasa resistentes a espectinomicina (McCutchan et al., 1982; Thin et al., 1983).

Tetraciclina

La primera tetraciclina, clortetraciclina, fue descubierta en un huerto en 1945 por Benjamin Minge Duggar. Las tetraciclinas se usaron para tratar a pacientes alérgicos a penicilina, pero su eficacia disminuyó con el tiempo y la concentración inhibitoria mínima aumentó debido a determinantes de gonococo cromosómico. El surgimiento del determinante TetM⁴ (causante de altos niveles de resistencia a tetraciclina) en el plásmido conjugativo a mediados de la década de 1980 resultó en la exclusión de la tetraciclina para el tratamiento de la gonorrea en los Estados Unidos y en otros países. En febrero de 1985 *Centers for Disease Control and Prevention* en Estados Unidos identificó 12 cepas de *N. gonorrhoeae* con altos niveles de resistencia a tetraciclina pero susceptible a penicilina, y en ese mismo año se recomendó el uso de tetraciclina únicamente en pacientes alérgicos a penicilina (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1985; Magnus Unemo & Shafer, 2014).

Espectinomicina

La espectinomicina fue desarrollada específicamente para el tratamiento de la casos de gonorrea resistentes a penicilina a principios de la década de 1960 (Easmon et al., 1984) y en 1967 se reportaron casos resistentes a espectinomicina y susceptibles a penicilina en

³ La **penicilasa** es una enzima que pertenece a la familia **β –lactamasa** y puede inactivar a la penicilina.

⁴ **TetM** es una proteína resistente a tetraciclina. Anula el efecto inhibitorio de la tetraciclina en la síntesis de proteínas a través de una modificación no covalente de los ribosomas.

los Países Bajos (Stolz, Zwartt, & Michelt, 1975). La espectinomicina fue introducida como primera línea de tratamiento para militares de Estados Unidos en la antigua República de Corea en 1981, pero después de 4 años, una tasa de 8.2% de fallas en el tratamiento fueron reportados, y fue reemplazada por ceftriaxona (cefalosporina de amplio espectro) (Boslego et al., 1987). En la década de 1980 el uso de espectinomicina fue abandonado internacionalmente como primera línea de tratamiento mono terapéutico para la gonorrea.

Fluoroquinolonas

A mediados de la década de 1980 las fluoroquinolonas ciprofloxacina y ofloxacina fueron usadas ampliamente, con dosis iniciales de 250 mg. de ciprofloxacina y en la década de 1990 se reportaron fallas con el tratamiento con ciprofloxacina y se duplicó la dosis a 500 mg. (Gransden, Warren, Phillips, Hodges, & Barlow, 1990). Como se había observado con otros antibióticos, la resistencia a las dosis más altas surgió y se extendió rápidamente, inicialmente en regiones de la región del pacífica del Oeste de Asia y en algunos países del Oeste del Pacífico se dejó de usar como primera línea de tratamiento a mediados de la década de 1990 (Magnus Unemo & Shafer, 2014).

Debido a los altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas, varios países asiáticos y europeos quitaron la ciprofloxacina como primera línea de tratamiento a principios de la década del 2000. Actualmente la prevalencia a la resistencia a fluoroquinolonas a nivel mundial es de 50% a 90% en algunos países (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2007; J. W. Tapsall, 2005).

Macrólidos

En 1952, se descubrieron los macrólidos, cuando la eritromicina fue aislada del microorganismo de suelo *Streptomyces erythraeus* (Magnus Unemo & Shafer, 2014). En 1980 se desarrolló un derivado sintético de eritromicina, azitromicina. Comparado con

eritromicina, azitromicina es más efectiva contra la actividad de *N. gonorrhoeae*, además de tener la ventaja de ser un tratamiento de dosis única. Desafortunadamente, a mediados de la década de 1990 se reportaron casos de resistencia a azitromicina en América Latina, en donde además es usada para el tratamiento de otras infecciones de transmisión sexual, como clamidia y sífilis. Se identificaron cepas con altos niveles de resistencia a azitromicina en Escocia, Inglaterra, Argentina, Italia y los Estados Unidos y Suecia del 2009-14 Susanne Jacobsson and others, 'WGS Analysis and Molecular Resistance Mechanisms of Azithromycin-Resistant (MIC > 2 Mg / L) Neisseria Gonorrhoeae Isolates in Europe from 2009 to 2014', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 1–8 <<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw279>>.. En el 2016 *Centers for Disease Control and Prevention* se reportó que el porcentaje de cepas de gonorrea con susceptibilidad a azitromicina disminuyó, un indicador de resistencia, incrementando más del 300 por ciento entre el 2013 y el 2014 (de 0.6 por ciento a 2.5 por ciento en las cepas de gonorrea aisladas).

La primera línea empírica de tratamiento en Canadá, Estados Unidos, Europa y Australia son las cefalosporinas de espectro extendido, principalmente ceftriaxona o cefixima y azitromicina (macrólidos) como co-terapia (Suay-García & Pérez-Gracia, 2017). Se han reportado casos de cepas con alta resistencia a azitromicina en el Reino Unido, Irlanda, Italia, Suecia, China, Australia, Argentina, Canadá y los Estados Unidos. El incremento en la resistencia a azitromicina en *N. gonorrhoeae* amenaza la sustentabilidad a largo plazo de los regímenes actuales de terapia dual antibiótica, que son las últimas opciones de tratamiento empírico de primera línea en varios países (Walter et al., 2016).

Cefalosporinas

Las cefalosporinas fueron descubiertas en 1948 por Giuseppe Brotzu de un cultivo aislado de *Cephalosporium acremonium*. Las modificaciones químicas de estos compuestos

resultaron en el primer agente antibiótico útil. Las cefalosporinas de tercera generación, ceftriaxona (inyectable) y cefixima (oral), son actualmente el tratamiento usado contra la gonorrea, después de que las fluoroquinolonas dejarán de ser eficientes en la década del 2000 (Magnus Unemo & Nicholas, 2012).

En la última década se han encontrado cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a cefalosporina. El primer reporte fue en Japón y en la última década se han reportado casos de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a cefalosporinas en otras regiones del mundo (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

La resistencia a antibióticos en gonorrea y fallas en los tratamientos han sido verificados en Japón (Yokoi et al., 2007) y en Europa (Ison, Hussey, Sankar, Evans, & Alexander, 2011; Magnus Unemo & Shafer, 2011). Se reportó una cepa de *N. gonorrhoeae* en Japón con resistencia a ceftriaxona parental asociada con un probable tratamiento fallido con ceftriaxona (Ohnishi et al., 2011). Lo anterior seguido con la identificación de una cepa altamente resistente en Francia y en España (Centers for Disease Control and Prevention, 2012; Magnus Unemo & Nicholas, 2012).

Desafortunadamente, la vigilancia de la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* es muy limitada en varias regiones del mundo, lo que ha ocasionado un descontrol en el conocimiento de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *N. gonorrhoeae*. Ya se han reportado casos de fallas en el tratamiento con cefixima en Japón y en diferentes países en Europa, Norteamérica y Sudamérica, y algunas fallas en tratamientos faríngeos con ceftriaxona han sido identificados en Japón, Europa y Australia (Ohnishi et al., 2011; M. Unemo et al., 2010; Magnus Unemo & Nicholas, 2012).

Capítulo 3: Genética de la resistencia a antibióticos

Muchos de los mecanismos de resistencia a antibióticos relevantes en la clínica son caracteres adquiridos. Los genes de resistencia que los codifican pueden ser incorporados en plásmidos, transposones o integrones, o pueden existir como cassettes de genes o como fragmentos parciales de genes liberados por bacterias y ser adquiridos por nuevas cepas a través de transferencia horizontal. Estos procesos son las principales formas de diseminación de genes de resistencia adquiridos pero las mutaciones también son esenciales para la evolución y diversificación de los genes adquiridos (Woodford & Ellington, 2007).

Aunque el intercambio genético alguna vez se pensó que era imposible entre bacterias con reproducción asexual, ahora se sabe que es la mayor fuerza en la evolución de procariontes. De hecho, la falta de intercambio genético entre bacterias ahora se cree es una situación inusual, limitada a sólo algunos linajes, como los patógenos genéticamente monomórficos⁵ (Didelot & Maiden, 2010).

N. gonorrhoeae tiene una capacidad extraordinaria de alterar su material genético dado que es naturalmente competente a la transformación durante todo su ciclo de vida (Cannon & Sparling, 1984). Uno de los mecanismos por el que los gonococos obtienen resistencia a antibióticos es a través de la transferencia de genes (transformación y subsecuente recombinación en el genoma) (Magnus Unemo & Shafer, 2014). *N.*

⁵ **Patógenos genéticamente monomórficos** son linajes de bacterias con niveles de diversidad genética extremadamente baja. Ha sido posible analizar estos linajes de bacterias usando genómica comparativa de alto rendimiento. Los genomas de linajes genéticamente monomórficos contienen muy pocos sitios polimórficos. Algunos ejemplos son *Staphylococcus aureus* y *Yersinia pestis* (Achtman, 2012).

gonorrhoeae usa estos mecanismos para adaptarse rápidamente y sobrevivir en ambientes hostiles en diferentes sitios en el cuerpo del hospedero.

La transferencia de genes entre poblaciones de bacterias es mediada por tres mecanismos: conjugación, transducción y transformación (Didelot & Maiden, 2010). Estos procesos promueven la adquisición de nuevos elementos genéticos del “pool genético”, y están asociados al surgimiento de nuevos fenotipos (Didelot & Maiden, 2010; Giedraitienė, Vitkauskienė, Naginienė, & Pavilonis, 2011; Redfield, 2001). Las bacterias frecuentemente importan genes, o fragmentos de genes, en regiones de material genético homólogo existente en su genoma, un proceso que fue identificado en *Neisseria* en 1992 por el grupo de John Maynard Smith en la Universidad de Sussex en Inglaterra, a través de la observación de genes mosaico en loci que codifican para antígenos y resistencia de antibióticos (Spratt, Bowler, Zhang, Zhou, & Smith, 1992). Este fenómeno conocido como recombinación homóloga, está ampliamente distribuido en el genoma de muchas bacterias y generalmente es una consecuencia de la recombinación dependiente de homología mediada por la enzima de recombinación RecA. Estudios más recientes sugieren altos niveles de recombinación dentro del género *Neisseria* (Didelot & Maiden, 2010).

Una vez dentro del citoplasma del receptor, los fragmentos de DNA no son degradados una vez que son integrados al cromosoma del hospedero. Esto generalmente ocurre a través del reemplazo de una secuencia del receptor por una del donador (Thomas & Nielsen, 2005).

Como organismos haploides, todas las bacterias dependen de la transferencia horizontal de secuencias de cromosomas para permitir la mezcla de diferentes combinaciones de genes (Kline, Sechman, Skaar, & Seifert, 2003). El intercambio

genético ocurre tan frecuentemente en *Neisseria*, que se considera a *N. gonorrhoeae* como una población panmítica⁶ (Hamilton & Dillard, 2006; Kline et al., 2003).

La transferencia horizontal de genes es el mayor contribuyente en la evolución de los genomas bacterianos y puede facilitar la diseminación de genes para la resistencia de antibióticos entre reservorios ambientales y patógenos potenciales (Munck et al., 2015). Algunos estudios de fuentes de genes de resistencia de antibióticos han encontrado que varios de los genes relevantes para la resistencia de antibióticos como el gen de la resistencia a cefalosporinas de la familia *ctx-m*, el gen para la resistencia a las quinolonas de la familia *qnr*, tienen homólogos cercanos en especies bacterianas no patógenas (Forsberg, Reyes, Wang, Selleck, & Morten, 2012). Estos descubrimientos muestran que los genes de resistencia a antibióticos pueden ser transferidos de reservorios ambientales a patógenos humanos.

a) *Transducción y conjugación*

Ambos procesos dependen de agentes infecciosos que mueven DNA de una célula a otra. En ambos, la transferencia de DNA parece ser un efecto colateral de las actividades infecciosas de estos agentes (Lorenz & Wackernagel, 1994).

En la conjugación, la célula donadora debe contener un elemento conjugativo (plásmido o transposon), y la célula donadora y receptora tienen que establecer un contacto físico suficientemente estable para permitir la transferencia de DNA. Ambas células tienen que estar metabólicamente activas para permitir la síntesis de DNA y otras actividades (Redfield, 2001).

⁶ Población panmítica es aquella donde todos los individuos tienen el potencial de entrecruzamiento sin haber restricciones de entrecruzamiento, ya sean genéticas o de comportamiento y por lo tanto toda recombinación es posible.

Los agentes infecciosos responsables de la conjugación son en su mayoría plásmidos, pequeñas moléculas circulares de DNA que se replican independientemente del cromosoma del hospedero, aunque algunos transposones también pueden causar conjugación. Ambos tipos de elementos de conjugación causan que sus células hospederas formen una conexión con las células que no tienen el elemento y pasan una copia del elemento de DNA a la nueva célula hospedera. Si hay DNA cromosómico conectado al elemento, este también es transferido (Thomas & Nielsen, 2005).

La transferencia horizontal de genes también ocurre por plásmidos conjugativos en *N. gonorrhoeae*, que no únicamente pueden transferir su propio DNA, sino que también puede co-movilizar DNA cromosómico o plásmido (Pachulec & Does, 2010). Se han descrito tres tipos de plásmidos conjugativos en *N. gonorrhoeae*, un plásmido de 24.5 MDa sin marcador detectable, y dos plásmidos de 25.2 MDa que contienen el determinante *tetM* (Pachulec & Does, 2010).

La transducción es causada por fagos bacterianos (virus) que ocasionalmente empaquetan DNA del hospedero en lugar de DNA del fago, en partículas virales y después inyectan este DNA en nuevas células (Redfield, 2001). No se conoce ningún fago que infecte *N. gonorrhoeae* (Hamilton & Dillard, 2006).

b) Transformación

La transferencia genética por transformación no requiere de una célula viva, porque la liberación de DNA durante la muerte y lisis celular proporciona DNA libre. El receptor tiene que estar fisiológicamente activo para poder tomar el DNA. No es necesaria una relación genética cercana entre el donador y el receptor (Lorenz & Wackernagel, 1994; Thomas & Nielsen, 2005). La transformación es la única forma de intercambio genético de marcadores de cromosomas conocida en *Neisseria* (Kline et al., 2003). A pesar, de que la

conjugación de plásmidos es posible en *Neisseria* y contribuye a la resistencia de antibióticos, la conjugación no moviliza secuencias cromosómicas.

La transformación también contribuye a la adquisición de resistencia de antibióticos codificada por cromosoma; ambos mecanismos, transformación y conjugación, han contribuido a la resistencia a penicilina en *N. gonorrhoeae*; β -lactamasa TEM-1, codificada por plásmido y mutaciones cromosómicas múltiples en genes que codifican para β -lactamos, que incrementan la resistencia de manera progresiva.

N. gonorrhoeae es naturalmente competente a la transformación genética a lo largo de su crecimiento (Hamilton & Dillard, 2006). En el 2001 Dillard y Seifert encontraron que la mayoría de cepas de *N. gonorrhoeae* tienen islas genéticas que codifican un sistema de secreción tipo IV, que proporciona DNA transformante al medio, sin lisis celular (Dillard & Seifert, 2001). Este sistema de secreción tipo IV es parecido al sistema de conjugación factor-F y se cree que también funciona para transferir otras moléculas que son importantes para la patogénesis de *N. gonorrhoeae*. La identificación de este sistema sugiere que en la mayoría de cepas de *N. gonorrhoeae* el DNA liberado para transformación no sólo se obtiene de células lisadas, pero también puede ser secretado por bacterias en crecimiento que pueden continuar causando infección en otros hospederos (Kline et al., 2003). El DNA para la transferencia horizontal de genes en su mayoría proviene de lisis celular, pero las frecuencias de transferencia incrementan aproximadamente 500 veces en cepas que secretan DNA por la vía del sistema de secreción tipo IV, que se encuentra en la isla genética de gonococos (*Gonococcal Genetic Island GGI*) (Pachulec & Does, 2010).

Todos los tipos de DNA se unen inespecíficamente a la superficie celular. Sin embargo, para la toma de DNA, *N. gonorrhoeae* únicamente reconoce DNA con

secuencia de 10 bases (GCCGTCTGAA), presente únicamente en el cromosoma de especies de *Neisseria* (Hamilton & Dillard, 2006).

Mutaciones

Las mutaciones son una de las principales fuerzas en evolución pues generan la variabilidad genética en las poblaciones, materia prima de la selección natural (Lee, Popodi, Tang, & Foster, 2012; Loewe & Hill, 2010). Las bacterias tienen tiempos de generaciones cortos y pueden evolucionar en lo que es percibido como tiempo real. Esta habilidad de adaptarse rápidamente a las condiciones cambiantes se ilustra muy bien en la evolución de la resistencia a antibióticos. Cada nuevo agente antibacteriano presenta a las bacterias con nuevos retos (como condiciones de crecimiento adverso a su exposición) y consistentemente han superado los retos impuestos.

Las mutaciones tienen consecuencias evolutivas únicamente si son transmitidas a las siguientes generaciones. Inicialmente, la mutación puede ser portada por una pequeña parte de la población, y, eventualmente por selección natural o deriva génica la mutación puede ser fijada y transmitida a toda la población (Futuyma, 2013).

Los efectos de las mutaciones pueden ser ampliamente divididos en tres categorías: la primera, mutaciones que son dañinas a la adecuación del portador; estas mutaciones generalmente reducen la supervivencia. Segunda, mutaciones neutrales, que tienen poco o ningún efecto en la adecuación. Finalmente, mutaciones ventajosas, que incrementan la adecuación, permitiendo a los organismos adaptarse a nuevos ambientes (Eyre-Walker & Keightley, 2007).

Los efectos de las mutaciones en la adecuación⁷ pueden variar desde muy ventajosas hasta muy desventajosas, atravesando por toda la gama entre estas dos, como mutaciones neutras o casi neutras.

Una mutación puede alterar uno o más caracteres fenotípicos, como tamaño, color o resistencia a antibióticos, estas alteraciones en tales características pueden afectar la supervivencia y reproducción, los dos componentes más importantes de la adecuación.

Se han reportado diferentes tipos de mutaciones en el DNA, desde cambios en una sola base, hasta alteraciones que afectan secuencias más largas en el DNA que pueden involucrar un gen completo o una parte (Futuyma, 2013; Krebs, Kilpatrick, Lewin, & Goldstein, 2010).

Las mutaciones tienen asociadas a ellas costos de adecuación que serán seleccionados en contra en la ausencia de antibióticos. Sin embargo, mutaciones secundarias compensatorias en el gen blanco u otros en el cromosoma, pueden mejorar la adecuación de las bacterias resistentes. Así, las mutaciones en genes de resistencia a antibióticos pueden propagarse verticalmente en poblaciones de bacterias aún en la ausencia de selección (Wright, 2012).

⁷ **Adecuación** es el éxito de una entidad para reproducirse; por lo tanto, la contribución media de un alelo o genotipo a la siguiente generación o las generaciones exitosas.

Capítulo 4: Mecanismos de resistencia a antibióticos

Para inhibir sus blancos bacterianos en *N. gonorrhoeae*, los antibióticos necesitan cruzar las envolturas celulares bacterianas y en algunos casos tienen que ser activados por enzimas bacterianas, antes de poder acceder a esos blancos. *N. gonorrhoeae* tiene determinantes de protección contra los efectos de antibióticos, tales como enzimas que inactivan antibióticos como β -lactamasas y bombas de eflujo de multi-resistencia (Martinez & Baquero, 2000).

Tres tipos de genes intrínsecos son relevantes en cepas resistentes a antibióticos: i) genes involucrados en la síntesis y posicionamiento celular del blanco del antibiótico; ii) genes involucrados en el acceso de antibióticos a sus blancos (como aquellos requeridos para activar antibióticos inactivos) y son necesarios para el acceso bioquímico del antibiótico; y iii) genes involucrados en la protección del blanco del antibiótico, como desintoxicación por enzimas que modifican antibióticos o eflujo de los compuestos antibacterianos.

Bajo el concepto de bala-blanco, los mecanismos de resistencia a antibióticos pueden ser clasificados en:

Blancos: (i) Protegidos por modificación (mutaciones que los hacen insensibles a la acción de antibióticos, tales como mutaciones en RNA polimerasa, (ii) modificados por una enzima (como la metilación de un residuo de adenina en rRNA 23S, haciéndolos insensibles a macrólidos, (iii) reemplazados (por ejemplo, proteínas ribosomales de protección que confieren resistencia contra tetraciclinas) y (iv) protegidos a nivel celular o

poblacional (formación de una barrera protectora por secreción, por ejemplo, una gran cantidad de exopolisacáridos).

Balas: (i) modificadas para que la eficiencia sea perdida, como en el caso de acetilación de aminoglucósidos, (ii) destruidos (como en el caso de antibióticos β -lactamos a través de la acción de β -lactamasas), y (iii) expulsados de las células como en los mecanismos de resistencia de bombas de expulsión.

Penicilina

La resistencia a penicilina en gonococos ocurre por dos rutas: por la producción de un tipo de β -lactamasa ,TEM-1, codificada en un plásmido y mutaciones cromosómicas múltiples en genes que codifican para β -lactamos, que incrementan la resistencia de manera progresiva, los genes de resistencia cromosómica pueden ser transferidos de una cepa con alto nivel de resistencia a una cepa susceptible por transformación y recombinación homóloga (Zhao, Tobiason, Hu, Seifert, & Nicholas, 2005). Se requieren múltiples mutaciones cromosómicas para la resistencia de alto nivel. Únicamente cuando estas mutaciones son combinadas, se incrementa la resistencia drásticamente (Patel et al., 2011).

Los blancos de los agentes β -lactamos son las proteínas de unión a penicilina (PBPs por sus siglas en inglés), enzimas localizadas en la envoltura celular que participan en el metabolismo de la pared celular. Se conocen cinco mutaciones génicas que contribuyen al alto nivel de resistencia cromosómica a penicilina en *N. gonorrhoeae* (Patel et al., 2011).

Las primeras dos mutaciones que codifican para PBP-2 y PBP-1 bajan su afinidad a penicilinas, y así la susceptibilidad del organismo. PBP-2 es codificada por el locus *penA*. La tercera y cuarta mutación en los loci *mtr* y *penB* producen efectos aditivos. El

locus *mtr* media la resistencia a un amplio rango de antibióticos, detergentes y colorantes a través de un sistema de eflujo activo. Mutaciones en el locus *penB*, que afectan una porina, resultan en permeabilidad reducida de la envoltura celular a antibióticos hidrófilos y otros compuestos. El efecto combinado de mutaciones en *penA* y expresión incrementada de *mtr* incrementa la CIM de penicilina casi 120 veces. Los gonococos que presentan estos cambios son llamados *N. gonorrhoeae* cromosómicamente resistente. Susceptibilidad reducida a cefalosporinas, tetraciclinas y otros agentes también es mediada por mecanismos cromosómicos. La quinta mutación en *penC*, incrementa la resistencia a penicilina y tetraciclina, es el resultado de una mutación espontánea y es fácilmente transferible entre cepas. *penC* altera la permeabilidad a antibióticos, esta mutación resulta de una mutación puntual en el gen *pilQ*, que cambia Glu-666 a Lys (Zhao et al., 2005).

La resistencia a penicilina, además de ser cromosómicamente mediada también es mediada por plásmido, β -lactamasa tipo TEM-1. β -lactamasa hidroliza el anillo β -lactamo de las penicilinas, induciendo su inactivación. La resistencia mediada por cromosoma es lenta e incremental, por el contrario, la resistencia mediada por plásmido es un proceso de un paso.

Las cepas productoras de penicilasa fueron detectadas al mismo tiempo en el Reino Unido y en Estados Unidos en 1976, en pacientes en África y el Lejano Oriente, respectivamente (Ashford et al., 1976). A pesar de que el mismo tipo de β -lactamasa TEM estaba presente en ambas cepas, el tamaño del plásmido era diferente. Sin embargo, la transmisión del plásmido requería de la presencia de un plásmido movilizador, que sólo se encontraba presente en la cepa asiática, lo que influyó en que la cepa asiática se disipara más rápida y ampliamente (Patel et al., 2011).

Quinolonas

La resistencia a ciprofloxacina y ofloxacin, quinolonas de segunda generación, ha evolucionado a través de múltiples cambios cromosómicos. El acceso de las quinolonas a sus blancos es reducido por cambios en la permeabilidad celular y posibles mecanismos efluentes. Estos cambios producen bajos niveles de resistencia a quinolonas. Los blancos de las quinolonas son topoisomerasas, como DNA girasa. La resistencia clínica de alto nivel es mediada por alteración de los sitios blanco, inicialmente por mutación en el gen *gyrA*. Se han descrito múltiples sustituciones de aminoácidos, que cuando son combinados, resultan en altos niveles de resistencia. Múltiples mutaciones también ocurren en el gen *parC* que codifica para la síntesis de topoisomerasa IV, un blanco secundario de quinolonas en gonococos (Patel et al., 2011).

Cefalosporinas

En gonococos, la baja susceptibilidad y resistencia a las cefalosporinas es mediada por cromosoma y se debe a los mismos cambios que suceden en la baja susceptibilidad a penicilina (Patel et al., 2011). Sin embargo, no todas las cefalosporinas son hidrolizadas por la β -lactamasa TEM-1, por lo que algunos compuestos son activos en contra de *N. gonorrhoeae* productora de penicilasa.

Los determinantes primarios de la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro en *N. gonorrhoeae* son alteraciones específicas del gen *penA* que codifica para PBP2, que también es blanco letal para las cefalosporinas.

El alelo *penA* se considera surgió por transformación de DNA seguido por recombinación con genes parciales de *penA*, particularmente aquellos de especies comensales de *Neisseria* que comúnmente residen en la orofaringe, como *Neisseria perflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria cinerea*, y *Neisseria*

flavescens. Esta transferencia horizontal intragénica *in vivo* de genes enteros o parciales de *penA* pudo haber ocurrido durante infecciones de faringe por gonococos. La adquisición de alelos mosaico *penA* parece incrementar las concentraciones de inhibición mínima de cefixima más que los de ceftriaxona (Patel et al., 2011).

Tetraciclina

La resistencia a tetraciclina es a través de dos mecanismos principales: expresión de la proteína TetM codificada por plásmido y mutaciones en genes endógenos (resistencia mediada por cromosoma) que pueden ser transferidos de una cepa resistente a una cepa susceptible por transformación de DNA y recombinación homóloga. Tres genes están involucrados en la resistencia mediada por cromosoma a tetraciclina (CIM de tetraciclina >2 µg/mL): *mtrR*, *penB*, y *tet-2*.

En el 2005, el grupo de Nicholas de la Universidad de Carolina del Norte demostró que la resistencia de *tet-2* se debe a una mutación puntual, Val-57 a Met en el gen *rpsJ* que codifica para la proteína ribosomal S10 (Hu, Nandi, Davies, & Nicholas, 2005). Además, esta misma mutación se encontró en seis distintas cepas resistentes a tetraciclina aisladas en la clínica con una CIM ≥ 2 µg/mL. También identificaron que la mutagénesis por saturación alta del codón para Val-57, también induce otras dos mutaciones (Leu y Gln) que confieren niveles idénticos de resistencia a la mutación Met-57. Sus datos sugieren que los aminoácidos sin carga alteran la estructura de rRNA cerca del sitio de unión de tetraciclina, lo que resulta en una baja afinidad al antibiótico.

Macrólidos

Los mecanismos de resistencia a macrólidos incluyen eflujo de estos antibióticos y modificación del blanco ribosomal de enzimas o mutaciones que reducen la afinidad de los antibióticos a los ribosomas (L. Ng, Martin, Liu, & Bryden, 2002). Se han descrito

diferentes sistemas efluentes que confieren resistencia a macrólidos. La primera bomba descrita para *N. gonorrhoeae* fue el sistema MtrC-MtrD-MtrE, codificado por el operón *mtrRCDE*, que exporta agentes hidrofóbicos como colorantes tales como cristal violeta y macrólidos como azitromicina y eritromicina. Recientemente se encontró otra bomba de eflujo de macrólidos codificada por el gen *mef* en cepas clínicas de *N. gonorrhoeae* (Luna, Cousin S., Whittington, & Roberts, 2000).

Otra modificación ribosomal involucra mutaciones en el bucle de péptido-transferasa en el dominio V de rRNA 23S y también confiere resistencia a macrólidos (L. Ng et al., 2002).

La resistencia a azitromicina en *N. gonorrhoeae* ha sido atribuida principalmente a dos mecanismos: mutaciones puntuales en rRNA 23S A2059G (numeración de *Escherichia coli*) que confiere altos niveles de resistencia ($MIC \geq 256 \mu\text{g/mL}$) cuando se presenta en 3 o 4 de los 4 alelos del gen rRNA 23S o C2611T (numeración de *E. coli*) confiriendo baja a moderada resistencia ($MIC = 2-32 \mu\text{g/mL}$); y la sobre expresión de la bomba de eflujo MtrCDE mayormente causada por una delección -35 en la región promotora del represor *mtrR* y contribuciones menores de mutaciones en MtrR A39T y G45D (Walter et al., 2016).

Los agrupamientos filogenéticos geográficos y temporales indican que la evolución de resistencia a azitromicina se presenta independientemente y puede rápidamente expandirse clonalmente en una región a través de redes sexuales locales (Jacobsson et al., 2016).

Capítulo 5: Evolución de la resistencia a antibióticos

La investigación de la resistencia a antibióticos ha ampliado el conocimiento de los procesos evolutivos que gobiernan el desarrollo y la propagación de la resistencia a ellos. Se han clasificado ampliamente como: 1) resistencia innata, 2) resistencia adquirida (transferencia génica horizontal o elevadas tasas de mutación) y 3) resistencia *de novo* (Tenover, 2006).

Además de las mutaciones, existen otros mecanismos que generan variación génica en las bacterias, como la reorganización intragenómica de secuencias genómicas (recombinación intracromosomal) y la adquisición de secuencias de DNA externo de otros organismos a través de transferencia horizontal génica. Ambos mecanismos juegan un papel importante en la evolución y adaptación de bacterias, como la evasión a la respuesta inmune, distribución de genes que incrementan la virulencia y la resistencia a antibióticos (Davies & Davies, 2010; Rodríguez-Rojas et al., 2013; Tenover, 2006).

El descubrimiento y desarrollo de fármacos se encuentra encerrado en una batalla co-evolutiva con compuestos bacterianos naturales, ningún antibiótico usado hasta ahora ha escapado la resistencia bacteriana.

Las bacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia a antibióticos a través de varios mecanismos, como alteración por mutaciones de los blancos de antibióticos, cambios en la permeabilidad y flujo de antibióticos, y transferencia horizontal de genes que confieren resistencia a antibióticos (Rodríguez-Rojas et al., 2013)

El proceso fundamental en evolución es un cambio en las características de una población o especie, independientemente de sí la resistencia es innata o adquirida,

existen diferentes mecanismos que originan la variación génica, aunque no son la causa de evolución pero sí el ingrediente necesario en evolución (Futuyma, 2013; Schroeder, Brooks, & Brooks, 2017).

Una de las perspectivas clásicas que revolucionó el estudio de la evolución de resistencia a antibióticos en la década de 1940, fue la demostración de la exposición de bacterias a agentes letales, que resultó en la selección de variantes resistentes pre-existentes y se observó que los agentes no siempre inducen la aparición *de novo* de variantes resistentes (Rodríguez-Rojas et al., 2013).

Todos los antibióticos son susceptibles a la evolución a resistencia en bacterias. Los antibióticos son pequeñas moléculas orgánicas (masa molecular ~100-2,000 Da) compuestos de C, H, O, S y otros elementos. Los microorganismos viven rodeados por miles de moléculas parecidas, el mundo de las bacterias es un mundo de pequeñas moléculas, en donde existen niveles de comunicación complejos entre las moléculas y las otras bacterias a su alrededor.

Sin embargo, muchos de estos compuestos son tóxicos para las bacterias, muchos de los cuales ahora pueden estar presentes y no tener ningún efecto tóxico para ellas. Algunos de los mecanismos que han evolucionado son el bloqueo de entrada de compuestos tóxicos en las células o la disminución de las concentraciones intracelulares de tales compuestos. Adicionalmente, mecanismos altamente específicos como la alteración o mutación de blancos celulares de antibióticos y desarrollo de enzimas degradadoras o modificadoras. La evolución de las defensas de bacterias ha ocurrido a lo largo de milenios.

Desafortunadamente, la mayoría de la literatura en resistencia a antibióticos se centra únicamente en la evolución de la resistencia en patógenos humanos previamente

susceptibles a antibióticos. La gran mayoría de bacterias son no patógenas, sin embargo, éstas también están expuestas a antibióticos que ocurren naturalmente y han evolucionado resistencia a ellos.

La microbiota del suelo representa uno de los orígenes evolutivos de la resistencia a antibióticos más antiguos y se ha propuesto como reservorio de genes de resistencia a antibióticos disponible en el intercambio de genes con patógenos clínicos (Forsberg et al., 2012). En el 2012 el grupo de Dantas en Missouri, Estados Unidos, publicó un estudio donde encontraron bacterias de suelo no patógenas con multi-resistencia a antibióticos usando metagenómica de selección de alto rendimiento, donde encontraron cepas de bacterias que contenían cassettes contra cinco clases de antibióticos (β -lactamos, aminoglucósidos, amfenicoles, sulfonamidas y tetraciclinas) con perfecta identidad de nucleótidos con los genes de diversos patógenos humanos, la identidad también comprendió de regiones no codificantes, lo que ofrece no únicamente evidencia de intercambio lateral, pero también un mecanismo por el cual se disemina la resistencia a antibióticos.

El suelo es el hábitat más grande de microorganismos en la Tierra, y está comenzando a ser reconocido como el mayor reservorio de genes de resistencia a antibióticos. El suelo además de entrar en contacto con antibióticos usados para el ganado, también es el hábitat natural del actinomiceto género *Streptomyces*, que cuenta con varias de las especies que naturalmente producen antibióticos (Costa et al., 2011).

En otro estudio hecho por el grupo de Gerard Wright en Canadá en el 2011, reportaron un análisis hecho con metagenómica dirigida de DNA antiguo de sedimentos de permafrost del Pleistoceno tardío, de 30,000 años de edad, donde encontraron una colección diversa de genes que codifican para la resistencia de antibióticos de β -lactamos, tetraciclina y glucopéptidos (Costa et al., 2011).

Gerard Wright et al. 2006 propusieron el concepto de resistoma a todos los genes que directamente o indirectamente actúan para conferir resistencia a antibióticos en bacterias. Esto incluye los elementos de resistencia en bacterias patógenas y también en los organismos más diversos, los no patógenos. Además, el resistoma incluye los genes de bacterias que contribuyen a la resistencia a antibióticos en un organismo en particular, el resistoma intrínseco. La otra parte del resistoma son los genes domésticos que pueden inducir los elementos de resistencia por mutación o sobreexpresión, nombrados elementos de proto-resistencia.

Ahora entendemos que, a diferencia de los organismos complejos, el flujo de genes en bacterias puede ocurrir de manera vertical y horizontal. Por lo tanto, la resistencia a antibióticos que evoluciona en una bacteria puede ser transmitida a su proge y también puede ser movilizada horizontalmente a bacterias de otras especies. Así, la resistencia a antibióticos en bacterias no patógenas puede ser transferida a bacterias patógenas.

La presión de los antibióticos selecciona a bacterias con elevadas tasas de mutación – conocidas como bacterias mutadoras o con fenotipo mutador – ya que los alelos presentes en estas bacterias incrementan la posibilidad de tener mutaciones favorables que aceleran la tasa de evolución en ciertas condiciones. En este proceso, las bacterias mutadoras pueden ser fijadas en la población por un segundo orden de selección autostop o hitchhiking⁸, con las mutaciones favorables que han originado (Barton, 2000). Esta característica de hipermutabilidad se produce generalmente por alteración en genes que pertenecen al sistema de reparación de DNA (*mutS*, *mutL*, *mutH*, y *uvrD*) (Namadurai et al., 2010; Stohl & Seifert, 2006). La ausencia del sistema de

⁸ El **efecto autostop o hitchhiking** es cuando un alelo cambia su frecuencia no porque tenga un efecto en la adecuación, pero porque está cerca de otro gen que está siendo sometido a un barrido selectivo y está en la misma cadena de DNA.

reparación de DNA aumenta la tasa de mutación y la frecuencia a la que dos secuencias divergentes se recombinan, ya sean de la misma cepa de bacteria o de diferentes cepas. Se ha observado que la probabilidad de adquirir nuevas funciones por mutaciones y recombinación es favorecida en cepas deficientes del sistema de reparación (Rodríguez-Rojas et al., 2013).

En 1997 Mao et al. demostraron que la presión de antibióticos puede seleccionar a las bacterias con fenotipo mutador (Mao, Lane, Lee, & Miller, 1997). La selección individual de un mutante resistente a un antibiótico incrementa a proporción de mutadores en la población seleccionada de 0.001% (la frecuencia normal en una población de *E. coli*) a 0.5%. Además, selecciones sucesivas pueden incrementar la proporción de cepas mutadoras en la población seleccionada a un 100%. Así, un antibiótico no únicamente puede seleccionar resistencia, sino que también, a través del aumento de la proporción de mutadores, puede seleccionar indirectamente a la selección de resistencia a antibióticos no relacionados (Mao et al., 1997).

Diferentes antibióticos pueden incrementar las tasas de mutaciones de diferentes maneras como daño oxidativo, respuesta SOS, desbalance de nucleótidos y respuestas de estrés general (Martinez & Baquero, 2000).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) ha sido postulada como un paso común en la letalidad antibiótica. Esta vía de muerte celular es mediada por un incremento en la tasa de respiración, una reducción en los niveles de NADH y la oxidación irreversible de grupos de hierro-sulfuro, que llevan a la formación de radicales hidroxilos. Sin embargo, este mecanismo parece no ser estrictamente necesario, ya que las quinolonas y cefalosporinas son igualmente efectivas en condiciones anaeróbicas. Se sabe que las especies reactivas de oxígeno causan daño en componentes celulares clave, como proteínas, lípidos y DNA. Este daño puede causar

lesiones al DNA directa o indirectamente, que, si son dejados sin reparar, llevan a la acumulación de mutaciones. Se ha observado que el tratamiento de *Neisseria gonorrhoeae* con antibióticos a concentraciones sub-letales incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno, que correlaciona significativamente con un incremento en la mutagénesis (Hill et al., 2016).

Como consecuencia del incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (producidas por fluoroquinolonas, aunque otros antibióticos no relacionados también producen la respuesta SOS) la respuesta SOS es activada. Esta activación inicia la expresión de polimerasas de DNA especializadas que pueden pasar las lesiones de DNA con reducida fidelidad, de hecho, se sabe que las quinolonas son mutagénicas en bacterias.

Los antibióticos beta-lactámicos como penicilina y cefalosporinas, también pueden inducir la respuesta SOS, pero lo hacen a través de una vía completamente diferente. La inhibición de la división celular por exposición a betalactámicos induce el operon *dpiBA*, uno de los genes efectores que se activa con este operón es *DpiA*, esta molécula se une al origen de replicación de cromosoma e inhibe la replicación, induciendo la respuesta SOS e incrementando la variabilidad genética. *dinB* también es inducido por exposición a beta lactamos por una vía independiente a la respuesta SOS.

El cuerpo humano y los sitios expuestos a bajas concentraciones de antibióticos pueden convertirse en puntos de recombinación y sitios de inducción de mutaciones por antibióticos, responsables de variación fenotípica y específicamente del surgimiento, mantenimiento y diseminación de resistencia a antibióticos.

Además de las mutaciones, existen otros mecanismos que generan variación genética en *N. gonorrhoeae*, tales como la reorganización intragenómica, de secuencias

genómicas también conocido como recombinación intracromosomal y la adquisición de secuencias de DNA foráneo de otros organismos a través de la transferencia horizontal de genes. Ambos mecanismos han jugado un papel importante en la evolución y adaptación de *N. gonorrhoeae*, como evasión del sistema inmune e incremento a la resistencia de antibióticos. La mayoría de la resistencia a antibióticos ha sido posiblemente adquirida a través de transferencia horizontal de genes que confieren resistencia a antibióticos.

A pesar de los costos de adecuación, la presión de antibióticos selecciona a las bacterias que tienen una tasa de mutación más alta, estas altas tasas de mutación son conferidos normalmente por alteraciones en genes de reparación de DNA (Schroeder et al., 2017), las mutaciones en los genes del sistema de reparación también incrementan la prevalencia de recombinación genética, proporcionando diversidad para la resistencia a antibióticos (Schroeder et al., 2017).

Conclusiones

La resistencia a antibióticos ha probado ser inevitable. Los movimientos de genes horizontal y verticalmente en las poblaciones bacterianas no respetan frontera. Las bacterias viven en ambientes dominados por moléculas pequeñas, y han evolucionado mecanismos específicos y no específicos para evadir compuestos y desintoxicar compuestos nocivos. Además de la resistencia que ha evolucionado miles de años antes del descubrimiento de los antibióticos, la resistencia *de novo* puede evolucionar por mutación y amplificación de genes, y a través de estos procesos pueden surgir nuevos alelos que confieran resistencia a antibióticos.

Sin embargo, los antibióticos aún son el caballo de batalla en la medicina moderna, un mundo sin antibióticos sería un mundo sin cirugías, tratamientos para pacientes con cáncer, tratamientos para infecciones oportunistas, por mencionar sólo algunos de sus usos. El número de muertes aumentaría drásticamente en recién nacidos y personas de tercera edad, sería retroceder un siglo en el tiempo.

El desarrollo de nuevas herramientas genómicas epidemiológicas para la vigilancia de resistencia a antibióticos y análisis de su diseminación es clave para el mejoramiento de la respuesta en salud pública a infecciones emergentes. En el caso de *N. gonorrhoeae*, los cultivos bacterianos aún siguen siendo cruciales para permitir estudios de secuencias de genoma completo y generar evidencia microbiológica para planear estrategias de cómo disminuir la diseminación de esta amenaza resistente a antibióticos.

Siempre habrá resistencia a antibióticos, pero la velocidad a la que actúa dependerá en cómo tratemos la enfermedad. La probabilidad de la evolución de

resistencia a antibióticos es un fenómeno complejo en el cual la fisiología, genética, dinámica bacteria-antibiótico y el comportamiento histórico de las poblaciones de bacterias, junto con la estructura física del medio selectivo, juegan un papel importante.

Los avances en el entendimiento de la evolución de resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* permitirán a los médicos tomar decisiones más acertadas en los tratamientos. Sin embargo, es importante que los médicos tengan un conocimiento integral en evolución pues la medicina es el mayor beneficiario de los descubrimientos que se han hecho en evolución. Entender los procesos que contribuyen a la evolución y selección de la resistencia es esencial para el manejo y desarrollo de antibióticos. La selección de cepas resistentes es inevitable y la clínica se encuentra atrapada en una creciente escasez de antibióticos para el tratamiento de *N. gonorrhoeae*.

El enfoque evolutivo para mejorar el problema de escasez de antibióticos no debe ser tomado como único para atacar el problema, pero tal vez sí como piedra angular para entender cómo, por qué y hacia dónde deberíamos mirar en la clínica y en el desarrollo de nuevos fármacos.

El estudio de Costa et al., 2011 demuestra de modo conclusivo que la resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que precede la presión de selección moderna de uso de antibióticos en la clínica.

Es posible que el problema global de la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* empeore en un futuro cercano y las complicaciones severas que comprometen la salud reproductiva y general de los individuos infectados emerjan como una epidemia silenciosa sino se toman las medidas necesarias para evitar esta amenaza inminente.

El estilo de vida actual, donde las personas pueden viajar de un país a otro en algunas horas ha aumentado la transferencia de cepas resistentes en poblaciones donde antes no se presentaba.

El programa de la OMS *The Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme* (GASP) documenta el surgimiento y propagación de resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* desde 1992 y ha proporcionado información nacional, regional y global de las guías de tratamiento (Who, 2012; WHO, 2012). Sin embargo, la vigilancia y reporte de nuevos casos es carente o de baja calidad en países con alta incidencia de gonorrea. Es necesario implementar protocolos que sean estándar en los países que son parte de GASP para tener datos confiables de la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* a nivel global, lo que permitirá detectar patrones de infección y resistencia.

Un acercamiento de salud pública comprehensivo para el manejo de la infección por gonococo incluye diagnóstico, tratamiento, seguimiento (incluyendo el manejo de tratamientos fallidos), prueba de cura, prevención de reinfección, notificación a pareja(s), y notificación de los nuevos casos a instituciones de salud pública regionales.

Las nuevas cepas multi-resistentes a antibióticos y la poca investigación para el descubrimiento de nuevos antibióticos hacen necesario aumentar los esfuerzos para alargar el tiempo de eficacia de los antibióticos usados actualmente.

Los avances en la detección de susceptibilidad a través de métodos moleculares de tiempo real son una realidad, la secuenciación de genoma completo en *N. gonorrhoeae* ha sido usada en diferentes estudios, en el Reino Unido se analizaron cepas de la ciudad de Brighton que fueron colectadas en un período de cuatro años y cepas de otras locaciones del Reino Unido, y usaron resultados obtenidos de pacientes en Estados Unidos para calibrar su análisis (Ezewudo et al., 2015; Silva et al., 2017). La aportación

más importante del estudio del grupo de Dilrini De Silva ha sido el desarrollo de una herramienta nueva, un nomograma⁹ de transmisión, en el cual el número de polimorfismos de nucleótidos únicos entre cepas es la base de localización de contactos y puede ser usada para desarrollar una respuesta de salud pública. A pesar de que no se puede probar el contacto de persona a persona con esta nueva herramienta, el nomograma puede ser usado en combinación con datos clínicos y de contactos para controlar la propagación de gonorrea, de una manera que no era posible con los métodos microbiológicos tradicionales.

En los últimos años, la secuenciación completa de genomas ha sido ampliamente usada en bacteriología. La información que se obtiene con esta prueba puede ser usada para entender la evolución, resistencia a antibióticos, transmisión de *N. gonorrhoeae* y características de virulencia pues permite rastrear la transmisión y resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* a nivel local, nacional e internacional.

La cantidad de información y los costos cada vez más bajos de esta prueba son las principales razones del éxito de este tipo de prueba. La implementación de esta prueba en el programa GASP podría ayudar a mejorar la respuesta en salud pública a *N. gonorrhoeae*.

En el 2016 *Public Health England* reportó un brote de gonorrea resistente a azitromicina aislaron y analizaron las cepas de los pacientes por secuenciación de genoma completa, donde lograron especificar el ancestro común más reciente y región (England, 2016).

La individualización de los tratamientos retrasaría la presión de selección a la par que aumentaría el tiempo de eficacia de los antibióticos usados actualmente, pues se

⁹Los **nomogramas** muestran las relaciones entre dos o más variables a través de escalas numéricas, así el valor de una de las variables puede ser encontrado por una simple construcción geométrica.

podría tomar ventaja de las cepas que aún son sensibles a antibióticos viejos, como tetraciclina y ciprofloxacina.

La batalla contra la resistencia a antibióticos en *N. gonorrhoeae* aún continúa, pues la evolución es inevitable, así como la resistencia a antibióticos que aún no han sido descubiertos.

Referencias

- Achtman, M. (2012). Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 367, 860–867. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0303>
- American Chemical Society International Historic Chemical Landmarks. (1999). The Discovery and Development of Penicillin 1928-1945. *The Alexander Fleming Laboratory Museum, UK*.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Andrews, J. M. (2006). *Determination of Minimum Inhibitory Concentrations Jennifer M Andrews*. Birmingham: NHS.
- Ashford, W. A., Golash, R. G., & Hemming, V. G. (1976). Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *The Lancet*, 24(6), 117–119. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)90918-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)90918-1)
- Barton, N. H. (2000). Genetic hitchhiking. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 355, 1553–1562. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0716>
- Bignell, C., Unemo, M., Jensen, J. S., Babayan, K., Barton, S., Cusini, M., ... Meijden, W. Van Der. (2013). 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *International Journal of STD & AIDS*, 85–92. <https://doi.org/10.1177/0956462412472837>
- Boslego, J. W., Tramont, E. C., Takafuji, E. T., Diniega, B. M., Mitchell, B. S., Small, J. W., ... Stein, D. C. (1987). Effect of Spectinomycin Use on the Prevalence of Spectinomycin-Resistant and of Penicillinase-Producing *Neisseria Gonorrhoeae*. *New England Journal of Medicine*, 317(5), 272–278. <https://doi.org/10.1056/NEJM198707303170504>
- Cannon, J. G., & Sparling, P. F. (1984). The genetics of the gonococcus. *Annual review of microbiology*, 38, 111–133. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.38.100184.000551>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2012). Cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* Public Health Response Plan, (August).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1985). Tetracycline-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* -- Georgia, Pennsylvania, New Hampshire. Recuperado el 19 de abril de 2017, a partir de <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000611.htm>

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2007). Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006: Fluoroquinolones No Longer Recommended for Treatment of Gonococcal Infections. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 332–336.
- Clardy, J., Fischbach, M. a, & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current Biology*, 19(11), 437–441. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>
- Costa, V. M. D., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., ... Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00016-10>
- Didelot, X., & Maiden, M. C. J. (2010). Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in Microbiology*, 18(7), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.04.002>
- Dillard, J. P., & Seifert, H. S. (2001). A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Molecular Microbiology*, 41(1), 263–277.
- Dunlop, E. M. C. (1947). GONORRHOEAE AND THE SULPHONAMIDES *. *BRITISH JOURNAL OF VENEREAL DISEASES*, 81–83.
- Easmon, C., Forster, G., Walker, G., Ison, C., Harris, J., & Munday, P. (1984). Spectinomycin as initial treatment for gonorrhoea. *Br Med J*, 289(oCToBER), 1032–1034. <https://doi.org/10.1136/bmj.289.6451.1032>
- England, P. H. (2016). *Infection report Outbreak of high level azithromycin resistant gonorrhoea in England : an update* (Vol. 10).
- Enters for Disease Control and Prevention. (2015). *Gonococcal Infections - 2015 STD Treatment Guidelines*.
- Eyre-Walker, A., & Keightley, P. D. (2007). The distribution of fitness effects of new mutations. *Nature reviews. Genetics*, 8(8), 610–8. <https://doi.org/10.1038/nrg2146>
- Ezewudo, M. N., Joseph, S. J., Castillo-ramirez, S., Dean, D., Rio, C., Didelot, X., ... Read, T. D. (2015). Population structure of *Neisseria gonorrhoeae* based on whole genome data and its relationship with antibiotic resistance. *Peer J*, 1–23. <https://doi.org/10.7717/peerj.806>
- Fifer, H., Natarajan, U., Jones, L., Alexander, S., Golparian, D., & Unemo, M. (2016). Failure of Dual Antimicrobial Therapy in Treatment of Gonorrhoea. *New England Journal of Medicine*, 374(25), 2504–6. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1514294>

- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., & Morten, O. A. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107–1111. <https://doi.org/10.1126/science.1220761>.The
- Futuyma, D. J. (2013). *Evolution* (3rd Editio). Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Garvin, C. H. (1941). The Sulfonamides in Acute Gonococcal Urethritis *, XXXIV(6).
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137–46. <https://doi.org/1103-01e> [pii]
- Gransden, W. R., Warren, C. A., Phillips, I., Hodges, M., & Barlow, D. (1990). Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. *Lancet (London, England)*, 335(8680), 51.
- Hamilton, H. L., & Dillard, J. P. (2006). Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae* : from DNA donation to homologous recombination. *Molecular Microbiology*, 59(2), 376–385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04964.x>
- Handsfield, H. H., McCutchan, J. A., Corey, L., & Ronald, A. R. (1992). Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of uncomplicated gonorrhea in adults and adolescents. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 15 Suppl 1, S123-30.
- Hill, S. A., Masters, T. L., & Wachter, J. (2016). Gonorrhea – an evolving disease of the new millennium. *Microbial Cell*, 3(9), 371–389. <https://doi.org/10.15698/mic2016.09.524>
- Hu, M., Nandi, S., Davies, C., & Nicholas, R. A. (2005). High-Level Chromosomally Mediated Tetracycline Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Results from a Point Mutation in the rpsJ Gene Encoding Ribosomal Protein S10 in Combination with the mtrR and penB Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4327–4334. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4327>
- Hughes, G., Ison, C., Field, N., FolkPublic Health Englandard, K., Kennedy, I., Alexander, S., ... Tong, W. (2014). Guidance for the detection of gonorrhoea in England.
- Hughes, J. M. (2001). Emerging Infectious Diseases : A CDC Perspective. *Emerging Infectious Diseases*, 7(3), 494–496.
- Ison, C. A., Hussey, J., Sankar, K. N., Evans, J., & Alexander, S. (2011). Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Eurosurveillance*, 16(14), 1–4.
- Jacobsson, S., Golparian, D., Cole, M., Spiteri, G., Martin, I., Bergheim, T., ...

- Crowley, B. (2016). WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC > 2 mg / L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe from 2009 to 2014. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw279>
- Kampmeier, R. H. (1983). Introduction of Sulfonamide Therapy for Gonorrhea. *Sexually transmitted diseases*, 10(2), 81–84.
- Kirkcaldy, R. D. (Cdc), Zaidi, A. (Cdc), Hook, E. W. (University of A., Holmes, K. H. (University of W., Soge, O. (University of W., del Rio, C. (Emory), ... Weinstock, H. S. (2013). *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Resistance Among Men Who Have Sex With Men and Men Who Have Sex Exclusively With Women : *Annals of Internal Medicine*, 158(5), 2005–2010. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-5-201303050-00004>
- Kline, K. A., Sechman, E. V, Skaar, E. P., & Seifert, H. S. (2003). Recombination , repair and replication in the pathogenic *Neisseriae* : the 3 R ϕ s of molecular genetics of two human-specific bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*, 50(1), 3–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03679.x>
- Krebs, J. E., Kilpatrick, S. T., Lewin, B., & Goldstein, E. S. (2010). *Lewin's genes* X. Jones and Bartlett.
- Lee, H., Popodi, E., Tang, H., & Foster, P. L. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), E2774-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210309109>
- Lewis, D. A. (2010). The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sexually Transmitted Infections*, 86(6), 415–421. <https://doi.org/10.1136/sti.2010.042648>
- Lind, I. (1997). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clinical Infectious Diseases*, 24((Suppl 1)), S93-7. <https://doi.org/10.1097/00042307-199901000-00011>
- Loewe, L., & Hill, W. G. (2010). The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365, 1153–1167. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0317>
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological reviews*, 58(3), 563–602.
- Luna, V. A., Cousin S., J., Whittington, W. L. H., & Roberts, M. C. (2000). Identification of the conjugative *mef* gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2503–2506. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2503-2506.2000>

- Mao, E. F., Lane, L., Lee, J., & Miller, J. H. (1997). Proliferation of mutators in a cell population. *Journal of Bacteriology*, *179*(2), 417–422. <https://doi.org/8990293>
- Martin, J. E., Lester, A., Price, E. V., & Schmale, J. D. (1970). Comparative study of gonococcal susceptibility to penicillin in the United States, 1955–1969. *Journal of Infectious Diseases*, *122*(5), 459–461. <https://doi.org/10.1093/infdis/122.5.459>
- Martinez, J. L., & Baquero, F. (2000). MINIREVIEW-Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*(7), 1771–1777. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1771-1777.2000>. Updated
- McCutchan, J. A., Adler, M. W., & Berrie, J. R. (1982). Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Great Britain, 1977-81: alarming increase in incidence and recent development of endemic transmission. *British medical journal (Clinical research ed.)*, *285*(6338), 337–340.
- Morse, S. S. (2009). *Microbial Evolution and Co-Adaptation: A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg. A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Munck, C., Albertsen, M., Telke, A., Ellabaan, M., Nielsen, P. H., & Sommer, M. O. A. (2015). Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. *Nature Communications*, *6*(8452), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms9452>
- Namadurai, S., Jain, D., Kulkarni, D. S., Tabib, C. R., Friedhoff, P., Rao, D. N., & Nair, D. T. (2010). The C-terminal domain of the MutL homolog from *neisseria gonorrhoeae* forms an inverted homodimer. *PLoS ONE*, *5*(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013726>
- Ng, L.-K., & Martin, I. E. (2005). The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale / AMMI Canada*, *16*(1), 15–25.
- Ng, L., Martin, I., Liu, G., & Bryden, L. (2002). Mutation in 23S rRNA Associated with Macrolide Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(9), 3020–3025. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.3020>
- Ohnishi, M., Golparian, D., Shimuta, K., Saika, T., Hoshina, S., Iwasaku, K., ... Unemo, M. (2011). Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(7), 3538–3545. <https://doi.org/10.1128/AAC.00325-11>
- Pachulec, E., & Does, C. Van Der. (2010). Conjugative Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS ONE*, *5*(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009962>

- Patel, A. L., Chaudhry, U., Sachdev, D., Sachdeva, P. N., Bala, M., & Saluja, D. (2011). An insight into the drug resistance profile & mechanism of drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *The Indian journal of medical research*, *134*(4), 419–31.
- Percival, A., Rowlands, J., Corkill, J. E., Alergant, C. D., Arya, O. P., Rees, E., & Annels, E. H. (1976). Penicillinase-producing *Gonococci* in Liverpool. *The Lancet*, (8000), 1379–1382.
- Phillips, I. (1976). Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *The Lancet*, *308*(7987), 656–657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)92466-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)92466-1)
- Pogany, L., Romanowski, B., Robinson, J., Gale-Rowe, M., Latham-Carmanico, C., Weir, C., & Wong, T. (2015). Management of gonococcal infection among adults and youth: New key recommendations. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, *61*(10), 869–73, e451-6.
- Redfield, R. J. (2001). Do bacteria have sex? *Nature reviews. Genetics*, *2*(8), 634–9. <https://doi.org/10.1038/35084593>
- Reyn, A., Korner, B., & Bentzon, M. W. (1958). Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. *The British journal of venereal diseases*, *34*(4), 227–39. <https://doi.org/10.1136/sti.34.4.227>
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, *303*(6–7), 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>
- Schroeder, M., Brooks, B. D., & Brooks, A. E. (2017). The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes*, *8*(39), 1–23. <https://doi.org/10.3390/genes8010039>
- Silva, D. De, Peters, J., Cole, K., Cole, M. J., Cresswell, F., Dean, G., ... Wilson, D. J. (2017). Whole-genome sequencing to determine *Neisseria gonorrhoeae* transmission : an observational study. *Lancet Infect Dis.*, *16*(11), 1295–1303. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30157-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30157-8). Whole-genome
- Spratt, B. G., Bowler, L. D., Zhang, Q., Zhou, J., & Smith, J. M. (1992). Role of Interspecies Transfer of Chromosomal Genes in the Evolution of Penicillin Resistance in Pathogenic and Commensal *Neisseria* Species. *Journal of Molecular Evolution*, *34*, 115–125.
- Stohl, E. A., & Seifert, H. S. (2006). *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, *188*(21), 7645–7651. <https://doi.org/10.1128/JB.00801-06>
- Stolz, E., Zwartt, H., & Michelt, M. (1975). Activity of eight antimicrobial agents in vitro against *N. Gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis*, 257–64.

- Suay-García, B., & Pérez-Gracia, M. T. (2017). Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: latest developments. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2931-x>
- Tapsall, J., Ndowa, F., Lewis, D., & Unemo, M. (2009). Meeting the public health challenge of multidrug and extensively drug resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7(7), 821–34. <https://doi.org/10.1586/eri.09.63>
- Tapsall, J. W. (2005). Antibiotic Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *CID*, 41(Suppl 4), 263–268.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>
- Thayer, J. D., Ph, D., Field, F. W., Perry, M. I., Martin, J. E., & Garson, W. (1961). *Surveillance Studies of Neisseria gonorrhoeae Sensitivity to Penicillin and Nine Other Antibiotics** (Vol. 24).
- Thin, R. N., Barlow, D., Eykyn, S., & Phillips, I. (1983). Imported penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* becomes endemic in London. *The British journal of venereal diseases*, 59(6), 364–368. <https://doi.org/10.1136/sti.59.6.364>
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat.Rev.Microbiol.*, 3(1740–1526 (Print)), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Tsevat, D. G., Wiesenfeld, H. C., Parks, C., & Peipert, J. F. (2017). Sexually transmitted diseases and infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 216(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.08.008>
- Unemo, M., Golparian, D., Sary, A., & Eigentler, A. (2011). First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Eurosurveillance*, 16(43), 3–5.
- Unemo, M., Golparian, D., Syversen, G., Vestrheim, D. F., & Moi, H. (2010). Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Eurosurveillance*, 15(47), 4–6.
- Unemo, M., & Jensen, J. S. (2017). Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and *Mycoplasma genitalium*. *Nature Reviews Urology*, 14(3), 139–152. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.268>
- Unemo, M., & Nicholas, R. A. (2012). Emergence of multidrug resistant drug resistant and untreatable gonorrhoea. *Future microbiology*, 7(12), 1401–1422. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.117>. Emergence
- Unemo, M., & Shafer, W. M. (2011). Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1230, 1–15.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06215.x>

- Unemo, M., & Shafer, W. M. (2014). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 587–613. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-14>
- Van Slyke, C., Arnold, R., & Buchholtz, M. (1943). Penicillin therapy in sulfonamide-resistant gonorrhea in men. *Am J Public Health Nations Health*, 33(12), 1392–1394. <https://doi.org/10.1001/jama.1944.02850190024006>
- Wainwright, M., & Swant, H. T. (1986). C . G . Paine and the Earliest Surviving, 2, 42–56.
- Walter, D., Irene, M., Shelley, P., Amrita, B., Gary, V. D., Morag, G., ... Mulveya, M. R. (2016). Genomic epidemiology and molecular resistance mechanisms of azithromycin resistant 2 *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014. *J. Clin. Microbiol.*, (March). <https://doi.org/10.1128/JCM.03195-15>
- Who. (2012). Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *World Health Organization*, 40. https://doi.org/978_92_4_150350_1
- WHO. (2012). Monitoring gonococcal antimicrobial susceptibility. *Baseline report on global sexually transmitted infection surveillance 2012*, 21–25.
- Woodford, N., & Ellington, M. J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(1), 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x>
- Workowski, K. A., Berman, S. M., & Douglas Jr., J. M. (2008). Emerging antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: urgent need to strengthen prevention strategies. *Ann Intern Med*, 148(8), 606–613. <https://doi.org/148/8/606> [pii]
- World Health Organization. (2017). WHO EMRO | What is the difference between antibiotic and antimicrobial resistance? | Antimicrobial resistance | Health topics. Recuperado el 14 de abril de 2017, a partir de <http://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/what-is-the-difference-between-antibiotic-and-antimicrobial-resistance.html>
- Wright, G. D. (2012). *Antibiotic Resistance. Chapter: The Origins of Antibiotic Resistance*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4>
- Yokoi, S., Deguchi, T., Ozawa, T., Yasuda, M., Ito, S. I., Kubota, Y., ... Maeda, S. I. (2007). Threat to cefixime treatment for gonorrhea [14]. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1275–1277. <https://doi.org/10.3201/eid1308.060948>
- Zhao, S., Tobiason, D. M., Hu, M., Seifert, H. S., & Nicholas, R. A. (2005). The penC mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol*, 57(5), 1238–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2958.2005.04752.x.The