



Universidad de la República
Facultad de Ciencias



Estudio y caracterización de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacina circulantes en Uruguay.

Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

Federico Parnizari

Tutor: Dra. QF Graciela Borthagaray

Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de
Química (UDELAR)

Montevideo 2016

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INDICE..... | 2 |
| RESUMEN | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 1.1 NEISSERIA GONORRHOEAE | 6 |
| 1.2 GONORREA | 10 |
| 1.3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO | 12 |
| 1.4 TRATAMIENTO | 14 |
| 1.5 ORÍGENES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE AISLAMIENTOS QNGR..... | 19 |
| 1.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA..... | 22 |
| 1.7 RESISTENCIA DE GONOCOCOS A CIPROFLOXACINA | 25 |
| 1.8 MÉTODO DE TIPIFICACIÓN..... | 26 |
| 2. OBJETIVOS..... | 32 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 32 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 33 |
| 3.1 CULTIVOS Y SELECCIÓN DE CEPAS..... | 33 |
| 3.2 ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN..... | 34 |
| 3.3 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA..... | 36 |
| 3.4 ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS..... | 40 |
| 3.5 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN | 43 |
| 3.6 PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)..... | 47 |
| 3.7 TRANSFORMACIÓN | 50 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 52 |
| 4.1 | PERFIL DE COLECCIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS..... | 52 |
| 4.2 | EXTRACCIÓN DE ADN..... | 56 |
| 4.3 | AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN <i>POR</i> | 57 |
| 4.4 | AMPLIFICACIONES DE FRAGMENTOS PORINAS CON PRIMERS NG-MAST..... | 58 |
| 4.5 | PERFILES PFGE..... | 61 |
| 4.6 | ANÁLISIS NG MAST..... | 63 |
| 4.7 | CLASIFICACIÓN DE GENOGRUPOS..... | 68 |
| 4.8 | INTEGRACIÓN DE MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN..... | 70 |
| 4.9 | TRANSFORMACIÓN..... | 73 |
| 5. | CONCLUSIONES..... | 74 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA..... | 77 |
| 7. | ANEXOS..... | 82 |
| 7.1 | SECUENCIACIÓN DE ADN DE CEPAS QNRG..... | 82 |
| 7.2 | SECUENCIA DE PROTEINAS EN LAS CEPAS QNGR PORTADORAS DE PORB IB..... | 89 |
| 7.3 | SECUENCIA DE PROTEINAS EN LAS CEPAS QNGR PORTADORAS DE PORB IA..... | 91 |
| 7.4 | ALINEACIÓN DE ALELOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GENOGRUPOS..... | 92 |

RESUMEN

La vigilancia de infecciones causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, es una necesidad en todo el mundo. La constante adquisición de mecanismos de resistencia ante diferentes agentes antimicrobianos recomendados contra este tipo de infecciones, han vuelto imprescindible llevar adelante investigaciones que permitan identificar las cepas circulantes así como entender los comportamientos de estas frente a los antibióticos. En las últimas décadas se han vuelto más comunes los aislamientos resistentes a quinolonas (QRNG) y su propagación en todo el mundo.

Nuestro país no está ajeno a esta situación y el estudio de la colección de aislamientos que se encuentran conservados en el laboratorio, es de gran importancia para el seguimiento del estado de estas infecciones en Uruguay. Al analizar la sensibilidad a ciprofloxacina de los aislamientos de la colección, se observa que a partir de mediados de la década del 2000, la recuperación de estos aislamientos en centros de salud locales se ha incrementado notoriamente. Se ponen a prueba por tanto, diferentes métodos de tipificación que ayudan a una completa caracterización de los aislamientos seleccionados. Luego de analizar los perfiles de sensibilidad a antibióticos de estos aislamientos, mediante la amplificación de una región altamente variable de una de las porinas de superficie, se ha desarrollado una técnica que permite diferenciar de manera económica y rápida, las cepas portadoras de los subtipos de porinas PorB IA y de PorB IB. Se pudo ver cómo, a pesar de que los primeros aislamientos de este tipo recuperados localmente presentaban porinas del tipo PorB IA y bajo nivel de resistencia a ciprofloxacina, estas no se mantuvieron en el tiempo y fueron suplantadas en su totalidad por cepas portadoras del subtipo PorB IB con, mayoritariamente, altos niveles de resistencia a ciprofloxacina.

A su vez se llevó a cabo la técnica de NG-MAST la que permitió identificar cuales sequence types (STs) son los que están circulando en nuestra población, encontrándose que de los 28 aislamientos analizados, 13 presentaban STs no registrados hasta el momento en la base de datos internacional. Los aislamientos seleccionados fueron también sometidos al

análisis de genogrupos, profundizando la técnica de NG-MAST, además del análisis de pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Se obtuvieron resultados totalmente concordantes entre los diferentes métodos de tipificación utilizados y se pudo destacar el alto poder discriminatorio que se observa en la asignación de STs.

Observando las diferencia en la resistencia a ciprofloxacina que presentan los aislamientos portadores de uno u otro subtipo de porinas PorB, sumado trabajos desarrollados anteriormente en el laboratorio, que evidencia el rol del sistema de eflujo MtrCDE como mecanismo de resistencia, se llevaron a cabo ensayos de transformación que permitan explicar la incidencia de estas características como determinantes en el valor de resistencia a ciprofloxacina. No se pudieron extraer conclusiones de estos ensayos ya que no fue posible recuperar colonias con las transformaciones propuestas. De todas maneras se considera de vital importancia continuar con estos análisis en fin de dilucidar los mecanismos que han llevado a este tipo de bacterias a presentar este comportamiento frente a la ciprofloxacina.

Palabras claves: *Neisseria gonorrhoeae*, tipificación, ciprofloxacina, NG-MAST, porinas.

1. INTRODUCCIÓN

Un área muy importante de la salud se refiere a las enfermedades de transmisión sexual (ETS) o enfermedades venéreas como se conocían en la antigüedad, término derivado del nombre Venus, la diosa romana del amor y la fertilidad. Estas enfermedades se propagan debido al contacto sexual y son de las enfermedades infecciosas más comunes en el mundo, lo que las hace, desde hace mucho tiempo, un blanco importante de estudio. Esto se ha ido reafirmando con el tiempo ya que, por ejemplo, estudios realizados por la división de prevención de ETS del Center for Disease Control and Prevention (CDC) en el año 2000 arrojan datos sumamente preocupantes en relación a las infecciones de transmisión sexual (ITS). En este trabajo se indica la aparición durante el año 2000 de casi 19 millones de nuevos casos de ETS destacando que casi la mitad de los mismos se dan en personas de entre 15 y 24 años [1]. Estas enfermedades fueron detectadas a lo largo de la historia de la humanidad, encontrándose menciones en diversos documentos, como por ejemplo en varios pasajes de la biblia donde hace referencia a patologías concordantes con sífilis y gonorrea. Existe una gran diversidad de ETS, en este caso nos centraremos en las de origen bacteriano. Al hablar de bacterias, hablamos de microorganismos unicelulares independientes que se multiplican por división simple, creando una copia de su material genético y dándoselo a su progenitor [2]. Dentro de las ITS bacterianas, se pueden destacar como las más frecuentes la infección por *Chlamydia trachomatis*, la gonorrea y la sífilis.

1.1 NEISSERIA GONORRHOEAE

El género *Neisseria* pertenece a la familia de bacterias *Neisseriaceae* y son cocos gram negativos, aerobias o anaerobios facultativos, utilizadoras de pocos carbohidratos, reductoras de nitratos y que no tienen la capacidad de producir indol a partir de triptófano [3]. Dentro de este género, solo dos especies son patógenas en humanos, *Neisseria meningitidis* o meningococo y *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) o gonococo. Por el contrario, el resto de las especies como *Neisseria flavescens* o *Neisseria sicca* entre otras, no son bacterias patógenas y están presentes como flora normal de nasofaringe [4].

N. gonorrhoeae se presenta en forma de cocos gram negativos, que se disponen en pares con sus caras adyacentes aplanadas, adoptando una forma de granos de café o de riñones [3, 5-7]. El crecimiento en superficie produce colonias con tintes rosados o grisáceos, generalmente de un tamaño que va desde los 0,5 mm a 1 mm de diámetro. Existen diferentes tipos de colonias de *N. gonorrhoeae* identificables morfológicamente (las colonias de tipo 1 y 2 son más chicas respecto a las colonias tipo 3 y 4) y con diferencias fisiológicas (como por ejemplo la necesidad de las tipo 1 y 2 de iones férricos para su crecimiento) [8, 9]. Luego de observar este comportamiento morfológico de los gonococos, en el año 1968, los mismos investigadores siguieron con esta línea de investigación encontrando evidencia de la estrecha relación entre la morfología de las colonias de gonococos y su virulencia [10]. Estos hallazgos fueron fundamentales en el estudio de los mecanismos patogénicos que presentan estas bacterias.

Para la obtención y análisis de colonias características, los cultivos primarios son inspeccionados inmediatamente de observado el crecimiento. Luego de las 48 horas de incubación las colonias generalmente aumentan de tamaño perdiendo el brillo y generando superficies mas rugosas con bordes dentados [3, 5]. Por ello es de suma importancia obtener un cultivo puro de 18 a 24 horas para realizar la caracterización por morfología de colonia, además de conocer claramente el caso particular en análisis ya que también se ha observado cambios de morfología durante el tratamiento con algunos antibióticos, como con la penicilina donde la morfología de las colonias cambia luego de las primeras cuatro horas después de haber comenzado el tratamiento [3].

1.1.1 ESTRUCTURA DE MEMBRANA

Los gonococos presentan una pared con una estructura típica de bacteria gram negativa en la que se distinguen dos membranas lipídicas limitando el periplasma que contiene una fina capa de peptidoglicano.

La membrana externa de *N. gonorrhoeae* presenta diversos antígenos que han sido objeto de estudio en los últimos años, de los cuales tres aparecen en grandes cantidades y se denominan proteínas POR I, II y III (PI, PII y PIII). La permeabilidad para sustancias hidrofílicas está determinada por la existencia

de estas proteínas de membrana conocidas como porinas principales las cuales juegan un papel sumamente importante en el ingreso de sustancias hacia el interior de la bacteria.

La PI, o PorB es cuantitativamente la proteína predominante de la membrana de *N. gonorrhoeae* [9, 11]. Es una proteína transmembrana que se presenta de forma trimérica en su estado nativo y que consiste en una porina voltaje-dependiente. Tiene similitudes con las porinas presentes en *E. coli* respecto a su peso molecular, su configuración trimérica y el tamaño del poro. Esta porina de *N. gonorrhoeae* aparece en todas las cepas en la forma correspondiente a alguno de los dos alelos que presenta su correspondiente gen *por*. Dichos alelos pueden ser nombrados como *porA* o *porB*. Ambas formas tienen alta homología y pueden ser diferenciadas mediante criterios bioquímicos e inmunológicos.

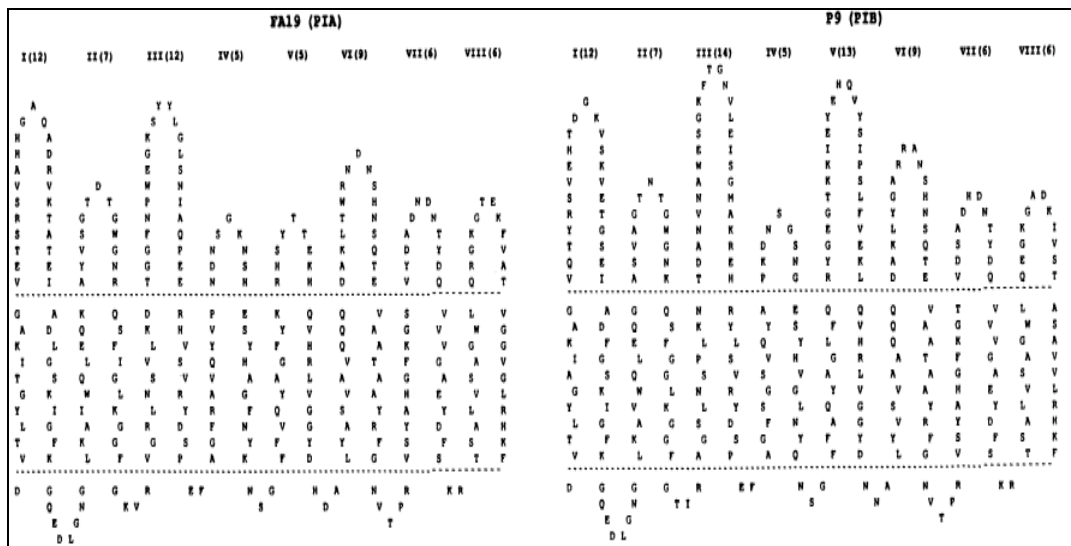


Figura 1. Secuencia aminoacídica de porina PIA (PorB IA) y PIB (PorB IB) y su conformación en membrana mostrando los 8 loops expuestos y los segmentos transmembrana. Imagen extraída de van der Ley et al [12].

Las dos clases de porinas, PorB IA y PorB IB, a su vez pueden ser divididas en subtipos definidos por la reacción con paneles de anticuerpos monoclonales (MAbs) [9, 11, 13]. Se han encontrado casos que no se pueden clasificar tan sencillamente, e incluso algunas cepas que presentan epítopes capaces de ser reconocidos tanto por anticuerpos monoclonales específicos para IA como para

IB, es decir cepas híbridas [14]. Las cepas que presentan PorB IA pueden invadir el torrente sanguíneo y causar una infección sistémica, situación que no ocurre en el caso de las cepas que presentan PorB IB ya que esta proteína contiene en la superficie de los gonococos sitios susceptibles a proteólisis [11]. Otra diferencia entre estas dos clases de porinas radica en el tamaño, donde se observa menor cantidad de residuos aminoacídicos en las PorB IA respecto a las PorB IB, y sumados a diversas sustituciones en la secuencia se observan diferencias de más de 100 aminoácidos en total entre las dos proteínas [15].

Estas clases de porinas presentan 8 loops expuestos en la superficie codificados por regiones de alta variabilidad génica separados por otras regiones más conservadas que codificaran para sectores de la proteína ubicados en el interior de la membrana. Es decir que las sustituciones de nucleótidos están distribuidas a lo largo de todo el gen y concentrados en las regiones que se predice que formaran los loops expuestos en la superficie donde la mayoría de estas sustituciones llevan a un reemplazo de aminoácidos [12, 14-17]. Hobbs et al [15], además de sugerir que pueden ocurrir intercambios genéticos horizontales de todo o parte del gen *por* durante el pasaje de la infección en una comunidad, establecen que las regiones más variables corresponden a los loops 5 y 6. Por lo tanto, a pesar de que la expresión de la proteína PorB es característica de las cepas de gonococos, existe cierta heterogeneidad entre las cepas. El análisis de la secuencia de los alelos *porA* y *porB* de los gonococos proporciona un alto nivel discriminatorio para la caracterización de las diferentes cepas, la identificación de las cepas circulantes y la investigación de la resistencia a antibióticos. Muchos trabajos realizados en los últimos años se han detenido en la secuenciación de los alelos completos del gen *por*, en busca de las diferentes mutaciones y de asociación entre las secuencias y los fenotipos de resistencia a antibióticos.

1.2 GONORREA

N. gonorrhoeae es el agente etiológico de la gonorrea y fue descrito por primera vez por Albert Neisser en el año 1879 [18]. El humano, es el único huésped natural que esta bacteria tiene y nunca forma parte de la flora normal del mismo por lo que su presencia indica infección. La gonorrea es una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en el mundo siendo un importante problema en países en desarrollo y dentro de las enfermedades infecciosas es una de las que reporta mayor cantidad de casos a nivel mundial [19]. Se pueden encontrar una gran cantidad de menciones a esta enfermedad a lo largo de la historia. La existencia de la sífilis puede generar que las documentaciones al respecto pueden ser un poco imprecisas ya que se encuentran algunas confusiones entre estas enfermedades e incluso en ocasiones son consideradas como diferentes manifestaciones de una misma enfermedad [9].

Esta infección bacteriana, que tiene un periodo de incubación de entre 2 y 8 días, puede presentarse tanto en cuadro sintomáticos como asintomáticos. Los cuadros asintomáticos son muy comunes principalmente en mujeres, siendo estas personas infectadas asintomáticas un reservorio para el mantenimiento y transmisión de esta infección en una población. Usualmente implica la infección por parte del gonococo, de las mucosas del tracto urogenital y recto. Existen casos también de infección de oro y nasofaringe. Por lo general, la bacteria coloniza estas membranas mucosas y desarrolla una infección local aunque en algunos casos, de no tratarse, puede producir una invasión de tejidos llegando a generar otras complicaciones como enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad tubárica, embarazos ectópicos, dolor pélvico crónico, fibrosis e incluso infección gonocócica diseminada [5, 6, 9, 19]. Las infecciones del tracto genitourinario, son sintomáticas en hombres, presentándose con una secreción purulenta de la uretra y disuria. En mujeres, la infección se da a nivel del endocérvix y se extiende por uretra y recto, e incluso puede llegar a las mucosas uterinas y provocar la inflamación de las trompas de Falopio (salpingitis), fibrosis o inflamación pélvica. El 20 % de las mujeres desarrolla infertilidad a causa de la salpingitis [19]. Durante el parto el recién nacido

puede adquirir la infección gonocócica a nivel ocular. Esta patología oftalmológica es adquirida cuando el neonato atraviesa el canal de parto de la madre infectada y en caso de no ser tratada puede ocasionar ceguera [5, 6, 9, 19]. La infección diseminada se da raramente porque, al contrario de lo que pasa con el meningococo, *N. gonorrhoeae* no se disemina fácilmente a nivel del torrente sanguíneo [19].

Es importante destacar que además de las complicaciones antes mencionadas, al estar presente esta bacteria, se facilita la transmisión de otras enfermedades de transmisión sexual [5]. Un ejemplo es lo que sucede con el VIH donde se cree que los gonococos provocan un reclutamiento de células inflamatorias infectadas por VIH como parte de la respuesta normal del organismo promoviendo de esta manera la transmisión de ambas infecciones [20].

N. gonorrhoeae tiene un tiempo de vida muy corto fuera del cuerpo humano, ya que es muy susceptible a condiciones químicas y físicas adversas del ambiente. Fuera del cuerpo humano generalmente muere por deshidratación además de no tolerar temperaturas por debajo de los 25°C, por lo que no se han encontrado evidencias que muestren una transmisión de la misma por un contacto que no sea directo entre las superficies mucosas [4, 19]. A pesar de que existe más de una forma de transmisión de esta bacteria, como mencionamos por ejemplo en la transferencia de madre a hijo durante el parto, la principal vía de contagio es por contacto sexual.

Son innumerables los esfuerzos que se han realizado por encontrar una vacuna contra esta infección, sobretodo utilizando a los pili como antígenos. Al presente no se han desarrollado vacunas efectivas para este tipo de infección bacteriana debido en parte a la gran variabilidad antigénica de los componentes superficiales de los gonococos, razón por la que esta infección no confiere inmunidad protectora contra una reinfección [19]. A su vez las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *N. gonorrhoeae* varían a lo largo del tiempo y de las regiones geográficas. Es por tanto sumamente importante para la prevención y el control de las infecciones, atacar ciertos puntos a nivel de la comunidad como son la educación para prevenir la infección, la detección temprana de los casos, el tratamiento antibiótico efectivo y la existencia de estudios epidemiológicos locales que permitan identificar la

cadena de transmisión, las cepas que están circulando en las diferentes subpoblaciones así como sus cambios temporales y geográficos. Para ello es esencial el desarrollo de técnicas de caracterización de cepas de *N. gonorrhoeae* altamente discriminatorias y reproducibles, sencillas y de bajo costo.

1.3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Como vimos, son numerosas las razones para considerar a *N. gonorrhoeae* como una bacteria importante sujeto de estudios epidemiológicos a lo largo del mundo. De allí la relevancia de contar con laboratorios de vigilancia de este patógeno en las diferentes regiones de manera de tener un control de las cepas presentes en la región, establecer un perfil de las mismas y así ver tendencias regionales y mundiales de la sensibilidad a antibióticos y poder asegurar el mejor tratamiento para los casos clínicos que aparezcan. Es crítico por tanto contar en el laboratorio con los conocimientos e insumos necesarios para poder realizar un correcto diagnóstico de esta infección y recuperación de las cepas en cultivo.

El diagnóstico en el laboratorio depende de la demostración de gonococos en el sitio de infección, ya sea por examen microscópico de un extendido coloreado con la técnica de gram y/o por cultivo o por amplificación de ácidos nucleicos. Es importante conservar la muestra en condiciones que aseguren la viabilidad de la bacteria durante su transporte cuando se utilizará el cultivo o la integridad del ADN cuando se utilizarán métodos por amplificación de ácidos nucleicos, en tanto que el extendido se realiza en el momento de la toma de muestra. El cultivo es el método de referencia para el diagnóstico y permite el posterior estudio de sensibilidad a los antibióticos del aislamiento. La toma de muestra es común que se realice en el hombre de la uretra y en la mujer de endocérnix pero en ocasiones puede realizarse también de conjuntiva de neonato o en adultos, de mucosa rectal, próstata (primer chorro de orina), vagina (prepúberes), e incluso de sangre.

En el caso de una tinción de gram de un exudado purulento, el observar diplococos gram negativos dentro o asociados a leucocitos polinucleares se

considera un resultado sugestivo de infección con gonococo [9]. En el caso de la detección por cultivo, la muestra se siembra en medios selectivo y no selectivo. *N. gonorrhoeae* es una bacteria nutricionalmente exigente, el medio no selectivo puede ser agar chocolate con suplemento definido de Kellogg o Isovitalex(BD) o Vitox(Oxoid). Los medios selectivos agregan al medio no selectivo, vancomicina y colisitina para inhibir bacterias gram positivas y gram negativas (*N. gonorrhoeae* es resistente a colistin) respectivamente, nistatina, anisomicina o anfotericina para inhibir hongos y trimetoprim para inhibir *Proteus* (bacteria gram negativa también resistente a colistin). Para el estudio de sensibilidad a los antibióticos se utiliza medio GC suplementado.

Este microorganismo crece preferentemente en un rango de temperatura de entre 35° a 37 °C con una atmosfera húmeda enriquecida en CO₂ (entre 3 y 8 %), entre 24 a 72 hs de incubación [3, 5-7, 9]. Podemos lograr esta atmósfera enriquecida en CO₂ mediante el uso de estufas acondicionadas para este fin, pero también se puede realizar el método de la jarra de extinción con vela.

Luego de 24 a 72hs de incubación el cultivo se inspecciona visualmente en busca de colonias de morfología típica, y se realiza una coloración de gram para observar diplococos gram negativos dispuestos en parejas. Un diagnóstico presuntivo primario, puede ofrecerse con la observación de colonias típicas y morfología característica al gram, en el aislamiento primario en un medio selectivo. Es necesario completar este diagnóstico con resultados positivos para las pruebas de oxidasa y superoxol [5, 7]. En el caso de aislamientos realizados a partir de muestras extraídas de uretra de hombres sintomáticos, son indiferentes las características selectivas del medio de cultivo ya que el número de gonococos supera ampliamente el número de otras especies de la flora. Por otro lado, para otro tipo de muestras se recomienda el uso de medios selectivos ya que aumenta la posibilidad de realizar un aislamiento puro que permitan realizar el diagnóstico.

En casos de aislamientos de otros sitios no ano-genitales, o en estudios con implicancia médico legales y en fallas de tratamiento, el diagnóstico primario debe ser confirmado con pruebas específicas, bioquímicas o inmunológicas. Algunas de estas pruebas se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Pruebas específicas para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* [5]

| Pruebas | Resultados esperados para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
|---|--|
| Superoxol (H ₂ O ₂ 30%) | Positivo (reacción explosiva) |
| Catalasa (H ₂ O ₂ 3%) | Positivo (reacción débil) |
| Test de carbohidratos | Positivo glucosa, negativo maltosa, lactosa y sacarosa |
| Reduccion de NO ₃ | Negativo |

Tanto el test de catalasa como superoxol son ensayos sencillos, rápidos y de bajo costo que nos permiten aproximarnos a un mejor diagnóstico. De todas maneras el test de referencia para la confirmación del diagnóstico, diferenciado a los gonococos de otras especies de *Neisseria*, es el test de utilización de carbohidratos. En este test se busca observar la capacidad de *N. gonorrhoeae* de degradar la glucosa pero no la maltosa, sacarosa, fructosa o lactosa [9].

Una vez que se haya completado la identificación presuntiva, cuando se requiera confirmación se pueden realizar pruebas adicionales basadas en la detección de ácidos nucleicos, en la detección de actividad β -galactosidasa, γ -glutamylaminopeptidasa [5, 7] y en la detección de antígenos mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reaccionan con la proteína de membrana de gonococos, PorB [7].

1.4 TRATAMIENTO

Muchas líneas de estudio en bacteriología centran sus esfuerzos en conocer los mecanismos de infección de las bacterias patógenas, su virulencia, sus mecanismos de resistencia, etc., para de esta manera atacar la problemática de las infecciones. Para afrontar la lucha contra las enfermedades provocadas por bacterias patógenas, los seres humanos contamos con una serie de defensas naturales. En primer lugar, las bacterias encuentran una primera dificultad a la hora de infectar el organismo y son las barreras mecánicas donde se destaca la piel como la principal barrera. Como parte de estas primeras defensas, también son de gran importancia las membranas mucosas del tracto digestivo, respiratorio y genital, donde el mucus que baña las células previene la colonización de las bacterias en estas y la presencia de pelos interfiere en la

entrada de bacterias y otros materiales exógenos. Es importante destacar que algunas secreciones también presentan actividad antimicrobiana. Por detrás de esta primer barrera, las bacterias que logren atravesarlas se encuentran con un segundo nivel de defensas del organismo, la cual es mediada por las defensas inmunológicas que puede presentarse en forma de respuestas inespecíficas y específicas [2]. Pese a que estas defensas presentes en los seres humanos son de vital importancia, no siempre logran ganar la lucha contra estos microorganismos patógenos, por lo que a lo largo de la historia, uno de los blancos de estudio más importante se centró en la búsqueda de sustancias químicas que ayuden a superar estas adversidades provocadas por las bacterias. Es aquí donde aparece el concepto de antibióticos.

Según la Real academia española un antibiótico es "...sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos, por su acción bactericida".

Existen diversas evidencias de que los antibióticos son usados desde mucho tiempo antes que fueran descubiertos. A fines del siglo XIX, los diferentes estudios de numerosos científicos, buscando una solución a las enfermedades bacterianas, empiezan a mostrar indicios que posteriormente llevaron al descubrimiento de los antibióticos. Desde el descubrimiento de la Penicilina por Alexander Fleming (1881-1955) en 1928, el estudio de los antibióticos ha ocupado un lugar sumamente importante en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Esta área termina de marcar su relevancia durante la segunda guerra mundial donde era imperiosa la necesidad de encontrar un tratamiento contra las infecciones bacterianas producidas en las heridas.

Las bacterias, como todos los seres vivos, buscan la manera de sobrevivir y enfrentar las diferentes condiciones adversas. En los últimos años, la aparición de mecanismos de resistencia en diversas bacterias patógenas a drogas antibacterianas ha sido un problema que requiere de amplios estudios y exhaustivos controles en todo el mundo. En ocasiones se sustituye el antibiótico de elección mientras que en otros casos se buscan otras alternativas para contrarrestar los mecanismos de resistencia presentes.

Son mucho los factores que influyen en este rápido desarrollo de las bacterias de adquisición de resistencia a los diferentes antibióticos empleados. En un trabajo publicado en 1994 [21], Levy propone lo que llama la "ecuación de resistencia de drogas" donde figuran los factores más influyentes. En esta ecuación, Levy plantea que el problema de la resistencia de antibióticos está liderado por el antibiótico y por los determinantes de la resistencia. De esta manera plantea que si alguno de estos dos factores no están presentes, el problema no aparecerá. Por otro lado, la presencia de estos factores y teniendo una buena propagación de la cepa resistente y/o de sus determinantes de resistencia, este tipo de bacterias se instalarán rápidamente en una comunidad.

El tratamiento en el caso de la *N. gonorrhoeae* fue modificándose a lo largo del tiempo y adaptándose a las nuevas necesidades. Las diferentes infecciones alrededor del mundo a lo largo de los años y la aplicación de diferentes terapias ha llevado a la selección de cepas que presentan resistencia a ciertos antibióticos restringiendo las posibilidades de tratamiento y acentuando la necesidad de estudios epidemiológicos exhaustivos, de manera de controlar y conocer las diferentes cepas circulantes en la población. El siglo XX fue fundamental para los avances en este tema. Se establecen diversos programas de seguimiento a nivel mundial y regional de manera de controlar las diferentes situaciones que puedan aparecer. Es por ello que la OMS establece una serie de recomendaciones para el tratamiento de las ITS y el control de los antibióticos de uso. Establece también que la eficacia de un tratamiento de primera elección debe obtener resultados positivos como mínimo en el 95% de los casos, entre otras recomendaciones como bajo costo, tolerancia y toxicidad aceptable, dosis oral única, entre otras. Entre el 85% y 95% es necesario un control exhaustivo mientras que por debajo de ese valor es inaceptable el uso de ese tratamiento [22].

Desde que se comenzó a estudiar esta bacteria y su relación a diferentes antibióticos se pudo observar que en general presentaba sensibilidad hacia la mayoría de los agentes antimicrobianos, en comparación con el resto de las bacterias gram negativas.

En un comienzo, a mediados de la década de 1930, se introducen las sulfonamidas como tratamiento. Con el tiempo y el uso se empieza a detectar el desarrollo de resistencia a estos antibióticos [4, 9].

En el año 1943, el uso de penicilina para el tratamiento de la gonorrea era sumamente efectivo, las bacterias podían ser inhibidas con apenas 0.01 µg/ml. A partir de fines de la década del 1950, la resistencia a este antibiótico ha ido aumentando considerablemente. En 1957, el descubrimiento de cepas con sensibilidad disminuida a penicilina llevó a un aumento en la dosis que se administraba [4, 9]. Muchos estudios han demostrado que la resistencia a penicilina está asociada a diferentes mutaciones puntuales en el ADN que generan un cambio a nivel superficial de la célula. Una de las alteraciones es a nivel del gen *penA* que codifica para la PBP2 y que generan una disminución en la afinidad de esta proteína por la penicilina. Otra alteración estudiada es en los loci *mtr* y *penB*, modificando la membrana exterior haciéndola menos permeable a algunos antibióticos además de a la penicilina [9]. En 1976 se describe una nueva forma de resistencia a penicilina basada en la producción de β-lactamasa, transmitida por plásmidos que confería a las bacterias un nivel más alto de resistencia [4, 9].

La tetraciclina fue otro de los antibióticos de elección, pero la resistencia mediada por los loci *mtr* y *penB*, como en la penicilina y el loci *tet*, donde el gen *tetM* aportado a la célula codifica una proteína citoplasmática que protege a los ribosomas de la acción de este antibiótico, llevo a una alta prevalencia de cepas tetraciclina resistentes. Por ende, este antibiótico paso a ser otro de los que se dejo de usar como tratamiento de esta infección [4, 9]. También se reportaron casos de resistencia cromosómica para eritromicina y aminoglucósidos [23-25].

Otras alternativas para el tratamiento de gonococos penicilina resistentes son las cefalosporinas de amplio espectro, una única dosis de 125 mg de ceftriaxona o de 400 mg de cefixime [4].

La espectinomicina es un antibiótico de amplio uso en áreas donde se reportaron numerosos casos de bacterias resistentes a penicilina aunque también se han detectado mutaciones del gen *spc*, que modifican el sitio

blanco de acción de este antibiótico, la subunidad ribosómica 30S y que produce alta resistencia en un solo paso [9].

En 1989, como respuesta a las importantes cantidades de aislamientos penicilina resistentes, el CDC recomienda el uso de cefalosporinas de amplio espectro o de fluoroquinolonas para el tratamiento de las infecciones gonocócicas [26]. La problemática constante de encontrar un tratamiento adecuado llevo a que en los últimos años se fuera haciendo más común el uso de fluoroquinolonas para el tratamiento de la gonorrea como alternativa a la penicilina. En 1993 el CDC indica que una única dosis de 500 mg ciprofloxacina o 400 mg en el caso de ofloxacina se considera suficiente para el tratamiento de las infecciones gonocócicas [27]. Este tratamiento es el de primera elección en muchos lugares hoy en día para tratar esta infección, pero debido a los antecedentes observados con los antibióticos previamente usados y el mayor conocimiento de los mecanismos de resistencia desarrollados por las diversas bacterias se han establecido numerosos programas de vigilancia alrededor del mundo para controlar la eficacia de estos tratamientos. Estos controles han ido mostrando resultados preocupantes en cuanto a la sensibilidad que presenta esta bacteria frente a las quinolonas que terminaron eliminando el uso de estos antibióticos en algunos países o poniéndolo en duda en muchos otros casos por lo que es imperiosa la realización de una vigilancia exhaustiva de las cepas circulantes en las diferentes regiones y el conocimiento de las mismas y su comportamiento. De hecho, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha colocado a la ciprofloxacina en el Grupo A de antibióticos, que se refiere a los agentes apropiados para la inclusión en los test de rutina [28].

Los controles deben ser claros y comparables a lo largo del mundo de manera de poder fácilmente compartir la información y analizarla. Es por ello que el CLSI establece los patrones de interpretación de resultados de sensibilidad de gonococos a ciprofloxacina. Se consideraran sensibles a este antibiótico las cepas que presenten una CIM $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$. Si el resultado se encuentra entre 0,12 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ se considera sensibilidad disminuida, mientras serán consideradas resistentes todas las cepas cuya CIM sea mayor o igual 1 $\mu\text{g/ml}$ [28]. Otra posible caracterización que puede ayudar al análisis de datos es el grado de resistencia a ciprofloxacina, que los diferentes aislamientos de

gonococos pueden presentar. Para ellos se considera las cepas con CIM entre 1 µg/ml y 2 µg/ml como aislamientos resistentes mientras que si la CIM es mayor o igual a 4 µg/ml, los aislamientos serán considerados de alta resistencia [29].

Las últimas publicaciones del CDC y la WHO [30, 31] recomiendan como tratamiento primario ante las infecciones causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, el uso de una única dosis de 250 mg de ceftriaxona seguida de una dosis de 1 g de azitromicina. Este tratamiento puede modificarse en algunos casos particulares y también se indica que en caso de contar con ceftriaxona, esta puede ser sustituida por 400 mg de cefixime. Los planes terapéuticos que recomienda el Ministerio de Salud Pública en el Uruguay para infecciones por *N. gonorrhoeae* implican el uso de dosis únicas de 1 g de azitromicina, 250 mg de ceftriaxona o 500 mg de ciprofloxacina. En el caso de ceftriaxona o ciprofloxacina se recomienda agregar una única dosis de azitromicina con el fin de tratar infecciones asociadas que se puedan presentar [32].

1.5. ORÍGENES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE AISLAMIENTOS QNGR

A raíz de los estudios epidemiológicos mencionados, es que en las últimas décadas se han detectado la aparición de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacina las cuales se han ido incrementando de manera importante [33]. Los primeros hallazgos fueron realizados en el sudeste asiático, África y Australia [4, 34].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en el año 1990 un programa de vigilancia mundial que se encarga de coleccionar y analizar datos de susceptibilidad antimicrobiana de gonococos, conocido como GASP (Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme). Este programa busca unificar datos de susceptibilidad de gonococos a los diferentes antibióticos de manera de establecer controles y tomar decisiones en cuanto a los tratamientos más efectivos a nivel mundial y/o regional [35].

Este programa ha funcionado en diferentes regiones del mundo, como por ejemplo en la región oeste del pacífico (WPRO – Western Pacific Regional

Office) el cual comienza a emitir reportes desde el año 1992 [36]. Más tarde, en el año 2007, se agrega a este programa los datos provenientes del sudeste asiático (SEAR – South East Asian Region) [37]. Son de suma importancia estas regiones ya que en la década del 90 la mayor cantidad de infecciones se dan allí como informa la OMS, de los aproximadamente 62 millones de casos a nivel mundial en el año 1995, alrededor de 29 millones son detectados en el sur y sudeste de Asia [38]. En los primeros informes de este programa ya se observan, entre los años 1992 y 1994, la aparición de casos endémicos de gonococos ciprofloxacina resistentes (QRNG), en países como Japón, China, Hong Kong y Filipinas. Estos casos también aparecen en países de la región como Nueva Zelanda y Australia aunque en estas situaciones, los pacientes adquirieron estas infecciones fuera del país [39]. Para el año 1996 estas cifras continuaron creciendo, mostrando muy pocos países de esta región sin casos QRNG [36]. A nivel general estos números se siguen incrementando, viendo que en los años 2007 y 2008 las tasas de QNGR alcanzan valores mayores al 75% e incluso llegando al 100% o muy cercanos en países como China, Mongolia, Tailandia, Hong Kong, India y Sri Lanka [37]. En este momento se detectan porcentajes más bajos en Australia y Nueva Zelanda aunque igualmente significativos a la hora de optar por este tratamiento. Estos valores se mantienen en los últimos reportes publicados por el programa de WPRO SEAR y por el AGSP (Australian Gonococcal Surveillance Programme) [40, 41]. A comienzos de los 90' también se comienzan a detectar QNGR en otras partes del mundo. Por ejemplo en Reino Unido se reporta el primer aislamiento con sensibilidad reducida a ciprofloxacina en el año 1990, en un paciente proveniente de Tailandia [42]. Continuando con estudios en esta área se continúan detectando casos de aislamientos con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina y fallas a tratamientos con 250 mg [43-45]. A partir de 1995 se encuentran casos en Reino Unido, de pacientes que infectados en Filipinas y Rusia, no respondieron a un tratamiento con 500 mg de ciprofloxacina, encontrándose los primeros aislamientos con alto nivel de resistencia a este antibiótico (MIC = 16 mg/ml) [46, 47]. En las últimas décadas, la aparición de estos aislamientos a nivel mundial es cada vez más común [48]. En España, a partir de la década de los 90' se comienza a encontrar cepas con sensibilidad

disminuida, pero es recién en el año 2000 que se encuentra el primer aislamiento con resistencia a quinolonas y un fuerte incremento en los años siguientes [49]. Una situación similar se observó en Suiza con la aparición de cepas resistentes en el 2002 y un posterior incremento de las mismas, aunque en esos momentos todos los aislamientos con estas características aparecen debido a contactos sexuales fuera del país [50]. Este comportamiento se repite en Noruega donde el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacina crece desde un 3% en el año 1995 a un 47% en el 2007, donde la mayoría de estos casos fueron adquiridos en Asia [51].

En África, en un principio no se detectaron cepas QNGR debido a que no era un antibiótico de uso a causa de su baja disponibilidad. Con el tiempo fueron apareciendo cepas resistentes como en las demás partes del mundo [52].

En nuestra región, la situación no difiere considerablemente de lo que ocurre en otras partes del mundo, aunque si podemos ver que las apariciones de cepas resistentes a quinolonas es un poco posterior a lo que se describió previamente. Desde comienzos de los 90' un total de 130 laboratorios distribuidos en 43 países comienzan a participar del programa de vigilancia de la OMS, GASP para América y el Caribe. EEUU y Canadá mantienen desde entonces importantes controles de vigilancia y reportes de datos de sensibilidad.

Argentina, en la década del 90 comienza un activo trabajo en la vigilancia de *N. gonorrhoeae*. En 1993, el centro nacional de referencia para enfermedades de transmisión sexual establecido en la Argentina desde el año 1980, comienza a formar parte del programa de la OMS de vigilancia de gonococos, GASP. Un screening publicado en el año 2001, muestra la evolución de la sensibilidad a antibióticos, de aislamientos de *N. gonorrhoeae* recolectados entre los años 1985 y 1999 [53]. De los 33316 aislamientos analizados, solo 1 presentó sensibilidad reducida a ciprofloxacina (MIC = 0,5 µg/ml) y fue aislado en el año 1996 [53, 54]. Trabajos posteriores comienzan a encontrar cepas resistentes a ciprofloxacina. En Argentina, es donde se cree que se presenta el primer caso de una cepa con alta resistencia a quinolonas de América Latina. Este caso ocurre en el 2000 en un paciente de 34 años del cual se obtiene un aislamiento que muestra una CIM a ciprofloxacina de 16 µg/ml [54]. En la provincia de

Santa Fe se reportan dos aislamientos con CIM de 2 µg/ml ese mismo año, que luego se demostró por medio de electroforesis de campos pulsantes (PFGE) que ambos pertenecían a un mismo clon [55]. Este mismo trabajo, informa de otro aislamiento en el año 2003 con una alta resistencia a ciprofloxacina (CIM = 16 µg/ml), que el estudio de PFGE muestra que no está relacionado con los dos casos antes descritos. Trabajos publicados en los últimos años han mostrado un fuerte incremento de las cepas QNGR llegando a niveles que superan el 50% [56].

La situación en Uruguay es concordante con lo ocurrido en países de la región y es otro de los países de América que presenta un laboratorio de referencia para *N. gonorrhoeae* perteneciente al GASP, donde se realiza un importante trabajo de vigilancia. Se reportan en el año 1997 dos cepas con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina pero es en la década siguiente que se empezaron a encontrar en mayor número cepas con resistencia a ciprofloxacina [57, 58].

1.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Como vimos, la elección de un antibiótico para el tratamiento de las infecciones bacterianas no es tarea sencilla. Es fundamental entonces conocer los numerosos mecanismos que han desarrollado las bacterias para sobrevivir a la acción de los antibióticos, entenderlos y estudiarlos detalladamente de manera de tomar las maneras más eficientes de tratamiento. Se ha observado que los gonococos han desarrollado en los últimos años resistencia a las quinolonas.

A la hora de tratar de entender el comportamiento de las diferentes cepas de *N. gonorrhoeae* respecto a los antibióticos es necesario conocer las diferentes maneras que tienen las bacterias de generar resistencia [2].

Una posibilidad es la *disminución en la entrada del antibiótico*. Muchas drogas utilizan sistemas de transporte trans-membrana presentes en la célula para ingresar y actuar en sus blancos intracelulares. Algunas bacterias por tanto, generan acciones sobre el sistema de transporte utilizado y de esta manera adquiere cierta resistencia sobre la droga. Este mecanismo es uno de los primeros que fueron observados en el caso de la penicilina por A. Flemming. De todas maneras este mecanismo de resistencia no tiene gran relevancia

dado que no se genera un bloqueo total en la admisión del antibiótico y además puede ser superado fácilmente con el aumento en la cantidad de droga administrada. De todas maneras, la aparición de estos mecanismos generó diversas líneas de investigación dado que se observaron muchos casos en los que ocurren junto a otros mecanismos de resistencia. Otra manera más significativa por la que las bacterias aumentan su resistencia es disminuyendo el contacto del sitio blanco con la droga, produciendo la expulsión de la misma. En este caso la droga ingresa a la célula y el desarrollo de alguna proteína sistemas de proteínas, permite el transporte de la droga hacia el exterior disminuyendo la concentración intracelular.

Otra posibilidad es la *inactivación del antibiótico*. Mediante este tipo de mecanismos, la droga entra a la célula donde es inactivada por modificaciones enzimáticas. Estas enzimas han sido blanco de diversas investigaciones dado su especificidad para actuar sobre determinados antibióticos y por la variedad de enzimas existentes que actúan sobre un mismo antibiótico. Un ejemplo son las enzimas que reaccionan con penicilina o cefalosporinas, llamadas penicilinasas y cefalosporinasas respectivamente [59]. Otras de estas enzimas modifican o inactivan otros antibióticos como la estreptomycin, la kanamicina, y otras drogas estructuralmente relacionadas, por la adición de un grupo químico que altera la actividad de la droga. El cloranfenicol también está sometido a este tipo de mecanismos de resistencia.

En algunas ocasiones la bacteria genera una *alteración del sitio blanco* de acción del antibiótico. En este caso se crean copias mutadas de las moléculas blanco sobre las que el antibiótico no actúa y de esta manera escapan a la acción de estos. Algunos ejemplos de este tipo de mecanismos es el caso de los β -lactámicos, donde se modifica las enzimas que asisten en la producción de peptidoglicanos celulares, no siendo capaces de sintetizar la pared celular en presencia del antibiótico. Para el caso de las quinolonas la modificación en muchas bacterias se da en los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican para las subunidades A y B de la ADN girasa, y los genes *parC* y *parE* que codifican para las subunidades de la topoisomerasa IV.

El eflujo activo es un mecanismo de resistencia ampliamente distribuido en las bacterias patógenas. En el caso de las bacterias Gram negativas las bombas

de eflujo predominantes pertenecen a la superfamilia RND, las cuales tienen un amplio espectro de sustratos que incluye antibióticos antisépticos, colorantes y detergentes. En particular en la bacteria patógena gram negativa *N. gonorrhoeae* la sobre-expresión de la bomba de eflujo MtrRCDE, perteneciente a la familia RND, ocasiona disminución de sensibilidad a varios antibióticos útiles en el tratamiento de la infección, y a la selección de otros mecanismos de resistencia [60, 61]. Esta sobre-expresión se genera por mutaciones en la región codificante de la proteína represora MtrR o sobre la zona del promotor del gen *mtrR*. Una mutación en cualquiera de los genes del operón suprime el fenotipo, produciendo cepas hipersensibles a los agentes hidrofóbicos [62, 63]. El conocimiento existente de la secuencia de los genes que codifican para la proteína reguladora y para los genes estructurales, las metodologías ya desarrolladas para estudiar la expresión del operón y para probar definitivamente la implicancia de las mutaciones en la sobre-expresión, aportan el conocimiento necesario para la obtención de un buen modelo para el estudio de potenciales inhibidores de bombas de eflujo de la superfamilia RND. El desarrollo de inhibidores de bombas de eflujo es una estrategia promisoría para restaurar la actividad de los antibióticos existentes por lo que varias de estas sustancias han sido estudiadas en los últimos años [64].

La resistencia de bacterias frente a un único antibiótico es extraña y raramente causa problemas clínicos. Hoy en día, con el uso de sucesivos medicamentos para combatir las bacterias causantes de infecciones, estas van adquiriendo mecanismos de resistencia para los sucesivos antibióticos administrados en la comunidad. Jacob Kupersztoch estudio la multi-resistencia que presentaba *Shigella* en Méjico [65]. Encontró que se podía evaluar la resistencia en función de la cronología de antibióticos administrados en la comunidad. Las resistencias más comunes encontradas correspondían a los primeros antibióticos que fueron utilizados contra esta bacteria y así sucesivamente. De esta manera podemos ver que con el correr del tiempo, se van creando microorganismos cada vez más resistentes a mayor número de drogas [2].

Las bacterias que presentan este patrón de resistencia son producto de una presión de selección del antibiótico que se fue desarrollando desde el comienzo del empleo de estas drogas. La multi-resistencia se encuentra generalmente en

bacterias que causan infecciones, pero también se observa este comportamiento en microorganismos de la flora normal que colonizan en tracto intestinal, la piel y las vías respiratorias superiores [66].

Cuando hablamos de resistencia bacteriana no podemos dejar de lado la existencia de los plásmidos [2]. El material genético formado por un único cromosoma no es suficiente por si solo en la vida y la supervivencia de estos microorganismos por lo que a través de la evolución, las bacterias han adquirido otro tipo de material genético separado del cromosoma, que se replica y transcribe independiente del ADN cromosómico, y que es conocido como plásmido. Diferentes plásmidos pueden estar presentes en una misma célula, y este tipo de ADN puede presentar numerosos genes, lo que le conferirá a la célula portadora la capacidad de desarrollar nuevas funciones y fabricar nuevos productos no presentes en el genoma original de la misma. Este lo confiere a las bacterias la capacidad de adquirir mecanismos de resistencia del ambiente. Una de las principales funciones que adquieren las bacterias de esta manera es la de resistir a la acción de los antibióticos.

1.7 RESISTENCIA DE GONOCOCOS A CIPROFLOXACINA

Se han encontrado y comprobado para la penicilina, diversos mecanismos de resistencia asociados como bombas de eflujo, ingreso afectado a nivel de porinas y modificaciones en las moléculas blanco [67]. La situación no es tan clara para el caso de la ciprofloxacina. Diversos estudios realizados hasta el momento han esbozado algunas características de las cepas QNGR que podrían explicar el mecanismo de resistencia que estas adquirieron. La ciprofloxacina actúa sobre las topoisomerasas por lo que la mayoría de estos trabajos se enfocan sobre mutaciones puntuales que puedan afectar estas proteínas. Muchos de estos estudios sobre cepas con resistencia a fluoroquinolonas muestran ciertos cambios característicos a nivel cromosómico. Se ha podido observar en numerosas ocasiones, las mutaciones puntuales sobre el gen *gyrA* que lleva a cambios aminoacídicos sobre la subunidad A de la ADN girasa y sobre el gen *parC* que cambiará aminoácidos en la topoisomerasa IV [68]. Específicamente se ha demostrado que las cepas con

sensibilidad disminuida a este tipo de antibióticos presentan una única mutación de *gyrA* y para el caso de cepas con resistencia se observa una doble mutación sobre este gen. Estos cambios involucran sustituciones de los residuos de Ser-91 y/o Asp-95 en *gyrA*, destacándose como el reemplazo más común la aparición de un residuo Phe en lugar de la Ser-91. También se observó que una única mutación en el gen *parC* está asociada a las cepas que presentan alta resistencia [69-76].

La doble mutación encontrada en *gyrA* puede ser considerada como marcadores de alta resistencia a fluoroquinolonas, pero el hecho de que estas sustituciones no se den no asegura una sensibilidad a este tipo de antibióticos. Se han encontrado también aislamientos que presentan alta resistencia a fluoroquinolonas pero que carecen de la mutación descrita para *parC* [71, 74]. Este hallazgo podría indicar que otros mecanismos complementarios a la mutación en *gyrA* pueden estar actuando a la hora de conferirle este tipo de resistencia significativa. En otras bacterias, la resistencia a fluoroquinolonas está asociada a mecanismos de eflujo, por lo que es una alternativa importante en la búsqueda de algún mecanismo complementario. En gonococos, la resistencia a agentes hidrofóbicos está mediada por el sistema de eflujo MtrRCDE [77]. Trabajos realizados en la cátedra han observado que los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* estudiados han presentado en los últimos años, más específicamente entre el 2000 y el 2007, un incremento en la expresión de la bomba de eflujo MtrCDE y que estos fenotipos están asociados a aumentos en los valores de CIM a ciprofloxacina [78, 79].

1.8 MÉTODO DE TIPIFICACIÓN

La epidemiología puede ser definida como el “el estudio de la distribución y de los determinantes de los estados o acontecimientos relacionados con la salud y su aplicación al control de estos problemas en las poblaciones” [80].

Para realizar con éxito este tipo de estudios es de gran importancia llevar a cabo métodos sencillos y efectivos de tipificación de los microorganismos causantes de las diferentes enfermedades infecciosas. Muchos brotes epidémicos surgen a partir de una única fuente. Estos microorganismos por

tanto son clonales, es decir progenie de una misma cepa, lo que los convierte en aislamientos genéticamente idénticos o muy similares.

Mediante la aplicación de los diferentes métodos de tipificación, se busca conocer los diferentes brotes, identificar correctamente los microorganismos causantes de las infecciones y por ende llevar a cabo, en caso de que sea posible, una inmunización de la población. Por todo esto, es imprescindible que los métodos a utilizar sean capaces de clasificar las diferentes cepas a estudiar, permitiendo agrupar los aislamientos epidemiológicamente relacionados y distinguir los que no estén relacionados.

Para evaluar los métodos de tipificación, es necesario tener en cuenta algunos conceptos importantes. Uno de ellos es la reproducibilidad. Este concepto se refiere a la capacidad de un método de identificar un mismo aislamiento en diferentes ocasiones, en diferente tiempo y diferente lugar. El otro concepto clave es el poder de discriminación, que se refiere a la probabilidad de que en el análisis de una determinada población, dos cepas no relacionadas sean caracterizadas como diferentes y clasificadas como pertenecientes a dos subtipos diferentes. En el trabajo publicado por Hunter y Gaston [81] se propone, para la evaluación de esta característica, la aplicación de un índice numérico, conocido como el índice de Simpson que viene dado por la siguiente ecuación:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=0}^{j=s} n_j (n_j - 1)$$

Donde D es el índice de discriminación, N el número total de cepas de una población a analizar, s el número de subtipos y n_j el número de cepas pertenecientes al subtipo j.

A lo largo de mucho tiempo las técnicas de tipificación, más usadas estuvieron centradas en el estudio de uno o más marcadores fenotípicos. La determinación de auxotipo y serotipo en *N. gonorrhoeae* es un ejemplo. El auxotipo está basado en la capacidad de ciertas cepas de crecer sin ciertos aminoácidos, purinas o pirimidinas, u otros nutrientes específicos y se ha utilizado comúnmente en estudios epidemiológicos. Esta técnica es complicada, requiere un intenso trabajo y consume mucho tiempo. La otra técnica que se mencionaba, del estudio del serotipo se realiza con un panel de

anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinados epítopes. En los casos más comunes en *Neisseria* los anticuerpos están dirigidos a epítopes ubicados en las proteínas de membrana PorB [13, 82]. Esta clase de tipificación requiere anticuerpos monoclonales bien caracterizados, y por tanto presenta algunas limitaciones como son la incapacidad de discriminar entre cepas de individuos no relacionadas epidemiológicamente, su reproducibilidad, el requerimiento de reactivos específicos, la especificidad de especies que presentan, entre otros detalles [15, 17, 83]. Generalmente la caracterización por auxotipo y serotipo se utiliza de manera combinada aumentando su capacidad de discriminación significativamente.

Buscando solucionar estos inconvenientes, se han estudiado diferentes variantes como por ejemplo la tipificación basada en los perfiles de resistencia a los antibióticos, pero en este caso la habilidad de los gonococos para transferir mecanismos de resistencia contra los diferentes antibióticos descartan a este tipo de técnicas como candidatas para la tipificación en estudios de epidemiología que se prolonguen en el tiempo.

En los últimos años, de la mano de los avances significativos en el área de la ciencia, son más los estudios que buscan trabajar con técnicas de tipificación molecular. Estas técnicas, revolucionaron la epidemiología, dado su alto poder discriminatorio, su alta reproducibilidad y su capacidad de tipificar todas las cepas. Se basan en el estudio de diferentes moléculas que se pueden clasificar en tres grupos:

- Lipopolisacáridos y ácidos grasos

- Proteínas

- Ácidos Nucleicos

En el grupo de Lipopolisacáridos y ácidos grasos, se destaca el análisis por SDS-Page, utilizados fundamentalmente para bacterias gram negativas. Son métodos simples pero de bajo poder discriminatorio.

En cuanto a los métodos de proteínas, se destaca el MLEE (Multi locus enzyme electrophoresis). Este método consiste en la determinación de movilidad electroforética de un set de enzimas constitutivas de las bacterias. Estos métodos son muy utilizados para el estudio epidemiológico de enfermedades infecciosas [84].

Por último están los métodos basados en el estudio de ácidos nucleicos. Se han investigado numerosos métodos de caracterización basados en el trabajo con el ADN bacteriano, donde se busca comparar genéticamente las diversas cepas de *N. gonorrhoeae*, ya sea mediante el análisis por RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), de todo el ADN o de genes individuales, o mediante la amplificación por PCR con la consecuente secuenciación de fragmentos polimórficos [15, 83-87]. Uno de los métodos moleculares genéticos más utilizados es la tipificación del gen *opa* de Rourke et al. [87]. Este método se basa en el análisis de patrones de bandas encontrados tras la digestión con enzimas de restricción del producto de amplificación de los 11 genes *opa*. Como otros tantos métodos genéticos basados en comparación de patrones de bandas, el principal inconveniente radica en la dificultad en la comparación de resultados de un laboratorio a otro, además de su dificultad en el análisis de numerosos aislamientos.

Diversas razones han llevado a que hoy en día, las técnicas que implican la secuenciación de determinados segmentos de ADN sean las más empleadas. Estos métodos presentan numerosas ventajas entre las que se pueden destacar el hecho de lograr ensayos que permitan obtener resultados que pueden ser compartidos y comparados de manera sencilla entre los diferentes laboratorios y a lo largo del tiempo. Esto permite generar por ejemplo grandes bases de datos de fácil acceso para los diferentes investigadores, lo que permite realizar un relevamiento mundial de las cepas, ampliando la transmisión de datos entre los laboratorios, y ofreciendo una herramienta sumamente útil en los estudios epidemiológicos.

El principal problema en este tipo de técnicas radica en encontrar un fragmento de ADN de un tamaño que sea beneficioso en cuanto al costo y la eficacia. Además el marcador genético que se elija debe ser lo suficientemente polimórfico para que se puedan distinguir cepas que no estén relacionadas epidemiológicamente [17]. Es por ello que los genes codificantes de proteínas expuestas a la superficie, son de gran interés, dado la selección producida por la respuesta inmune del huésped.

Uno de los fragmentos de ADN ampliamente elegidos es el locus *por*, de aproximadamente 1 kb, el cual, como mencionamos, codificara una de las

proteínas transmembrana, llamada proteína PI de *N. gonorrhoeae*, también conocida como PorB (secuenciación *por*). Este locus, que se encuentra en todas las cepas en la forma de alguno de los dos alelos con alta homología *porA* y *porB*, ofrece numerosas ventajas. Entre otras cosas, se espera que este gen muestre altos niveles de variación genética dado que codifica una proteína de membrana altamente polimórfica [15, 16]. Estas proteínas no sufren grandes variaciones durante una infección, como si ocurre en el caso de otros antígenos como los pili o lipooligosacáridos [88].

Los primeros trabajos que involucraron este gen, se encargaron de desarrollar métodos que involucran la secuenciación del gen completo. Esto, a pesar de demostrar un gran poder discriminatorio, no es del todo práctico, implica mucho trabajo y realmente no es necesario dado que se ha demostrado que puede utilizarse un fragmento interno de este gen que abarque los segmentos más variables del mismo, obteniendo resultados similares [17, 89].

Algunos trabajos han mostrado que cepas que fueron reconocidas como idénticas mediante la tipificación por el gen *opa*, tienen secuencias de *por* que se diferencian en la sustitución de al menos un par de bases y viceversa. Aunque podría decirse que la tipificación del gen *opa* puede ser considerado un método más efectivo, se demostró que la tipificación del gen *por* puede también ser usada como técnica de caracterización de *N. gonorrhoeae* [15, 17, 89].

1.8.1NG-MAST

Un trabajo publicado en 2004 [89], propone un nuevo método de tipificación de *N. gonorrhoeae*, basado en la secuenciación de dos locus altamente polimórficos. Uno de ellos es el gen *por*, codificante de las proteínas transmembrana PorB, el otro locus es el *tbpB*, gen que codifica para la subunidad β de la glicoproteína transportadora de hierro. El método de Martin et al. implica la amplificación y posterior secuenciación de dos segmentos internos de los genes *por* y *tbpB*.

Para ello se utilizan los siguientes primers:

Tabla 2. Primers a utilizar. Numeración basada en la secuencia *por* de la cepa MS11 (GenBank M21289) y *tbp* de la cepa UU1008 (GenBank 2286066) [89].

| | | |
|--|--------------------|--------------------|
| | Primer F (5' - 3') | Primer R (5' - 3') |
|--|--------------------|--------------------|

| | | |
|-------------|--|--|
| <i>por</i> | ³⁵⁰ CAA GAA GAC CTC GGC AA ³⁶⁶ | ¹⁰⁸⁶ CCG ACA ACC ACT TGG T ¹⁰⁷¹ |
| <i>tbpB</i> | ¹⁰⁹⁸ CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC ¹¹¹⁸ | ¹⁶⁸⁶ TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG ¹⁶⁶⁶ |

Los primers *por* están dirigidos a regiones conservadas de la secuencia, ubicadas en la zona previa al inicio del loop 2 y del loop 8 y sirven tanto para el alelo *porIA* como para el alelo *porIB*. El producto de amplificación obtenido es de aproximadamente 737 pb. Los primers *tbpB* también están dirigidos a regiones conservadas del gen y permite obtener un producto de aproximadamente 589 pb. A partir de la secuenciación de los productos obtenidos, se toman, en el caso del producto del gen *por*, un fragmento de 490 pb definido a partir de la posición 455, tomando como referencia la cepa MS11 (GenBank M21289). Para el producto obtenido del gen *tbp*, el fragmento a estudiar es de 390 pb comenzando en la posición 1118 en la secuencia de la cepa UU1008 (GenBank 2286066).

Para el análisis de los resultados, es necesario tener en cuenta la base de datos electrónica, de fácil acceso, www.ng-mast.net. Es allí donde se centralizan los datos obtenidos mediante este ensayo, en diferentes laboratorios. Al ingresar las secuencias obtenidas para *por* y *tbp*, el sistema nos brinda el número de alelo al que corresponden estas secuencias en la base de datos o en caso de ser una nueva secuencia, se le asignara un nuevo número. Luego, mediante la combinación de los números alélicos *por* y *tbpB*, se asigna un determinado ***sequence type*** (ST).

Al intentar profundizar el estudio de las cepas circulantes en una comunidad, se busca llevar adelante análisis que nos permitan relacionar más a fondo las características moleculares y los perfiles de resistencia a los diversos antibióticos de uso. En esta línea podemos encontrar el trabajo realizado recientemente por Chisholm et al. [90] que propone una nueva caracterización de las cepas en estudio donde se establece un nuevo grupo de clasificación, que se da a conocer como ***genogrupo***. Al analizar los diferentes STs obtenidos para las diferentes cepas analizadas por NG-MAST, se consideran pertenecientes a un mismo genogrupo a todas las cepas que compartan uno de los alelos del NG-MAST (alelo *por* o alelo *tbpB*) y el alelo restante presente por

lo menos un 99% de similitud. Este 99% de similitud implica que para el alelo *por* las diferentes cepas no difieran en más de 5 pares de bases y para el caso de alelo *tbpB* en más de 4 pares de bases. De esta manera, se clasifican en genogrupos y se nombran con la letra G seguido del número de ST que predomina en cada grupo.

2.OBJETIVOS

Como se menciona anteriormente, nuestro país presentó no solo un rápido aumento en el número de aislamientos de *N. gonorrhoeae*, sino también en los valores de CIM que presentan. Esto puede corresponder a la diseminación clonal de una o pocas cepas y de la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia.

Por ello en este trabajo se busca contribuir al conocimiento de la epidemiología de la resistencia a Ciprofloxacina en *Neisseria gonorrhoeae* y de los mecanismos bioquímicos que la determinan.

2.1OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Confirmar los niveles de resistencia a Ciprofloxacina de aislamientos locales
- Estudiar la distribución temporal de dichos aislamientos
- Caracterizar los aislamientos utilizando los patrones de resistencia a Penicilina, Tetraciclina, Ceftriaxona y Azitromicina y el fenotipo Mtr
- Desarrollar una técnica de amplificación por PCR para diferenciar aislamientos conteniendo los diferentes alelos del gen *por*
- Analizar la relación clonal de los aislamientos
- Determinar el rol de la porina PorB IB y del fenotipo Mtr en la resistencia a ciprofloxacina

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1CULTIVOS Y SELECCIÓN DE CEPAS

Como resultado del trabajo de estudio de mecanismos de resistencia y transmisión de genes de resistencia, trabajo de investigación principal del laboratorio de microbiología clínica de la Facultad de Química (UDELAR) desde hace más de una década, se dispone de una colección muy importante de aislamientos de *N. gonorrhoeae*, caracterizados según fenotipos de resistencia en el que se incluye el fenotipo MTR (cepas que gracias a la acción del sistema de eflujo mtrCDE expresan un alto nivel de resistencia a agentes hidrofóbicos). Para algunos de los aislamientos también se ha estudiado en profundidad la expresión y las mutaciones existentes en el operón MtrRCDE. La numerosa colección conservada en el laboratorio fue analizada de manera de tener un perfil de sensibilidad a antibióticos completo y por ende observar y controlar el avance de los diferentes mecanismos de resistencia presentes en la comunidad local. Estos aislamientos fueron proporcionados principalmente por centros de salud localizados en la ciudad de Montevideo y en menor medida por centros localizados en el interior del país.

Como se mencionó anteriormente, el Ministerio de Salud Pública en el Uruguay recomienda para infecciones por *N. gonorrhoeae* el uso de dosis únicas de 1 g de azitromicina, 250 mg de ceftriaxona o 500 mg de ciprofloxacina [32]. Dado que a nivel mundial pudo observarse un significativo aumento en la resistencia que presentan estas bacterias a fluoroquinolonas, se optó para este trabajo, por seleccionar, dentro de la colección de cepas existentes, aquellas que presenten resistencia o sensibilidad disminuida a ciprofloxacina. De las cepas existentes en el banco del laboratorio, la primera cepa con esta característica aparece en el año 2004 y aumenta considerablemente en el año 2007 con un importante número de este tipo de cepas. Todos los aislamientos están codificados con las letras NG seguidas de un número de 6 cifras en el que las primeras dos corresponden al año que fueron aislados, las siguientes dos cifras corresponde a una codificación de identificación del centro de salud donde fue recolectada la muestra y las últimas dos son números consecutivos según la entrada de las muestras al laboratorio. De aquí en más puede encontrarse en

este trabajo, los códigos de los aislamientos como números de cuatro cifras, sin las cifras de identificación del centro de salud, con el fin de simplificar la codificación.

Los aislamientos fueron subcultivados en medio Agar base GC (Oxoid) enriquecido con suplemento Kellog-Cistina al 1% (v/v). Las placas fueron incubadas 24 horas, en atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente se realizó coloración de gram, prueba de oxidasa, superoxol y test de carbohidratos para confirmación.

Las cepas fueron conservadas en caldo cerebro-corazón (BHI, Oxoid) con glicerol al 10% (v/v) y almacenadas a -80°C.

3.2 ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN

3.2.1 TINCIÓN GRAM [2]

La clasificación más común se da en cuanto a la posibilidad de las bacterias de teñirse por la técnica de Gram, métodos descubiertos por Hans Christian Gram a fines de la década de 1880. Este método distingue las bacterias en base a la estructura de componentes de la pared celular. Las bacterias gram-negativas, tienen una pared celular de tres capas. La más externa está compuesta por una membrana bilipídica asimétrica conteniendo glucolípidos y funciona como protección extra para la célula. La capa media mantiene la forma y rigidez, y está compuesta por peptidoglicano mientras que la capa interna es la membrana celular cuya función principal es la de mantener el material que la célula necesita y excretar el material tóxico. Las bacterias gram-positivas no tienen la membrana bilipídica externa y su contenido de peptidoglicano es mucho mayor que la de las bacterias Gram negativas. *N. gonorrhoeae*, es una bacteria Gram negativa.

3.2.2 PRUEBA OXIDASA [5, 9]

Prueba realizada con el reactivo de Kovacs, el cual es una solución 1% p/v de diclorhidrato-tetrametil-p-dihidroclorofenilendiamina. Se basa en detectar la presencia de citocromo c en la cadena respiratoria del microorganismo.

Al ser este reactivo, tóxico para la bacteria, generalmente no se aplica directamente sobre la placa sino que se toma un papel absorbente el cual es humedecido con el reactivo de Kovacs. Con un aplicador de madera se toman algunas colonias aisladas y se frota sobre el papel. Para considerar el resultado como positivo, se debe observar la aparición de un color púrpura rápidamente (aproximadamente 10 segundos de la aplicación). Se debe realizar sobre un cultivo fresco, es decir de entre 18 y 24 horas y tomar la precaución de no realizarlo con asa de nicromo las que pueden arrojar resultados falsos positivos.

3.2.3 PRUEBA SUPEROXOL [5]

Esta prueba se realiza con el reactivo de H_2O_2 al 30%. Se toma con un asa de crecimiento de un cultivo fresco de entre 18 y 24 horas y se transfiere a una placa donde se le agregará el reactivo. *N. gonorrhoeae* se caracteriza por una reacción muy fuerte (explosiva) en esta prueba apenas entra en contacto con el H_2O_2 .

3.2.4 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Se basa en la habilidad diferencial de las especies de *Neisseria* de metabolizar carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa y maltosa), produciendo ácido. Se puede realizar este ensayo en medios acondicionados para la detección del ácido producido, con indicadores de pH, o mediante kits comerciales. En nuestro trabajo utilizamos la técnica rápida que no requiere el crecimiento de la bacteria [91]. En cada hoyo (uno por cada azúcar a estudiar) de una placa de microtitulación, se colocó 100 μ L de una solución buffer de fosfatos con un indicador de pH, a la que se agregó 5 μ L de una suspensión del aislamiento en estudio con una turbidez 4 de la escala de Mac Farland, y 5 μ L de una solución del carbohidrato al 20%. Luego de 4 horas de incubación a 35°C, se leyó el resultado según se observó cambio de color del indicador a medio ácido (el aislamiento utiliza el carbohidrato) o no (no utilización del carbohidrato). En cada ensayo se utilizaron cepas de identidad conocida como control de calidad.

3.3EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

3.3.1ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Se prepararon minigeles de agarosa en buffer TBE 0,5 X (45 mM Tris-borato/1 mM EDTA). Según el tamaño de gel necesario se puede preparar 20 o 40 ml. Se fundió la agarosa hasta obtener una solución totalmente translúcida. Se agregó, después de fundida, 1 μ l de una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml cada 20 ml de agarosa. Se colocó el gel en un soporte adecuado, se colocó el peine con el número de pocillos necesario y se dejó solidificar. Se prepararon las muestras con buffer de carga 6 X conteniendo azul de bromofenol y glicerol. Se dejó migrar en buffer TBE 0,5 X, a aproximadamente 100 mV, por aproximadamente 20 minutos. Se detuvo la corrida y se visualizó bajo transiluminador de luz UV.

3.3.2EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó un protocolo modificado del descrito por Ausubel et al [92]. Para la extracción del ADN genómico de los aislamientos, las colonias aisladas de gonococos fueron utilizadas para la preparación de una suspensión celular (3 en escala Mac Farland) en 600 μ l de suero fisiológico y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos, descartándose el sobrenadante por inversión. Se resuspendió el pellet pipeteando en 200 μ l de buffer TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl /1 mM EDTA) a los que se le agregaron 20 μ l de lisozima 50 mg/ml. Se incubó a 37°C durante 15 minutos. Se agregaron 250 μ l de buffer TE pH 8.0, 25 μ l de SDS 10 % y 3 μ l de proteinasa K 20 mg/ml y luego de mezclar se incubaron 1 hora a 37°C. Inmediatamente después, se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos. Se agregó 285 μ l de NaCl 5 M frío y se agitó por inversión. Posteriormente se incubó en hielo durante 10 minutos, agitando por inversión por lo menos 5 veces durante la incubación. Al finalizar los 10 minutos de incubación, se centrifugó a 13.000 rpm 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo cónico de 1,5 ml, sin aspirar el precipitado que se desprende fácilmente. En los casos en que el sobrenadante estaba muy sucio se repitió la centrifugación. Una vez recuperado el sobrenadante, se agregó

igual volumen de isopropanol frío para precipitar el ADN y se volvió a agitar por inversión hasta que se observara la formación de una "medusa". Se continuó centrifugando a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado por inversión y se lavó el precipitado con 900 µl de etanol 70% frío. Se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Luego de retirar el sobrenadante y aspirar los restos de etanol cuidadosamente, se dejó secar destapado y protegidos en estufa a 37°C.

Para finalizar, se resuspendió el precipitado en 100 µl de H₂O miliQ y se incubó a 65°C por aproximadamente 20 minutos.

3.3.3. ANÁLISIS DE CALIDAD DEL ADN GENÓMICO.

De manera de comprobar que las muestras no se encuentren degradadas, se corren las soluciones de ADN obtenidas en un gel de agarosa 0,8%. Se tomaron 3 µl de cada una de las muestras de extracción y se les agregó 2 µl de buffer de carga 6 X. Se sembraron los 5 µl en el gel.

Una vez visualizadas las bandas correspondientes en el gel se analizó la eficiencia de la reacción de extracción midiendo la concentración de ADN mediante espectrofotometría. Para ello se diluyó la muestra, se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times F_{\text{dil}} \times \text{Coef}_{\text{ADN}}$$

donde:

A_{260} – Absorbancia medida a 260 nm

F_{dil} – Factor de dilución de la muestra a medir

Coef_{ADN} – Coeficiente de extinción para el ADN doble hebra que es $0.020 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$, por lo que una densidad óptica (OD) de 1.000 corresponde a una concentración de 50 µg/mL para el ADN doble hebra

Dado que estas muestras van a ser utilizadas para la reacción de PCR, el resultado debe permitir obtener cantidades suficientes que permitan utilizar entre 10 y 40 ng por reacción

Adicionalmente podemos evaluar la pureza de la muestra obtenida, y poder determinar la ausencia o presencia de proteínas contaminantes en la muestra de ácido nucleico. Dado que las proteínas pueden absorber a una longitud de onda de 280 nm debido a los residuos aromáticos presentes en aminoácidos como triptófano y tirosina, la medida a esta longitud de onda es indicador de proteínas contaminantes. Se calculó por tanto el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm:

$$\text{Pureza} = \text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280}$$

En caso de que la muestra no contenga cantidades significativas de proteínas contaminantes es esperable un resultado superior a 1,8.

3.3.4 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

La PCR es una técnica rápida de alta especificidad. Esta técnica utiliza la enzima ADN polimerasa que dirige la síntesis de ADN. Estas enzimas sintetizan la cadena complementaria de DNA en el sentido 5' > 3' usando como molde ADN monocatenario e incorporando nucleótidos en el extremo 3', a partir de una región de doble cadena. Los primers o cebadores, son oligonucleótidos monocatenarios sintéticos, que se unen a una región específica de la cadena simple de ADN generando estas regiones de doble cadena necesarias para que comience a trabajar la ADN polimerasa [93]. En los comienzos se utilizaba ADN polimerasa extraída de *E. coli*. Hoy en día, la enzima que generalmente se usa es la conocida como Taq polimerasa. Esta es extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* y tiene como principal ventaja, el ser termoestable, es decir que puede soportar periodos de incubación largo a altas temperaturas [94].

Por tanto, la técnica de PCR basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1. Desnaturalización
2. Hibridación de los primers
3. Extensión del primer por la ADN polimerasa

En un comienzo se atraviesa una primera etapa en la cual la muestra es sometida a altas temperaturas generando la desnaturalización del ADN y formando las cadenas simples. En un segundo paso los primers se unen a la zona específica complementaria, delimitando el área que se quiere amplificar. Por último, la ADN polimerasa comienza a sintetizar la doble cadena en dirección 5´ > 3´, a partir de los primers y con el uso de desoxinucleotidos (dNTP´s) presentes en la solución. Este proceso, formara al fin dos copias de ADN doble cadena del fragmento de ADN de interés. Una vez finalizado se comienza nuevamente con la etapa de desnaturalización lo que generara cuatro copias del fragmento de ADN de interés. La repetición consecutiva de estos ciclos generara numerosas copias de este ADN doble cadena [93].

Estos procesos son llevados a cabo en un termociclador (Perkin Elmer; GeneAmp PCR system 2400). Estos equipos permiten programar ciclos con tiempos y temperaturas definidas para que sean realizados uno a continuación de otro de manera automática y precisa.

Para realizar este ensayo se utilizó la técnica de Hot Start PCR de manera de evitar amplificaciones inespecíficas durante el comienzo de la reacción. En microtubos cónicos de 0,5 ml se prepararon las siguientes mezclas en hielo:

| <u>Mezcla 1</u> | | <u>Mezcla 2</u> | |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------|----------|
| H ₂ O | csp 19 µl | H ₂ O | csp 5 µl |
| Buffer 10X | 2 µl | Buffer 10X | 0,5 µl |
| MgCl ₂ 50 mM | 0,75 µl | dNTPs 40 mM | 0,5 µl |
| Primer Forward 50 µM | 0,2 µl | <i>Taq</i> ADNpolimerasa (5 U/µl) | 0,25 µl |
| Primer Reverse 50 µM | 0,2 µl | | |

La muestra de ADN se diluyó de manera de que la concentración final este entre los 10 ng/µl y 40 ng/µl. Se tomó esta dilución y se agregó 1 µl a la mezcla 1. En forma análoga se prepararon mezclas de amplificación control: a) sin ADN; b) sin oligonucleótidos; y c) control positivo. Esta mezcla se colocó en el termociclador y comienza el ciclo con el primer paso de incubación a altas temperaturas. Sobre el final de esta etapa se agregaron los 5 µl de la mezcla 2. Luego se continuó el ciclo tal como fuera programado en el equipo.

3.3.5 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

La detección del producto de PCR se realizó mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, observación por iluminación UV y documentación por fotografía. Se tomaron 3 µl de cada una de las reacciones de PCR y se les agregó 2 µl de buffer de carga. Se sembraron los 5 µl en un gel junto a los controles preparados de la misma manera y un marcador de peso molecular.

3.3.6 SECUENCIACION DE PRODUCTOS DE PCR

En algunos casos fue necesario llevar a cabo la secuenciación de los productos obtenidos. Esto se llevo a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo, donde se cuenta con un secuenciador automático de 4 capilares, ABI 3130 (Applied Biosystems), y es llevado a cabo mediante el método enzimático de Sanger. Alternativamente, también se enviaron algunas muestras a secuenciar a la empresa biotecnológica MacroGen que cuentan con secuenciadores ABI 3730xl (Applied Biosystems). Las muestras de ADN a secuenciar se prepararon según las indicaciones del laboratorio que realiza la secuenciación. Una vez obtenidos los resultados de secuenciación, estos fueron analizados con software específicos como los son el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y Clustal W del EBI (European Bioinformatics Institute), ambos de acceso libre on line.

3.4 ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Se llevo a cabo la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aislamientos seleccionados mediante el método de dilución en agar que establece el CLSI [95]. Los agentes antimicrobianos probados fueron Azitromicina (Laboratorio Urufarma), Eritromicina (Laboratorio Abbott), Penicilina (Laboratorio Sigma), Tetraciclina (Laboratorio Sigma), Espectinomina (Laboratorio Sigma), Ciprofloxacina (Laboratorio Urufarma), Ceftriaxona (Laboratorio Libra) y Tritón X-100 (Laboratorio Sigma). El método

se realizó por duplicado utilizando diluciones de los antibióticos en agar base GC (Oxoid) enriquecido con suplemento Kellog al 1% (v/v).

Se utilizaron como controles las cepas de referencia provistas por el Laboratory Centre for Disease Control of Canada (WHO III, WHO V, WHO VII y ATCC 49226). Los valores de CIM esperados para estas cepas que confirmaran la valides del ensayo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Rango de CIM ($\mu\text{g/mL}$) esperados para las cepas control incluidas en el ensayo de sensibilidad a agentes antimicrobianos.

| Agente Antimicrobiano | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|-----------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | WHO III | WHO V | WHO VII | ATCC 49226 |
| Penicilina | 0,032-0,063 | 0,25-0,5 | 0,008-0,016 | 0,25-1,0 |
| Tetraciclina | 0,125-0,25 | 0,5-1,0 | 0,25-0,5 | 0,25-1,0 |
| Espectinomicina | 16-32 | 16-32 | 16-32 | 16-32 |
| Ceftriaxona | 0,002-0,004 | 0,008-0,016 | <0,25 | 0,004-0,016 |
| Ciprofloxacina | 0,002-0,008 | 0,002-0,008 | 0,002-0,008 | 0,001-0,008 |
| Azitromicina | 0,032-0,063 | 0,125-0,25 | 0,125-0,25 | 0,25-0,5 |
| Eritromicina | 0,063-0,125 | 0,5-1,0 | 0,5-1,0 | --- |

La preparación del inculo se realizó por el método de suspensión directa de colonias [95]. Es decir que se preparó el inculo a partir de colonias obtenidas de cultivos de 18 a 24 horas en agar base GC enriquecido con suplemento Kellog-Cistina al 1 % (v/v). Se realizaron suspensiones en tubos de 0,5 mL de caldo Müller-Hinton y ajustando la suspensión hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0,5 de la escala MacFarland que corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL. Luego se realizó una dilución 1:10 en caldo estéril para alcanzar una concentración de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL, que va a ser usada para sembrar en el ensayo.

3.4.1PROCEDIMIENTO

Los diferentes antibióticos a analizar fueron incorporados a las placas de medio. Se prepararon diluciones sucesivas como indica la CLSI [95] generando

placas con diferentes concentraciones de antibiótico. Se prepararon también placas control la cuales no contienen agentes antimicrobianos.

Tabla 4. Diagrama de las diluciones a incluir en el ensayo para el análisis de sensibilidad de cada antibiótico. (*) Para el caso del Triton TX-100 las diluciones de antibióticos a ensayar son en mg/mL

| DILUCIONES DE ANTIBIOTICOS (µg/mL) | RANGO DE CONCENTRACIONES A ENSAYAR DE CADA ANTIBIOTICO | | | | | | |
|------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|
| 0,000125 | | | | | | | |
| 0,00025 | | | | | | | |
| 0,0005 | | | | | | | |
| 0,001 | | | | | | | |
| 0,002 | | | | | | | |
| 0,004 | | | | | | | |
| 0,008 | | | | | | | |
| 0,016 | | | | | | | |
| 0,032 | | | | | | | |
| 0,063 | | | | | | | |
| 0,125 | | | | | | | |
| 0,25 | | | | | | | |
| 0,5 | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | |
| 32 | | | | | | | |
| 64 | | | | | | | |
| 128 | | | | | | | |
| 256 | | | | | | | |

Luego mediante un replicador de Steer, se inocularon las placas con las suspensiones preparadas anteriormente y diluidas aproximadamente a 1×10^7 UFC/mL. Adicionalmente se inocularon las cepas control de sensibilidad conocida. Una vez finalizado este procedimiento, se dejaron secar las placas y se invirtieron, incubándolas durante 20 a 24 horas bajo atmosfera de 5% de CO_2 a $35^\circ C$. Para finalizar se determinó la CIM como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento. La presencia de una sola colonia o "faint haze" no fue considerado crecimiento. El

ensayo se consideró válido si las cepas control presentaban valores de CIM en el rango preestablecido en la tabla 3.

Se determinaron las cepas como Sensible, Intermedia o Resistente como se muestra en Tabla 5. También se utilizó este ensayo para definir si los aislamientos presentan fenotipo Mtr. Para ellos se utilizó el criterio definido por Morse et al. [96], en el que se define cepas portadoras del fenotipo Mtr a aquellas que presentan CIM a eritromicina $\geq 2\mu\text{g/ml}$ y a Tritón TX-100 $\geq 2000\mu\text{g/ml}$.

Tabla 5. Clasificación de cepas según CIM. Para penicilina, tetraciclina, espectinomicina, ceftriaxona y ciprofloxacina se define criterio según CLSI [28]

| Agente Antimicrobiano | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | |
|-----------------------|--------------------------|----------|-------------|
| | S | I | R |
| Penicilina | $\leq 0,06$ | 0,12-1 | ≥ 2 |
| Tetraciclina | $\leq 0,25$ | 0,5-1 | ≥ 2 |
| Espectinomicina | ≤ 32 | 64 | ≥ 128 |
| Ceftriaxona | $\leq 0,25$ | - | - |
| Ciprofloxacina | $\leq 0,06$ | 0,12-0,5 | ≥ 1 |
| Azitromicina | $\leq 0,25$ | 0,5-1 | ≥ 2 |
| Eritromicina | - | - | ≥ 2 |
| Tritón X-100 | - | - | ≥ 2000 |

3.5 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN

3.5.1 DISEÑO DE PRIMERS

A la hora de evaluar un posible método de tipificación, hay que tener en cuenta que este debe ser altamente efectivo además de ser sencillo y no demasiado costoso. A su vez es conveniente que pueda ser fácilmente aplicable para un gran número de muestras que puedan incluso haber sido tomadas en diferentes tiempos. Como ya mencionamos anteriormente, la permeabilidad de la bacteria a las sustancias hidrofílicas contribuye al fenotipo de sensibilidad y viene determinada por el tipo de porina principal. Es por ello que es importante el desarrollo de un método simple de tipificación, de bajo costo, que no requiera reactivos de difícil obtención, aplicable a todas las cepas y que permita la distinción de los diferentes tipos de porina.

En este trabajo se buscó desarrollar una nueva técnica para la tipificación de cepas de *N. gonorrhoeae*, basada en establecer posibles mutaciones mediante la amplificación de una región específica del gen *por* que codifica para las porinas de membrana PorB IA y PorB IB. Para el desarrollo de este método de tipificación, se realizó un estudio exhaustivo de las secuencias conocidas de los alelos *porA* y *porB*, y de los trabajos publicados del tema, de manera de ubicar las regiones más variables. Numerosos trabajos realizados previamente han demostrado que las mayores variaciones aminoacídicas de la proteína entre las diferentes cepas de *N. gonorrhoeae* están localizadas fundamentalmente a nivel de los ocho loops expuestos a la superficie externa de la membrana [12, 15]. Teniendo en cuenta esto, Viscidi et al. proponen en uno de sus trabajos que no es necesario llevar a cabo la secuenciación del gen *por* completa (aproximadamente 1 kb) y que se podrían obtener los mismos resultados con el estudio de un fragmento específico de 220 pb, que abarque fundamentalmente las regiones variables de los loops 3, 4 y 5 donde se observaría el mayor grado de polimorfismo de la proteína [12, 17]. La aplicación de la técnica sobre este fragmento, en lugar de sobre el gen completo, lleva a una importante reducción en el número de nucleótidos a ser secuenciados lo que permite llevar a cabo la secuenciación de manera más sencilla y con menor error, además de reducir los costos. Por otro lado, Unemo et al., realizan la amplificación y posterior secuenciación de las regiones correspondientes a cada uno de los loops de manera aislada por lo que diseñan diferentes primers que les permita llevar a cabo las correspondientes PCRs. A su vez diseñan los primers de manera específica para cada uno de los alelos del gen *por* (*porA* y *porB*) [97].

En este trabajo, buscamos diseñar los primers de manera de que sea posible la aplicación de la técnica de PCR indiscriminadamente en ambos alelos del gen *por*, evitando de esta manera el ensayo previo de detección de los subtipos *porA* y *porB*. También se buscó reducir al máximo el segmento de interés de manera de reducir costos en caso de necesitar posteriores secuenciaciones y aumentar la eficiencia de la reacción de PCR. Por tanto, analizando diferentes secuencias extraídas de GenBank, se optó por trabajar con primers que estén comprendidas en determinadas zonas del gen, dentro de las regiones

conservadas, donde pueden hallarse segmentos con secuencias nucleotídicas idénticas o muy similares para ambos alelos, previo al comienzo del loop 2 y posteriores a la finalización del loop 6 como se muestra en la Figura 1. Adicionalmente, teniendo en cuenta la diferencia de tamaño que presentan ambos subtipos de porina, y sabiendo que muchas deleciones importantes que generan estas diferencias se encuentran dentro del fragmento que se propone amplificar, se buscaron primers cuyo producto de amplificación de uno u otro alelo de porinas, cuente con tal diferencia de tamaño que permita ser evidenciado en un análisis posterior electroforético. De esta manera se contaría con una metodología rápida y sencilla de detectar que alelo de porina presenta, sin necesidad de recurrir a técnicas como la secuenciación.

Tomando como referencia la secuencia del gen *por* completo extraída de GenBank correspondiente al trabajo realizado por Gotschlich et al. (Figura 1) [11], que consta de 1391 pb, se diseñaron, con el programa Vector NTI, los primers a usar en este ensayo. Se utilizan las condiciones de PCR definidas en este trabajo (ver 4.3) y al realizar el ensayo, estos oligos dan como resultado la amplificación de un fragmento de ADN de un tamaño de 580 pb que abarca desde aproximadamente 20 pb previos al comienzo del loop 2 y finaliza aproximadamente 18 pb posterior a la finalización del loop 6.

```

1 taaatgcaaa gctaagcggc ttggaaagcc cggcctgctt aaatttctta accaaaaaag
61 gaatacagca atgaaaaaat ccctgattgc cctgactttg gcagccctt ctgttgoggc
121 aatggccgat gtcaccctgt acggtgccat caaagcggc gtacaaactt acogttctgt
181 agaacataca gacggcaagg taagtaagt ggaacccggc agcgaatcg ccgacttcgg
241 ttcaaaaatc ggcttcaaag gccaaaga cctoggcaac ggctgaagg ccgttggca
301 gttggacaa ggtgcctccg togccggcac taacacggc tggggaaca aacaatcctt
361 cgtcggcttg aagggcggct toggtaccat ccgocgggt agcctgaaca gcccctgaa
421 aaacaccggc gccaacgtca atgcttggga atccggcaaa ttacoggca atgtgctgga
481 aatcagcggc atggcccaac gggaacaccg ctacctgtcc gtacgtacg attctccga
541 atttgccggc ttcagcggca gogtacaata cgcacctaaa gacaattcag gctcaaaccg
601 cgaatcttac cacgttggct tgaactacca aaacagcggc ttcttcgcac aatacgcgg
661 cttgttccaa agatacggcg aaggcactaa aaaaatcgaa tacgatgatc aaacttatag
721 taatcccagt ctgtttgtg aaaaactgca agttcacctg ttggtaggcg gttacgacaa
781 taatgccctg tacgtttccg tagccgcaca acaacaagat gccaaattgt atgggcaat
841 gagcggtaat tgcacaact ctcaaacoga agttgcggct acccggcat acogtttcgg
901 caatgtaacg ccccgcttt cttacgcca cggcttcaaa ggactgttg atagtgcaa
961 ccacgacaat acttatgacc aagtgttgt cggcgggaa tacgacttct ccaaacgcac
1021 ttctgccttg gtttctgccc gctggttgca aggaggcaaa ggccagaca aaatcgtatc
1081 gactgccagc gccgtcgttc tgcgccaaa attctaactc gcaaagattg gtatcaaaa
1141 aaagcctgtc gtcagacagg ctttttctg tttctgttt tctgtttct gtttctgtt
1201 ttctgttttc tgtttctgt tttctgttt ctgtttctg tttctgttt tctgtttct
1261 gtttctgtt ttctgtttc tgtttctgt tttctgttt ctgtttctg tttctgttt
1321 tctgtttct gtttctgtt ttctgtttc tgtttctgt tttctgttt ctgtttctg
1381 ttttctgtt t

```

Figura 2. Secuencia completa del gen *por* extraída de GenBank (J03017) correspondiente al trabajo de Gotschlich et al [11]. Aparece resaltado en amarillo las regiones donde se hibridaran los primers los nucleótidos entre ellos son la secuencia que será amplificada.

| | |
|---|---|
| <u>5' - TTTGGCAGTTGGAACAA - 3'</u> Tamaño: 17 pb Posición: desde <u>294</u> ha sta <u>310</u> % GC: 41% | <u>5' - AACTTCGGTTTGAGAGT - 3'</u> Tamaño: 17 pb Posición: desde <u>858</u> ha sta <u>874</u> % GC: 41% |
|---|---|

Figura 3. Primers diseñados con sus correspondientes características.

3.5.2 TIPIFICACIÓN POR NG-MAST

Se comprobó el éxito de la tipificación mediante el uso de los primers diseñados que se describieron anteriormente, obteniendo un fragmento pequeño que nos permite identificar el alelo del gen *por* presente en cada aislamiento, simplemente con la corrida en un gel de agarosa. De todas maneras es necesario verificar la efectividad de este método y se intenta seguir adelante con la caracterización de la colección de cepas existentes en el laboratorio. En busca desafiar este método antes descrito y profundizar en la tipificación y caracterización de las cepas en estudio se realizó la técnica de NG-MAST descrita por Martin et al. [89]. Este trabajo es hoy en día de suma importancia describiendo un método de tipificación reconocido a nivel mundial y

de amplio uso. La aplicación de este método de tipificación es de suma importancia dada la posibilidad de ingresar y utilizar los datos a la base de datos que existe vía internet y de esta manera generar una base de datos de tipificación de este tipo de bacterias a nivel mundial. Este método implica la amplificación de un fragmento del gen *por* de un poco más de 100 pb mayor al obtenido con el método desarrollado en el laboratorio y la amplificación adicional de un fragmento del gen *tbpB*. Estos productos fueron secuenciados y posteriormente ingresados en la base de datos de la página de internet www.ng-mast.net, donde a cada alelo se le fue asignado un determinado número. La combinación de los alelos de *por* y *tbpB* obtenidos generó en esta base de datos un determinado número que caracteriza las cepas conocido como Sequence Type (ST).

Luego de obtener estos resultados para la colección de cepas del laboratorio se decidió aplicar los criterios descritos por Chisholm et al. [90] para la clasificación adicional de cepas asignándole un código de genogrupo al que pertenecen.

3.6 PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

En esta búsqueda por caracterizar detalladamente la colección de aislamientos del laboratorio, se agrega el análisis con esta técnica fundamental para la comparación de cepas, determinando una “huella digital genética” de cada aislamiento. Una de las limitaciones que tiene como método de tipificación radica en la dificultad en la comparación de resultados interlaboratorio. De todas maneras es un método de alta eficiencia en la discriminación de aislamientos y es ampliamente usado en estudios epidemiológicos. Debido a esto se incorporó el equipo para realizar esta técnica en el laboratorio y es de gran importancia comenzar a utilizar esta nueva técnica para las diferentes líneas de investigación que se desarrollan.

Se comienza esta técnica, con la preparación de los bloques. Para ello se cultivaron las cepas de *N. gonorrhoeae*, en agar GC adicionado de 1% de

suplemento Kellogg, a 36°C en atmósfera conteniendo 5% de CO₂, durante 18 a 24 horas.

Se resuspendió suficiente cantidad de cultivo en 1 mL de TE, hasta obtener una suspensión ligeramente turbia y homogénea, la cual se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos, para sedimentar células. Se disolvió en caliente 1 % de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) en TBE 0.5x. Luego se enfrió la solución de agarosa a 50°C y se mantuvo esta temperatura en un baño de temperatura constante. Luego de retirar el sobrenadante de la centrifugación de la suspensión de células antes obtenidas, con una pipeta pasteur se resuspendió el sedimento en 1 mL de ABPF y es homogeneizado en vortex. Se llenaron los bloques con la suspensión de células en agarosa, utilizando una pipeta pasteur y se dejó en reposo durante 10-15 min para que solidifique

Después se lleva a cabo el tratamiento de los bloques. Para ello, en una placa de petri pequeña, una para cada cepa, se agregó 5 mL TE buffer, 100 µL de SDS al 20% y 100 µL Proteinasa K. Cuidadosamente fueron retirados los bloques de los moldes y colocados en las placas de petri correspondientes las cuales fueron selladas con parafilm e incubadas a 50°C por un mínimo de 48 hs. Luego de lavar tres veces los bloques con 10 mL de TE, por agitación durante 30 min se puso el bloque en una placa de petri conteniendo 15 mL de TE, se selló con parafilm y fue guardado a 4°C.

Por último se realizó el tratamiento con enzima de restricción. En un eppendorf de 1.5 mL se agregó 150 µL de dH₂O, 22 µL buffer de reacción y un trozo de bloque de 2 a 3 mm (el tamaño a agregar depende de la concentración del bloque). Se colocaron 3 mL de la enzima de restricción XbaI y se agitó. Luego se incubó a 37°C toda la noche.

Una vez finalizado el procesamiento de las muestras, se colocaron los moldes y vertió el gel 1% agarosa permitiendo que solidifique por lo menos 30 min.

Luego se fundió ABPF al 1% y se puso a enfriar a 50°C. Se preparan 2L de TBE 0,5X que se agregan a la cámara y se prendió la bomba de agua y la refrigeración. Cuidadosamente se colocaron los bloques tratados con la enzima de restricción en los huecos y se taparon con ABPF al 1% fundida. Luego de que la agarosa solidificó, se colocó el gel en la cámara de electroforesis.

Las condiciones de corrida son las siguientes:

Tiempo inicial: 1 segundos

Tiempo final: 15 segundos

Tiempo de corrida: 18 horas

Voltaje:175 V

Para finalizar, el gel fue teñido con bromuro de etidio por al menos 1 minuto, se decoloró durante al menos 1 hora y se fotografió con iluminación UV.

Una vez terminado el ensayo, es importante realizar una correcta interpretación de los resultados. Para el análisis de resultado, se sigue la guía realizada por Tenover et al. [98]. En este trabajo, se proponen determinados criterios para reconocer aislamientos como parte de un mismo brote o de lo contrario, como aislamientos no relacionados. Estos criterios pueden aplicarse para pequeños grupos de aislamientos (generalmente de menos de 30 casos) y recolectados en cortos periodos de tiempo. Además, para considerar confiable esta metodología de interpretación, los patrones obtenidos deben presentar por lo menos 10 fragmentos diferentes. Luego de reconocer un patrón común del brote, el resto de los perfiles obtenidos para cada aislamiento, son comparados contra este patrón. Cuando no existen diferencias entre los perfiles respecto al patrón, se puede decir que estos aislamientos son indistinguibles y por tanto están relacionados genética y epidemiológicamente. Cuando se observan diferencia, el análisis debe ser más profundo de manera de diferenciar las variaciones debidas a eventos genéticos puntuales, de los aislamientos no relacionados genéticamente. Los eventos puntuales que pueden ocurrir son mutaciones que agreguen o eliminen un sitio de restricción (lo que ocasionaría diferencias de 3 fragmentos) o inserciones y deleciones (que mostrarían diferencia en 2 fragmentos). Es por ello que si la diferencia de un aislamiento contra el patrón es de 2 o 3 fragmentos, este se considerara estrechamente relacionado ya que esta diferencia viene dada por un solo evento genético puntual. Si ocurriesen dos eventos genéticos, las diferencias de fragmentos serian de entre 4 y 6. En este caso los aislamientos estarían posiblemente relacionados y estos casos, generalmente ocurren en aislamientos colectados en largos periodos de tiempo o en gran número de pacientes. Por último, si las

diferencias encontradas son de 7 o más fragmentos, se puede decir que estos aislamientos, no están relacionados ni epidemiológicamente ni genéticamente. En este trabajo por tanto se decidió seguir los lineamientos descritos para el análisis de resultados, teniendo en cuenta que la situación de la colección estudiada no cumple con todos los criterios establecidos en el trabajo de Tenover et al. A la hora de reportar los resultados de esta técnica se utilizara un criterio mínimamente modificado del trabajo mencionado anteriormente redactado por Tenover et al. Se le asignará el tipo A₁ a un grupo y los aislamientos indistinguibles o estrechamente relacionados a este. Cuando estén posiblemente relacionados, se asignaran subtipos de este grupo y se nombran como A₂, A₃, etc. Por último, cuando no están relacionados, se nombraran con otro tipo, es decir tipo B, tipo C, etc.

3.7 TRANSFORMACIÓN

Buscando ampliar los conocimientos de los niveles de incidencia del sistema MtrCDE y la PorB en la resistencia a antibióticos, se propone llevar a cabo un ensayo de transformación. El objetivo será incorporar un segmento amplificado del alelo *porB* por la técnica de NG-MAST antes mencionada, a la cepa de referencia NGFA19, la cual es portadora del alelo *porA*. De esta manera se busca observar si la porción más variables del gen codificante de porinas son suficientes para generar un cambio en el perfil de resistencia de los gonococos a la ciprofloxacina. Para ello se elige el aislamiento NG0708, portador del alelo *porB* y con alta resistencia a la ciprofloxacina. A este aislamiento se le realizó con éxito la extracción de ADN y posterior amplificación de un segmento del gen *por*, mediante la técnica de NG-MAST. Dado las características de este aislamiento y debido a que, tanto la comprobación de la amplificación mediante corrida en gel de agarosa como la secuenciación realizada presento resultados claros y definidos, es que se decidió llevar a cabo este ensayo de transformación tomando a la NG0708 como aislamiento dador.

Tabla 6. Cuadro comparativo de sensibilidad a antibióticos de los aislamientos dador y receptor a utilizar en el ensayo de transformación.

| | CIM (µg/mL) | | | | | |
|--------|-------------|------|-----|-------|----|--------|
| | P | T | Er | CIP | E | TX-100 |
| NGFA19 | 0,016 | 0,25 | 0,5 | 0,008 | 32 | 32 |
| NG0708 | 1 | 1 | 1 | 8 | 16 | 0,5 |

Se presume que el efecto que puede tener el tipo de porina que presentan las diferentes cepas de *N. gonorrhoeae* puede actuar conjuntamente con el sistema de eflujo MtrCDE ya mencionado anteriormente. Es por ello que mediante una transformación adicional se propone estudiar este efecto. Es por eso que se intentó realizar el mismo ensayo sobre una cepa transformada, obtenida en una investigación previa en el laboratorio [79], la cual ya presenta el alelo *porA* y una sobreexpresión del sistema MtrCDE. De esta manera se busca estudiar en primer lugar el efecto de la adquisición de una porina PorB IB, y en segundo lugar, observar si este efecto presenta un mismo patrón de cambio al incorporarse en un aislamiento con sobreexpresión del sistema MtrCDE.

Las transformantes se seleccionan en Penicilin 0.032 ug/mL de acuerdo a lo descrito por Acevedo [78], de donde también se extrae la metodología que se aplica de la siguiente manera:

Se descongeló y se realizaron subcultivos de la cepa de interés. Se tomaron 50 µL medio de transformación (10 mL de caldo GC con 20 µL de cloruro de magnesio 1M) y se realizó en él una suspensión de 10 colonias piliadas. Solo la cepas piliadas (P+) de gonococos son plausibles de transformación. Las P- no pueden incorporan ADN a la célula [99]. Esto hace suponer que los pili están directamente relacionados en el reconocimiento o entrada de ADN transformante [9]. Se incubó a 37°C por 45 minutos. Se tomó una placa GC suplementada con Kellog-Cistina y se colocaron en cuatro lugares, tomas de 10 µL de la suspensión preparada. Se le realizan a cada una de estas tomas, los siguientes agregados:

Buffer TE (control negativo)

2 µL de ADN de la cepa dadora

10 µL de ADN de la cepa dadora

15 µL de ADN de la cepa dadora

Se incubó la placa a 37°C por 4 horas. Con un ansa se seccionó la porción de agar que contenía las cuatro mezclas antes descritas y se transfirieron a microtubos cónicos con 500 µL de medio de transformación. Luego con tomas de 150 µL de cada preparación se realizaron plaques en placas de GC suplementada con Kellog-Cistina con antibiótico elegido para la selección (0,032 µg/mL de penicilina). Como control positivo que compruebe la viabilidad celular, se realizó una placa con la suspensión original. Todas las placas se incubaron en atmosfera de CO2 5% entre 48 y 72 horas cuando se buscaron cepas transformadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PERFIL DE COLECCIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS

Tabla 7. Datos de sensibilidad a agentes antimicrobianos de las cepas con resistencia a ciprofloxacina entre los años 2004 y 2010. Se muestran los resultados para Penicilina (P), Tetraciclina (T), Espectinomocina (E), Ceftriaxona (Cro), Ciprofloxacina (Cip), Azitromicina (Az), Eritromicina (E) y Tritón TX-100 (TX-100). Se muestra también el perfil betalactamasa (β - lac). SD corresponde a sin dato. Los puntos de corte para cada antibiótico pueden observarse en Tabla 5.

| Aislamiento | C.I.M. µg/ml | | | | | | | | β - lac |
|-------------|--------------|----|----|-------|-----|------|-----|--------|---------------|
| | P | T | E | Cro | Cip | Az | Er | TX-100 | |
| NG0421 | 1 | 1 | 16 | 0,032 | 1 | 0.5 | 2 | 16000 | - |
| NG0520 | 1 | 2 | 16 | 0,032 | 1 | 1 | 2 | >16000 | - |
| NG0521 | 1 | 1 | 16 | 0,008 | 1 | 0.25 | 2 | >16000 | - |
| NG0522 | 1 | 16 | 16 | 0,016 | 2 | 0.5 | 2 | >16000 | - |
| NG0606 | 2 | 2 | 16 | 0,032 | 16 | 1 | 2 | >16000 | - |
| NG0703 | 1 | 1 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - |
| NG0704 | 2 | 2 | <8 | 0,032 | 16 | 0.25 | 0.5 | 8.000 | - |
| NG0707 | 1 | 2 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - |
| NG0708 | 1 | 1 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - |
| NG0711 | 2 | 2 | <8 | 0,032 | 32 | 0.25 | 0.5 | >16000 | - |
| NG0712 | 1 | 1 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - |
| NG0714 | 16 | 2 | <8 | 0,016 | 32 | 1 | 8 | >16000 | - |
| NG0715 | 0.5 | 2 | <8 | 0,016 | 16 | 0.25 | 0.5 | >16000 | - |
| NG0716 | 0.5 | 1 | 16 | 0,016 | 16 | 0.25 | 1 | 16.000 | - |
| NG0717 | 2 | 4 | SD | 0,016 | 16 | 0.25 | 0.5 | >16000 | - |
| NG0718 | 2 | 1 | 16 | 0,032 | 32 | 0.25 | 1 | >16000 | - |

| | | | | | | | | | |
|--------|-------|----|----|-------|----|-------|----|--------|---|
| NG0726 | 8 | 4 | SD | 0,016 | 32 | 0,25 | 2 | >16000 | - |
| NG0808 | 2 | 8 | SD | 0,063 | 16 | 0,5 | 2 | >16000 | - |
| NG0820 | 1 | 2 | SD | 0,004 | 16 | 0,125 | 1 | 16.000 | - |
| NG0906 | 1 | 2 | SD | 0,008 | 16 | 0,5 | 4 | >16000 | - |
| NG0925 | 2 | 8 | SD | 0,125 | 16 | 0,5 | 2 | 8.000 | - |
| NG0929 | SD | SD | SD | 0,008 | 16 | 0,5 | SD | SD | - |
| NG0931 | 0,125 | 16 | SD | 0,016 | 2 | 2 | SD | SD | - |
| NG0946 | 4 | 4 | SD | 0,008 | 16 | 0,125 | 1 | 8000 | - |
| NG0952 | 2 | 8 | SD | 0,016 | 32 | 1 | 2 | >16000 | - |
| NG1014 | 2 | 2 | SD | 0,016 | 16 | 0,5 | 2 | 4000 | - |
| NG1022 | 1 | 1 | SD | 0,008 | 16 | 0,5 | 2 | 8000 | - |
| NG1032 | 1 | 2 | SD | 0,032 | 32 | 0,5 | 2 | 4000; | - |

Como se explicó previamente, se buscó caracterizar determinados aislamientos de la colección con la que se cuenta en el laboratorio, aislados entre los años 1997 al 2013. Luego de someter a todos los aislamientos conservados en el laboratorio a los ensayos de sensibilidad, se seleccionaron los que presentaban resistencia o sensibilidad disminuida a ciprofloxacina para seguir con el trabajo estudiándolos a fondo (ver Tabla 7) y se busca entonces realizar un relevamiento de la situación de la resistencia a ciprofloxacina en estos años. En el gráfico 1, puede observarse la evolución de los aislamientos analizados desde el año 1997.

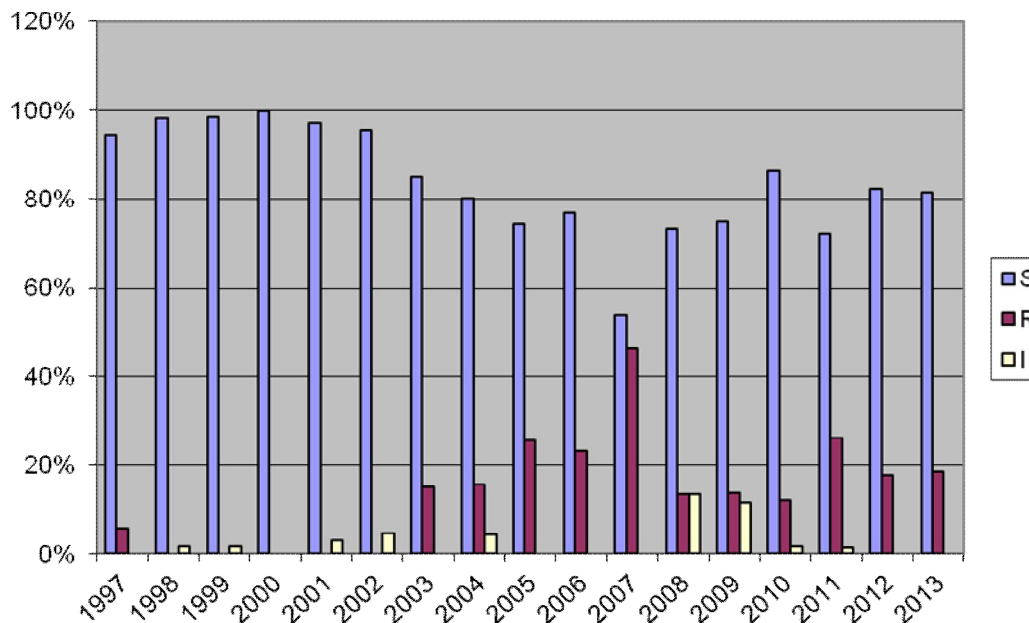


Gráfico 1 - Resultados de los análisis de sensibilidad a ciprofloxacina de los aislamientos recibidos en el laboratorio desde el año 1997 al 2013 expresados en porcentaje respecto al total de aislamientos analizados por año

Como puede observarse en el gráfico, pese a que aparece un evento puntual de cepas resistentes a ciprofloxacina en el año 1997, esta situación no vuelve a observarse hasta la década siguiente. Al analizar detenidamente estos casos, se observa que los mismos fueron aislados en un centro de salud que presta servicios a trabajadores extranjeros radicados temporalmente en el país, y junto a la ausencia de nuevos casos en los años siguientes, permite presumir que se trate de casos importados. Los aislamientos resistentes a ciprofloxacina comienzan a aparecer nuevamente en el año 2003 haciéndose cada vez más comunes y superando el 10% de los aislamientos recuperados hasta el año 2013. Existe un marcado crecimiento de casos en el año 2007, donde se alcanza el 50% del total de casos recuperados ese año.

En la Tabla 7 se muestra también el perfil de sensibilidad a otros antibióticos que presentan estos aislamientos. En cuanto a la respuesta a la penicilina, es de destacar que ningún aislamiento estudiado presenta sensibilidad contra este agente antimicrobiano. Llama la atención, el aislamiento NG0714 el cual presenta una alta resistencia a la penicilina (CIM = 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en ausencia de producción de betalactamasas. También se puede ver que ningún aislamiento es sensible a tetraciclina, destacándose dos aislamientos con CIM de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (NG0522 y NG0931), lo cual hace presumir que se trata de aislamientos TRNG, es decir alta resistencia a tetraciclina mediada por plásmidos. Para espectinomicina, se cuenta con datos solo del 50% de los aislamientos presentando todos estos, siendo todos sensibles. Esta situación también se repite para ceftriaxona, donde la totalidad de los aislamientos estudiados presentan sensibilidad ante este antibiótico. Al estudiar la respuesta a la azitromicina, se vio que un solo aislamiento (NG0931) muestra resistencia a este antibiótico pero el resto de los aislamientos presenta sensibilidad disminuida o una sensibilidad con CIMs muy cercanas al punto de corte. La respuesta a eritromicina y tritón fueron estudiados con el fin de evaluar el fenotipo MTR, observándose que la presencia o ausencia de este fenotipo es heterogénea en la población de aislamientos estudiados, encontrándose tanto aislamientos portadores del fenotipo MTR como otros que no lo presentan. Es importante destacar también, que la totalidad de los aislamientos ciprofloxacina

resistentes recuperados en el periodo de estudio de este trabajo, son betalactamasa negativos.

Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de analizar los datos obtenidos, es el grado de resistencia que presentan los diferentes aislamientos ciprofloxacina resistentes. Estos aspectos son contemplados en el grafico 2. Cabe destacar que este grafico no contempla los datos anteriores al año 2004. La razón de que esto ocurra es que en los estudios realizados sobre los aislamientos de más antigüedad no se incluían diluciones para determinación de CIM por encima de 1 µg/ml por lo que los aislamientos resistentes simplemente eran categorizados como ≥ 1 µg/ml haciendo imposible determinar el grado de resistencia que estos presentaban. Por otro lado, estos aislamientos no se encuentran conservados en la colección existente, por lo que no se puede llevar a cabo un nuevo ensayo de sensibilidad para determinar el valor exacto.

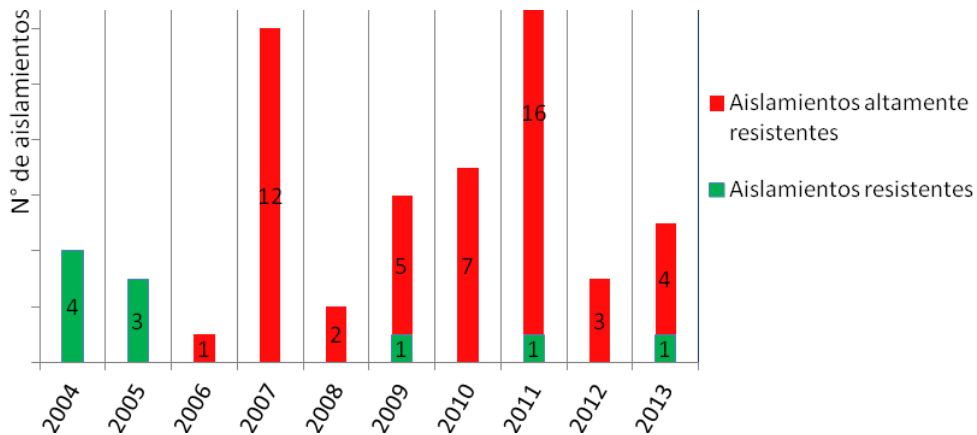


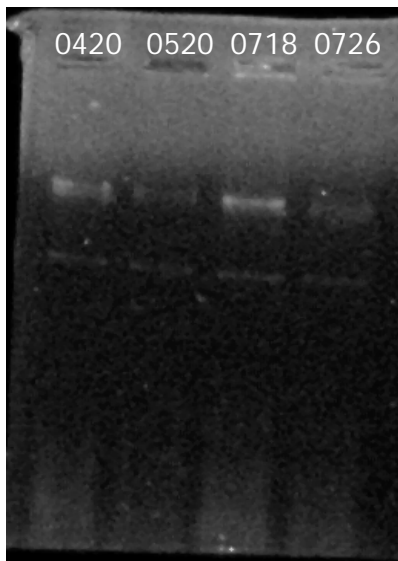
Gráfico 2 - Caracterización de los aislamientos QNGR. Se muestran la cantidad de aislamientos resistentes (CIM entre 1 µg/ml y 2 µg/ml) y de alta resistencia (CIM ≥ 4 µg/ml) a lo largo del periodo de estudio.

Puede observarse claramente como los casos de baja resistencia son cada vez más extraños mientras que los aislamientos de alta resistencia son los que predominan en la última década de estudio. Mientras que antes del año 2000 era extraño encontrar cepas con este comportamiento frente a las

fluoroquinolonas, últimamente puede apreciarse que son cada vez más comunes y que han desarrollado mecanismos para aumentar esa capacidad de resistencia. De todas maneras, a pesar de que últimamente predominan los aislamientos con alta resistencia a ciprofloxacina, los de baja resistencia siguen apareciendo.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Como se menciona anteriormente, una vez analizado el perfil de sensibilidad a los diferentes antibióticos estudiados de los aislamientos de la colección de cepas existentes en el laboratorio, nos enfocamos en la situación de las cepas ciprofloxacina resistentes halladas. Como primer paso en la búsqueda de más datos acerca de la implicancia del tipo de porina presente en los mecanismos de resistencia contra la ciprofloxacina, se llevó a cabo la extracción de ADN de los aislamientos de interés.



Luego de realizada la extracción de ADN, tal como se describe en la sección de materiales y métodos se procedió a comprobar el resultado de la misma corriendo las muestras en un gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE 0,5 X con bromuro de etidio. En la figura 1 se observa uno de los geles realizados con este fin. Este procedimiento fue llevado a cabo para todas las cepas seleccionadas para este estudio.

Figura 4. Extracciones de ADN de diferentes cepas corridas en gel de agarosa al 0,8 %.

Posterior a la observación del ADN extraído en el gel de agarosa se determinó la pureza del ADN extraído y la concentración del mismo mediante la medida de absorbancias a 260 nm y 280 nm. A medida que se realizaban las

extracciones se comprobó la pureza de las mismas y en caso de resultados no deseados, se repitió el protocolo de extracción hasta obtener un juego completo de soluciones de ADN extraído de cada una de las cepas de interés apropiado para continuar con los análisis.

4.3 AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN *POR*

Una vez realizadas y verificadas las extracciones, se procedió a realizar la amplificación de los segmentos de ADN de interés por PCR, con los primers diseñados en el laboratorio.

El primer paso para la utilización de estos primers y poner a punto esta técnica, implica establecer las mejores condiciones de PCR para estos oligos. Para ello se realiza un primer ensayo bajo gradiente de temperatura con la cepa codificada como NG0704. Se establece en un termociclador un ensayo en el que, en el programa configurado, se genere un gradiente de temperatura de annealing que varíe entre 58°C y 65°C.

Programa:

Ciclo inicial: 3 minutos a 94°C

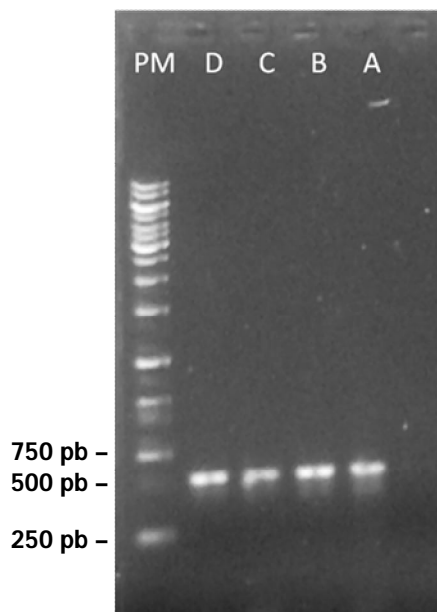
Ciclo intermedio (30 ciclos):

desnaturalización a 94°C por 30 segundos

annealing en gradiente 58°C – 65°C por 30 segundos

extensión a 72°C por 30 segundos

Ciclo Final: 1 minuto a 72°C



En la Figura 5 se puede observar el gel en el que se analizaron las amplificaciones realizadas de la secuencia *por* de la cepa NG0704 para diferentes temperaturas de annealing. Se seleccionaron las amplificaciones obtenidas para 58°C, 60°C, 63°C y 65°C identificadas como muestras A, B, C y D respectivamente.

Figura 5. Amplificación de fragmentos de porinas, desarrolladas con diferentes temperaturas de annealing, visualizadas en gel de agarosa 1 % con bromuro de etidio.

Observando que en todo el rango de temperatura ensayado se obtienen resultados específicos del producto buscado, se decide utilizar la temperatura de annealing mayor, es decir 65°C. Luego de seleccionar las condiciones optimas de amplificación, se toman las extracciones realizadas y se someten a este ensayo de PCR con estos primers. En el siguiente gel se pueden observar algunas de estas amplificaciones.



Figura 6. Amplificación de fragmentos de porinas visualizadas en gel de agarosa 1 % con bromuro de etidio.

En este gel se pueden observar dos grupos de amplificaciones con una clara diferencia de tamaño. Por un lado se puede ver un mismo tamaño de las cepas NG0421, NG0520, NG0521 y NG0522, mientras que las cepas NG0606, NG0703, NG0707 y NG0708 presentaron amplificaciones de mayor tamaño. El control positivo que se encuentra similar a este último grupo corresponde a la extracción del aislamiento NG0704, la cual se había comprobado que podía ser amplificada con éxito en las pruebas de optimización de las condiciones de PCR.

4.4 AMPLIFICACIONES DE FRAGMENTOS PORINAS CON PRIMERS NG-MAST

Se realizó el protocolo detallado en el trabajo publicado por Martin et al. [89]. En una primera instancia, los resultados obtenidos no estaban acordes a los esperados. Los fragmentos obtenidos para diferentes aislamientos tenían un tamaño cercano a los 1500 pb, como se ve en la Figura 7, lo que correspondería al doble aproximadamente del tamaño esperado. La identificación de los fragmentos se llevó a cabo en gel de agarosa 1% corrido en buffer TBE 0,5X y utilizando el marcador de peso molecular Fermentas GeneRuler 1 kb. Se realizó el análisis de diferentes cepas en diferentes ensayos de PCR obteniendo el mismo resultado

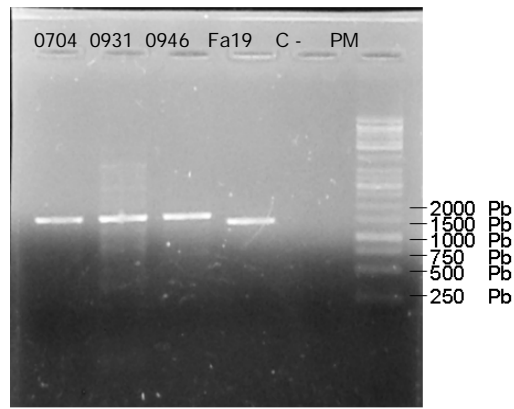


Figura 7. Gel de agarosa 1% en buffer TBE 0,5X.

Luego de analizar las diferentes posibilidades, se plantea como hipótesis que el fragmento que se obtiene sea el dímero del amplicon de interés. Intentando separar este producto se realiza una modificación en la concentración del buffer de corrida para probar la influencia de la fuerza iónica del mismo, sobre el producto de amplificación.

Por tanto se realiza el análisis de la cepa NG0931 según el protocolo del trabajo de Martin et al, y se corre en un gel de agarosa 1% modificando el buffer de corrida a TBE 1X. Se muestra el resultado obtenido en

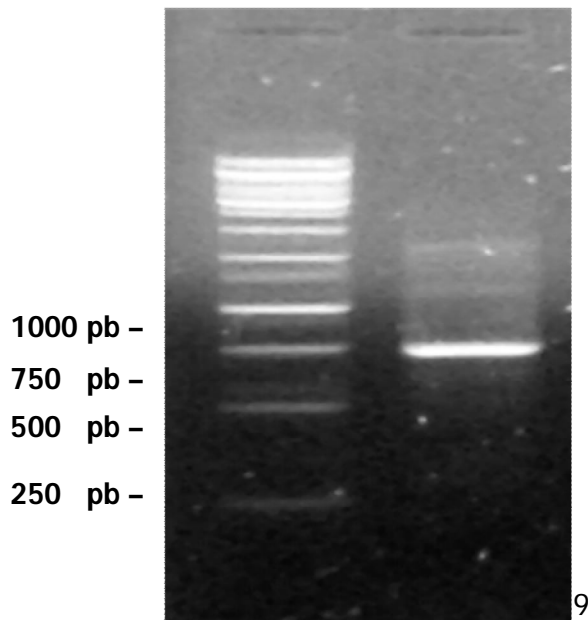


Figura 8. Gel de agarosa 1% en buffer TBE 1X.

el gel en la Figura 8, donde se observa el fragmento buscado de aproximadamente 750 pb.

De todas maneras en la Figura 7, correspondiente a un gel de agarosa al 1% se puede ver un detalle importante. En él se corrieron los productos obtenidos de la amplificación de fragmentos por la técnica PCR, utilizando los primers reportados en el trabajo NG-MAST. Allí se observa una clara diferencia de tamaño entre los tres primeros fragmentos y el último, correspondiente a la cepa NGFA19. Luego, se llevó a cabo la secuenciación de dichos fragmentos los cuales fueron analizados utilizando la herramienta electrónica BLAST. Mediante estos alineamientos se pudo observar que las cepas NG0704, NG0931 y NG0946 son portadoras del alelo *porB* mientras que la NGFa19 contiene el alelo *porA*. Esto confirma la diferencia de tamaño observada en el gel, teniendo así un método sencillo y rápido de caracterización de cepas según el alelo de porina principal que presenta.

Este ensayo se llevó a cabo en todas las cepas de *N. gonorrhoeae* pertenecientes a la colección de la cátedra que presentan resistencia a ciprofloxacina. Se observaron los perfiles electroforéticos obtenidos para los diferentes alelos lo que permite deducir su secuencia aminoacídica, pudiendo diferenciar la cepas portadoras de las diferentes porinas, PorB IA y PorB IB. Como se observa en la siguiente tabla, los únicos aislamientos con PorB IA fueron encontrados en los años 2004 y 2005 mientras que de ahí en más, entre los años 2006 y 2010, solo fueron recuperados aislamientos que presentan porinas del tipo PorB IB.

Tabla 8. Caracterización de las cepas estudiadas en función de la secuencia aminoacídica deducida que presentan y los valores de resistencia a ciprofloxacina obtenidos.

| Aislamiento | Porina | Año | CIM Cipro (µg/ml) | Aislamiento | Porina | Año | CIM Cipro (µg/ml) |
|-------------|---------|------|-------------------|-------------|---------|------|-------------------|
| NG0421 | PorB IA | 2004 | 1 | NG0717 | PorB IB | 2007 | 16 |
| NG0520 | PorB IA | 2005 | 1 | NG0718 | PorB IB | 2007 | 32 |
| NG0521 | PorB IA | 2005 | 1 | NG0726 | PorB IB | 2007 | 32 |
| NG0522 | PorB IA | 2005 | 2 | NG0808 | PorB IB | 2008 | 16 |
| NG0606 | PorB IB | 2006 | 16 | NG0820 | PorB IB | 2008 | 16 |
| NG0703 | PorB IB | 2007 | 8 | NG0906 | PorB IB | 2009 | 16 |
| NG0704 | PorB IB | 2007 | 16 | NG0925 | PorB IB | 2009 | 16 |
| NG0707 | PorB IB | 2007 | 8 | NG0929 | PorB IB | 2009 | 16 |
| NG0708 | PorB IB | 2007 | 8 | NG0931 | PorB IB | 2009 | 2 |
| NG0711 | PorB IB | 2007 | 32 | NG0946 | PorB IB | 2009 | 16 |
| NG0712 | PorB IB | 2007 | 8 | NG0952 | PorB IB | 2009 | 32 |
| NG0714 | PorB IB | 2007 | 32 | NG1014 | PorB IB | 2010 | 16 |
| NG0715 | PorB IB | 2007 | 16 | NG1022 | PorB IB | 2010 | 16 |
| NG0716 | PorB IB | 2007 | 16 | NG1032 | PorB IB | 2010 | 32 |

4.5 PERFILES PFGE

Se realizó el análisis de los perfiles obtenidos por PFGE para las cepas que se muestran a continuación:

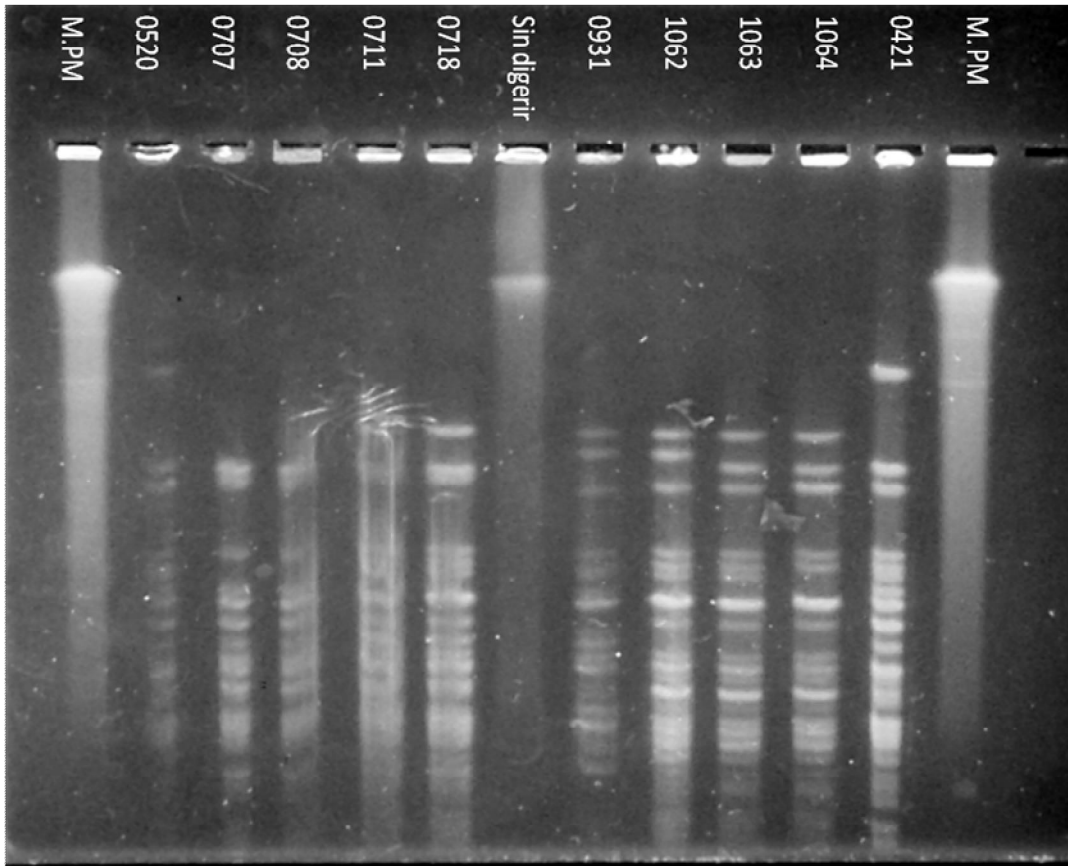


Figura 9. Perfiles de PFGE obtenidos. Las muestras NG1062 y NG1063 corresponden a aislamientos que se conocían como epidemiológicamente relacionados que servirán como control adicional de la técnica.

Se realizó manualmente, un análisis detallado de las bandas obtenidas, encontrando en primer lugar que cada perfil está compuesto por más de 10 fragmentos diferentes. Se aplicó entonces el sistemas de interpretación de resultados adaptado del descrito por Tenover et al [98] y detallado anteriormente.

Se puede observar entonces que los aislamientos NG0520 y NG0421 tienen una diferencia de 2 fragmentos. Los perfiles obtenidos para NG0707 y NG0708 no presentan diferencias entre si, al igual que los aislamientos NG0711 y NG0718 que tampoco presentan diferencias. Por último, el aislamiento NG0931 no se encuentra estrechamente relacionado a ninguno de los otros aislamientos analizados con esta técnica.

Por último se evaluó las diferencias entre los grupos definidos en una primera instancia, donde se pudo ver que los aislamientos pertenecientes a estos

grupos formarían parte de la categoría de posiblemente relacionados. El grupo 1 (NG0520 y NG0421) y el grupo 2 (NG0707 y NG0708) difieren en 5 bandas. El grupo 1 (NG0520 y NG0421) y Grupo 3 (NG0711 y NG0718) también difieren en 5 bandas. Por último al analizar el grupo 2 (NG0707 y NG0708) contra el grupo 3 (NG0711 y NG0718), se observó que difieren entre ellos en 4 bandas.

Por lo tanto, observando las características que se describieron anteriormente, y viendo que todos los aislamientos están entre sí en la categoría de posiblemente relacionados, los grupos definidos por esta técnica son los siguientes:

Grupo A₁ = NG0520 y NG0421 (Diferencia de 2 fragmentos)

Grupo A₂ = NG0707 y NG0708 (Sin diferencias)

Grupo A₃ = NG0711 y NG0718 (Sin diferencias)

Grupo A₄ = NG0931

4.6 ANÁLISIS NG MAST

Se llevó a cabo el análisis descrito por Martin et al. [89], las secuencias fueron ingresadas a la base de datos de la página web de NG-MAST (www.ng-mast.net) y se procedió a analizar los resultados obtenidos para esta tipificación. Se analizaron un total de 28 aislamientos donde solo uno presentó resultados que no pudieron ser analizados por el método de NG-MAST. Para el resto de los aislamientos estudiados, se le asignó un número de alelo *por* y un número de alelo *tbpB* y posteriormente por combinación de estos se obtuvieron los sequence type (ST) de los aislamientos en estudio.

De todos estos aislamientos recibidos entre el año 2004 y 2010 y analizados con esta técnica, se obtuvieron 13 alelos *por* diferentes, encontrándose que la mayoría de los aislamientos recibidos en el año 2007, presenta el alelo *por* 4 o 262.

Tabla 9. Números de identificación obtenidos para los alelos *por* de los distintos aislamientos analizados. En rojo se observan los números de identificación de alelos *por* asignados no registrados hasta el momento.

De los 28 alelos *por* ingresados, 10 de ellos correspondían a secuencias únicas por lo que se les fue asignados nuevos números de identificación de alelos *por*. En el caso de los segmentos amplificados del gen *tbpB*, se encuentran 7 alelos diferentes, sobresaliendo el alelo 4 que fue encontrado en 12 de los aislamientos analizados. Para este alelo, fueron 2 los aislamientos no

| Alelos <i>por</i> | N° aislamientos | Aislamientos |
|-------------------|-----------------|---|
| 4 | 6 | NG0704, NG0711, NG0715, NG0718, NG0726 y NG1032 |
| 262 | 5 | NG0703, NG0707, NG0708, NG0712 y NG1022 |
| 90 | 4 | NG0421, NG0520, NG0521 y NG0522 |
| 3167 | 2 | NG0606 y NG0717 |
| 3178 | 2 | NG0906 y NG0929 |
| 1891 | 1 | NG0808 |
| 905 | 1 | NG1014 |
| 3176 | 1 | NG0716 |
| 3177 | 1 | NG0820 |
| 3179 | 1 | NG0931 |
| 3180 | 1 | NG0946 |
| 3181 | 1 | NG0952 |
| 3036 | 1 | NG0925 |

ingresados hasta el momento en la base de datos de NG-MAST.

Tabla 10. Números de identificación obtenidos para los alelos *tbpB* de los distintos aislamientos analizados. En rojo se observan los números de identificación de alelos *tbpB* asignados no registrados hasta el momento.

| Alelos <i>tbpB</i> | N° aislamientos | Aislamientos |
|--------------------|-----------------|---|
| 4 | 12 | NG0606, NG0704, NG0711, NG0715, NG0717, NG0718, NG0726, NG0925, NG0946, NG0952, NG1014 y NG1032 |
| 29 | 7 | NG0703, NG0707, NG0708, NG0712, NG0716, NG0906, NG0929 |
| 106 | 4 | NG0421, NG0520, NG0521 y NG0522 |
| 135 | 1 | NG0820 |
| 455 | 1 | NG0931 |
| 1108 | 1 | NG0808 |
| 1109 | 1 | NG1022 |

Analizando estos resultados y de la combinación de ambos tipos de alelos, la base de datos asignó los sequence types correspondientes. Se encontró que

15 aislamientos presentaban STs ya registrados por otros investigadores en esta base de datos, mientras que para el resto, fueron asignado nuevos STs, es decir, que las secuencias determinadas del alelo *por* y/o del alelo de *tbp* para este grupo de aislamientos o la combinación de los mismos, nunca había sido ingresada en esta base de datos, que hoy en día cuenta con más de 5500 STs asignados. En su mayoría, estos nuevos números de ST son debido a alelos del gen *por* no registrados hasta el momento en esta base de datos.

Tabla 11. Sequence type obtenidos para los diferentes aislamientos y su relación con la CIM a ciprofloxacina y los alelos *por*. En rojo se observan los ST asignados no registrados hasta el momento.

| STs | Cantidad de aislamientos | Código de los aislamientos | CIM Cipro (rango) | Alelo de <i>por</i> |
|------|--------------------------|---|-------------------|---------------------|
| 225 | 5 | NG0704, NG0711, NG0715, NG0718 y NG0726 | 16 – 32 | <i>porB</i> |
| 307 | 4 | NG0421, NG0520, NG0521 y NG0522 | 1 – 2 | <i>porA</i> |
| 4444 | 4 | NG0703, NG0707, NG0708 y NG0712 | 4 – 16 | <i>porB</i> |
| 5231 | 2 | NG0606 y NG0717 | 16 | <i>porB</i> |
| 5246 | 2 | NG0906 y NG0929 | 8 – 16 | <i>porB</i> |
| 5243 | 1 | NG0716 | 8 | <i>porB</i> |
| 5244 | 1 | NG0808 | 16 | <i>porB</i> |
| 5245 | 1 | NG0820 | 16 | <i>porB</i> |
| 5247 | 1 | NG0925 | 16 | <i>porB</i> |
| 5248 | 1 | NG0931 | 2 | <i>porB</i> |
| 5249 | 1 | NG0946 | 16 | <i>porB</i> |
| 5250 | 1 | NG0952 | 16 | <i>porB</i> |
| 5251 | 1 | NG1022 | 16 | <i>porB</i> |
| 1403 | 1 | NG1014 | > 16 | <i>porB</i> |

Cabe destacar que los 4 aislamientos que presentan porinas PorB IA en su superficie y que fueron recibidos en el laboratorio entre el año 2004 y 2005, presentan el mismo número de codificación para el alelo *por* y lo mismo ocurre para el alelo *tbpB*, por lo que también son identificados con el mismo ST (ST 307), el cual ya existía en la base de datos. Además estos aislamientos presentan el mismo nivel de resistencia a ciprofloxacina. Al incorporar los resultados planteados antes en este trabajo se puede ver que estos aislamientos también comparten otras similitudes como el perfil de sensibilidad a antibióticos analizados, son betalactamasa negativos y presentan todos, fenotipo MTR.

En cuanto a los aislamientos con nuevos ST, es posible observar que todos presentan porinas PorB IB y la mayor cantidad de nuevos códigos se encuentra sobretodo en los aislamientos recibidos en el año 2009.

A continuación, en la Tabla 12 se puede ver los resultados obtenidos para NG-MAST junto al perfil completo de los aislamientos en estudio.

Tabla 12. Resumen de resultados. Perfil de sensibilidad a antibiótico para Penicilina (P), Tetraciclina (T), Espectinomicina (E), Ceftriaxona (Cro), Ciprofloxacina (Cip), Azitromicina (Az), Eritromicina (Er) y Tritón TX-100. Se observa también si son productoras de betalactamasa (β lac) y si presentan fenotipo MTR. Por último se observan los códigos obtenidos del ensayo de NG-MAST, tanto para los alelos por y tpb, como para el ST y aislamientos sin datos (SD).

| Aislamiento | C.I.M. ug/ml | | | | | | | | β lac | Fenotipo MTR | PorB | Alelo PorB | Alelo Tpb | Sequence Type |
|-------------|--------------|----|----|-------|-----|-------|-----|--------|-------------|--------------|---------|------------|-----------|---------------|
| | P | T | E | Cro | Cip | Az | Er | TX-100 | | | | | | |
| NG0421 | 1 | 1 | 16 | 0,032 | 1 | 0.5 | 2 | 16000 | - | MTR | PorB IA | 90 | 106 | 307 |
| NG0520 | 1 | 2 | 16 | 0,032 | 1 | 1 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IA | 90 | 106 | 307 |
| NG0521 | 1 | 1 | 16 | 0,008 | 1 | 0.25 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IA | 90 | 106 | 307 |
| NG0522 | 1 | 16 | 16 | 0,016 | 2 | 0.5 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IA | 90 | 106 | 307 |
| NG0606 | 2 | 2 | 16 | 0,032 | 16 | 1 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IB | 3167 | 4 | 5231 |
| NG0703 | 1 | 1 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 262 | 29 | 4444 |
| NG0704 | 2 | 2 | ≤8 | 0,032 | 16 | 0.25 | 0.5 | 8.000 | - | NO MTR | PorB IB | 4 | 4 | 225 |
| NG0707 | 1 | 2 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 262 | 29 | 4444 |
| NG0708 | 1 | 1 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 262 | 29 | 4444 |
| NG0711 | 2 | 2 | ≤8 | 0,032 | 32 | 0.25 | 0.5 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 4 | 4 | 225 |
| NG0712 | 1 | 1 | 16 | 0,016 | 8 | 0.5 | 1 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 262 | 29 | 4444 |
| NG0714 | 16 | 2 | ≤8 | 0,016 | 32 | 1 | 8 | >16000 | - | MTR | PorB IB | SD | SD | SD |
| NG0715 | 0.5 | 2 | ≤8 | 0,016 | 16 | 0.25 | 0.5 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 4 | 4 | 225 |
| NG0716 | 0.5 | 1 | 16 | 0,016 | 16 | 0.25 | 1 | 16.000 | - | NO MTR | PorB IB | 3176 | 29 | 5243 |
| NG0717 | 2 | 4 | SD | 0,016 | 16 | 0.25 | 0.5 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 3167 | 4 | 5231 |
| NG0718 | 2 | 1 | 16 | 0,032 | 32 | 0.25 | 1 | >16000 | - | NO MTR | PorB IB | 4 | 4 | 225 |
| NG0726 | 8 | 4 | SD | 0,016 | 32 | 0.25 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IB | 4 | 4 | 225 |
| NG0808 | 2 | 8 | SD | 0,063 | 16 | 0.5 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IB | 1891 | 1108 | 5244 |
| NG0820 | 1 | 2 | SD | 0,004 | 16 | 0,125 | 1 | 16.000 | - | NO MTR | PorB IB | 3177 | 135 | 5245 |
| NG0906 | 1 | 2 | SD | 0,008 | 16 | 0.5 | 4 | >16000 | - | MTR | PorB IB | 3178 | 29 | 5246 |
| NG0925 | 2 | 8 | SD | 0,125 | 16 | 0.5 | 2 | 8.000 | - | MTR | PorB IB | 3036 | 4 | 5247 |
| NG0929 | SD | SD | SD | 0,008 | 16 | 0.5 | SD | SD | - | SD | PorB IB | 3178 | 29 | 5246 |
| NG0931 | SD | SD | SD | 0,016 | 2 | 2 | SD | SD | - | SD | PorB IB | 3179 | 455 | 5248 |
| NG0946 | 4 | 4 | SD | 0,008 | 16 | 0,125 | 1 | 8000 | - | NO MTR | PorB IB | 3180 | 4 | 5249 |
| NG0952 | 2 | 8 | SD | 0,016 | 32 | 1 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IB | 3181 | 4 | 5250 |
| NG1014 | 2 | 2 | SD | 0,016 | 16 | 0.5 | 2 | 4000 | - | MTR | PorB IB | 905 | 4 | 1403 |
| NG1022 | 1 | 1 | SD | 0,008 | 16 | 0.5 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IB | 262 | 1109 | 5251 |
| NG1032 | 1 | 2 | SD | 0,032 | 32 | 0.5 | 2 | >16000 | - | MTR | PorB IB | 4 | 4 | 225 |

4.7 CLASIFICACIÓN DE GENOGRUPOS

Una vez que se estableció la tipificación mediante la asignación de los diferentes sequence types, el objetivo fue profundizar en la caracterización de los aislamientos, analizando si pueden ser agrupados en genogrupos. Como vimos, los genogrupos están formados por aislamientos que comparten algunos de los alelos *por* o *tbp* y donde el alelo restante presente por lo menos un 99% de similitud (≤ 5 pb para el alelo *por* y ≤ 4 pb para *tbp*).

Se estudia detenidamente la Tabla 12 seleccionando los aislamientos que compartan el código de alguno de los alelos. Los candidatos a pertenecer a un mismo genogrupo se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Aislamientos candidatos a ser asignados a diferentes genogrupos, agrupados según el alelo que tienen en común.

| Aislamiento | Alelo coincidente | Alelo restante |
|-------------|-------------------|------------------|
| NG0703 | <i>por</i> 262 | <i>tbpB</i> 29 |
| NG0707 | | <i>tbpB</i> 29 |
| NG0708 | | <i>tbpB</i> 29 |
| NG0712 | | <i>tbpB</i> 29 |
| NG1022 | | <i>tbpB</i> 1109 |
| NG0703 | <i>tbpB</i> 29 | <i>por</i> 262 |
| NG0707 | | <i>por</i> 262 |
| NG0708 | | <i>por</i> 262 |
| NG0712 | | <i>por</i> 262 |
| NG0716 | | <i>por</i> 3176 |
| NG0906 | | <i>por</i> 3178 |
| NG0929 | | <i>por</i> 3178 |
| NG0606 | <i>tbpB</i> 4 | <i>por</i> 3167 |
| NG0704 | | <i>por</i> 4 |
| NG0711 | | <i>por</i> 4 |
| NG0715 | | <i>por</i> 4 |
| NG0717 | | <i>por</i> 3167 |
| NG0718 | | <i>por</i> 4 |
| NG0726 | | <i>por</i> 4 |
| NG0925 | | <i>por</i> 3036 |
| NG0946 | | <i>por</i> 3180 |
| NG0952 | | <i>por</i> 3181 |
| NG1014 | | <i>por</i> 905 |
| NG1032 | | <i>por</i> 4 |

Según la tabla anterior, se realiza la alineación de las secuencias que se indican a continuación (ver alineación en ANEXO **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**):

-*tbpB* 29 / *tbpB* 1109

-*por* 262 / *por* 3176 / *por* 3178

-*por* 4 / *por* 905 / *por* 3036 / *por* 3167 / *por* 3180 / *por* 3181

De esta manera se descartan los alelos que no presentan un mínimo de 99% de similitud y si son identificados como parte de un mismo genogrupo, los que si cumplen esta condición.

Tabla 14. Resumen de los ST obtenidos y su agrupación en los diferentes genogrupos

| Aislamiento | Sequence Type | Genogrupo |
|-------------|---------------|----------------|
| NG0421 | 307 | G307 |
| NG0520 | 307 | G307 |
| NG0521 | 307 | G307 |
| NG0522 | 307 | G307 |
| NG0808 | 5244 | No corresponde |
| NG0820 | 5245 | No corresponde |
| NG0931 | 5248 | No corresponde |
| NG1022 | 5251 | No corresponde |
| NG0703 | 4444 | G4444 |
| NG0707 | 4444 | G4444 |
| NG0708 | 4444 | G4444 |
| NG0712 | 4444 | G4444 |
| NG0716 | 5243 | G4444 |
| NG0906 | 5246 | G4444 |
| NG0929 | 5246 | G4444 |
| NG0715 | 225 | G225 |
| NG0717 | 5231 | G225 |
| NG0718 | 225 | G225 |
| NG0726 | 225 | G225 |
| NG0606 | 5231 | G225 |
| NG0704 | 225 | G225 |
| NG0711 | 225 | G225 |
| NG0925 | 5247 | G225 |
| NG0946 | 5249 | G225 |
| NG0952 | 5250 | G225 |
| NG1014 | 1403 | G225 |

| | | |
|--------|-----|------|
| NG1032 | 225 | G225 |
|--------|-----|------|

Como podemos ver, mediante estos métodos de tipificación, se pudo clasificar los 28 aislamientos que fueron sometidos a estudio, en 14 STs e inclusive, con un estudio más exhaustivo se pueden agrupar en 3 genogrupos diferentes. Cabe destacar que a 4 aislamientos no se les pudo determinar un código de genogrupo dado que no están relacionados con el resto por ninguno de los alelos analizados y el restante aislamiento no se le pudo determinar los alelos por ni *tpbB* por lo que no se le asigno ST ni genogrupo.

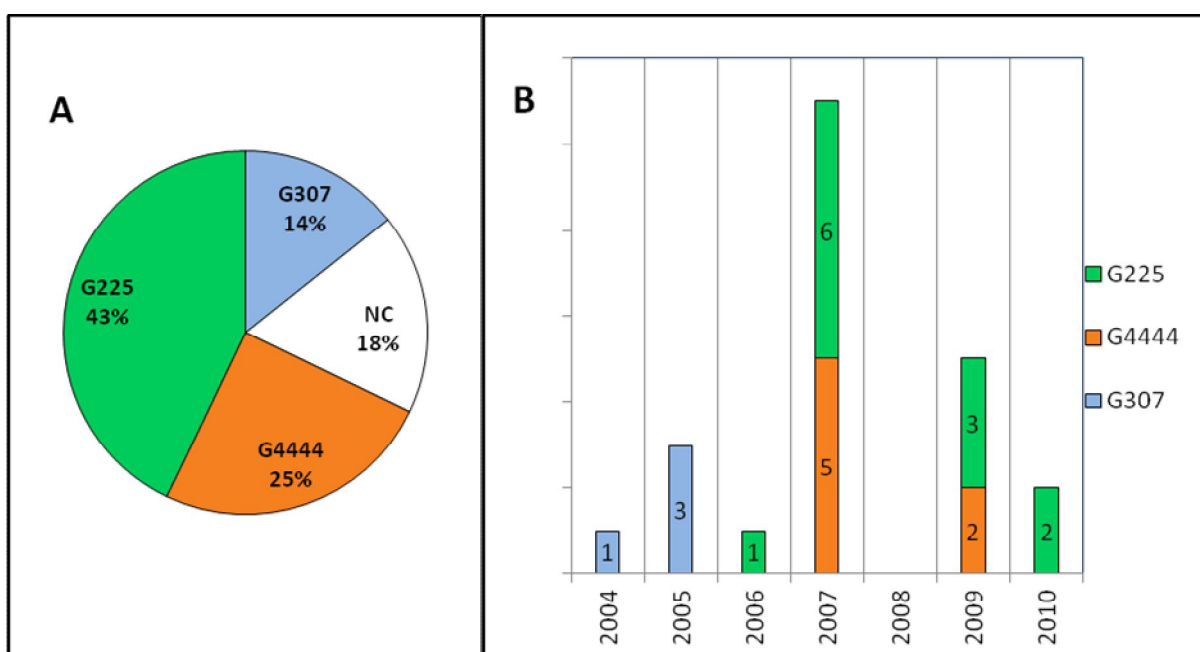


Gráfico 3. Distribución de Genogrupos. **A** – Porcentaje de cada uno de los genogrupos obtenidos para todos los aislamientos de estudio. No Corresponde (NC) se refiere a los aislamientos que no pudieron ser asignados a ningún genogrupo. **B** – Distribución de los diferentes genogrupos de los aislamientos estudiados a lo largo de los años.

4.8 INTEGRACIÓN DE MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN

En este trabajo se llevaron a cabo diferentes técnicas de tipificación para caracterizar de manera precisa, un set de aislamientos seleccionados para

estudio. Un mayor aporte puede observarse al correlacionar estos diferentes métodos aplicados.

4.8.1 GENOGRUPOS vs CIMs

En primer lugar es importante detenerse en los genotipos obtenidos por el método de NG-MAST, y ver la asociación de los diferentes genogrupos y el perfil de sensibilidad a los antibióticos. Al analizar los diferentes genogrupos obtenidos en su conjunto, se encuentran características similares mayoritariamente en los aislamientos pertenecientes al mismo.

Al analizar el genogrupo G307, compuesto por 4 de los aislamientos estudiados, se puede ver que todos presentan la porina PorB IA y que comparten características en cuanto a su perfil de sensibilidad a antibióticos. Todos los aislamientos son sensibles a espectinomicina y ceftriaxona, y sus CIM no se diferencian en más de dos diluciones (dentro del límite de reproducibilidad del método). Para penicilina y azitromicina se puede observar que los aislamientos presentan casi en su totalidad sensibilidad disminuida. Para el caso de tetraciclina, aparecen aislamientos en el límite entre sensibilidad disminuida y resistencia (CIM entre 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), excepto por el NG0522 que presenta una clara resistencia a este agente antimicrobiano, de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, este genogrupo comparte la característica de presentar baja resistencia a ciprofloxacina.

Los 7 aislamientos que componen el genogrupo G4444, son portadores de la porina PorB IB y son sensibles a espectinomicina y ceftriaxona. En su totalidad presentan sensibilidad disminuida a penicilina y azitromicina, con una sola excepción que es sensible a este último antibiótico. Para eritromicina, el único aislamiento que presenta resistencia es el NG0906 que tiene un valor de CIM de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para tetraciclina se observa un comportamiento similar al descrito para el genogrupo G307 donde se encuentran aislamientos con sensibilidad disminuida y resistentes. Por último, cabe destacar que todos los aislamientos presentan una alta resistencia a la ciprofloxacina.

Por último, genogrupo G225, está compuesto por aislamientos que expresan la porina PorB IB y son sensibles a espectinomicina, ceftriaxona y en su mayoría a

azitromicina, aunque existen algunos casos de sensibilidad disminuida. Al analizar detenidamente la sensibilidad a ceftriaxona de los aislamientos que se dispone de los datos, se observa que el NG0925, a pesar de ser sensible a este antibiótico igual que el resto, presenta un valor de CIM de 0,125 µg/mL, mientras que el resto de los aislamientos no supera el valor de 0,016 µg/mL. Este es el único genogrupo cuyos aislamientos, exceptuando el NG0715 y NG1032 que presentan sensibilidad disminuida, son resistentes a penicilina. Lo mismo ocurre con tetraciclina, donde el NG0718 es el único aislamiento que presenta sensibilidad disminuida a este antibiótico.

4.8.2 GENOTIPOS vs PULSOTIPOS

Al estudiar cómo se comportaron los aislamientos analizados por PFGE y la clasificación por genotipos, puede verse que la correlación es directa. Pese a que se concluyó que los cuatro diferentes perfiles obtenidos para los aislamientos analizados por PFGE, estén posiblemente relacionados, se pudo ver que los diferentes grupos estrechamente relacionados se correspondían con diferentes genotipos como se ve en la Tabla 15.

Tabla 15. Análisis de los pulsotipos obtenidos por PFGE y su relación con los genogrupos

| Aislamiento | Genogrupo | Pulsotipo |
|-------------|----------------|----------------------|
| NG0421 | G307 | GRUPO A ₁ |
| NG0520 | G307 | GRUPO A ₁ |
| NG0707 | G4444 | GRUPO A ₂ |
| NG0708 | G4444 | GRUPO A ₂ |
| NG0711 | G225 | GRUPO A ₃ |
| NG0718 | G225 | GRUPO A ₃ |
| NG0931 | No determinado | GRUPO A ₄ |

Esto muestra que ambas técnicas, de reciente incorporación en el laboratorio para el estudio epidemiológico de *N. gonorrhoeae* en Uruguay, son de alto poder

discriminatorio observando que aislamientos relacionados mediante una técnica y diferenciados del resto, confirman este comportamiento con la otra metodología.

4.9 TRANSFORMACIÓN

En la búsqueda de evidenciar el papel del tipo de porinas en la resistencia a ciprofloxacina, se busco en este trabajo, transformar la cepa NGFA19 que presenta porinas del tipo PorB IA con un producto de amplificación del fragmento de la porina del tipo PorB IB. Para ello se amplifico el fragmento del gen *por* determinado en la técnica de tipificación de NG-MAST antes discutida, y se intentó introducir este fragmento en el genoma de una cepa que presenta el alelo *porA*. En caso de que la hipótesis de que la modificación de las regiones más variables de los genes codificantes de porinas, influyen en el ingreso de la ciprofloxacina, sea correcta, las cepas transformantes obtenidas, deberían presentar un aumento en la CIM para este antibiótico. Por otro lado se trabajo, sobre un aislamiento, transformado anteriormente [79], de una cepa portadora de la porina PorB IA, a la que se le genero una sobreexpresión del sistema MtrCDE. Se intento incorporar el fragmento de la región más variable del gen *porB* del aislamiento NG0708, obtenido como se describió anteriormente.

No fue posible llevar a cabo estas pruebas, dado que no se logro obtener colonias transformantes en ninguno de los casos. Se buscaron alternativas, generando nuevos subcultivos de la cepa de interés, realizando nuevas amplificación del fragmento de ADN a incorporar, aumentar las cantidades de ADN utilizada, pero de todas maneras fue imposible completar la transformación y las cepas obtenidas no presentaban la modificación genética deseada. Otra prueba realizada, implicó el uso de una nueva cepa dadora, la NG0703 que presentaba características similares a la NG0708, no teniendo éxito nuevamente en la obtención de cepas transformadas. Por último se modificó el aislamiento receptor por el NG0522, el cual presenta baja resistencia a ciprofloxacina y al cual se le determinó la presencia de porinas del tipo PorB IA al igual que la NGFA19. De esta manera, tampoco fue posible obtener colonias genéticamente modificadas.

5. CONCLUSIONES

Se observa en este trabajo, un aumento significativo de los aislamientos con resistencia a ciprofloxacina recuperados en nuestro país, característica acompañada con lo que sucede en el resto del mundo. Dentro de los aislamientos QRNG es importante resaltar, que a medida que avanzaron los años, predominan los que presentan altos niveles de resistencia aunque siguen encontrándose aislamiento de baja resistencia.

La constante adquisición de mecanismos de resistencia en estas bacterias, debe venir acompañado de un control exhaustivo, y es allí donde el desarrollo de técnicas de tipificación, rápidas, sencillas y de bajo costo es fundamental. Dado la importancia de las porina PorB y la sospecha de contribución en el aumento de resistencia a ciprofloxacina de gonococos, el método de tipificación propuesto en este trabajo, permite mediante el uso de los primers diseñados, la amplificación de un corto segmento de la región más variables del gen *por*, que además de presentar la posibilidad de la secuenciación de estas regiones para un estudio más profundo, permite analizar los productos de PCR directamente en un gel de agarosa donde visualmente y de manera rápida se puede diferenciar los aislamientos portadores de las porinas PorB IA de las que presentan las PorB IB. El análisis realizado muestra que de las cepas QRNG de la colección, existe una predominancia de los aislamientos portadores de porinas PorB IB, y que los aislamientos encontrados que presentan PorB IA están restringidos a los años 2004 y 2005, no encontrándose otra aparición más adelante.

La técnica de tipificación de NG-MAST, es una herramienta de suma importancia para el seguimiento mundial de las infecciones por gonococos y la utilización de esta, a la colección de aislamientos del laboratorio permitió identificar grupos de cepas ya registradas en la base de datos en otras partes del mundo, y también

permitió identificar aislamientos cuyos STs no habían sido ingresados aun, es decir que su primera aparición registrada fue en nuestro país. Más aun, se profundizó en la tipificación por este método, analizando los genogrupos. Se encontró que de los 28 aislamientos analizados, y descartando los 5 que no pudieron ser asignados a ningún genogrupo, los restantes aislamientos fueron agrupados en 3 genogrupos diferentes. Vale la pena destacar el genogrupo G307, en el cual los aislamientos coinciden también en el subtipo de porina que portan, el perfil obtenido por PFGE y el perfil de CIM a los diferentes antibióticos entre los que se observa un mismo nivel de baja resistencia a ciprofloxacina. Dado que la aparición de este tipo de aislamientos, se concentra en los años 2004 y 2005, sin ninguna aparición posterior, se puede presumir, que corresponden al ingreso de una nueva cepa en el país, que se estableció en la población con baja prevalencia y que desaparece en un periodo de 24 meses. Observando la sensibilidad que presentan estos aislamientos, a los antibióticos utilizados en esa fecha como tratamiento común a este tipo de infecciones, se puede suponer que fueron estos tratamientos aconsejados, los que actuaron como presión selectiva sobre este genogrupo.

Esta relación encontrada en estos grupos de aislamientos fue confirmada mediante la técnica de PFGE, en la que se analizaron muestras de los diferentes genogrupos y se observó que aislamientos pertenecientes a un mismo genogrupo, también se encontraban relacionadas según el perfil obtenido de pulsotipos. Este análisis también mostro que aunque los aislamientos analizados pudieran pertenecer a diferentes genogrupos, según la clasificación propuesta por Tenover et al., todos podrían estar epidemiológicamente relacionados. De todas maneras, nuestra colección de cepas no es la muestra ideal que proponen en el trabajo de interpretación mencionado, y dadas sus limitaciones se debería profundizar el estudio de los perfiles, realizando esta técnica a la totalidad de aislamientos de la colección.

Tanto los resultados obtenidos para el NG-MAST, como por PFGE y los perfiles de sensibilidad a antibióticos de los aislamientos estudiados, presentaron resultados

concordantes entre sí, demostrando pues, el valor de todas estas técnicas en la búsqueda de protocolos de caracterización que permitan llevar a cabo sistemas de vigilancia local de este patógeno. También se puede observar el alto poder discriminatorio del ensayo de NG-MAST mediante la asignación de sequence types. Además de tener la gran virtud de ser un método fácilmente reproducible interlaboratorio, en los ensayos realizados se observó como aislamientos epidemiológicamente relacionados por la técnica de PFGE, presentaron STs diferentes. Mientras los perfiles de PFGE denotan diferencias genéticas en los sitios de acción de las enzimas de restricción utilizadas, los diferentes STs son asignados según diferencias genéticas en fragmentos particulares de las proteínas expuestas y altamente antigénicos, muy susceptibles a alteraciones durante la infección. La variabilidad observada en esta técnica contradice de cierta manera las hipótesis primaria que motivo este trabajo. El creciente número de aislamientos QRNG, en cortos periodos de tiempo, hizo suponer que se podía deber a una misma cepa circulante, pero los resultados obtenidos muestran que esta hipótesis no es correcta y que se tratan de diferentes cepas.

Este trabajo pretendió en una última instancia, observar el aporte generado por los diferentes subtipos de porinas PorB que presentan estas bacterias, en la sensibilidad contra la ciprofloxacina. De igual manera se intentó ver como se modifica el perfil de sensibilidad de una cepas de *N. gonorrhoeae* según la porina que porta, cuando está potenciada por el efecto de la sobreexpresión del sistema de eflujo MtrCDE. No se pudo obtener ninguna respuesta a estos cuestionamientos, dado que la imposibilidad de obtener aislamientos transformantes no permitió seguir adelante con los ensayos. De todas maneras la observación de CIM mas altos en los aislamientos predominantes en nuestra colección que presentan porinas PorB IB, respecto a las que presentan PorB IA, y los estudios realizados anteriormente en el laboratorio respecto a los sistemas de eflujo, hacen muy importante continuar con esta línea de investigación.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Weinstock, H., S. Berman, and W. Cates, Jr., *Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000*. *Perspect Sex Reprod Health*, 2004. **36**(1): p. 6-10.
2. Levy, S.B., *The antibiotic paradox : how miracle drugs are destroying the miracle*. 1992, New York: Plenum Press.
3. Reyn, A., *Laboratory Diagnosis of Gonococcal Infections*. *Bull World Health Organ*, 1965. **32**: p. 449-69.
4. Parija, *Textbook of Microbiology & Immunology*. 2009: Elsevier India Pvt. Limited.
5. Perilla MJ, A.G., Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp J, Popovic T, Wells J, and S Dowell, *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. 2004(WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6).
6. Ng, L.K. and I.E. Martin, *The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2005. **16**(1): p. 15-25.
7. Dillon, D.A. and S. Starnino, *Manual para el Laboratorio. Identificación de Neisseria gonorrhoeae y análisis de su susceptibilidad a los antibióticos*. Centro coordinador para el Programa de vigilancia de la susceptibilidad de los gonococos a los agentes antimicrobianos (GASP) en América Latina y el Caribe (LAC), 2011. **Second edition**.
8. Kellogg, D.S., Jr., et al., *Neisseria Gonorrhoeae. I. Virulence Genetically Linked to Clonal Variation*. *J Bacteriol*, 1963. **85**: p. 1274-9.
9. Holmes, K.K., *Sexually transmitted diseases*. 2nd ed. 1990, New York: McGraw-Hill. xviii, 1115, 22, 47 p., 16 p. of plates.
10. Kellogg, D.S., Jr., et al., *Neisseria gonorrhoeae. II. Colonial variation and pathogenicity during 35 months in vitro*. *J Bacteriol*, 1968. **96**(3): p. 596-605.
11. Gotschlich, E.C., et al., *Porin protein of Neisseria gonorrhoeae: cloning and gene structure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(22): p. 8135-9.
12. van der Ley, P., et al., *Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp*. *Infect Immun*, 1991. **59**(9): p. 2963-71.
13. Knapp, J.S., et al., *Serological classification of Neisseria gonorrhoeae with use of monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein I*. *J Infect Dis*, 1984. **150**(1): p. 44-8.
14. Cooke, S.J., et al., *Naturally occurring isolates of Neisseria gonorrhoeae, which display anomalous serovar properties, express PIA/PIB hybrid porins, deletions in PIB or novel PIA molecules*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998. **162**(1): p. 75-82.
15. Hobbs, M.M., et al., *Molecular typing of Neisseria gonorrhoeae causing repeated infections: evolution of porin during passage within a community*. *J Infect Dis*, 1999. **179**(2): p. 371-81.

16. Unemo, M., et al., *Comparison of serologic and genetic porB-based typing of Neisseria gonorrhoeae: consequences for future characterization*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4141-7.
17. Viscidi, R.P., et al., *Comparison of sequencing of the por gene and typing of the opa gene for discrimination of Neisseria gonorrhoeae strains from sexual contacts*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(12): p. 4430-8.
18. Richter, J.H., *Albert Neisser; centenary of birth, 1855-January 22-1955*. AMA Arch Derm, 1955. **71**(1): p. 92-4.
19. Harvey, R.A., P.C. Champe, and B.D. Fisher, *Microbiology*. 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
20. Fleming, D.T. and J.N. Wasserheit, *From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection*. Sex Transm Infect, 1999. **75**(1): p. 3-17.
21. Levy, S.B., *Balancing the drug-resistance equation*. Trends Microbiol, 1994. **2**(10): p. 341-2.
22. WHO, W.H.O., *Guidelines for the management of sexually transmitted infections*. World Health Organization, 2003.
23. Johnson, S.R. and S.A. Morse, *Antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae: genetics and mechanisms of resistance*. Sex Transm Dis, 1988. **15**(4): p. 217-24.
24. Maness, M.J., G.C. Foster, and P.F. Sparling, *Ribosomal resistance to streptomycin and spectinomycin in Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol, 1974. **120**(3): p. 1293-9.
25. Young, H., A. Moyes, and A. McMillan, *Azithromycin and erythromycin resistant Neisseria gonorrhoeae following treatment with azithromycin*. Int J STD AIDS, 1997. **8**(5): p. 299-302.
26. *1989 Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1989. **38 Suppl 8**: p. 1-43.
27. *1993 sexually transmitted diseases treatment guidelines*. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep, 1993. **42**(RR-14): p. 1-102.
28. CLSI, C.a.L.S.I., *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23*. 2013.
29. Shultz, T.R., J.W. Tapsall, and P.A. White, *Correlation of in vitro susceptibilities to newer quinolones of naturally occurring quinolone-resistant Neisseria gonorrhoeae strains with changes in GyrA and ParC*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(3): p. 734-8.
30. 2016.
31. Workowski, K.A. and G.A. Bolan, *Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015*. MMWR Recomm Rep, 2015. **64**(RR-03): p. 1-137.
32. Braselli, P.D.A., et al., *Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) - Pautas de Diagnóstico, Tratamiento y Control Epidemiológico*. 2005, Ministerio de Salud Pública: Republica Oriental del Uruguay.
33. *Fluoroquinolone resistance in Neisseria gonorrhoeae--Colorado and Washington, 1995*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1995. **44**(41): p. 761-4.
34. Kam, K.M., et al., *Detection of quinolone-resistant Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(6): p. 1462-4.
35. WHO, W.H.O., *Global surveillance network for gonococcal antimicrobial susceptibility*. . Geneva: World Health Organization, 1990. **WHO/VDT/90-452**.
36. *Antimicrobial resistance in gonococci, WHO Western Pacific Region, 1996. The WHO Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*. Commun Dis Intell, 1997. **21**(23): p. 349-53.

37. Tapsall, J.W., et al., *Surveillance of antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae in the WHO Western Pacific and South East Asian regions, 2007-2008*. Commun Dis Intell Q Rep, 2010. **34**(1): p. 1-7.
38. WHO, W.H.O., *Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates*. Geneva: World Health Organization, 2001. **WHO/HIV_AIDS/2001.02**.
39. *Surveillance of antibiotic susceptibility of Neisseria gonorrhoeae in the WHO western Pacific region 1992-4*. WHO Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Genitourin Med, 1997. **73**(5): p. 355-61.
40. Lahra, M.M., *Surveillance of antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae in the WHO Western Pacific and South East Asian Regions, 2010*. Commun Dis Intell Q Rep, 2012. **36**(1): p. 95-100.
41. Lahra, M.M., *Australian Gonococcal Surveillance Programme annual report, 2012*. Commun Dis Intell Q Rep, 2013. **37**(3): p. E233-9.
42. Turner, A., et al., *Ciprofloxacin resistant Neisseria gonorrhoeae in the UK*. Genitourin Med, 1990. **66**(1): p. 43.
43. Gransden, W.R., C. Warren, and I. Phillips, *4-Quinolone-resistant Neisseria gonorrhoeae in the United Kingdom*. J Med Microbiol, 1991. **34**(1): p. 23-7.
44. Birley, H., et al., *High level ciprofloxacin resistance in Neisseria gonorrhoeae*. Genitourin Med, 1994. **70**(4): p. 292-3.
45. Lewis, D.A., G.E. Forster, and B.T. Goh, *Ciprofloxacin resistant gonococci arriving from Thailand*. Genitourin Med, 1994. **70**(5): p. 360.
46. Turner, A., et al., *Importation into the UK of a strain of Neisseria gonorrhoeae resistant to penicillin, ciprofloxacin and tetracycline*. Genitourin Med, 1995. **71**(4): p. 265-6.
47. Lewis, D.A., M.G. Brook, and M.S. Shafi, *High level ciprofloxacin resistant gonorrhoea imported from Russia*. Genitourin Med, 1997. **73**(4): p. 325-6.
48. Martin, I.M., S. Hoffmann, and C.A. Ison, *European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI): the first combined antimicrobial susceptibility data for Neisseria gonorrhoeae in Western Europe*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(3): p. 587-93.
49. Arreaza, L., et al., *Antibiotic resistance of Neisseria gonorrhoeae in Spain: trends over the last two decades*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(1): p. 153-6.
50. Le Lin, B., et al., *A new sexually transmitted infection (STI) in Geneva? Ciprofloxacin-resistant Neisseria gonorrhoeae, 2002-2005*. Swiss Med Wkly, 2008. **138**(15-16): p. 243-6.
51. Jakopanec, I., K. Borgen, and P. Aavitsland, *The epidemiology of gonorrhoea in Norway, 1993-2007: past victories, future challenges*. BMC Infect Dis, 2009. **9**: p. 33.
52. Lewis, D.A., *Antimicrobial-resistant gonorrhoea in Africa: An important public health threat in need of a regional gonococcal antimicrobial surveillance programme*. Southern African Journal of Epidemiology and Infection, 2011. **26**:4: p. 215-220.
53. Famiglietti, A., et al., *Evolution of Neisseria gonorrhoeae drug susceptibility in Buenos Aires, Argentina, 1985-99*. Sex Transm Infect, 2001. **77**(2): p. 142.
54. Fiorito, S., et al., *Emergence of high level ciprofloxacin resistant Neisseria gonorrhoeae strain in Buenos Aires, Argentina*. Sex Transm Infect, 2001. **77**(1): p. 77.
55. Mendez Ede, L., et al., *[Resistance surveillance of Neisseria gonorrhoeae in a hospital in Santa Fe province, Argentina: 1997-2004]*. Rev Argent Microbiol, 2008. **40**(3): p. 173-9.

56. D'Alessandro, P.B.V., A. Konowalczyk, E. Dourado, M. Montoto, and L.S. G. Manzoti, A.M. Romeo, M. Millara, M.C. Perrone, *Multiresistant Neisseria gonorrhoeae, a reality at our hospital*. Rev. Arg. de Urol., 2013. **78**: p. 130-133.
57. Starnino, S., et al., *Retrospective analysis of antimicrobial susceptibility trends (2000-2009) in Neisseria gonorrhoeae isolates from countries in Latin America and the Caribbean shows evolving resistance to ciprofloxacin, azithromycin and decreased susceptibility to ceftriaxone*. Sex Transm Dis, 2012. **39**(10): p. 813-21.
58. Dillon, J.A., et al., *Challenges in the control of gonorrhea in South America and the Caribbean: monitoring the development of resistance to antibiotics*. Sex Transm Dis, 2006. **33**(2): p. 87-95.
59. Pagotto, F., et al., *Sequence analysis of the family of penicillinase-producing plasmids of Neisseria gonorrhoeae*. Plasmid, 2000. **43**(1): p. 24-34.
60. Zarantonelli, L., et al., *Decreased susceptibility to azithromycin and erythromycin mediated by a novel mtr(R) promoter mutation in Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(5): p. 651-4.
61. Zarantonelli, L., et al., *Decreased azithromycin susceptibility of Neisseria gonorrhoeae due to mtrR mutations*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(10): p. 2468-72.
62. Veal, W.L., et al., *Loss-of-function mutations in the mtr efflux system of Neisseria gonorrhoeae*. Microbiology, 1998. **144 (Pt 3)**: p. 621-7.
63. Hagman, K.E. and W.M. Shafer, *Transcriptional control of the mtr efflux system of Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4162-5.
64. Sumithra T G, C.V.K., Susan Cherian, Binsila B Krishnan and Siju Susan Jacob, *Efflux Pump Inhibitors for Antibacterial Therapy*. Journal of Indian Veterinary Association, 2012. **10**(1): p. 69 - 75.
65. Kupersztoch-Portnoy, Y.M., *Antibiotic Resistance of Gram Negative Bacteria in Mexico: Relationship to Drug Consumption*. Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids, ed. S.B. Levy, R.C. Clowes, and E.L. Koenig. Vol. VIII. 1981: Springer US.
66. Levy, S.B., *Antibiotic resistance: an ecological imbalance*. Ciba Found Symp, 1997. **207**: p. 1-9; discussion 9-14.
67. Tapsall, J.W., *Antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 4**: p. S263-8.
68. Belland, R.J., et al., *Neisseria gonorrhoeae acquires mutations in analogous regions of gyrA and parC in fluoroquinolone-resistant isolates*. Mol Microbiol, 1994. **14**(2): p. 371-80.
69. Yong, D., et al., *Epidemiological characteristics and molecular basis of fluoroquinolone-resistant Neisseria gonorrhoeae strains isolated in Korea and nearby countries*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(2): p. 451-5.
70. Mavroidi, A., et al., *Characterization of Neisseria gonorrhoeae strains with decreased susceptibility to fluoroquinolones isolated in Greece from 1996 to 1999*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(9): p. 3489-91.
71. Ison, C.A., et al., *Drift in susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to ciprofloxacin and emergence of therapeutic failure*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(11): p. 2919-22.
72. Deguchi, T., et al., *DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(2): p. 561-3.
73. Deguchi, T., et al., *Fluoroquinolone treatment failure in gonorrhea. Emergence of a Neisseria gonorrhoeae strain with enhanced resistance to fluoroquinolones*. Sex Transm Dis, 1997. **24**(5): p. 247-50.

74. Deguchi, T., et al., *Quinolone-resistant Neisseria gonorrhoeae: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(4): p. 1020-3.
75. Chaudhry, U., et al., *Mutation patterns in gyrA and parC genes of ciprofloxacin resistant isolates of Neisseria gonorrhoeae from India*. Sex Transm Infect, 2002. **78**(6): p. 440-4.
76. Su, X. and I. Lind, *Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in Neisseria gonorrhoeae strains isolated in Denmark from 1995 to 1998*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(1): p. 117-23.
77. Hagman, K.E., et al., *Resistance of Neisseria gonorrhoeae to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system*. Microbiology, 1995. **141 (Pt 3)**: p. 611-22.
78. Acevedo, A., *Efujo activo de antibióticos mediado por el sistema MtrC-MtrD-MtrE en Neisseria gonorrhoeae*, in *Catedra de Microbiología*. 2004, Tesis de Doctorado. Facultad de Química de la Universidad de la República: Montevideo, Uruguay.
79. Ingold, A., *Mutaciones en MtrD y fluoroquinolonas*, in *Microbiología Clínica*. 2010, Tesina de grado. Facultad de Química de la Universidad de la República: Montevideo, Uruguay.
80. Porta, M.S., et al., *A dictionary of epidemiology*. 5th ed. 2008, Oxford: Oxford University Press. xxiv, 289 p.
81. Hunter, P.R. and M.A. Gaston, *Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(11): p. 2465-6.
82. Tam, M.R., et al., *Serological classification of Neisseria gonorrhoeae with monoclonal antibodies*. Infect Immun, 1982. **36**(3): p. 1042-53.
83. Unemo, M., et al., *Molecular epidemiology of Neisseria gonorrhoeae: sequence analysis of the porB gene confirms presence of two circulating strains*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(10): p. 3741-9.
84. Selander, R.K., et al., *Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics*. Appl Environ Microbiol, 1986. **51**(5): p. 873-84.
85. Lau, Q.C., V.T. Chow, and C.L. Poh, *Differentiation of Neisseria gonorrhoeae strains by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of outer membrane protein IB genes*. Genitourin Med, 1995. **71**(6): p. 363-6.
86. Thompson, D.K., et al., *A typing system for neisseria gonorrhoeae based on biotinylated oligonucleotide probes to PIB gene variable regions*. J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1652-60.
87. O'Rourke, M., et al., *Opa-typing: a high-resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoea*. Mol Microbiol, 1995. **17**(5): p. 865-75.
88. Zak, K., et al., *Antigenic variation during infection with Neisseria gonorrhoeae: detection of antibodies to surface proteins in sera of patients with gonorrhoea*. J Infect Dis, 1984. **149**(2): p. 166-74.
89. Martin, I.M., et al., *Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area*. J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1497-505.
90. Chisholm, S.A., et al., *Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone*. Euro Surveill, 2013. **18**(3).
91. Brown, W.J., *Modification of the rapid fermentation test for Neisseria gonorrhoeae*. Appl Microbiol, 1974. **27**(6): p. 1027-30.
92. Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. 1988: John Wiley & Sons.

93. Watson, B., Bell, Gann, Levine, Losick, *Biología Molecular del Gen*, ed. edición. 2005: Editorial Panamericana.
94. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
95. CLSI, C.a.L.S.I., *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. 2012.
96. Morse, S.A., et al., *Gonococcal strains from homosexual men have outer membranes with reduced permeability to hydrophobic molecules*. Infect Immun, 1982. **37**(2): p. 432-8.
97. Unemo, M., et al., *Molecular typing of Neisseria gonorrhoeae isolates by pyrosequencing of highly polymorphic segments of the porB gene*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 2926-34.
98. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
99. Biswas, G.D., et al., *Factors affecting genetic transformation of Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol, 1977. **129**(2): p. 983-92.

7. ANEXOS

7.1 SECUENCIACIÓN DE ADN DE CEPAS QNRG

| | | |
|------|---|-----|
| 0726 | -----NNNGNANN TG--C-----GTGG-ACA | 18 |
| 0925 | -----GNAGNGNNNNN--CAG-----GTGG-ACA | 21 |
| 0946 | -----GGGGNNNNNNNNGGN--NNN-----TTNG-ANA | 25 |
| 0704 | -----NNNNNCTT--GCG-----TGGA-ANA | 18 |
| 0808 | -----ANNNNN TN--TNG-----NTGG-ACA | 18 |
| 0711 | -----GNNNNNNNNNTN--GNG-----TTGG-ACA | 22 |
| 0718 | -----ANTNACCN--NGA-----TAGANNA | 19 |
| 0820 | -----NNNNNNNG--NNG-----TTGGTACA | 19 |
| 1032 | -----GACNNNNNTTTG--GNN-----CTGG-ACA | 22 |
| 0715 | -----NGNNNNNNNTNG--GNG-----TTGG-ACA | 22 |
| 0606 | -----GNNNNNNNN TN--NNGCNGTTGGANNAN | 26 |
| 0931 | -----GNNNNGNTTG--TNG-----GGAGACA | 20 |
| 0703 | -----NNGNNNNN--NNN-----NGG-ACA | 17 |
| 0708 | -----CTNNNCCTGC--AGA-----TNG-ACA | 19 |
| 0707 | -----NNNNNNNNNTNT--GNGTT--NGG-ACA | 25 |
| 0716 | -----NNNNNTCTGGNGT-----TGG-ACA | 20 |
| 0929 | -----GGGNANN--NGT-----TGG-ACA | 16 |
| 0714 | -----TNGNNTGNGC-CAGC-----TTGN-ACC | 21 |
| PorB | GGCTTCAAAGGCCAAGAAGACCTCGGCAACGGCCTGAAGGCCGTTTGGCAG-TTGGAAACA | 239 |
| 0421 | -----NNNNGNTTGGNGT-----TGGACA | 19 |
| 0520 | -----NTAGNNNGGGCA-----GTGGACA | 20 |
| 0521 | -----AGNNNNNTNNGNAG-----TTGGACA | 21 |
| 0522 | -----GGGGNCCNMGNG-----TGGGACA | 20 |
| PorA | -----CGGCCTGAAAGCCATTGGCAGT-----TGGAAACA | 30 |
| 0726 | -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT | 77 |
| 0925 | -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCGGNTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT | 80 |

```

0946 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 84
0704 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 77
0808 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 77
0711 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 81
0718 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 78
0820 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGNNGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 78
1032 -AGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGNNGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 81
0715 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGNTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 81
0606 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 85
0931 -GGCGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCNGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 79
0703 -CGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 76
0708 -TGTGNCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 78
0707 -GGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 84
0716 -CGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGNTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 79
0929 -TGCGCCTCCGTCGCCGGCGCTAACAGCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 75
0714 -GGTGCNCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGNNGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 80
PorB AGGTGCCTCCGTCGCCGGCACTAACACCCGGCTGGGGCAACAAACAATCCTTCGTCCGGCTT 299
0421 AA--GCCTACGTACGCGGTAATAAGAAGGCTGGGGCAGCCCAATCCTTCATCGGTTT 77
0520 AA--GCCTACGTACGCGGTAATAAGAAGGNTGGGGCAGCCCAATCCTTCATCGGTTT 78
0521 AA--GCCTACGTACGCGGTAATAAGAAGGNTGGGGCAGCCCAATCCTTCATCGGTTT 79
0522 AA--GCCTACGTACGCGGTAATAAGAAGGNTGGGGCAGCCCAATCCTTCATCGGTTT 78
PorA AAAAGCCTACGTACGCGGTAATAAGACAGGCTGGGGCAACCCCAATCCTTCATCGGTTT 90
* * * * *
0726 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 137
0925 GAAGGGCGGCTTCGGTATCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 140
0946 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 144
0704 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCTCCTGAAAAACACCAA 137
0808 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 137
0711 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 141
0718 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 138
0820 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 138
1032 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 141
0715 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 141
0606 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 145
0931 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCGG 139
0703 GAAAGGCGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCGG 136
0708 GAAAGGCGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCGG 138
0707 GAAAGGCGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCGG 144
0716 GAAAGGNGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCGG 139
0929 GAAGGGCGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCTCCTGAAAAACACCGG 135
0714 GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGNNGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCAA 140
PorB GAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACCGG 359
0421 GAAAGGCGGCTTCGGTAAAGTGCGCGTCGGCCATTTGAACAACATCCTGAAAGACACCGA 137
0520 GAAAGGCGGCTTCGGTAAAGTGCGCGTCGGCCATTTGAACAACATCCTGAAAGACACCGA 138
0521 GAAAGGCGGCTTCGGTAAAGTGCGCGTCGGCCATTTGAACAACATCCTGAAAGACACCGA 139
0522 GAAAGGNGGCTTCGGTAAAGTGCGCGTCGGCCATTTGAACAACATCCTGAAAGACACCGA 138
PorA GAAAGGCGGCTTCGGTAAAGTGCGCGTCGGCCGTTTGAACAGCCTCCTGAAAGACACCGG 150
* * * * *
0726 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 196
0925 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 199
0946 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCA 203
0704 GGACAACGTCAANG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 196
0808 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 196
0711 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 200
0718 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 197
0820 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 197
1032 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 200
0715 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCANCG 200
0606 GGACAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGCG 204
0931 CGCCAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCAATGNGCTGGAAATCAGCG 198
0703 TGCCAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATATACCGGCGAGTTTCTGGAAATCAGCA 195
0708 TGCCAACGTCAATG-C TTGGGAATCCGGCAAATATACCGGCGAGTTTCTGGAAATCAGCA 197

```

```

0707 TGCCAACGTCAATG-CTTGGGAATCCGGCAAATATACCGGCGAGTTTCTGGAAATCAGCA 203
0716 TGCCAACGTCAATG-CTTGGGAATCCGGCAAATATACCGGCGAGTTTCTGGAAATCAGCA 198
0929 TGCCAACGTCAATNGCTTGGGAATCCGGCAAATATACCGGCGAGTTTCTGGAAATCAGCA 195
0714 GGACAACGTCAATG-CTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCANGC 199
PorB CGCCAACGTCAATG-CTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCAATGTGCTGGAAATCAGCG 418
0421 ---CGGCTTCAATC-CTTGGGAG---GGTAAA-----AGCTACTATTTGGGTTTAAGCA 184
0520 ---CGGCTTCAATC-CTTGGGAG---GGTAAA-----AGCTACTATTTGGGTTTAAGCA 185
0521 ---CGGCTTCAATC-CTTGGGAG---GGTAAA-----AGCTACTATTTGGGTTTAAGCA 186
0522 ---CGGCTTCAATC-CTTGGGAG---GGTAAA-----AGCTACTATTTGGGTTTAAGCA 185
PorA ---CGGCTTCAATC-CTTGGGAG---GGTAAA-----AGCTACTATTTGGGTTTAAGCA 197
      * * * * *
0726 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 256
0925 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 259
0946 NAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 263
0704 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 256
0808 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 256
0711 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 260
0718 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 257
0820 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 257
1032 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACNCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 260
0715 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 260
0606 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 264
0931 GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 258
0703 AAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 255
0708 AAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 257
0707 AAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 263
0716 AAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 258
0929 AAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 255
0714 GAATGGNCAAACGGGAACACCGCTNCTGTCCGTACNCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 259
PorB GAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 478
0421 ACATTGCCCAACCCGAANAACGCCACGTTTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 244
0520 ACATTGCCCAACCCGAANAACGCCACGTTTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 245
0521 ACATTGCCCAACCCGAANAACGCCACGTTTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 246
0522 ACATTGCCCAACCCGAANAACGCCACGTTTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 245
PorA ACATTGCCCAACCCGAAGAACGCCACGTTTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCCG 257
      * * * * *
0726 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 313
0925 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCNCCATAAGATAAATTCAGACTCAAA---CGGCGAAT 316
0946 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCNCCATAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 320
0704 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 313
0808 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 313
0711 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 317
0718 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 314
0820 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAANATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 314
1032 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACNCACTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 317
0715 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCNCCATAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 317
0606 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 321
0931 GCTTCAGTGGCAGTGTACAATACGCACCTAAAGACAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 315
0703 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 312
0708 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 314
0707 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 320
0716 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 315
0929 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 312
0714 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 316
PorB GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGACAATTCAGGCTCAAA---CGGCGAAT 535
0421 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTGCCTAACGACAATTCGGGCAAAAATCGCAGCGAAT 304
0520 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTGCCTAACGACAATTCGGGCAAAAATCGCAGCGAAT 305
0521 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTGCCTAACGACAATTCGGGCAAAAATCGCAGCGAAT 306
0522 GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTGCCTAACGACAATTCGGGCAAAAATCGCAGCGAAT 305
PorA GCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGTGCCTAACGACAATTCGGGCAAAAATCGCAGCGAAT 317
      * * * * *

```

0726 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 373
 0925 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 376
 0946 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 380
 0704 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 373
 0808 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 373
 0711 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 377
 0718 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 374
 0820 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 374
 1032 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 377
 0715 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 377
 0606 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 381
 0931 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 375
 0703 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 372
 0708 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 374
 0707 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 380
 0716 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 375
 0929 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 372
 0714 CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 376
 PorB CTTACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGT 595
 0421 CTTACCATGCAGGCTTCAACTACAAAAACAGCGGCTTCTTCGTGCAATATGCCGGCTCCT 364
 0520 CTTACCATGCAGGCTTCAACTACAAAAACAGCGGCTTCTTCGTGCAATATGCCGGCTCCT 365
 0521 CTTACCATGCAGGCTTCAACTACAAAAACAGCGGCTTCTTCGTGCAATATGCCGGCTCCT 366
 0522 CTTACCATGCAGGCTTCAACTACAAAAACAGCGGCTTCTTCGTGCAATATGCCGGCTCCT 365
 PorA CTTACCATGCAGGCTTCAACTACAAAAACAGCGGCTTCTTCGTGCAATATGCCGGCTTCT 377
 ***** * ***** ***** **** ***** ***** ***** ***** *

0726 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGANAATCAATTTTATAGNGTCC 433
 0925 TCCAAAGATACGGCGAAGGCNCTAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCC 436
 0946 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCC 440
 0704 TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCC 433
 0808 TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAATCAACTTTATAGTGTCC 433
 0711 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCC 437
 0718 TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCC 434
 0820 TCCAAANATACGTCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCC 434
 1032 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCC 437
 0715 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGANAATCAATTTTATAGTGTCC 437
 0606 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGANAA---ATTTTATAGTGTCC 438
 0931 TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATGATCAAGCTTATAGTGTCC 435
 0703 TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTATCC 432
 0708 TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTATCC 434
 0707 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTATCC 440
 0716 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTATCC 435
 0929 TCCAAANATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTATCC 432
 0714 TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCNAATACGATA---AATTTATNNTGNCC 433
 PorB TCCAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATGGTCAAACTTATAGTATCC 655
 0421 ATAAAAGACAT-----AATT---ACACGAC----- 386
 0520 ATAAAAGACAT-----AATT---ACACGAC----- 387
 0521 ATAAAAGACAT-----AATT---ACACGAC----- 388
 0522 ATAAAANACAT-----AATT---ACACGAC----- 387
 PorA ATAAAAGACAT-----AGT---GGTTGTCCG----- 401
 * * * * * * * *

0726 CCAGCCTGNTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACNACAATAATG 493
 0925 CCGGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACNACAATAATG 496
 0946 CCAGCCTGCTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACNACAATAATG 500
 0704 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACNACAATAATG 493
 0808 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATG 493
 0711 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATG 497
 0718 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATG 494
 0820 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACNACAATAATG 494
 1032 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACNACAATAATG 497
 0715 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACNACAATAATG 497
 0606 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATG 498
 0931 CCAGTCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATG 495

0703 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTTCGGCGGTTACGACAATAATG 492
0708 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTTCGGCGGTTACGACAATAATG 494
0707 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTTCGGCGGTTACGACAATAATG 500
0716 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTTCGGCGGTTACGACAATAATG 495
0929 CCAGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTTCGGCGGTTACNACAATAATG 492
0714 CCCCCCTGTTTGTGAAAAANTGCNGNNTCACCGNTTGGTGGGCGGNNNNNACAATAATG 493
PorB CCAGTCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTAGGCGGTTACGACAATAATG 715
0421 -----TGANAACACCAGGTTACCGTTTGGTTCGGCGGTTACGACCATGATG 433
0520 -----TGANAACACCAGGTTACCGTTTGGTTCGGCGGTTACNACCATGATG 434
0521 -----TGANAACACCAGGTTACCGTTTGGTTCGGCGGTTACGACCATGATG 435
0522 -----TGANAACACCAGGTTACCGTTTGGTTCGGCGGTTACNACCATGATG 434
PorA -----TGCGGAATACG-----CACCGTTTGGTTCGGCGGTTACGACCATGATG 443
** ** ***** ** ** **

0726 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 552
0925 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 555
0946 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCTT 559
0704 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 552
0808 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 552
0711 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 556
0718 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 553
0820 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 553
1032 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 556
0715 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 556
0606 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGCGT 557
0931 CCCTGTACGTTTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAGCAAAGAGG 554
0703 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGAGT 551
0708 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGAGT 553
0707 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGAGT 559
0716 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGAGT 554
0929 CCCTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAACATGGAGT 551
0714 ATNTGTNGGCCTCCTNNGCNGCNNAACAACAAGATGCCNNATTGTTGGGGAANATGGNGG 553
PorB CCCTGTACGTTTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGT-ATGGAGCAATGAGC 774
0421 CCCTGTACGTTTCCGTAGCCGTACAGCAACAAGACGCGAAATTGACTTGGAGCAACGA-- 491
0520 CCCTGTACGTTTCCGTAGCCGTACAGCAACAAGACGCGAAATTGACTTGGAGCAACGA-- 492
0521 CCCTGTACGTTTCCGTAGCCGTACAGCAACAAGACGCGAAATTGACTTGGAGCAACGA-- 493
0522 CCCTGTACGTTTCCGTAGCCGTACAGCAACAAGACGCGAAATTGACTTGGAGCAACGA-- 492
PorA CCCTGTACGTTTCCGTAGCCGTACAGCAACAAGACGCGAAATTGACTTGGCGCAACGA-- 501
*** ** * * ***** ** **** ** * *

0726 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 610
0925 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 613
0946 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 617
0704 G-CTAATTCNCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 610
0808 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 610
0711 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 614
0718 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 611
0820 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 611
1032 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 614
0715 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 614
0606 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCTGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 615
0931 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAA-CCGAAGTTGCCGCTACCGN-GGCATACCGTTTCGGCA 611
0703 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 609
0708 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCG-CA 610
0707 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 617
0716 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 612
0929 G-CTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 609
0714 GGNTNNTTCNCNCACTCTTANACCNANGTNGTGTACCNCCGNCNTANNNTTTCNNCA 613
PorB G-GTAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 832
0421 ---TAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 547
0520 ---TAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 548
0521 ---TAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 549
0522 ---TAATTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGTTTCGGCA 548

```

PorA      ---TAATTTCGCACAACCTCTCAAACCGAAGTTGCCGCTACCGC-GGCATACCGCTTCGGCA 557
          *   *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
0726      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 666
0925      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 669
0946      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 673
0704      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATANTGCA 667
0808      ACTTAAACGCCCCGCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 667
0711      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 670
0718      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 667
0820      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 667
1032      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 670
0715      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 670
0606      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GT----- 661
0931      ATGTAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GT--ATAGTGCA 665
0703      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 665
0708      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 665
0707      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 673
0716      ACTTAAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 668
0929      ACTTAAACGCCCCGCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 666
0714      ACTNANNNNCCC-CCNNTTCTTNNGNCCACNGGCTTCAAAGGNTNNTGNTTNTTANTGNA 672
PorB      ATGTAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 888
0421      ACGTAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 603
0520      ACGTAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 604
0521      ACGTAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 605
0522      ACGTAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 604
PorA      ACGTAACGCCCC-GCGTTTCTTACGCC-ACGGCTTCAAAGGCTCT--GTTTCATAGTGCA 613
          *   *   *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

0726      GACTACGACAATACTT-----TAAGGGGGGGGNGG----- 696
0925      GACTACGACAATATTT-----NNGGGGNGGGGGGATGCNNTTNTNCCNTATACTTT 720
0946      GACTACNACAATANTT-----ATG----- 692
0704      NANTACGACAATATNN-----AN----- 685
0808      GACTACGACAATACTN-----GGGGTTTTTTTTGGGGGAGTAATNTTTNGNNTNCTAT 721
0711      GACTACGACAATACTT-----A-----TGACCA----- 693
0718      GACTACGACAATACTTATGACNNGGNKNNNNNNNNNNNGNNA----- 710
0820      GACTACGACAATACTTATGCAGGNNKKNNNNNNGGANAATCTGAAANNGGNCCNT 727
1032      GACTACGACAATACTTATG-----ACCAANGGGNNNNNNNGG----- 707
0715      GACTACNACAATACTT----- 686
0606      -----TCATAGTG-----CAGACTACG 678
0931      GAC-ACGACN-TACTA-----TGACNNGGGGNGTNTNANNNGACCNCNNCTTNN 716
0703      GACTACGACAATACTA-----GNGGGGGGNNNNNGGGGGGGGGGAAATCGCCANCC 717
0708      GACTACGACAATACT----- 680
0707      GACTACGACAATACT----- 688
0716      GACTACGACAATACT-----T----- 684
0929      GACTACGACAATATNC-----GAG-----TGGTGGGGGGGGGTTCTCGTCCCGTT 712
0714      GACNACNACAANATTN----- 688
PorB      AACCACGACAATACTT----- 904
0421      GATAACGACAATACTT----- 619
0520      GATAACGACAATACTT----- 620
0521      GATAACGACAATACTT----- 621
0522      GATAACGACAATACTT----- 620
PorA      GATAACGACAATACTT----- 629

0726      -----GGGGGGGAAA----- 707
0925      TTGGNTTTTGTTGGGNGNGAAAAAAACCCT-----TGGCAC'TGTTNGTNC 766
0946      -----
0704      -----
0808      TANGCC----NTGGGCNNAT'AAAAGC-----GGGGGGGTATTNT 758
0711      -----ANGGGNTTGTCCGA----- 707
0718      -----
0820      GGAGAN----CCNGGGGNGNNAAAAACAGCG-----GGGGGNNTTANTTT 769
1032      -----

```

```

0715 -----
0606 ---ACAATACTTTGTGNGT'TTNT----- 699
0931 GNGCACNACNCNNMNTNTNTT'NNGNANNA-T-----TATNNNTAAGAGCNC 761
0703 CCGGCC----CCCCCTCTGCANAAACNTT'TGTNTTTTAAACCCCCCNCNGGGGGT 773
0708 -----
0707 -----
0716 ATG-----ACCANGNGNN--TN 699
0929 NTGGTT---CCTGGGGTGNAAAAAA-----ACCGGGGGGGT 750
0714 -----
PorB -----
0421 -----
0520 -----
0521 -----
0522 -----
PorA -----

0726 -----
0925 CCCCCCTTTNGTCCCGNATAAAATTTACCCGNGNGAAGTTTCTTNNAGGGNTTTTT 826
0946 -----
0704 -----
0808 GTGGAAGAAGNTTCCCGANACNNAC-ATC-GNTGGAGTNT--GTANAGCAAANACCC 814
0711 -----
0718 -----
0820 NCCAAACAGNTTGGCGNGNNNNCACCTNTN-GTTTGAGNTTGGTGAATTAACNGCCC 828
1032 -----
0715 -----
0606 ---TTNNNNCCGG----- 710
0931 NTCTNNATNTNCGNNCGNNCNCNTGTGANGNNNGNGNNANTGNNNNNCCNNNNCN 821
0703 TGTNTNAGGAAAGGCNANNATGANANTNCGCCGAAANGANN'TCCCTGTTTTNAAAAAGTT 833
0708 -----TATGACANNNGNNNNNNNNNNNN----- 704
0707 -----TATGAC-----CAAGT----- 699
0716 NNNNNGGAAA----- 709
0929 TTTTTNAAAAANNGTCCCCGGGGNCCATCGATCGCAATCTAATTGCCTAAAAAGCC 810
0714 -----
PorB -----ATGACCAAGTGGTTGTCGGTGCGGAATACGACTTCTCCAAACGCAC 950
0421 -----
0520 -----
0521 -----
0522 -----
PorA -----

0726 -----
0925 TTTCC---NAAAGNCGCGGGNGTNTTNTGNAAA--AGNGGNNTGNGT'TTTTNGNG 879
0946 -----
0704 -----
0808 GNTTC--TAACAATTTGTNTCTGTNTNTTTT-----GCGGNC-CGGAGCCNAAGGG- 863
0711 -----
0718 -----
0820 TTTTCCATACAAATTTGGNATCTGGTTNTTGT-----NCGGCTACGAAGCNTNNNGGG 881
1032 -----
0715 -----
0606 -----
0931 NTTTTNNNNC'NTGANNTGCGNCGANNACTN'NNNN--NGAGGANNNNNNC'NNGTGTGA 878
0703 GTCCCTTTNGNNANGNGGCNCNGGGANNCCNGGAAAANNGGTTTTAGGANNNTNNNNN 893
0708 -----
0707 -----GGTTGTCGG 708
0716 -----
0929 NTTTTTTGNGNCNNC'NNCCGGNGGNTNTTTT--TTTCCCCCAACCACNNAANT 867
0714 -----
PorB TTCT-----GCCTTGGTTTCTGCCG----- 970
0421 -----
0520 -----

```



```

0521 -----
0522 -----
PorA -----

0726 -----
0925 ATATNNACNNNN--ANTGACAA--NCAANTNNGGGGNNNAAAN-----AANAAATNGN 928
0946 -----A--CCAAGTGGG-----TTGT 706
0704 -----
0808 --ATTTGNGNTN-TACCCCCTA--C-AACCNGNGAAATAG-ANTTTTTCANANAN--GG 913
0711 -----
0718 -----
0820 GCATTTATGGNCCTANCNCCGA--CCAACCGGNAAATNGCAGTTTTTTCANNAACAGG 938
1032 -----
0715 -----ATGACC-----AANGGG-----TTGT 702
0606 -----
0931 NCNTTTNAGNNAGAGCNCNNAGATNTANNNCGGNAGTGNTNA-----ANGNNNNCG 932
0703 AGANNTTNCNCNNGNTTNTTNANNNNCTNGCNNNCGAGNNAGGATN----- 939
0708 -----
0707 -----
0716 -----
0929 AGNTTTTTTCTNTAATNGGCGGGGAGAGNCAGAAGAGNANAGANNGAAGNNACNNTTTN 927
0714 -----NTGACNACGGGGN-----GG 703
PorB --GCTGGTTGCAAGAAGGCAAAGGCGCAGACAAAATCGTATCGACTGCCAGCGCCGTCGT 1028
0421 -----ACGACCANNKKNK-----KN 634
0520 -----ACGACCANNTGKK-----KN 635
0521 -----ACGACCANNGGNN-----GN 636
0522 -----ACGACCAANGGGN-----TT 635
PorA -----ACGACCAGTTACA-----CG 644

0726 -----
0925 NNNNNANN'TTNTNAAANNNNN----- 950
0946 CGGNA----- 711
0704 -----
0808 CGGGGGGACATAAAAANTTNACAATGNTANTCAATT 950
0711 -----
0718 -----
0820 CNGGGGGNNCNA----- 950
1032 -----
0715 CNGGNA----- 708
0606 -----
0931 TTTNNNNNCTCANGGATN----- 950
0703 ----CTNNNAANANA----- 950
0708 -----
0707 -----
0716 -----
0929 TTTGTNTCTCNNANCNCTGNACA----- 950
0714 NNNGGNNGNNN----- 714
PorB TCTGCGCCACAAATTCTAA----- 1047
0421 NNNNNNGGNA----- 645
0520 NGNNNNNGNA----- 646
0521 NNNNNNGGNA----- 646
0522 NNNNGGNA----- 643
PorA ACTGAGAAACACCAGGTT----- 662

```

7.2 SECUENCIA DE PROTEINAS EN LAS CEPAS QNGR

PORTADORAS DE PORB IB

0703 -----TRASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 41
 0716 -----RASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 40
 0906 -----TCASVAGANS GWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 41
 0929 -----TCASVAGANS GWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 41
 0708 -----TCASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 41
 1022 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 41
 0712 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 41
 0707 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRVGSLSNPLKNTG 40
 0606 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 40
 0717 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 41
 0925 -----WTGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 42
 1014 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 41
 0704 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 41
 0808 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 41
 0711 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 40
 0718 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 40
 0726 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 40
 0820 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 40
 0715 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 40
 1032 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 41
 0946 -----GASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 40
 0952 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTK 41
 0931 -----TGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTG 41
 Fa1090 GFKGQEDLGNGLKAVWQLEQGASVAGTNTGWGNKQSFVGLKGGFGTIRAGSLNSPLKNTG 120
 *****:*.***** ** .*****

0703 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0716 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0906 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0929 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0708 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 1022 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0712 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0707 ANVNAWESGKYTGEFLEISKMARREHRYLSARYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0606 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0717 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0925 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 102
 1014 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0704 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0808 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0711 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0718 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0726 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0820 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0715 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 1032 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0946 DNVNAWESGKFTGDVLEISMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 100
 0952 DNVNAWESGKFTGDVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 0931 ANVNAWESGKFTGNVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 101
 Fa1090 ANVNAWESGKFTGNVLEISGMAKREHRYLSVRYDSPEFAGFSGSVQYAPKDNSGSGNGESY 180
 *****:*.***** ** .*****

0703 HVGLNLRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDSQYYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
 0716 HVGLNLRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDSQYYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
 0906 HVGLNLRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDSQYYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
 0929 HVGLNLRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDSQYYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
 0708 HVGLNLRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDSQYYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
 1022 HVGLNLRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDSQYYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
 0712 HVGLNLRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDSQYYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161

0707 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYD**SQYYS**IPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
0606 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYD**-K**FYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 159
0717 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYD**-K**FYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
0925 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSGLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 162
1014 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSGLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
0704 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
0808 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQLYSVP SLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
0711 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
0718 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
0726 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
0820 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRY**V**EGTKKIEYDNQFYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
0715 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 160
1032 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
0946 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSL**V**VEKLVHRLVGGYDNNAL 160
0952 HVGLNYRNGGFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYDNQFYSVPSL**G**LFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
0931 HVGLNY**QNS**GFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYD**DQA**YS**M**PSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 161
Fa1090 HVGLNY**QNS**GFFAQYAGLFQRYGEGTKKIEYD**GQ**TYSIPSLFVEKLVHRLVGGYDNNAL 240
*****:*.***** : ** *.*:*****

0703 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 221
0716 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSA---- 216
0906 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 221
0929 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSA---- 217
0708 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGF**X**----- 211
1022 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 221
0712 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 221
0707 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 220
0606 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSV----- 212
0717 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDX 220
0925 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 222
1014 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSY**X**----- 207
0704 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSA---- 217
0808 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 221
0711 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 220
0718 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSA---- 216
0726 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSA---- 216
0820 YASVAAQQQDAKLYG**K**WRANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 220
0715 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 220
1032 YASVAAQQQDAKLYGTW**R**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 221
0946 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 220
0952 YASVAAQQQDAKLYGTW**S**ANSHNSQTEVAATAAYRFGNLT**P**RVSYAHGFKGSVHSADYDN 221
0931 Y**V**SVAAQQQDAKLYG**AKR**ANSHNSQTEVAATAAYRFGN**V**T**P**RVSYAHGFK**T****V**----- 214
Fa1090 Y**V**SVAAQQQDAKLYG**AMS**NSHNSQTEVAATAAYRFGN**V**T**P**RVSYAHGFK**T****V****D****S**AN**H**D**N** 300
*.****** :*****

7.3 SECUENCIA DE PROTEINAS EN LAS CEPAS QNGR PORTADORAS DE PORB IA

0421 -----
0521 -----
0522 -----
REFERENCIA MADVTLYGTIKAGVETSRSVAYHGAQADRVKTTTEIADLGSKIGFKGQEDLGNGLKAIWQ 60
0520 -----
Fa19 -----

```

0421      ---KAYVSGTKEGWGSRQSF IGLKGGFGKVRVGHLNNILKDTDGFNPWEGKSYYLGLSNI 57
0521      ---KAYVSGTKEGWGSRQSF IGLKGGFGKVRVGHLNNILKDTDGFNPWEGKSYYLGLSNI 57
0522      ---KAYVSGTKEGWGSRQSF IGLKGGFGKVRVGHLNNILKDTDGFNPWEGKSYYLGLSNI 57
REFERENCIA  LEQKAYVSGTKEGWGSRQSF IGLKGGFGKVRVGHLNNILKDTDGFNPWEGKSYYLGLSNI 120
0520      ---KAYVSGTKEGWGSRQSF IGLKGGFGKVRVGHLNNILKDTDGFNPWEGKSYYLGLSNI 57
Fa19      ----AYVSGTDTGWGNRQSF IGLKGGFGKVRVGR LNSV LKDTG GFNPWEGKSYYLGLSNI 56
          ***** . *** . *****:***.:***. *****

```

```

0421      AQPEERHVSRYDSPEFAGFSGSVQYVPNDNSGKNRSESYHAGFNYKNSGFFVQYAGSYK 117
0521      AQPEERHVSRYDSPEFAGFSGSVQYVPNDNSGKNRSESYHAGFNYKNSGFFVQYAGSYK 117
0522      AQPEERHVSRYDSPEFAGFSGSVQYVPNDNSGKNRSESYHAGFNYKNSGFFVQYAGSYK 117
REFERENCIA  AQPEERHVSRYDSPEFAGFSGSVQYVPNDNSGKNRSESYHAGFNYKNSGFFVQYAGSYK 180
0520      AQPEERHVSRYDSPEFAGFSGSVQYVPNDNSGKNRSESYHAGFNYKNSGFFVQYAGSYK 117
Fa19      AQPEERHVSRYDSPEFAGFSGSVQYVPNDNSGKNHSESYHAGFNYKNSGFFVQYAGFYK 116
          ***** *****:***** **

```

```

0421      RHNYTTEKHQVHRLVGGYDHDALYASVAVQQQDAKLTWSNDNSHNSQTEVAATAAYRFGN 177
0521      RHNYTTEKHQVHRLVGGYDHDALYASVAVQQQDAKLTWSNDNSHNSQTEVAATAAYRFGN 177
0522      RHNYTTEKHQVHRLVGGYDHDALYASVAVQQQDAKLTWSNDNSHNSQTEVAATAAYRFGN 177
REFERENCIA  RHNYTTEKHQVHRLVGGYDHDALYASVAVQQQDAKLTWSNDNSHNSQTEVAATAAYRFGN 240
0520      RHNYTTEKHQVHRLVGGYDHDALYASVAVQQQDAKLTWSNDNSHNSQTEVAATAAYRFGN 177
Fa19      RHYTTEKHQVHRLVGGYDHDALYASVAVQQQDAKLTWRNDNSHNSQTEVAATAAYRFGN 176
          ** . ***** *****

```

```

0421      VTPRVSYAHGFKGSVYDADNDNTX----- 201
0521      VTPRVSYAHGFKGSVYDADNDNTYD----- 202
0522      VTPRVSYAHGFKGSVYDADNDNTYDQ----- 203
REFERENCIA  VTPRVSYAHGFKGSVYDADNDNTYDQVVVGAEYDFSKRTSALVSAGWLQRKGTEKFBVAT 300
0520      VTPRVSYAHGFKGSVYDADNDNTYD----- 202
Fa19      VTPRVSYAHGFKGSVYDADNDNTYDX----- 202
          *****

```

```

0421      -----
0521      -----
0522      -----
REFERENCIA  VGGVGLRHKF 310
0520      -----
Fa19      -----

```

7.4 ALINEACIÓN DE ALELOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GENOGRUPOS

7.4.1 ALINEACION TBP 29 VS 1109

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment

```

tbp1109    CGTCTGAAAACAAGCTGACCACGGTTTTGGATGCGGTTGAATTGACACCAGACGGCAAGA
tbp29      CGTCTGAAAACAAGCTGACCACGGTTTTGGATGCGGTTGAATTGACACCAGACGGCAAGA
          *****

tbp1109    AAATCAAAGATCTCGACAACCTTCAGCAACGCCGCCCAACTGGTTGTGCGACGGCATTATGA
tbp29      AAATCAAAGATCTCGACAACCTTCAGCAACGCCGCCCAACTGGTTGTGCGACGGCATTATGA
          *****

tbp1109    TTCCGCTCCTGCCACCGAAAGCGGGAACGGTCAGGCAGATAAAGGTAAAAACGGTGGAA

```

```

tbp29      TTCCGCTCCTGCCACCGAAAGCGGGAACGGTCAGGCAGATAAAGGTGAAAACGGCAAAA
*****.*****.***

tbp1109    CAGACTTTACCTACACAACAACCTACACGCCGAAAAGCGATGAAAAAGACACCCAAACAG
tbp29      CAGCCTTTATCTACGAAACAACCTACACGCCGAAAAGTGATAAAAAAGACACCCAAACAG
***.***.***.*****.***.*****

tbp1109    GTATGGCGACCAATGGCGTGCAAACCGTTTCAAATACGGCAGGCGGCACAAGTGGCAAAA
tbp29      GTATGGCGACCAATGGCGTGCAAACCGTTTCAAATACGGCAGGCGGCACAAGTGGCAAAA
*****.*****

tbp1109    CAAAAACCCATTATAAAGTCCAAGTCTGCTGTTCCAACCTCAATTATCTGAAATACGGGC
tbp29      CAAAAACCCATTATAAAGTCCAAGCCTGCTGTTCCAACCTCAATTATCTGAAATACGGGC
*****.*****

tbp1109    TGCTGACACGTGAAAACAACAATTCCGTGA
tbp29      TGCTGACGCGCAAAAACAGCGAATCCGCGA
*****.***.***.***.***.***

```

7.4.2 ALINEACION POR 262 VS 3176 VS 3178

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment

```

3178      TTGAAGGGCGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
262       TTGAAGGGCGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
3176      TTGAAGGGCGGCTTCGGCACCATCCGCGTCGGCAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
*****.*****

3178      GGTGCCAACGTCAATGCTTGGGAATCCGGCAAATATACCGCGAGTTTCTGGAAATCAGC
262       GGTGCCAACGTCAATGCTTGGGAATCCGGCAAATATACCGCGAGTTTCTGGAAATCAGC
3176      GGTGCCAACGTCAATGCTTGGGAATCCGGCAAATATACCGCGAGTTTCTGGAAATCAGC
*****

3178      AAAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
262       AAAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
3176      AAAATGGCCAGACGGGAACACCGCTACCTGTCCGCACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
*****

3178      GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
262       GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
3176      GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
*****

3178      TACCACGTTGGCTTGAAC TACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTT
262       TACCACGTTGGCTTGAAC TACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTT
3176      TACCACGTTGGCTTGAAC TACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTT
*****

3178      CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTTTCCCC
262       CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTATCCCC
3176      CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAATCGAATACGATAGTCAATATTATAGTACCCCC
*****:****

```

```

3178   AGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
262    AGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
3176   AGCCTGTTTGTGAAAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
*****

3178   CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGAGTGCCT
262    CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGAGTGCCT
3176   CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGAGTGCCT
*****

3178   AATTCGCACA
262    AATTCGCACA
3176   AATTCGCACA
*****

```

7.4.3ALINEACION POR 4 VS 905 VS 3036 VS 3167 VS 3180 VS 3181

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment

```

3167   TTGAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
3180   TTGAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
3181   TTGAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
3036   TTGAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
4      TTGAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
905    TTGAAGGGCGGCTTCGGTACCATCCGCGCCGGTAGCCTGAACAGCCCCCTGAAAAACACC
*****

3167   AAGGACAACGTC AATGCTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGC
3180   AAGGACAACGTC AATGCTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGC
3181   AAGGACAACGTC AATGCTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGC
3036   AAGGACAACGTC AATGCTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGC
4      AAGGACAACGTC AATGCTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGC
905    AAGGACAACGTC AATGCTTGGGAATCCGGCAAATTTACCGGCGATGTGCTGGAAATCAGC
****.*****

3167   GGAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
3180   A G AATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
3181   GGAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
3036   GGAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
4      GGAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
905    GGAATGGCCAAACGGGAACACCGCTACCTGTCCGTACGCTACGATTCTCCCGAATTTGCC
.*****

3167   GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
3180   GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
3181   GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
3036   GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
4      GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
905    GGCTTCAGCGGCAGCGTACAATACGCACCTAAAGATAATTCAGGCTCAAACGGCGAATCT
*****

3167   TACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTTC
3180   TACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTTC
3181   TACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTTC
3036   TACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTTC
4      TACCACGTTGGCTTGAACTACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTTC

```

```

905      TACCACGTTGGCTTGAAC TACCGAAACGGCGGCTTCTTCGCACAATACGCCGGCTTGTTCC
          *****

3167     CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAAATCGAATACGATA---AATTTTATAGTGTCCCC
3180     CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCCCC
3181     CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCCCC
3036     CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCCCC
4       CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCCCC
905     CAAAGATACGGCGAAGGCACTAAAAAAATCGAATACGATAATCAATTTTATAGTGTCCCC
          *****

3167     AGCCTGTTTGTGTAAGAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
3180     AGCCTGCTTGTGTAAGAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
3181     GCCTGTTTGTGTAAGAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
3036     GCCTGTTTGTGTAAGAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
4       AGCCTGTTTGTGTAAGAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
905     GCCTGTTTGTGTAAGAACTGCAAGTTCACCGTTTGGTCGGCGGTTACGACAATAATGCC
          .*****

3167     CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGCGTGCT
3180     CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGCTCTGCT
3181     CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGAGTGCT
3036     CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGCGTGCT
4       CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGCGTGCT
905     CTGTACGCCTCCGTAGCCGCACAACAACAAGATGCCAAATTGTATGGAACATGGCGTGCT
          *****

3167     AATTCGCACA ACT
3180     AATTCGCACA ---
3181     AATTCGCACA ---
3036     AATTCGCACA ---
4       AATTCGCACA ---
905     AATTCGCACA ---
          *****

```