

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Evolución de los casos de linfogranuloma venéreo en Madrid: mejoras en el diagnóstico y la epidemiología molecular para comprender la dinámica de selección y dispersión de nuevas variantes

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Martínez García

DIRECTORES

Juan Carlos Galán Montemayor
Rafael Cantón Moreno

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Evolución de los casos de linfogranuloma venéreo en Madrid:
mejoras en el diagnóstico y la epidemiología molecular para
comprender la dinámica de selección y dispersión
de nuevas variantes**

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por

Laura Martínez García

Directores

Dr. Juan Carlos Galán Montemayor

Dr. Rafael Cantón Moreno

Madrid, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Doctorado en Microbiología y Parasitología



TESIS DOCTORAL

**Evolución de los casos de linfogranuloma venéreo en Madrid:
mejoras en el diagnóstico y la epidemiología molecular para
comprender la dinámica de selección y dispersión
de nuevas variantes**

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por

Laura Martínez García

Directores

Dr. Juan Carlos Galán Montemayor

Dr. Rafael Cantón Moreno

Madrid, 2023

A mis padres

A Rubén

Agradecimientos

Después de este largo y difícil camino en el que he crecido como profesional y como persona, me quedo sobre todo con la gente maravillosa con la que he tenido la suerte de compartirlo.

A mis directores de tesis, Juan Carlos Galán y Rafael Cantón, por creer en mí desde el primer momento y por darme la oportunidad de realizar esta tesis. Habéis sido mi ejemplo de esfuerzo y perseverancia, gracias por transmitirme la ilusión de trabajar en la Microbiología.

A Mario. Gracias por dejarme seguir tus pasos, por guiarme siempre que lo he necesitado, por demostrarme tu apoyo y cariño.

A Chema. Si hay una persona imprescindible en esta tesis, ése eres tú. Gracias por tu paciencia y tu buena disposición, has conseguido que la filogenia sea un poco más fácil para mí.

A Conchi. Empezaste siendo una compañera de trabajo y ahora sé que he ganado una verdadera amiga. Trabajar contigo no ha podido ser más fácil, esta tesis es también gracias a ti.

A mis residentes mayores y pequeños, Ana “Rizos”, Ana Luisa, Adri, Claudio, Juande, Mari “Turquí”, “Irenoides”, Rubén, Lorena, María, Sergio, Lourdes, Manu, Amaya, Hugo, Anina y Carolina, por hacer de la residencia una de las etapas más bonitas de mi vida.

A María Gálvez, mi “mamma” microbiológica. Gracias por transmitirme esa energía y buen humor que hacen que todo parezca mucho más fácil.

A mis compañeras de investigación con las que he tenido la suerte de trabajar y que me han acompañado en este camino. A Mari “Galleta”, Desi, Ana Sofía, Carmen Turrientes, Blanca, Marta y Ainhize, gracias por tantos y tan buenos momentos juntas, tanto dentro como fuera del laboratorio. A Malkoa, porque su trabajo también está reflejado en esta tesis. Y no me puedo olvidar de mis gestoras preferidas, Ana Moreno, Esther Torrecilla y Carmen de la Vega, por prestarme su ayuda siempre.

A mis compañeros de pandemia (con el permiso de los demás) Fede, Chema y Joel, tres personas maravillosas que hicieron que los peores momentos ahora sean buenos recuerdos, no puedo estar más agradecida por ello. También a Melanie, por estar ahí siempre que lo he necesitado.

A Lucas y Dani. Gracias por todos los momentos vividos juntos, por sacarme una sonrisa en los peores momentos. No sabéis cuánto me alegro de haberos conocido y de que forméis parte de mi vida.

A todos los facultativos, técnicos, rotantes, personal de investigación y residentes con los que he compartido este camino. A mis compañeras del Centro Sanitario Sandoval, el Centro Montesa y el Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, ha sido un verdadero placer colaborar y trabajar con vosotras.

A mis padres, Javi y Loreto. Gracias por vuestro cariño cada día, por comprenderme y ayudarme a alcanzar todas las metas que me he propuesto, todo lo que soy es gracias a vosotros.

A mi yaya "Pamen". Porque el orgullo de una abuela vale más que cualquier cosa. Gracias por demostrármelo cada día.

A mi yaya Meri, mi yayo Fernando y al "Lolo". Porque siempre me demostrasteis vuestro cariño y sé que este momento sería un orgullo para vosotros.

A Rubén. La Microbiología hizo que nos conociéramos y no puedo ser más feliz por compartir mi vida contigo. Gracias por tu paciencia, comprensión y cariño cada día.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
LISTADO DE FIGURAS	5
LISTADO DE TABLAS	9
RESUMEN	11
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	17
1. ¿Qué es una infección de transmisión sexual?	17
2. Las ITS como problema de salud pública global.....	19
2.1. Epidemiología de las ITS.....	19
2.2. Importancia de las ITS	21
2.2.1. Impacto sobre salud sexual y reproductiva	21
2.2.2. Impacto socioeconómico	21
3. Aumento de la incidencia de las principales ITS	22
3.1. <i>Treponema pallidum</i>	22
3.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	24
3.3. <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
3.4. Genotipos invasivos de <i>C. trachomatis</i> . Linfogranuloma venéreo	26
3.5. Causas y cambios implicados en el aumento de las ITS.....	27
3.5.1. Cambios en los comportamientos sociales.....	27
3.5.2. El fenómeno del <i>chemsex</i>	29
3.5.3. Impacto de la movilidad de la población	31
3.5.4. Mejoras sanitarias: impacto de la profilaxis pre-exposición para el VIH	31
3.6. Consecuencias del incremento de las ITS	33
4. Estrategias para el control de las ITS.....	33
4.1. Prevención primaria de las ITS	35
4.1.1. Profilaxis pre y post-exposición	35
4.1.2. Vacunación.....	36
4.2. Prevención secundaria de las ITS	37
4.2.1. Detección precoz para evitar la transmisión de las ITS	38
4.2.2. Diagnóstico precoz basado en técnicas rápidas	38
4.3. Vigilancia epidemiológica de las ITS.....	39
4.3.1. Monitorización de los casos.....	40
4.3.2. Epidemiología molecular	41
4.3.3. Monitorización de la resistencia a los antimicrobianos	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES	45
CAPÍTULO I	49
ANTECEDENTES	49

1.	Infecciones causadas por <i>C. trachomatis</i>	49
1.1.	Diversidad de <i>C. trachomatis</i> : aclaración de la nomenclatura	49
2.	Linfogranuloma venéreo	50
2.1.	Presentación clínica.....	50
2.2.	Antecedentes históricos y epidemiológicos.....	51
2.3.	Epidemia actual de linfogranuloma venéreo	52
2.3.1.	El inicio de la epidemia: brote en los Países Bajos	52
2.3.2.	La propagación de la epidemia en Europa.....	52
2.3.3.	La propagación de la epidemia fuera de Europa	55
2.3.4.	Linfogranuloma venéreo en España	57
2.3.5.	Características clínicas y epidemiológicas de la epidemia de LGV	59
2.3.6.	Epidemiología del LGV basada en <i>ompA</i>	60
	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	63
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
1.	Centros participantes y periodo de estudio	65
2.	Muestras incluidas en el estudio y detección de <i>C. trachomatis</i>	66
3.	Detección de genotipos L asociados a linfogranuloma venéreo.....	67
4.	Amplificación y secuenciación de los genes <i>pmpH</i> y <i>ompA</i>	68
4.1.	Análisis de las secuencias	69
4.2.	Análisis filogenético.....	70
5.	Datos clínicos y epidemiológicos.....	70
6.	Análisis estadístico	70
	RESULTADOS	71
1.	Evolución temporal de los casos de LGV en el CS Sandoval (2010-2019).....	71
2.	Evolución temporal de los casos de LGV en el resto de centros (2017-2019).....	72
3.	Secuenciación y análisis filogenético de los genes <i>pmpH</i> y <i>ompA</i>	74
4.	Patrones clínicos y epidemiológicos asociados a cada variante	77
	DISCUSIÓN	81
	CAPÍTULO II.....	89
	ANTECEDENTES	89
1.	Emergencia y expansión de un nuevo virus	89
2.	Primer año de pandemia en España y en la Comunidad de Madrid.....	91
2.1.	Medidas adoptadas	94
3.	Impacto del confinamiento	95
3.1.	Impacto en la salud de la población.....	95
3.2.	Impacto en la vigilancia de enfermedades transmisibles	97
3.3.	Impacto en la vigilancia de las ITS	100
3.4.	Impacto en las prácticas sexuales	101
	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	103

MATERIAL Y MÉTODOS	105
1. Centros participantes y periodo de estudio.....	105
2. Diagnóstico microbiológico de <i>C. trachomatis</i> y detección de genotipos L	105
RESULTADOS	107
DISCUSIÓN	109
ANEXO I	113
CAPÍTULO III	121
ANTECEDENTES	121
1. Esquemas de tipado en <i>C. trachomatis</i>	122
1.1. Métodos de tipificación serológicos	122
1.2. Métodos de tipificación molecular	123
1.2.1. Tipificación molecular basada en <i>ompA</i>	123
1.2.1.1. PCR-RFLP	123
1.2.1.2. Métodos de hibridación	123
1.2.1.3. Análisis de curvas de <i>melting</i>	124
1.2.2. Tipificación molecular basada en los genes <i>pmpH</i> y <i>ompA</i>	125
1.2.3. Tipificación molecular de alta resolución	126
1.2.3.1. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	127
1.2.3.2. <i>Multilocus variable-number tandem repeat analysis</i> (MLVA) ..	128
2. Secuenciación de genomas completos en <i>C. trachomatis</i>	130
3. Aplicación de los esquemas de tipado molecular a la epidemiología de los genotipos L	131
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	133
MATERIAL Y MÉTODOS	135
1. Conjunto de datos y análisis de diversidad	135
2. Selección de muestras.....	136
3. Amplificación y secuenciación de los genes a estudio.....	137
3.1. Análisis de las secuencias	139
3.2. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	139
3.3. Análisis filogenético.....	139
RESULTADOS	141
1. Análisis de diversidad y selección de los genes para el nuevo esquema	141
2. Inferencia del poder de discriminación de cada una de las estrategias mediante análisis <i>in silico</i>	142
3. Comparación del poder de discriminación del nuevo esquema con el esquema MLST de genes hipervariables	143
4. Aplicación del nuevo esquema a la caracterización de la epidemia de LGV.....	145
4.1. Análisis espacial y temporal de la epidemia de LGV	148

DISCUSIÓN	151
ANEXO II	155
CAPÍTULO IV	169
ANTECEDENTES	169
1. Infecciones extragenitales causadas por <i>C. trachomatis</i>	169
1.1. Infección anorrectal por <i>C. trachomatis</i>	170
1.2. Infección orofaríngea por <i>C. trachomatis</i>	171
1.3. Impacto de las infecciones extragenitales causadas por <i>C. trachomatis</i>	173
1.3.1. Impacto en la salud sexual y reproductiva	173
1.3.2. Impacto en la transmisión y el mantenimiento de la epidemia	173
2. Infecciones causadas por los genotipos L de <i>C. trachomatis</i>	174
2.1. Infección anorrectal por genotipos L	174
2.2. Infección extrarrectal por genotipos L	175
2.3. Impacto de las infecciones asintomáticas y extrarrectales por genotipos L ..	176
2.3.1. Impacto en el diagnóstico	176
2.3.2. Impacto en el control de la epidemia de LGV	177
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	179
MATERIAL Y MÉTODOS.....	181
1. Extracción del material genético	181
2. Controles	181
3. Diseño de la qPCR anidada en un solo tubo.....	182
3.1. Evaluación analítica de la qPCR anidada en un solo tubo.....	183
3.2. Evaluación clínica	183
3.2.1. Confirmación de los resultados positivos	184
3.2.2. Datos clínicos y epidemiológicos	184
RESULTADOS	185
1. Evaluación analítica	185
1.1. Eficiencia y rango de linealidad	185
1.2. Límite de detección	185
2. Evaluación clínica: impacto de las infecciones no diagnosticadas.....	186
2.1. Nuevos diagnósticos.....	186
2.2. Datos clínicos y epidemiológicos de los nuevos diagnósticos	188
DISCUSIÓN	191
CONCLUSIONES	197
BIBLIOGRAFÍA	201
ANEXO III	231

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CA	Comunidad Autónoma
CAM	Comunidad de Madrid
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CS	Centro Sanitario
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DALY	Años de vida ajustados por discapacidad
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDO	Enfermedad de Declaración Obligatoria
EPI	Enfermedad pélvica inflamatoria
Euro-GASP	<i>European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme</i>
ESSTI	<i>European Surveillance of Sexually Transmitted Infections</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTC	Emtricitabina
GASP	<i>Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme</i>
HSH	hombres que tienen sexo con hombres
HSM	hombres que tienen sexo con mujeres
HTLV	Virus linfotrópico de células T humanas
ITS	Infección de transmisión sexual
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
LGV	Linfogranuloma venéreo
MDA	Amplificación por desplazamiento múltiple
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MLVA	<i>Multilocus variable-number tandem repeat analysis</i>
MOMP	Proteína principal de membrana externa de <i>C. trachomatis</i>

HSD Hombres con parejas sexuales de sexo desconocido

NCBI *National Center for Biotechnology*

nvCT variante sueca de *C. trachomatis*

OMS Organización Mundial de la Salud

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

pb pares de bases

PGFE *Pulsed- field gel electrophoresis*

PMP Proteína polimórfica de membrana

PPE Profilaxis post-exposición

PPENO Profilaxis post-exposición no ocupacional

PrEP Profilaxis pre-exposición

QALY Años de vida ajustados por calidad

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

RENAVE Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica

RFLP Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

RFU *Relative fluorescence units*

SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SERMAS Servicio Madrileño de Salud

SIDA Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC Sistema nervioso central

SNP *Single nucleotide polymorphism*

ST Secuenciotipo

TARGA Tratamiento antirretroviral de gran actividad

TDAH Trastorno de déficit de atención e hiperactividad

TDF Tenofovir disoproxilo fumarato

TMS Trabajador masculino del sexo

UCI Unidad de Cuidados Intensivos

UE Unión Europea

VHB Virus de la hepatitis B

VHC Virus de la hepatitis C

VHS Virus del herpes simple

VIH Virus de la inmunodeficiencia adquirida

VNTR *Variable Number Tandem Repeat*

VPH Virus del papiloma humano

WGS *Whole genome sequencing*

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de las cuatro ITS curables (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis*) en el año 2016 en cada una de las regiones de la OMS.

Figura 2. Incidencia de las principales ITS bacterianas (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum*) por grupo de edad y sexo.

Figura 3. Evolución de los casos de sífilis en Europa y Estados Unidos en el periodo 2007-2020.

Figura 4. Evolución temporal de los casos de sífilis en España desde 1995 hasta 2019.

Figura 5. Evolución temporal de las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* en Europa.

Figura 6. Evolución temporal de las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* en España desde 1995 hasta 2019.

Figura 7. Evolución temporal del número de casos por cada 100.000 habitantes de *C. trachomatis*, *T. pallidum* y *N. gonorrhoeae* en Estados Unidos durante el periodo 1985-2015.

Figura 8. Evolución temporal de la infección por *C. trachomatis* en Europa.

Figura 9. Evolución de los casos de *C. trachomatis* en España.

Figura 10. Evolución temporal de linfogranuloma venéreo en Europa, según datos del ECDC.

Figura 11. Evolución temporal de los casos de sífilis **(A)** e infección gonocócica **(B)** en Reino Unido durante el periodo 1931-2017.

Figura 12. Consumo de drogas psicoactivas relacionadas con el fenómeno del *chemsex* en el periodo 2005-2018.

Figura 13. Porcentaje de usuarios de drogas estimulantes durante las prácticas sexuales (*chemsex*).

Figura 14. A) Vías de acceso al consumo de *chemsex*. **B)** Frecuencia de utilización de aplicaciones móviles para contactos sexuales.

Figura 15. Prevalencia de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium* en función del estatus VIH/PrEP.

Figura 16. Historia natural de las secuelas causadas por las infecciones por *C. trachomatis* no diagnosticadas y no tratadas en mujeres.

Figura 17. Continuidad asistencial de los servicios contra las ITS.

Figura 18. Número de casos notificados por Reino Unido en el periodo 2004-2006.

Figura 19. Dispersión radial de los casos de LGV desde Países Bajos hacia el resto de los países europeos durante el periodo 2003-2012.

Figura 20. Evolución temporal de los casos de LGV en el periodo 2010-2019 en los países con mayor número de casos acumulados.

Figura 21. Evolución temporal de los casos de LGV diagnosticados en Estados Unidos (2008-2015).

Figura 22. Evolución de la tasa ajustada por cada 100.000 habitantes y año de los diagnósticos de LGV en Canadá.

Figura 23. Número de casos de LGV en Nueva Gales del Sur (Australia). **A)** Periodo 2006-2015. **B)** Periodo 2017-2021.

Figura 24. Casos de LGV diagnosticados en España. **A)** Barcelona, periodo 2007-2011. **B)** Madrid, periodo 2009-2011.

Figura 25. Casos de LGV en pacientes VIH positivos y negativos, y proporción de pacientes VIH negativos entre la totalidad de los casos de LGV diagnosticados en población HSH. Países Bajos, periodo 2011-2017.

Figura 26. Representación esquemática del gen *ompA* de *C. trachomatis*. En detalle, se muestra el segmento variable II (VS-II) donde se muestran las diferencias nucleotídicas de las genovariantes L2a, L2', L2 y la nueva genovariante L2b.

Figura 27. Evolución de los nuevos diagnósticos de LGV en el CS Sandoval durante el periodo 2010-2019. Se representa la ecuación de la recta para cada uno de los periodos (2010-2014 y 2015-2019).

Figura 28. Evolución del número de muestras analizadas y proporción de casos de infección por *C. trachomatis* y de LGV en el CS Sandoval durante el periodo 2010-2019.

Figura 29. Evolución del número de muestras analizadas y proporción de casos de infección por *C. trachomatis* y de LGV en el resto de centros. **A)** Centro Montesa y **B)** Hospital Universitario Ramón y Cajal y Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla.

Figura 30. Distribución de las genovariantes de los genotipos L basados en la secuenciación del gen *ompA* durante el periodo 2010-2019.

Figura 31. Diagrama de redes de las secuencias aminoacídicas de las genovariantes de LGV obtenidas en Madrid durante el periodo 2010-2019. **A)** Periodo 2010-2014 y **B)** Periodo 2015-2019.

Figura 32. Patrones clínicos y epidemiológicos de los pacientes infectados por alguna de las cinco genovariantes mayoritarias.

Figura 33. Propagación espaciotemporal del SARS-CoV-2 en China desde el 31 de diciembre de 2019 hasta el 31 de enero de 2020.

Figura 34. Número de casos de infección por SARS-CoV-2 diagnosticados por día en China desde el 8 de diciembre de 2019 hasta el 11 de febrero de 2020.

Figura 35. Países que habían notificado casos de infección por SARS-CoV-2 hasta el 30 de enero de 2020, momento en el cual la OMS declaró la emergencia de salud pública internacional.

Figura 36. Número de casos y número de fallecimientos diarios por SARS-CoV-2 en España durante el primer año de pandemia.

Figura 37. Número de casos de SARS-CoV-2 diagnosticados en España y en la Comunidad de Madrid durante la primera ola (1-marzo-2020 a 10-mayo-2020).

Figura 38. Situación semanal de cada territorio durante la fase de desescalada en España.

Figura 39. Impacto de la pandemia por COVID-19 en la notificación de nuevos diagnósticos de VIH.

Figura 40. Impacto de la pandemia por COVID-19 en la notificación de nuevos casos de la hepatitis virales en Europa durante 2020 respecto a los años previos.

Figura 41. Impacto de la pandemia por COVID-19 en el número de solicitudes y nuevos diagnósticos para VPH.

Figura 42. Impacto de la pandemia por COVID-19 en la vigilancia de las principales ITS en Estados Unidos.

Figura 43. Evolución de los casos de linfogranuloma venéreo detectados durante el primer año de la pandemia por COVID-19 en Madrid (marzo-2020 a febrero-2021).

Figura 44. Porcentajes mensuales de los casos de linfogranuloma venéreo respecto al total de muestras positivas para *C. trachomatis* por año (marzo-2019 a febrero-2021).

Figura 45. Métodos moleculares basados en *ompA* para la identificación y genotipado de *C. trachomatis*. **A)** PCR-RFLP **B)** Hibridación y **C)** Curvas de *melting*.

Figura 46. Árbol filogenético de mínima evolución basado en la diversidad del gen *ompA*.

Figura 47. Reconstrucción filogenética de la secuencia nucleotídica de los genes *pmpH* y *pmpF*.

Figura 48. Reconstrucción filogenética de los fragmentos génicos utilizados en los esquemas MLST basados en los genes *housekeeping* de *C. trachomatis*.

Figura 49. Número de genomas completos disponibles en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology*) por año.

Figura 50. Diversidad evolutiva media (índice D) de los genes del genoma *core* de los genotipos L de *C. trachomatis*.

Figura 51. **A)** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado el concatenado de genes del esquema de Klint y cols. **B)** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado el concatenado de genes propuesto en este capítulo. **C)** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias de genomas completos disponibles en el NCBI (n=29).

Figura 52. Comparación de los diagramas de redes obtenidos utilizando el esquema MLST de genes hipervariables y el propuesto en este capítulo.

Figura 53. Análisis diagramas de redes obtenidos utilizando el esquema propuesto en este capítulo (4.042 pb) (n=68).

Figura 54. Representación trimestral de las variantes detectadas utilizando los genes concatenados del esquema propuesto en este capítulo (4.042 pb) desde julio de 2017 hasta septiembre de 2018 (n=68).

Figura 55. Representación esquemática de los distritos de Madrid donde se identificaron casos de LGV.

Figura 56. Porcentaje de infecciones causadas por *C. trachomatis* por localización anatómica en HSH.

Figura 57. Distribución de la infección anorrectal, faríngea y urogenital por *C. trachomatis* por ubicación anatómica. **A)** HSH y mujeres transgénero. **B)** Hombres cis-heterosexuales. **C)** Mujeres cis-heterosexuales.

Figura 58. Curvas Kaplan-Meier de la duración de *C. trachomatis* en faringe.

Figura 59. Principales semejanzas y diferencias entre las epidemias asociadas a los genotipos L y mpox.

Figura 60. Recta estándar obtenida a partir de las diluciones seriadas (10^3 - 10^{-2} ng/ml) de los fragmentos gBlocks™ de la cepa L2/434/Bu (genotipo L) utilizando la qPCR anidada en un solo tubo.

Figura 61. Diagrama de cajas y bigotes obtenido a partir de los valores de Ct para cada una de las qPCR evaluadas.

Figura 62. Curvas de *melting* o disociación obtenidas para los genotipos L (en azul, T^{a} de *melting* = $81 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) y los genotipos no L (en rosa, T^{a} de *melting* = $82,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores y sondas utilizados para la confirmación de la presencia de *C. trachomatis* y la detección de los genotipos L.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*.

Tabla 3. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes infectados por alguna de las genovariantes mayoritarias.

Tabla 4. Resumen de las características de los principales esquemas para el tipado de *C. trachomatis*.

Tabla 5. Listado de cepas utilizadas para el análisis de diversidad (n=29).

Tabla 6. Condiciones y cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes seleccionados en este capítulo.

Tabla 7. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes del esquema MLST basado en genes hipervariables.

Tabla 8. Diversidad evolutiva media (índice D) para cada uno de los marcadores de los esquemas MLST descritos previamente y el propuesto en este capítulo obtenidos en base a los 29 genomas completos disponibles.

Tabla 9. Cambios aminoacídicos detectados en los genes seleccionados en este estudio (68 muestras).

Tabla 10. Secuencia de los oligonucleótidos sintéticos gBlocks™ utilizados como controles en los experimentos realizados en este capítulo.

Tabla 11. Cebadores y sonda utilizados para la detección de los genotipos L mediante la qPCR anidada en un solo tubo.

Tabla 12. Prevalencia de los genotipos L por localización utilizando la qPCR clásica y la qPCR anidada en un solo tubo.

RESUMEN

La incidencia global de las infecciones de transmisión sexual (ITS) está en continuo aumento, constituyendo un importante problema de salud pública. Son varios los factores que han podido contribuir a este incremento, como el cambio en los comportamientos sexuales, el aumento de consumo de drogas recreativas asociadas al sexo (*chemsex*), la movilidad de la población, o la generalización de la profilaxis pre-exposición para la prevención del VIH, entre otros. El principal objetivo de esta Tesis es comprender y mejorar nuestro conocimiento sobre la dispersión de los microorganismos de transmisión sexual, tomando como modelo el linfogranuloma venéreo (LGV), ITS causada por los genotipos L de *Chlamydia trachomatis*.

En el **capítulo I**, se analizó la epidemiología molecular de LGV durante un periodo de 10 años; en un primer momento, la vigilancia se centró en los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), para posteriormente extender la vigilancia a otros grupos poblacionales con riesgo de exposición a ITS. El principal hallazgo fue el aumento progresivo en el número de casos de LGV a lo largo del periodo de estudio, asociado a su vez a una mayor diversidad de genovariantes, especialmente en población HSH. Además, la asociación entre LGV y el VIH fue disminuyendo a lo largo de los años, y el porcentaje de pacientes infectados por el VIH descendió del 84,3% al 66,2%, probablemente debido a las excelentes cuotas de población VIH con cargas virales indetectables que evitan la transmisión del virus.

En el **capítulo II**, se analizó el impacto del primer año de pandemia por COVID-19 en los nuevos diagnósticos de LGV. Aunque durante la primera ola y el confinamiento más estricto se observó un descenso en el número de casos, en los sucesivos meses, se observó un incremento tanto en el número de casos como en la proporción de LGV respecto a las muestras positivas para *C. trachomatis*. Estos resultados confirman como el LGV siguió aumentando durante el primer año pandémico, a pesar de las restricciones de movilidad y las medidas de distanciamiento.

En el **capítulo III**, se diseñó un nuevo esquema de tipado molecular específico para los genotipos L de *C. trachomatis*, con el objetivo de obtener información más precisa de la epidemiología de LGV. Este esquema demostró tener mayor poder discriminatorio para los genotipos L que los previamente publicados, permitiéndonos detectar un mayor número de genovariantes. Posteriormente, se realizó un análisis temporal y espacial de las genovariantes identificadas, revelando nuevas introducciones de L2b, así como la dispersión radial de las genovariantes desde la zona centro de Madrid.

En el **capítulo IV**, la hipótesis de trabajo fue que el bajo porcentaje de infecciones asociadas a genotipos L de localización faríngea y genital puede ser consecuencia de la baja carga bacteriana en esas localizaciones, próxima al umbral de sensibilidad de las técnicas diagnósticas disponibles. Para ello, se diseñó una nueva PCR anidada, que demostró tener mayor sensibilidad que la utilizada en la rutina habitual. Esta estrategia nos permitió sumar 89 casos de LGV que previamente habían pasado desapercibidos, lo que supuso un aumento de la prevalencia global del 20% (del 10,5% al 12,6%). Estos resultados ponen de manifiesto un posible escape diagnóstico que puede estar contribuyendo al mantenimiento de la epidemia, y, por tanto, en muestras faríngeas y genitales, el diagnóstico de LGV debería basarse en técnicas más sensibles que las actualmente disponibles.

SUMMARY

The global incidence of sexually transmitted infections (STIs) is continuously increasing, generating an important public health concern. Several factors may have contributed to this increase, such as changes in sexual behaviours, the increased use of recreational drugs associated with sex (*chemsex*), the population mobility, or the generalization of pre-exposure prophylaxis for HIV, among others. The main objective of this PhD Thesis is to understand and to improve our knowledge about the spread of sexually transmitted microorganisms, using lymphogranuloma venereum (LGV), an STI caused by L genotypes of *Chlamydia trachomatis*, as a model.

In the **chapter I**, the molecular epidemiology of LGV was analysed over a 10-year period. Initially, surveillance was focused on men who have sex with men (MSM); but subsequently, surveillance was extended to other population groups at increased risk of infection. The main finding was the progressive increase in the number of LGV cases during the study period, associated with a greater diversity of genovariants, especially in the MSM population. In addition, the association between LGV and HIV decreased over the years, and the percentage of HIV-infected patients decreased from 84.3% to 66.2%, probably due to high rate of HIV population with undetectable viral loads that prevent virus transmission.

In the **chapter II**, the impact of the first year of the COVID-19 pandemic on new LGV diagnoses was analysed. Although a decrease in the number of cases was observed during the first wave and strict lockdown, in the following months, an increase in both the number of cases and the ratio of LGV/*C. trachomatis*-positive samples was observed. These results confirm that LGV continued increasing during the first pandemic year, despite mobility restrictions and distancing measures.

In the **chapter III**, a new molecular typing scheme was designed specifically for L genotypes to obtain more accurate information about LGV epidemiology. This scheme proved to have greater discriminatory power for L genotypes than those previously published, allowing us to detect a greater number of genovariants. Subsequently, a temporal and spatial analysis was performed, revealing new introductions of L2b, as well as the radial dispersion of the genovariants from the central area of Madrid.

In the **chapter IV**, the hypothesis was that the low percentage of infections associated with L genotypes in pharyngeal and genital locations may be a consequence of the low bacterial load in these locations, close to the threshold of the available diagnostic

techniques. For this purpose, a new nested PCR was designed, which proved to be more sensitive than the one used in the usual routine. This strategy allowed us to add 89 cases of LGV that had previously gone undetected, resulting in an increase in the overall prevalence of 20% (from 10.5% to 12.6%). These results highlight a possible loss of diagnosis that may be contributing to the maintenance of the epidemic, and therefore, in pharyngeal and genital samples, LGV diagnosis should be based on more sensitive techniques than those currently available.

Introducción



1. ¿Qué es una infección de transmisión sexual?

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) constituyen una de las áreas que han adquirido mayor relevancia en temas de salud durante los últimos años. La Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce que las ITS representan un importante problema de Salud Pública y, aunque la lista propuesta por esta organización incluye más de 30 patógenos virales, bacterianos y parasitarios [1], en nuestra percepción se reducen a una cifra menor. Clásicamente, la definición de las ITS hace referencia a aquellas infecciones que se transmiten de una persona infectada a otra no infectada a través del contacto sexual, incluyendo sexo vaginal, oral o anal. Si bien, algunos de los patógenos que se transmiten por vía sexual, pueden transmitirse de madre a hijo durante el embarazo, el parto, o la lactancia. También hay que tener en cuenta que las alteraciones de las condiciones fisiológicas del tracto genital pueden dar lugar a síndromes no adquiridos por vía sexual, como es el caso de la candidiasis o la vaginosis bacteriana por *Gardnerella vaginalis* [2], situaciones clínicas que cursan con manifestaciones clínicas similares a las de las ITS y que, por tanto, requieren un diagnóstico diferencial [3].

Progresivamente la definición de ITS se ha ido haciendo más genérica, y a las ITS clásicas, se han incorporado otros patógenos no directamente asociados a las ITS pero que pueden ser adquiridos por contacto sexual, definidas por la OMS como ITS no clásicas. Los brotes de ITS no clásicas han ido en aumento [1], generando en algunos momentos situaciones de alarma social. El primero ejemplo que empezó a cuestionar la clara definición de las ITS fue el brote de Zika que tuvo lugar en 2016 y que afectó a numerosos países de América del Sur, Centroamérica y el Caribe, asociado a microcefalia en recién nacidos de madres infectadas durante el embarazo [4]. El virus del Zika fue el primer patógeno que, transmitido e a través de la picadura de un mosquito infectado, se trasmite también a través de las relaciones sexuales con una persona infectada. Otro ejemplo surgió con el brote por el virus del Ébola en el periodo 2014-2016 en la República Democrática del Congo, cuya transmisión tiene lugar a través del contacto con fluidos corporales de animales infectados, pero también persona-persona a través de objetos contaminados y fluidos corporales (sangre o vómitos). El hallazgo del ARN viral en el semen de personas infectadas hizo sospechar sobre la posible transmisión por vía sexual. Estrategias para minimizar el impacto de la transmisión sexual del virus se llevaron a cabo en Sierra Leona con pobre resultados [5], pues, aunque se redujo la transmisión, el impacto fue escaso, indicando que la transmisión por esta vía, si ocurría, era anecdótica. Más recientemente, se ha descrito un brote por *Shigella sonnei* extremadamente resistente asociado a determinadas prácticas sexuales en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) [6]. En este caso la transmisión estaría más

relacionada con prácticas sexuales de transmisión oral-rectal durante el contacto sexual que a la presencia del agente infeccioso en fluidos corporales o mucosas implicados en el acto sexual [7]. Otro ejemplo similar fue el brote de hepatitis A en HSH durante el periodo 2016-2017 que afectó a 17 países [8], incluyendo España [9].

El caso más paradigmático y reciente ha sido el brote epidémico de mpox, previamente denominado viruela del mono o “monkeypox” [10], que fue reconocido por la OMS como emergencia internacional el 23 de julio de 2022 [11]. Es conocido desde la década de los 70 que este virus puede infectar al ser humano a través del contacto con mucosas infectadas, mayoritariamente a través del contacto con lesiones presentes en la piel. En el brote de 2022, de manera similar a los anteriormente expuestos, la transmisión se asoció al contacto sexual, si bien otras vías de transmisión no sexuales también fueron descritas. En consecuencia, diversas organizaciones intentaron posicionarse a favor o en contra de considerar el brote de mpox como una ITS. Así, mientras que la OMS y el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) se posicionaron en contra de considerar mpox como una ITS, la *AIDS Healthcare Foundation* o la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) consideraron que, al comportarse como una ITS, debía ser considerada como tal. Diversos estudios confirmaron que el virus se detectaba en el 100% de muestras vaginales [12] y en un alto porcentaje (91%) en muestras de semen [13], demostrándose además su viabilidad mediante cultivo celular [14]. Asimismo, entre el 15-29% de las personas diagnosticadas de mpox presentaban otras ITS de manera concomitante [15]. Por tanto, la asociación temporal y anatómica con varias prácticas sexuales, la alta prevalencia de ITS concomitantes y la infectividad *in vitro* del virus aislado de semen sugieren firmemente que este virus se transmite a través del contacto sexual.

Estos son ejemplos que llevan a cuestionarnos qué es una ITS y que dificultan el hallazgo de una definición satisfactoria que permita incluir todos los ejemplos citados. Podríamos decir, a riesgo de equivocarnos, que *“Las ITS generalmente se definen como infecciones causadas por un microorganismo que en un momento y un contexto determinado se transmite predominantemente, pero no exclusivamente, de una persona a otra a través de los fluidos corporales (sangre, semen, fluidos vaginales, fluido rectal, saliva) durante las relaciones sexuales genitales, orales o anales con una pareja infectada”*.

En cualquier caso, se demuestra la importancia que las ITS han alcanzado en los últimos años, donde diversos microorganismos han encontrado una posibilidad de transmisión por vía sexual o en el contexto de una relación sexual, poniendo de manifiesto la vulnerabilidad comunitaria a nuevas amenazas.

2. Las ITS como problema de salud pública global

2.1. Epidemiología de las ITS

Según la OMS, más de un millón de ITS de las denominadas curables (causadas por *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Trichomonas vaginalis*) son adquiridas cada día en el mundo, estimándose en 2020 en más de 374 millones anuales [16]: 129 millones causadas por *C. trachomatis*, 82 millones por *N. gonorrhoeae*, 7,1 millones de sífilis y 156 millones por *T. vaginalis*. En cuanto a las denominadas ITS no curables (VHB, VIH, VPH y VHS), se estima que 490 millones de personas son portadoras del VHS causante del herpes genital y 300 millones de mujeres están infectadas por el VPH. Además, se estima que 296 millones de personas tiene una hepatitis B crónica y 38,4 millones de personas están infectadas por el VIH. Sin embargo, según los datos del Observatorio Mundial de la Salud de la OMS, la incidencia de las ITS puede variar sustancialmente entre las diferentes regiones [17] (Figura 1).

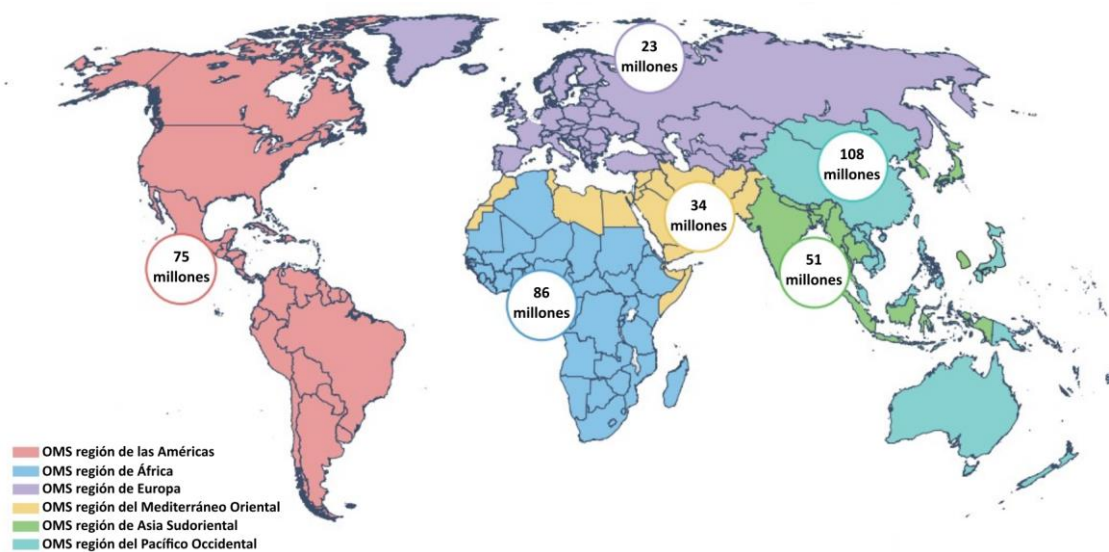


Figura 1. Número de casos de las cuatro ITS curables (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis*) en el año 2016 en cada una de las regiones de la OMS. Adaptado de Van Wergen y cols., 2022 [18].

La incidencia de las ITS por edad y sexo tampoco es homogénea. Así, las infecciones causadas por los genotipos no invasivos de *C. trachomatis* afectan más a mujeres jóvenes que a hombres, mientras que los genotipos invasivos (genotipos L) de *C. trachomatis*, asociados al linfogranuloma venéreo (LGV), afectan desproporcionadamente más a hombres que mujeres, y en un rango de edad mayor. Por su parte, las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum* afectan más a

varones, aunque en diferentes franjas de edad. Estas diferencias están relacionadas con la mayor vulnerabilidad de diversas poblaciones, como los jóvenes, HSH, trabajadores del sexo y aquellos con ciertas desventajas socioeconómicas [19] (Figura 2).

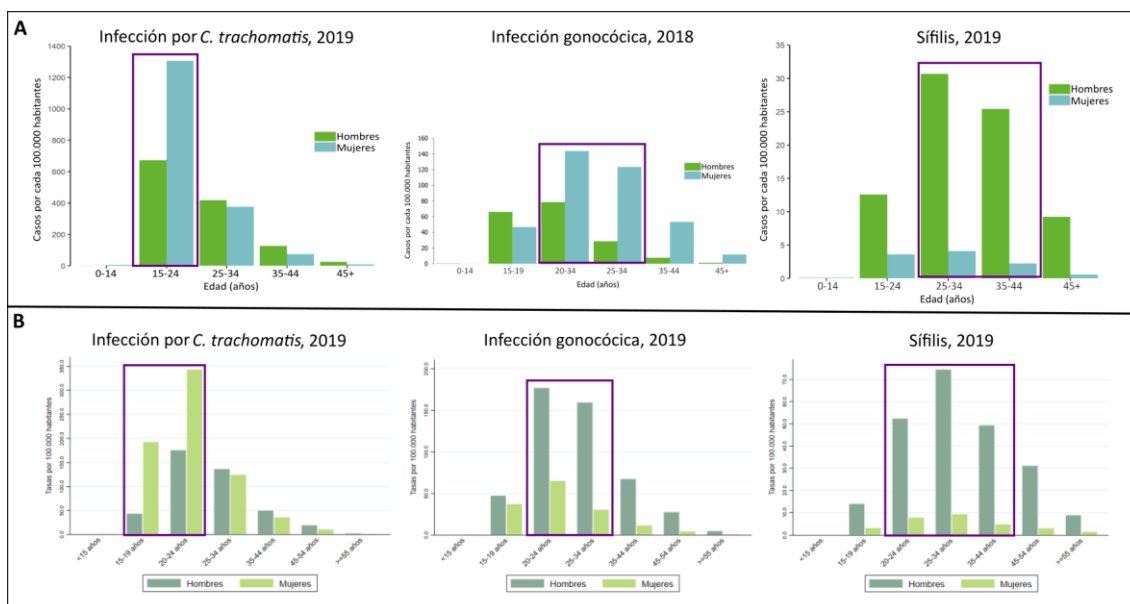


Figura 2. Incidencia de las principales ITS bacterianas (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum*) por grupo de edad y sexo. En la fila superior (A) se representan los datos europeos procedentes del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) [20–22] y en la fila inferior (B) los datos del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de España. En ambos escenarios se puede observar una gran similitud de los patrones por edad y sexo para cada microorganismo [23].

Por otro lado, es frecuente la detección simultánea de varias ITS. De hecho, algunas de ellas constituyen un importante factor de riesgo para la adquisición del VIH [24], ya que se ha demostrado que las infecciones por *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis* pueden aumentar hasta 8 veces el riesgo de infección por VIH [25]. Estas infecciones, particularmente en el caso de las úlceras, pueden causar la rotura de la barrera epitelial del tracto genital/rectal y el reclutamiento de células susceptibles (linfocitos CD4, macrófagos), favoreciendo el acceso del VIH [26]. De hecho, se ha observado una alta asociación entre el virus VHS-2 y el VIH [27]. Además, se ha demostrado que la presencia de ITS en personas que viven con VIH puede aumentar la eliminación de virus a través del tracto genital [26].

2.2. Importancia de las ITS

2.2.1. Impacto sobre la salud sexual y reproductiva

Las ITS se manifiestan habitualmente como procesos agudos (vaginitis, cervicitis, uretritis, proctitis, úlceras o verrugas genitales u orales); sin embargo, un porcentaje significativo de los casos puede cursar de forma asintomática, que, en ausencia de tratamiento, puede dar lugar a graves complicaciones, como el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en personas infectadas por el VIH o el cáncer cervical causado por el VPH. En 2018, ocho de cada 100.000 cánceres fueron asociados al VPH, diagnosticándose más de medio millón de casos cada año [28] y siendo causa de más de 300.000 muertes anuales [29]. En el caso de la hepatitis B, en 2019 se estimó que fue causa de 820.000 muertes, fundamentalmente debido a cirrosis o hepatocarcinoma [30].

En 2016, se calculó que casi un millón de embarazadas fueron diagnosticadas de sífilis, siendo ésta la segunda causa de muerte neonatal a nivel global [1]. Desde entonces, se ha documentado un incremento del 236% en sífilis congénita en Estados Unidos [31]. El herpes neonatal, adquirido durante el nacimiento, puede afectar a la piel, los ojos o la boca del recién nacido, pero también puede alcanzar el sistema nervioso central (SNC), con importantes secuelas neurológicas [32]. En Estados Unidos se ha observado un aumento de la incidencia del herpes neonatal en los últimos años [32,33], con una tasa de 5,3 casos por cada 1.000 nacidos vivos [18].

La infección crónica por *C. trachomatis* puede causar enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), dolor pélvico crónico, embarazo ectópico o infertilidad femenina [18]. Recientemente, se ha documentado el impacto de la infección crónica por *C. trachomatis* en la fertilidad masculina [34]. De modo similar, la infección no tratada por *N. gonorrhoeae* puede causar EPI, embarazo ectópico, infertilidad tubárica e infecciones diseminadas [35,36].

2.2.2. Impacto socioeconómico

Clásicamente las ITS se han asociado al pudor, la vergüenza y la discriminación, lo que ha favorecido en parte su diseminación a nivel global, creando un estigma con importantes consecuencias [37]. Este estigma hace que gran parte de la sociedad tenga una visión negativa de la sexualidad, evitando hablar abiertamente sobre el tema a todos los niveles, incluyendo a los profesionales sanitarios. A nivel individual, la estigmatización puede favorecer que no se realicen los cribados recomendados dando lugar a retrasos en el diagnóstico y el tratamiento, lo que contribuye a la transmisión de

las ITS. Por ello, uno de los objetivos estratégicos de la OMS para 2022-2030 es “crear un entorno que permita a las personas hablar cómodamente sobre su salud sexual, adoptar prácticas sexuales más seguras y solicitar tratamiento contra las ITS” [38].

El impacto de las ITS también se ha medido en términos económicos. En Estados Unidos, los costes directos de las ocho principales ITS se han estimado en 16,7 billones de dólares, siendo el VIH el que más impacto económico representa (13,7 billones), seguido de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* (1 billón) [39]. Además, las ITS pueden suponer una carga económica para los infectados, especialmente en los países en vías de desarrollo, donde el coste del tratamiento equivale a varios días del salario [40]. Sin embargo, no se conocen con exactitud ni los costes directos asociados a las secuelas de las ITS ni los costes indirectos [41].

Además, las ITS pueden tener un impacto sobre la población no infectada, cuantificada habitualmente en pérdida de años de vida ajustados por calidad (QALYs). Esto se debe a que las personas no infectadas muestran preocupación por adquirir una ITS, lo que se traduce en ansiedad y cambio en los comportamientos sexuales. Se estima que aquellas personas muy preocupadas por adquirir una ITS sufren una pérdida de 0,39 QALYs, siendo mayor para aquellos con comportamientos de alto riesgo [37]. Ciertos estudios han evaluado el impacto en años de vida ajustados por discapacidad (DALYs). En 2019, las ITS estaban entre las primeras enfermedades que más DALYs suponían en niños menores de 10 años, fundamentalmente debido a la sífilis congénita [42], mientras que *C. trachomatis* ocupó el séptimo lugar en la franja de edad entre 15 y 65 años [43].

3. Aumento de la incidencia de las principales ITS

Desde la década de los 2000 se ha observado un aumento progresivo en la incidencia de las ITS a nivel global [44], con rápidos aumentos para sífilis, gonorrea y en menor medida para las infecciones causadas por *C. trachomatis*. Sin embargo, las denominadas ITS no curables se han mantenido estables o incluso han descendido como consecuencia de la implementación de importantes medidas sanitarias, como la vacunación frente al VPH en mujeres o los mayores niveles de detección, diagnóstico y tratamiento de las personas infectadas por el VIH.

3.1. *Treponema pallidum*

En el caso de la sífilis, durante 2010-2011 se observó un incremento significativo en numerosos países como Estados Unidos [45], Canadá [46] y Australia [47], así como en varios países europeos, incluida España (Figuras 3A y 3B). En Europa, durante la década del 2000-2010, el 55% de los casos estaban asociados a HSH. Desde 2010, la sífilis siguió

umentando en Europa a expensas de los casos en hombres. Durante el periodo 2015-2019, se observó un incremento del 44% en los casos de sífilis entre los HSH VIH-negativos, aunque se mantuvo estable en los individuos VIH-positivos [22]. Desde 2016 se observó un nuevo incremento en el número de casos, tanto en Europa como en Estados Unidos (Figuras 3C y 3D).

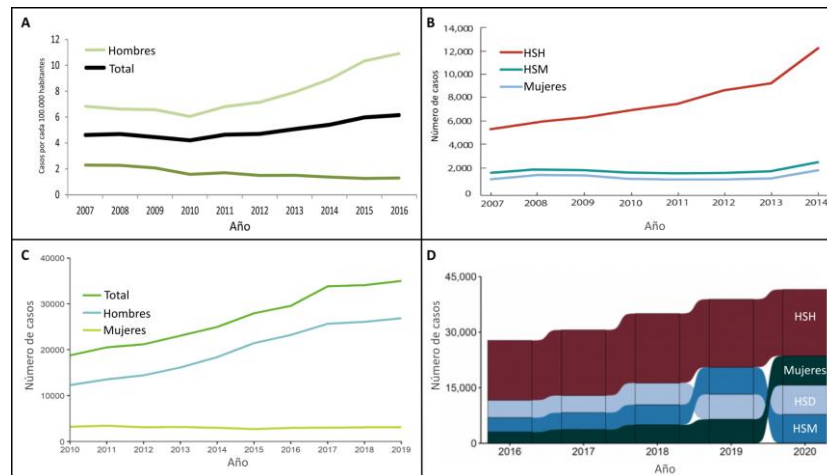


Figura 3. Evolución de los casos de sífilis en Europa y Estados Unidos en el periodo 2007-2020. **A)** Tasa de casos de sífilis por cada 100.000 habitantes en Europa en el periodo 2007-2016. **B)** Evolución de los casos de sífilis en Estados Unidos en el periodo 2007-2014. **C)** Evolución de los casos de sífilis en Europa en el periodo 2010-2019. **D)** Evolución de casos de sífilis en Estados Unidos el periodo 2016-2020. Datos procedentes del ECDC y CDC [22,48–50].

En España, el patrón es muy similar al observado en Europa y Estado Unidos. Según los datos del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), en España se observa por primera vez un cambio de tendencia en 2003, acentuándose en 2010 y alcanzando valores preocupantes a partir de 2016 (Figura 4).

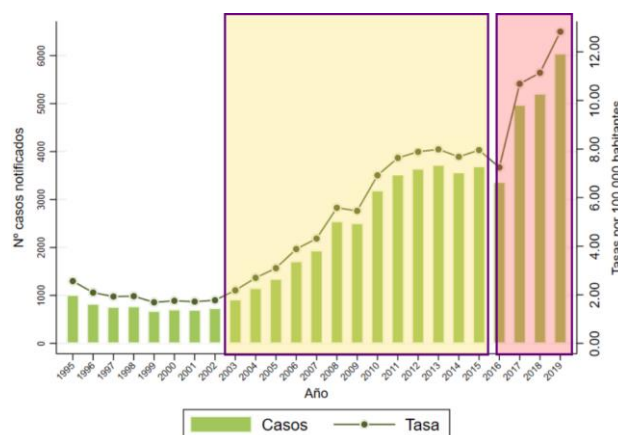


Figura 4. Evolución temporal de los casos de sífilis en España desde 1995 hasta 2019. En amarillo, se identifica el periodo en el que se observa un cambio de tendencia. En rojo, se identifica el periodo en el que se observa un incremento significativo de los casos. Datos procedentes del ISCIII [23].

3.2. *Neisseria gonorrhoeae*

Los casos de infección gonocócica también aumentaron en todo el mundo a partir del 2000, aunque en otros países los casos permanecieron estables respecto a otras ITS [51]. En Estados Unidos, los casos disminuyeron hasta 2009, con una tasa de 98 casos por 100.000 habitantes; sin embargo, a partir de entonces los casos fueron en aumento, y en 2020 se evidenció un incremento del 111% respecto al 2009 [52]. En Europa, el cambio de tendencia se observó en 2009; observándose una nueva aceleración en la detección de casos desde 2016 con un incremento del 224% en hombres y del 171% en mujeres [21], alcanzando el 586% en HSH (Figura 5).

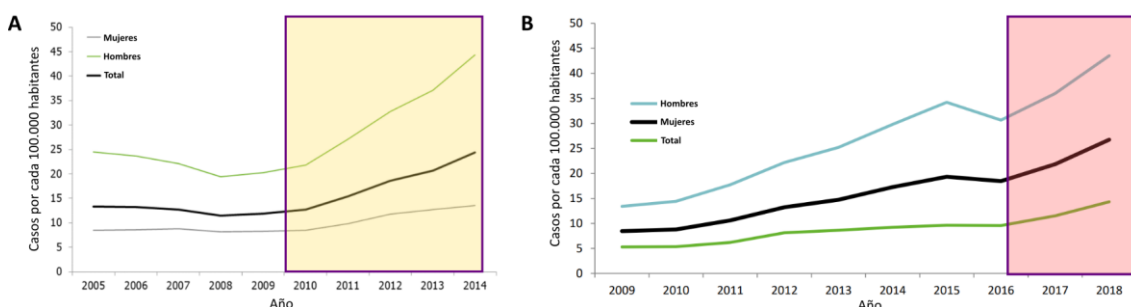


Figura 5. Evolución temporal de las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* en Europa. **A)** Periodo 2005-2014 [53]. **B)** Periodo 2009-2018 [21]. En amarillo **(A)** y rojo **(B)** se señalan los periodos donde se observa un incremento de los casos.

En España, aunque el patrón es similar, el cambio de tendencia se observa con ligera antelación a lo observado en el resto de Europa. El primer incremento en el número de casos se observa en 2005, observándose nuevamente un aumento significativo desde 2016 (Figura 6).

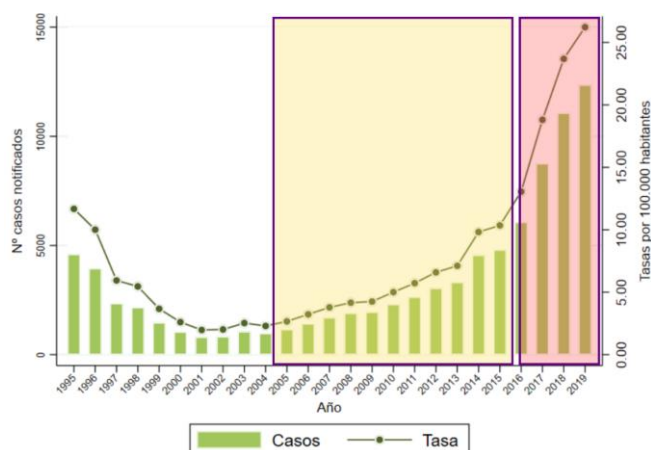


Figura 6. Evolución temporal de las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* en España desde 1995 hasta 2019. En amarillo, se identifica el periodo en el que se observa un cambio de tendencia. En rojo, se identifica el periodo en el que se observa un incremento casi exponencial de los casos. Datos procedentes del ISCIII [23].

3.3. *Chlamydia trachomatis*

Desde el año 2000, el número de infecciones causadas por *C. trachomatis* ha ido en aumento, aunque el incremento es menos acusado que el observado para sífilis o gonococo, con un incremento del 24% en el periodo 2010-2019. Sin embargo, esta información puede dar lugar a confusión, pues se trata de la ITS con mayor incidencia a nivel global, cuya tasa por cada 100.000 habitantes está en continuo ascenso (Figura 7).

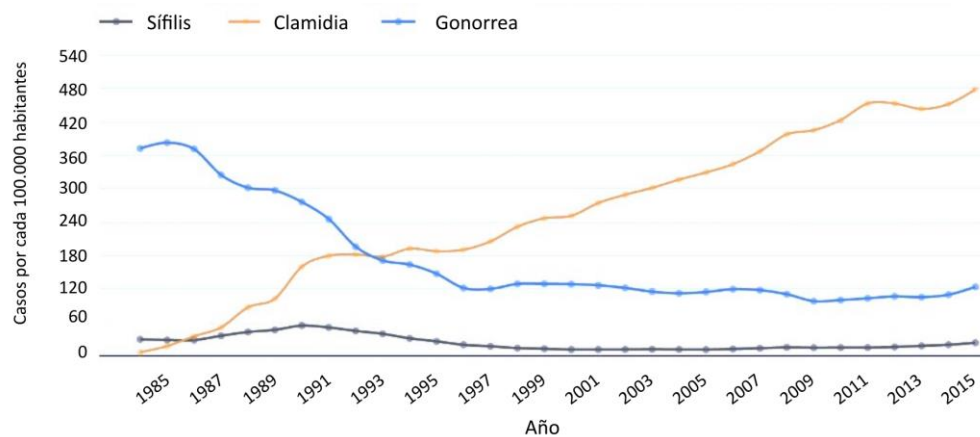


Figura 7. Evolución temporal del número de casos por cada 100.000 habitantes de *C. trachomatis*, *T. pallidum* y *N. gonorrhoeae* en Estados Unidos durante el periodo 1985-2015 [54].

En Europa, se observa un incremento significativo en 2007, que podría estar relacionado con una mejora diagnóstica debido a la implementación generalizada de las pruebas de detección molecular (Figura 8A). Desde entonces, la incidencia se mantuvo más o menos estable hasta el último informe del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), donde se observa un incremento sostenido desde 2017 (Figura 8B), aunque los datos de este último informe se presentan como número de casos en lugar de tasa de casos.

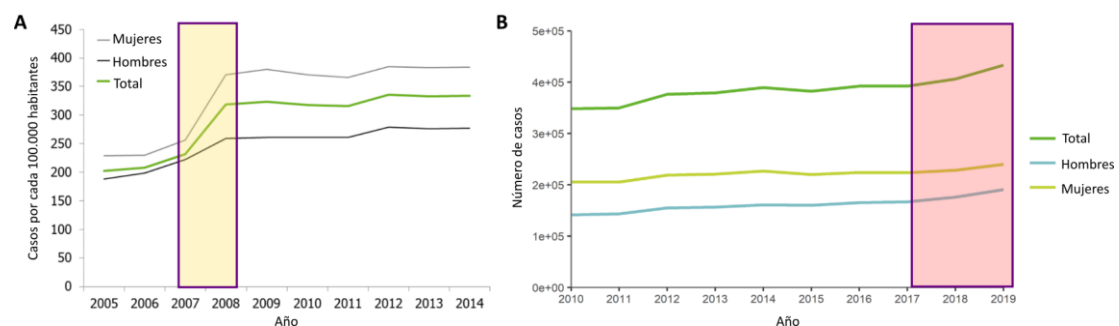


Figura 8. Evolución temporal de la infección por *C. trachomatis* en Europa. **A)** Casos por cada 100.000 habitantes en el periodo 2005-2014 [55]. **B)** Número de casos en el periodo 2010-2019. En amarillo se identifica el periodo en el que se observa un cambio de tendencia relacionada con la implementación generalizada de las técnicas de detección molecular. En rojo, se identifica el periodo el que se observa el incremento mantenido más reciente [20].

En España, siguiendo los patrones europeos, se observa un incremento de las infecciones causadas por *C. trachomatis* desde 2007 (Figura 9A); sin embargo, a diferencia del modelo europeo, el número de casos no ha dejado de aumentar cada año hasta el 2019 (Figura 9B).

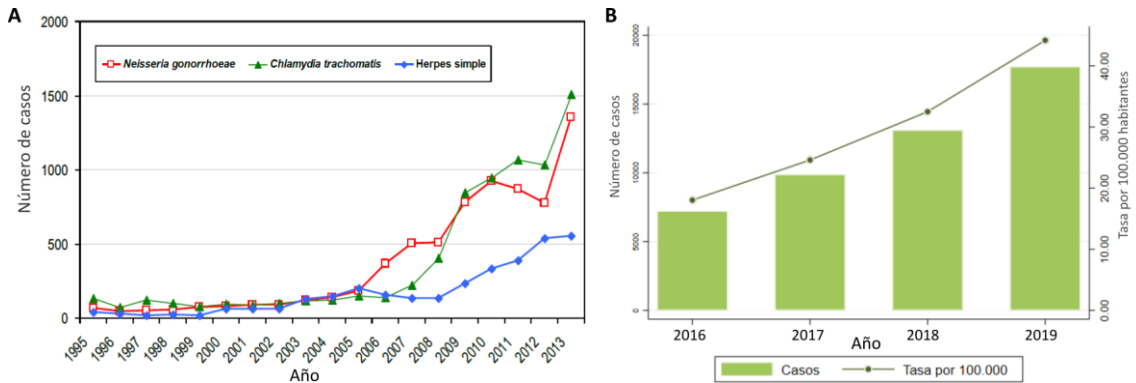


Figura 9. Evolución de los casos de *C. trachomatis* en España. **A)** Periodo 1995-2013. **B)** Periodo 2016-2019 [23,56].

3.4. Genotipos invasivos de *C. trachomatis*. Linfogranuloma venéreo

El LGV está causado por los genotipos L de *C. trachomatis*. De manera global, en Europa se produjo un importante aumento de los casos desde 2013 (Figura 10A). No obstante, si tomamos como referencia los casos de LGV en Reino Unido, por ser un país con uno de los mejores sistemas de notificación implementados, podemos observar un incremento importante desde 2009 hasta 2015, con un nuevo repunte más acentuado desde 2017 a 2019 (Figura 10B). En España, los datos temporales son escasos.

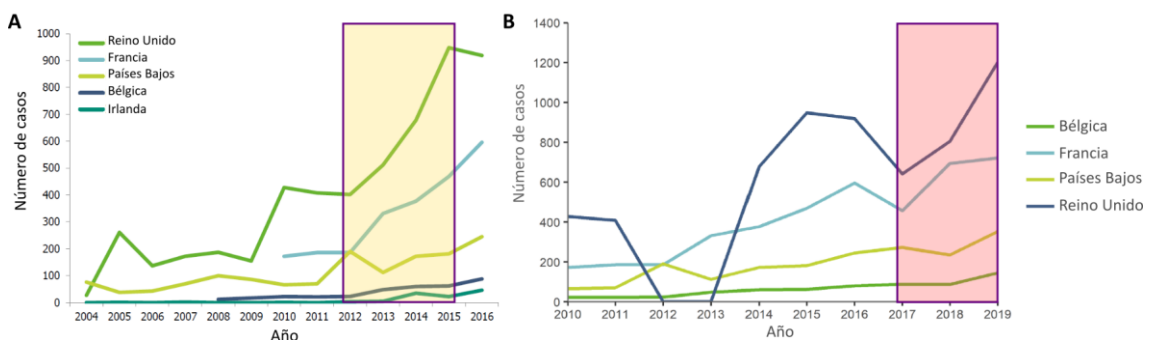


Figura 10. Evolución temporal de linfogranuloma venéreo en Europa, según datos del ECDC. **A)** Periodo 2004-2016 [57]. **B)** Periodo 2010-2019 [58].

En conclusión, podemos observar un patrón similar en Estados Unidos y Europa, incluida España, aunque con algunas particularidades. En primer lugar, se observa un primer cambio de tendencia en la primera década de los 2000. Para sífilis, el cambio de tendencia tiene lugar en 2010-2011 en Europa, y en 2004 de forma particular en España; para la infección gonocócica, el cambio de tendencia en Estados Unidos se observa en 2009, en Europa en 2008 y en España desde 2005. En segundo lugar, en todos los modelos analizados y todas las ITS, se observa un nuevo incremento en el número de casos desde 2016.

3.5. Causas y cambios implicados en el aumento de las ITS

El aumento en la incidencia de las ITS durante las últimas décadas se debe probablemente a varias causas. Por un lado, los cambios en los comportamientos sociales y sexuales, motivados por diversas razones a lo largo de la historia, se han relacionado con cambios en la epidemiología de estas infecciones. Posiblemente el VIH es uno de los aspectos que más ha impactado ya que la disponibilidad de tratamientos antirretrovirales eficaces, así como las medidas de prevención impulsadas, como la introducción de la profilaxis pre-exposición (PrEP), pueden haber influido globalmente en el aumento de las ITS. Otros factores son la mejora en las técnicas diagnósticas, como la introducción de los métodos basados en la amplificación de los ácidos nucleicos, y el aumento en la detección de los casos asintomáticos gracias a la implementación en los últimos años de los programas de cribado y los sistemas de notificación y vigilancia.

3.5.1. Cambios en los comportamientos sociales

Los comportamientos sociales de la población han ido cambiando a lo largo de los años, lo que ha influido directamente en la incidencia de las ITS. El comienzo de la epidemia del VIH en los años 80, asociado a elevadas tasas de mortalidad, supuso cambios importantes en los comportamientos sexuales de la población, especialmente en HSH. Se observó un descenso en el número de parejas y un aumento en las prácticas sexuales seguras [59], lo que dio lugar a un descenso significativo en la incidencia de la ITS, como la gonorrea, la hepatitis B y la sífilis [60] (Figura 11). En los años siguientes, se extendieron prácticas como la “seguridad negociada” [61], en la que las parejas sexuales con estatus serológico negativo para el VIH acordaban prescindir del uso del preservativo dentro de su relación, pero utilizar siempre prácticas seguras fuera de ella; o el *serosorting*, en el que los individuos solían elegir parejas sexuales serológicamente concordantes. A pesar de que el *serosorting* se asoció a un menor riesgo de adquisición del VIH [62], esto dio lugar a un descenso en el uso del preservativo y a un aumento en la incidencia de las ITS bacterianas, con independencia del estado serológico [63].

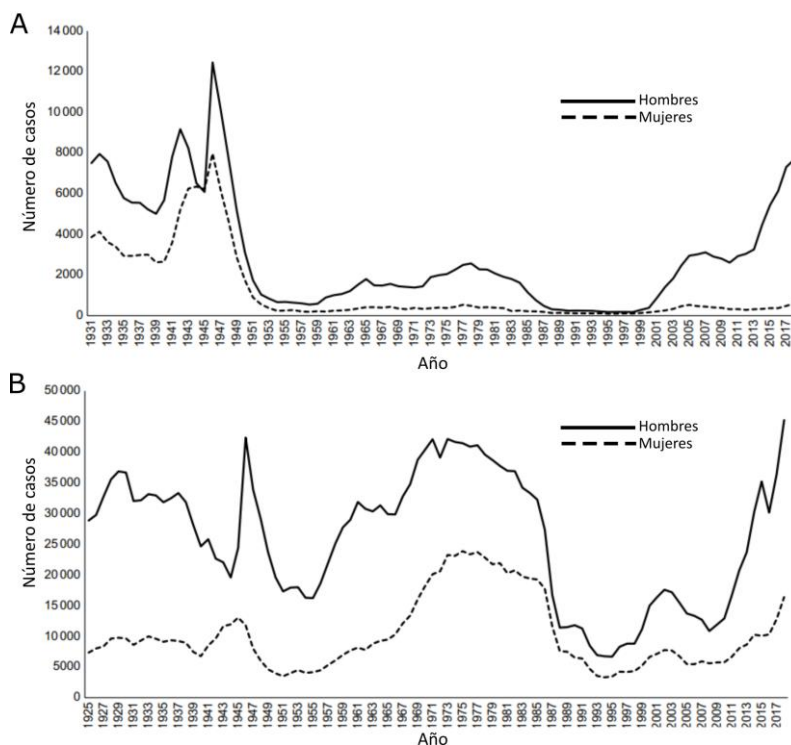


Figura 11. Evolución temporal de los casos de sífilis **(A)** e infección gonocócica **(B)** en Reino Unido durante el periodo 1931-2017 [64].

La llegada en 1996 del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) permitió alcanzar la supresión de la replicación viral y supuso un descenso radical en la mortalidad asociada al VIH [65–68]. Esto llevó a un importante optimismo en la comunidad científica y también en la población, lo que impactó directamente en los comportamientos sexuales. Varios estudios evidenciaron un aumento en las conductas sexuales de riesgo, con una menor motivación para el uso del preservativo [67,69], acompañado de un descenso en la percepción del riesgo de adquirir la infección por VIH gracias a los nuevos tratamientos [68]. Los pacientes con carga viral indetectable tienen un riesgo nulo de transmitir la infección por vía sexual, concepto conocido como “indetectable = intransmisible”. Las campañas que han utilizado este mensaje han sido una importante herramienta para eliminar el estigma y la vergüenza de las personas que viven con VIH, lo que podría contribuir a las altas tasas de comportamientos sexuales de riesgo [70]. De hecho, en población infectada por VIH se observó un aumento en las prácticas sexuales desprotegidas tras alcanzar cargas virales indetectables y niveles de linfocitos CD4 por encima de 350-500 células/mm³ [66]. Estos cambios se han asociado a continuos informes sobre el aumento de la incidencia de las principales ITS, especialmente gonorrea y sífilis en HSH [71–74]. Además, el CDC alertó en el año 2005

sobre el aumento de las nuevas infecciones por VIH en esta población [75], debido fundamentalmente a las altas tasas de comportamientos sexuales de riesgo.

Uno de los cambios sociales que probablemente más ha impactado en la epidemiología de las ITS es la llegada de internet, las redes sociales y las aplicaciones móviles para encuentros sexuales esporádicos. En 1999 en San Francisco se detectó un brote de sífilis en HSH asociado al uso de internet [76]. En esta misma ciudad, el uso de páginas web para establecer contactos sexuales aumentó del 23% en el año 2000 a más del 50% en 2008 [77]. Sin embargo, con la llegada de las aplicaciones móviles, su uso comenzó a descender desde 2010 a la vez que aumentaba el de las aplicaciones, cuyo uso aumentó del 1,4% en 2010 al 45% en 2016 [77]. Estos mismos resultados se observaron en otras ciudades, como Melbourne, donde se notificó un aumento del 77,8% en el uso estas aplicaciones desde 2011 al 2014 [78,79]. El uso de las aplicaciones móviles se ha asociado con comportamientos sexuales de riesgo, como la participación en sexo en grupo [80], mayor número de parejas sexuales [81], o mayor abuso de drogas, incluido el *chemsex* [82]. Además, también se ha relacionado con mayores tasas de infección por *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* [83].

3.5.2. El fenómeno del *chemsex*

El término *chemsex* comenzó a utilizarse a finales de los 90; éste se define como el sexo intencionado, principalmente en el colectivo HSH, bajo la influencia de drogas psicoactivas (mefedrona, GHB y metanfetaminas y, en menor medida, cocaína, ketamina, *speed* y éxtasis) (Figura 12).

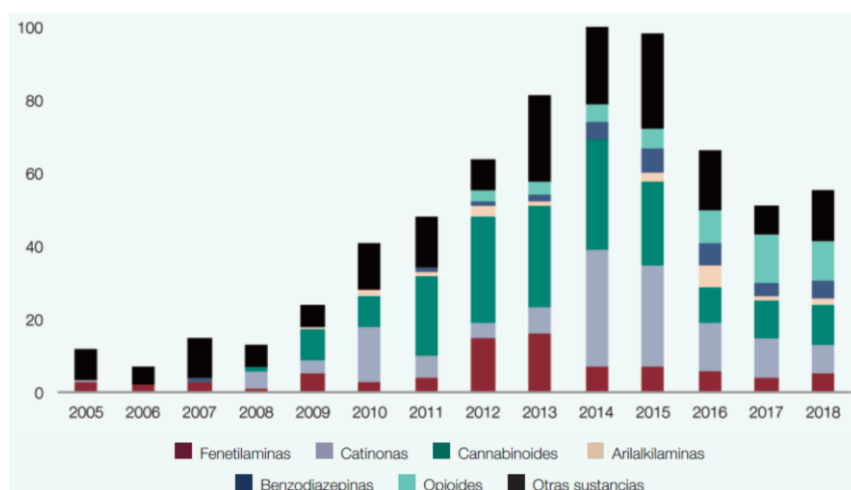


Figura 12. Consumo de drogas psicoactivas relacionadas con el fenómeno del *chemsex* en el periodo 2005-2018 [84]. El mayor consumo se observa en 2014-2015, previo al incremento observado en los casos de ITS.

INTRODUCCIÓN

El *chemsex* comenzó a popularizarse desde 2009 [85]. Aunque este fenómeno se inició en Reino Unido, poco a poco se fue expandiendo a otros países. En la Figura 13, se observa el impacto del *chemsex* en Europa, siendo España uno de los países más afectados (Figura 13A). Dentro del territorio nacional, Madrid, Andalucía y Cataluña, son las Comunidades Autónomas que encabezan esta lista (Figura 13B).

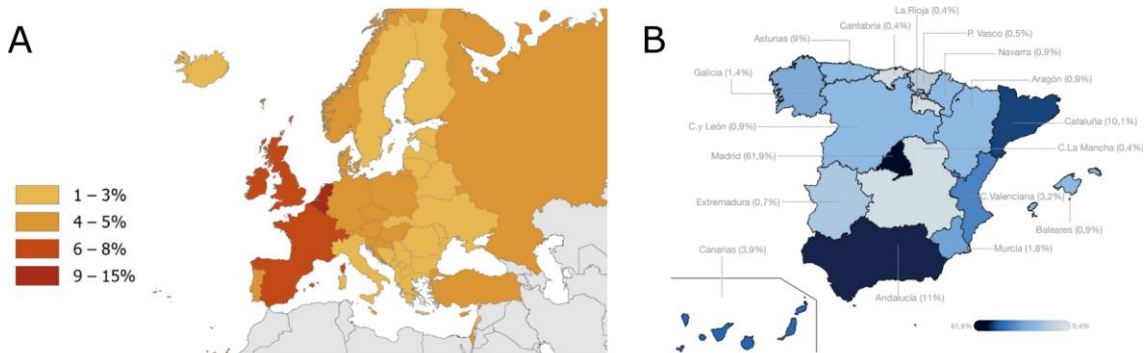


Figura 13. Porcentaje de usuarios de drogas estimulantes durante las prácticas sexuales (*chemsex*). **A)** Europa [86]. **B)** España [87].

Esta práctica se ha asociado con comportamientos sexuales de riesgo, como un menor uso del preservativo, mayor número de parejas sexuales, así como con una mayor incidencia de ITS, VIH y hepatitis C [88]. El *chemsex* se ha visto potenciado por el uso de las aplicaciones móviles, ya que hasta un 77% de los usuarios de *chemsex* reconocen que la vía de acceso para practicarlo es a través de estas aplicaciones. Además, la mayoría de los usuarios suelen utilizar más de una aplicación para este fin. Por otro lado, un porcentaje elevado practica *chemsex* en lugares de ocio como discotecas o saunas (Figura 14).

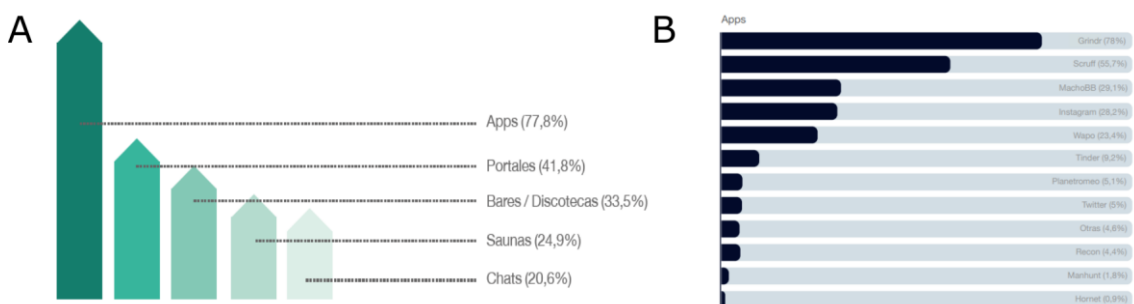


Figura 14. **A)** Vías de acceso al consumo de *chemsex* [89]. **B)** Frecuencia de utilización de aplicaciones móviles para contactos sexuales [87].

3.5.3. Impacto de la movilidad de la población

Los viajes internacionales se han considerado clásicamente un factor de riesgo para la adquisición de las ITS [90,91]; durante los viajes, las personas se sienten menos inhibidas respecto a las normas sociales y morales, lo que puede dar lugar a cambios en los comportamientos sexuales y la exposición a las ITS [92].

Previo al inicio de la pandemia, el número de turistas internacionales a nivel global ha aumentado de forma significativa año tras año, pasando de 278 millones en 1980 a 1.466 millones en 2019 [93], lo que potencialmente podría relacionarse con la propagación de las ITS. Según un metaanálisis, la prevalencia de relaciones sexuales casuales durante los viajes varía ampliamente entre estudios, con prevalencias entre el 5,6% y el 62,9% [94], siendo mayor en el caso de los HSH [95–97]. Además, en un 50% de los casos los contactos sexuales tenían lugar sin el uso de preservativo [94], lo que podría favorecer la adquisición de las ITS [98,99].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que otros tipos de desplazamientos, como la migración, ya sea por motivos sociales, económicos o políticos, puede influir en la transmisión de las ITS. Se ha demostrado que los comportamientos sexuales de esta población se ven influidos por el propio proceso migratorio [100], ya sea por la falta de apoyo social, la soledad [101], las necesidades económicas o cambios en las costumbres respecto a su país de origen [102], lo que hace a esta población especialmente vulnerable a padecer una ITS.

3.5.4. Mejoras sanitarias: impacto de la profilaxis pre-exposición para el VIH

La profilaxis pre-exposición (PrEP) para el VIH fue aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2012 y por la Agencia Europea del Medicamento en 2016 [103,104]. Sin embargo, en el caso de España, no fue hasta el 1 de noviembre de 2019 cuando se implementó en todo el territorio nacional. El uso de la combinación de tenofovir disoproxilo fumarato (TDF) y emtricitabina (FTC) ha demostrado alta eficacia en la prevención del VIH en ensayos clínicos aleatorizados, con eficacias globales por encima del 85% [105]. Sin embargo, su implementación ha causado mucha controversia debido a su seguridad a largo plazo, el riesgo de selección de resistencias o el riesgo de cambios en los comportamientos sexuales que podrían contrarrestar el beneficio de la PrEP.

El cambio en los comportamientos sexuales tras la introducción de la PrEP ha sido fuente de numerosos estudios. El acceso a la PrEP y la pérdida del miedo al VIH podría favorecer comportamientos como la reducción del uso del preservativo o un aumento en el número de parejas sexuales, lo que podría dar lugar a un incremento de las ITS. Los

primeros estudios sobre el impacto de la PrEP en los comportamientos sexuales no apoyaron de forma consistente que facilitasen las ITS. Sin embargo, estos estudios consistían en ensayos aleatorizados en los que los participantes desconocían si estaban recibiendo o no PrEP, y, en la mayoría de los casos, se observó un descenso en las conductas de riesgo [105]. En los estudios basados en encuestas a los posibles usuarios de PrEP, el 35% de los encuestados afirmaron que reducirían el uso del preservativo [106]. A medida que el uso de la PrEP se fue extendiendo, se han acumulado más evidencias en este aspecto. En un metaanálisis publicado en 2018 [107], la mayoría de los estudios no reflejaron cambios en el número de parejas sexuales o en el número de episodios de sexo anal, pero sí un descenso en el uso global del preservativo [108]. Además, las parejas sexuales de los usuarios de PrEP eran más frecuentemente VIH-positivas o de estatus serológico desconocido [109,110].

En cuanto al impacto en el aumento de las ITS, la mayoría de los estudios han observado una mayor incidencia de ITS en usuarios de PrEP [111] (Figura 15); en un metaanálisis se observó una clara asociación entre el uso de PrEP y el aumento de las ITS, con un incremento del 24% en la prevalencia de ITS en los usuarios de PrEP respecto a los no usuarios, especialmente en el caso de *C. trachomatis* y en localización rectal [107]. Sin embargo, muchos de estos estudios no diferencian entre ITS sintomáticas y asintomáticas; además, los usuarios de PrEP se someten más a menudo a cribado de ITS, pues es necesario para su correcto seguimiento [112]. En estudios que evaluaron la incidencia de ITS sintomáticas, como la gonorrea uretral o la sífilis primaria, los resultados son variables. En un estudio realizado en California, la incidencia de gonorrea uretral antes y después del inicio de la PrEP fue prácticamente la misma [113]. Sin embargo, en un estudio de cohortes se detectó un aumento de la incidencia de gonorrea y de *C. trachomatis* rectal tras el inicio de la PrEP [114].

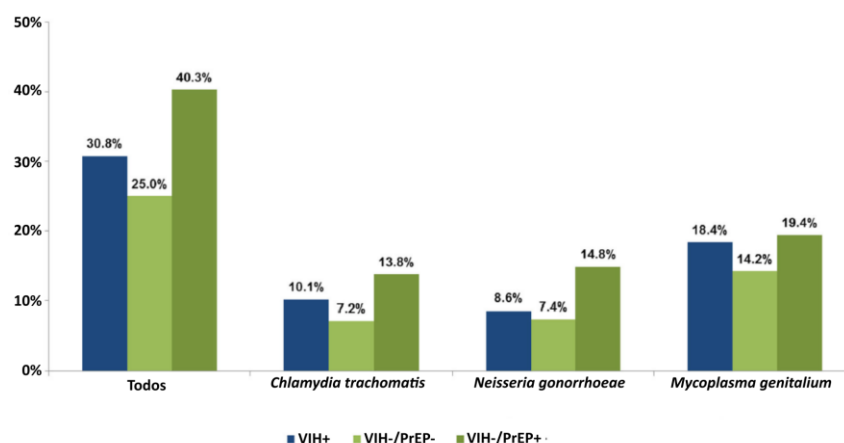


Figura 15. Prevalencia de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium* en función del estatus VIH/PrEP. Adaptado de Jansen y cols [111].

3.6. Consecuencias del incremento de las ITS

Uno de los principales problemas para el control de las ITS es el alto porcentaje de población asintomática. Estos individuos, en ausencia de síntomas, evitan el contacto con el sistema sanitario, contribuyendo al mantenimiento de la epidemia y dificultando su control. Por otro lado, la infección asintomática no es sinónima de un estado de portador, sino que los individuos asintomáticos y no diagnosticados podrán sufrir consecuencias directas sobre su salud (Figura 16), tal y como se ha comentado en el apartado 2.2.1. Por tanto, cuanto más circulen las ITS, mayor será la población asintomática en riesgo de complicaciones derivadas de la ausencia de diagnóstico.

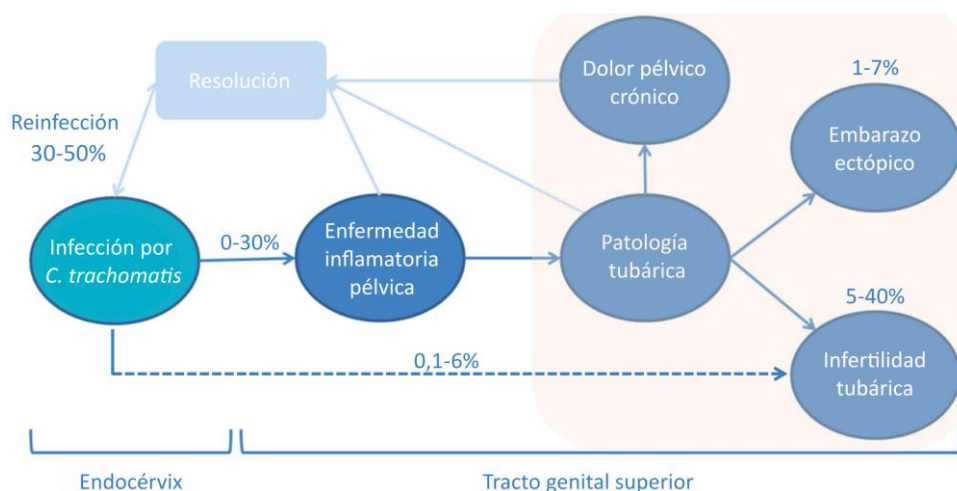


Figura 16. Historia natural de las secuelas causadas por las infecciones por *C. trachomatis* no diagnosticadas y no tratadas en mujeres. Adaptado de ECDC, 2015 [115].

4. Estrategias para el control de las ITS

En la 75 Asamblea de la OMS celebrada el 22 de mayo de 2022, la OMS rediseñó para el periodo 2022-2030 la Estrategia Global del Sector de Salud del periodo 2016-2021 [116], incluyendo en el mismo programa el VIH, las hepatitis virales y las ITS [38], lo que podría ser una oportunidad para la inclusión de las ITS en los programas nacionales de vigilancia. Las líneas generales de este plan estratégico global se resumen en:

- Programas de prevención primaria basados en concienciación comunitaria y formación docente de profesionales sanitarios que permitan crear un entorno favorable para hablar cómodamente sobre salud sexual e identificar cualquier población expuesta a ITS para su inmediato diagnóstico, lo que permitirá aumentar el cribado.

INTRODUCCIÓN

- Coordinar adecuados sistemas de derivación de los pacientes a la atención especializada, con independencia del lugar del diagnóstico (servicios públicos, privados y no gubernamentales).
- Fortalecer las capacidades tecnológicas diagnósticas en todos los laboratorios de manera homogénea de manera que exista una equidad en el diagnóstico. Asimismo, fortalecer la capacidad de los sistemas nacionales de información de salud para garantizar la recopilación y el análisis de datos desglosados con el objetivo de adecuar las políticas de salud, las pautas de tratamiento y la asignación de recursos.

El abordaje de la ITS requiere un planteamiento integral, sin limitarse a patógenos específicos. Para ello, el abordaje debe realizarse desde varios aspectos, todos ellos necesarios, con el objetivo de prevenir, diagnosticar, tratar y controlar estas infecciones, y con el propósito final de detener su creciente amenaza para la salud pública. Todas las estrategias deben centrarse en las diversas etapas del proceso asistencial de las ITS (Figura 17), garantizándose el acceso al mismo y la continuidad asistencial para todas las personas.

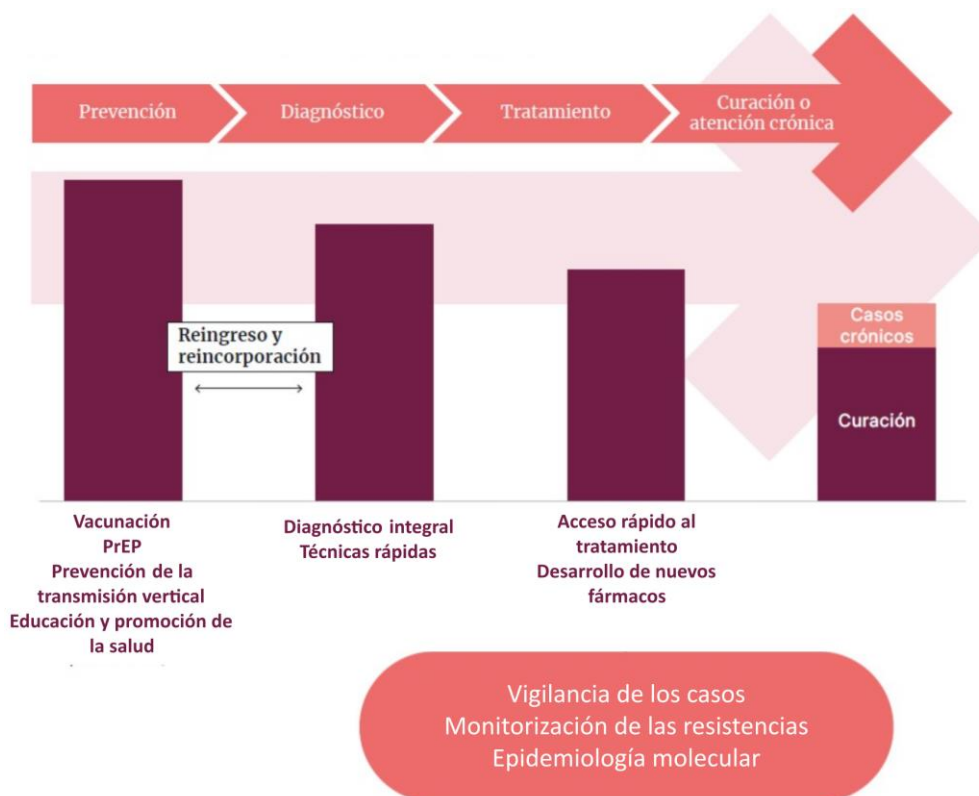


Figura 17. Continuidad asistencial de los servicios contra las ITS. Se destacan las herramientas necesarias para su control en cada una de las etapas del proceso. Adaptado de OMS, 2022 [38].

4.1. Prevención primaria de las ITS

La prevención primaria tiene como objetivo prevenir nuevos casos de infección, siendo las actividades de promoción de la salud sexual el pilar fundamental, que incluyen: PrEP, vacunación, educación para la salud, la educación sexual y la promoción de la salud reproductiva.

4.1.1. Profilaxis pre y post-exposición (PrEP y PPE)

La eficacia de la PrEP para la prevención del VIH ha sido confirmada por varios ensayos aleatorizados, doble ciego y controlados por placebo. Dos de los estudios más importantes fueron el estudio iPREX [105], donde se observó un descenso del 44% en la incidencia del VIH y el estudio *Partners*, en el que se incluyeron parejas serodiscordantes, y donde se observó un descenso del 75% en la incidencia del VIH [117]. Actualmente se recomienda el uso de la PrEP en dos modalidades, mediante una dosis diaria, o a demanda, en un régimen recomendado de 2-1-1 [118]. Este último consiste en la administración de dos comprimidos entre 2-24 horas antes de la relación sexual prevista, seguido de un tercer comprimido 24 horas después de los dos primeros y un cuarto comprimido 48 horas después de los dos iniciales. El estudio IPERGAY evaluó la eficacia de la PrEP a demanda, observándose una reducción del 86% en el riesgo de contraer la infección por VIH [118]. En las últimas recomendaciones de la OMS se propone el uso de cabotegravir inyectable de acción prolongada para la prevención del VIH, gracias a los resultados de dos ensayos aleatorizados que han demostrado una reducción del 79% del riesgo de infección por VIH [119].

A pesar de los buenos resultados de los ensayos aleatorizados en la prevención del VIH y que el fracaso de la PrEP es inusual en personas adherentes, la implementación mundial de la PrEP ha sido relativamente lenta, y las reducciones a nivel de la población de las infecciones por el VIH son modestas [120]. Según la OMS, en 2020 tan solo un 28% de la población mundial que podría beneficiarse de la PrEP estaba recibiendo el tratamiento.

Estas intervenciones son altamente recomendables para la prevención del VIH; sin embargo, como se ha comentado previamente, pueden dar lugar a un aumento de las relaciones sexuales sin preservativo y, por tanto, a un aumento de la incidencia de otras ITS. Por ello, estas intervenciones deben llevar asociadas el cribado periódico de ITS en todos los sitios anatómicos expuestos, así como las pruebas serológicas para la sífilis [121]. Los protocolos actualmente establecidos sugieren un cribado trimestral de ITS

para las personas en PrEP, si bien algunos países están discutiendo la posibilidad de alargar este plazo a 6 meses.

Otro de los posibles efectos de la PrEP es la posibilidad de seleccionar variantes virales resistentes a los antirretrovirales utilizados. Según el informe de vigilancia de la OMS, la resistencia a TDF o FTC fue del 3,5 % si la PrEP se inició antes de adquirir el VIH, mientras que la resistencia fue más probable (33,3%) cuando la PrEP se inició inadvertidamente durante una infección aguda por VIH no diagnosticada. Por ello, es necesario realizar una prueba de detección molecular de VIH en lugar de una prueba serológica antes de iniciar el tratamiento antirretroviral [122].

La profilaxis post-exposición (PPE) es el conjunto de medidas aplicadas cuando no se han aplicado o han fallado otras medidas de prevención primaria previas a la exposición. La PPE no ocupacional (PPENO) está dirigida a aquellos individuos que hayan tenido una exposición accidental a la infección fuera del ámbito sanitario. Para el VIH, ésta consiste en el tratamiento antirretroviral durante 28 días, debiéndose iniciar lo antes posible, preferiblemente dentro de las 6 horas posteriores a la exposición y siempre antes de transcurridas 72 horas. La administración de la PPENO para el VIH debe ser considerada para situaciones muy concretas, requiriendo una evaluación médica en todos los casos.

Además del VIH, se ha propuesto el uso de doxiciclina para la prevención de la sífilis, la gonorrea y la infección por *C. trachomatis*, tanto pre como post-exposición [123]. En un estudio en el que se evaluó el uso diario de doxiciclina en HSH, se produjo un descenso del 73% de sífilis, gonorrea e infección por *C. trachomatis* [124]. En una extensión del estudio IPERGAY se evaluó el uso de doxiciclina 24-72 horas después del contacto sexual de riesgo, con una menor incidencia de ITS en el grupo de intervención, especialmente para los casos de sífilis y *C. trachomatis* [124]. Sin embargo, hoy en día el uso de doxiciclina no está recomendado por ninguna guía clínica, pues aún son necesarios más estudios de seguridad y eficacia, así como evaluar el impacto en la resistencia a los antimicrobianos.

4.1.2. Vacunación

Clásicamente, las vacunas son una de las medidas más eficaces para la prevención de las enfermedades infecciosas. En el caso de las ITS, actualmente sólo la hepatitis B y el VPH disponen de vacuna comercializada. En el caso del VPH, existen tres vacunas autorizadas: la vacuna bivalente (genotipos 16 y 18), la tetravalente (genotipos 6, 11, 16 y 18) y la nonavalente (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58). Todas ellas incluyen los genotipos 16 y 18, responsables del 71% de los cánceres cervicales a nivel global,

mientras que la vacuna nonavalente incluye aquellos genotipos que en conjunto son responsables del 89% de los cánceres cervicales [125,126]. Estas vacunas han demostrado su eficacia en la prevención del cáncer de cérvix y ano, en la prevención de lesiones precancerosas en cérvix, vulva, vagina y ano, así como para la prevención de las verrugas genitales (tetra y nonavalente). Por tanto, es de especial relevancia la incorporación de esta vacuna a los calendarios de vacunación. En la actualidad, más de 100 países han incluido la vacunación contra el VPH en sus programas de inmunización [127]. Sin embargo, en 2020 sólo un 14% de las niñas habían recibido las dos dosis de la vacuna antes de cumplir los 15 años, estableciéndose el objetivo del 90% para 2030 [38].

Varias vacunas seguras y eficaces para la prevención de la infección por el VHB están disponibles desde los años 80. Actualmente se recomienda la administración de la vacuna lo antes posible tras el nacimiento, preferiblemente en las primeras 24 horas, ya que, seguida de 2 o 3 dosis adicionales, proporciona protección de larga duración [30]. El 98% de los países tienen implementado en su calendario de vacunación las tres dosis de la vacuna contra el VHB, y el 57% recomiendan la primera dosis al nacimiento. Sin embargo, en el informe de 2021 sobre la cobertura vacunal, ésta fue del 80% con las tres dosis, con grandes diferencias entre las distintas regiones [128]. Por ello, es necesario seguir promoviendo la vacunación al nacimiento, así como mejorar la vacunación sistemática en los niños. De igual modo, es importante fomentar la vacunación frente al VHB en los adultos, especialmente en grupos de riesgo como pacientes VIH, inmunodeprimidos, trasplantados, con hepatopatía o alcoholismo crónicos, o personas en riesgo de exposición (diálisis, HSH, personal sanitario...).

Por otro lado, es necesario promover la vacunación de aquellas infecciones, que, a pesar de no ser estrictamente ITS, causan un considerable número de casos adquiridos a través del contacto sexual, como la hepatitis A. La vacunación frente a la hepatitis A es de especial importancia en grupos de riesgo, como HSH, pacientes con hepatopatía crónica, así como en viajeros a zonas endémicas, especialmente los niños [129]. Además, el uso de la vacuna combinada frente a la hepatitis A y B favorecería la incorporación de la inmunización contra la hepatitis A en los calendarios vacunales.

4.2. Prevención secundaria de las ITS

La prevención secundaria va encaminada a la detección de la enfermedad en estadios precoces en los que el establecimiento de medidas adecuadas puede impedir su progresión e interrumpir cadenas de transmisión. Esta acción es de gran importancia en la mayoría de las ITS, pues un porcentaje muy significativo de las infecciones cursan de manera asintomática y, por tanto, un cribado proactivo permitiría identificar la

población recién infectada antes de transmitir la enfermedad a otras personas o debutar en el propio individuo no diagnosticado con complicaciones severas. Existen tres métodos principales de prevención secundaria: notificación a la pareja (búsqueda activa de casos, identificando a aquellas personas que puedan haber estado expuestas a la infección), pruebas oportunistas y programas de cribado.

4.2.1. Detección precoz para evitar de la transmisión vertical de las ITS

Son varias las ITS que pueden transmitirse verticalmente de madre a hijo, como el VIH, la sífilis, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, el VHS, el VHB o el HTLV-I. Para evitar la transmisión de estas infecciones sería recomendable un abordaje integral de la prevención, pues las intervenciones necesarias tienen varios elementos en común. Estas intervenciones deberían incluir el cribado prenatal de las mujeres embarazadas, el tratamiento temprano, la profilaxis frente a la oftalmia neonatal y el seguimiento de los recién nacidos, incluyendo la vacunación frente a la hepatitis B.

Muchos de los esfuerzos para la prevención de la transmisión vertical de las ITS han ido dirigidos a la prevención de la sífilis congénita. Los casos de sífilis congénita se utilizan como indicador de calidad de los servicios de salud; por ejemplo, en Estados Unidos, más de la mitad de los casos se debieron a un déficit en el cribado o el tratamiento [130]. En el último informe del CDC alertan sobre el preocupante incremento de la sífilis congénita, con un incremento del 236% respecto al 2016, cifras que indican que el cribado no es lo suficientemente generalizado. Desde 2007, la OMS ha puesto en marcha varias estrategias globales para la eliminación de la transmisión congénita de la sífilis. Desde 2012, la cobertura media de cribado prenatal a nivel global está por encima del 85%; sin embargo, en 2017 sólo el 9% de los países habían alcanzado el objetivo del 95% de mujeres embarazadas sometidas a cribado [131]. Por ello, es necesario seguir realizando esfuerzos para alcanzar los objetivos propuestos en la estrategia global de la OMS para el 2020-2030 [38].

4.2.2. Diagnóstico precoz basado en técnicas rápidas

Clásicamente, el abordaje de las ITS ha sido sindrómico. Éste se basa en el reconocimiento de grupos de signos y síntomas y, mediante el empleo de algoritmos diagnósticos, se establece un tratamiento empírico que cubre los principales patógenos implicados. El abordaje sindrómico favorece el tratamiento innecesario de muchos individuos, impactando directamente en el aumento de la resistencia a los antimicrobianos [132]. Además, esta aproximación no es eficiente debido al alto

porcentaje de infecciones asintomáticas, favoreciendo la persistencia de la infección y las secuelas asociadas.

A pesar de ello, las ITS se siguen tratando de una manera sindrómica a la espera de los resultados microbiológicos, pues en la mayoría de los casos éstos no están disponibles de manera inmediata. Así, desde 2001, la OMS estableció varios algoritmos para el manejo de los casos basados en árboles de decisión [133]. En la última actualización de junio de 2021, los algoritmos propuestos por la OMS incluyen una rama relacionada con la disponibilidad de métodos diagnósticos rápidos o moleculares. Disponer de métodos rápidos de diagnóstico permitiría el paso de un tratamiento clínico a uno etiológico, de especial importancia en países con escasos recursos, pues ayudaría a reducir las altas tasas de ITS en estos entornos. De hecho, la OMS recomienda la implementación de estas técnicas en los lugares de atención, especialmente en entornos donde el acceso al laboratorio sea difícil.

Hoy en día, se considera que la participación de los servicios de salud comunitaria es fundamental para acceder a una parte de la población a la cual el sistema sanitario tiene dificultades en llegar. Estas organizaciones están comprometidas a realizar un diagnóstico rápido, sencillo y a pie de paciente facilitando su derivación a centros especializados para su tratamiento y prevención terciaria.

Para el diagnóstico del VIH y de las principales hepatitis víricas están disponibles varias pruebas rápidas que permiten la detección de anticuerpos específicos en muestras de sangre, plasma o saliva. En el caso del VIH, también existen ensayos que permiten la detección simultánea del antígeno p24, mejorando la sensibilidad en fases tempranas de la infección. Estas técnicas pueden ser útiles en los programas de cribado, permitiendo un diagnóstico y el acceso temprano al tratamiento. Además, algunas de estas pruebas pueden utilizarse en autodiagnóstico, favoreciendo la adherencia a los programas de cribado.

4.3. Vigilancia epidemiológica de las ITS

Una última acción estratégica necesaria para el control de las ITS consiste en la implementación de sistemas de vigilancia de las ITS a tres niveles: 1) Identificación de las poblaciones prioritarias y monitorización de los casos, 2) epidemiología molecular y 3) monitorización de la resistencia a los antimicrobianos.

4.3.1. Monitorización de los casos

Los sistemas de vigilancia de las ITS deben proporcionar datos que sean representativos de la población y deben ser lo suficientemente sensibles para detectar posibles epidemias emergentes. Estos sistemas son esenciales no sólo para conocer las tendencias de la enfermedad, sino también para establecer estrategias de control y prevención, evaluar su eficacia, identificar poblaciones o zonas geográficas de mayor riesgo y para el desarrollo de políticas de salud pública. Sin embargo, a nivel global existe una considerable variabilidad en los sistemas de vigilancia implementados, lo que hace difícil comparar los datos entre regiones [19].

En Estados Unidos, el CDC se encarga de la recopilación de los datos de vigilancia procedentes de los laboratorios de Salud Pública de todos los departamentos de salud estatales y territoriales [19]. Las ITS de notificación obligatoria a nivel nacional son la sífilis (incluyendo la sífilis congénita), la gonorrea, la infección por *C. trachomatis* y el chanco blando (causado por *Haemophilus ducreyi*) [134].

En el caso de Europa, en 2001 se estableció la Red de Vigilancia Europea de las Infecciones de Transmisión sexual (ESSTI) cuyo principal objetivo era el de desarrollar y coordinar la vigilancia epidemiológica y de laboratorio de las ITS en Europa [135]. A partir de 2009, la coordinación de la vigilancia de las ITS en Europa quedó en manos del ECDC, siendo la sífilis (incluyendo la sífilis congénita), la gonorrea y la infección por *C. trachomatis* (incluyendo linfogranuloma venéreo) las infecciones bajo vigilancia [136]. Sin embargo, aún existen grandes diferencias entre los países miembros en cuanto a los sistemas utilizados para la notificación (activa, pasiva, basada en laboratorio o en datos clínicos) así como en las tasas de notificación [19]. En España, la vigilancia de las ITS se realiza a través del Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) y el Sistema de Información Microbiológica incluidos en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) [137,138]. Hasta 2015, sólo la sífilis (incluyendo la sífilis congénita) y la gonorrea eran EDO, momento a partir del cual se incluyó la infección por *C. trachomatis* y el linfogranuloma venéreo [139].

Estas redes de vigilancia bien establecidas contrastan con las de países en vías de desarrollo de África, América, o sur de Asia, en los que las estimaciones de las ITS normalmente se obtienen a partir de estudios transversales, a veces como parte de ensayos de prevención del VIH [140–142]. Uno de los objetivos de la OMS es que en 2025 más del 50% de los países dispongan de un adecuado sistema de vigilancia de las ITS, con un objetivo final por encima del 90% en 2030 [38].

4.3.2. Epidemiología molecular

Una herramienta esencial en la vigilancia epidemiológica de las ITS la constituyen los métodos de tipificación. Éstos proporcionan información muy valiosa que puede utilizarse para el desarrollo de medidas de control de salud pública e intervenciones preventivas, pues son útiles para la identificación de grupos de riesgo, el rastreo de contactos, control del fracaso de tratamiento y el control de la resistencia a los antimicrobianos.

Clásicamente, los métodos de tipificación pueden ser de dos tipos: fenotípicos y genotípicos. Los métodos fenotípicos se basan en las características fenotípicas de los microorganismos, como el perfil de resistencia a los antimicrobianos, los requerimientos nutricionales o las propiedades antigénicas. El desarrollo de los métodos moleculares hizo que los métodos fenotípicos se usaran cada vez menos, ya que estos métodos proporcionan un mayor poder de discriminación. En los últimos años, las técnicas de secuenciación de genomas completos (WGS) se ha posicionado como una herramienta con un gran potencial en el diagnóstico, la vigilancia de las infecciones y detección de resistencias.

En el caso de las ITS, se han descrito métodos de tipificación para los principales microorganismos, como *N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, *C. trachomatis* y *T. vaginalis*. Sin embargo, el número de estudios es muy limitado para ciertos microorganismos y actualmente existe una falta de armonización de los métodos que permitan la comparación a nivel internacional. Además, la aplicación de WGS a la vigilancia de las ITS sigue siendo muy limitada, especialmente para microorganismos cuyo cultivo es más difícil, como en el caso de *C. trachomatis* o *T. pallidum*.

La aplicación de la epidemiología molecular en ITS es una herramienta imprescindible para el control de estas infecciones. Por ejemplo, los clones ST1901 Y ST7363 de *N. gonorrhoeae*, diseminados globalmente, se han asociado a altos niveles de resistencia a cefalosporinas [143,144], lo que hace necesario monitorear su propagación mediante una tipificación molecular adecuada. En el caso de *C. trachomatis*, la tipificación ha demostrado utilidad en la diferenciación de reinfección y persistencia debido a fracaso del tratamiento. En un estudio del año 2015, el 80% de los genotipos detectados en el seguimiento de los pacientes infectados por *C. trachomatis* era distinto al genotipo del diagnóstico, poniendo de manifiesto que posiblemente las nuevas detecciones correspondían a reinfecciones [145].

4.3.3. Monitorización de la resistencia a los antimicrobianos

La monitorización de la sensibilidad a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de las ITS es crítico para la detección de resistencias emergentes y ajustar las recomendaciones para el tratamiento, siendo de especial importancia en el caso de *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium*.

N. gonorrhoeae ha ido adquiriendo poco a poco resistencia a las principales familias de antibióticos, como son las penicilinas, los macrólidos, las tetraciclinas y las fluorquinolonas [146]. En los últimos años, se han descrito cepas resistentes tanto a ceftriaxona/cefixima como a azitromicina en varios países, antibióticos de elección para el tratamiento de la infección gonocócica [147–149], incluyendo la resistencia a ambas familias de forma simultánea [150]. Así, la OMS incluyó a *N. gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas y fluorquinolonas entre los patógenos resistentes con prioridad alta para la búsqueda de nuevos antimicrobianos [151]. Para su vigilancia, la OMS estableció el programa *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (GASP)*, en el que una red de laboratorios de más de 60 países se encarga de monitorizar la resistencia en *N. gonorrhoeae*. De forma similar, desde 2009 en Europa la vigilancia se realiza a través del Programa Euro-GASP, en el que participan 26 países europeos [152].

La resistencia a azitromicina en *M. genitalium* está adquiriendo especial importancia, ya que se ha descrito un importante incremento en las tasas de resistencia en los últimos años [153,154], con muchos países con tasas por encima del 50% [155]. Actualmente no existen programas globales para el control de la resistencia a los antimicrobianos en *M. genitalium*. Sin embargo, sí hay países donde se ha implementado la vigilancia recientemente, como es el caso de Reino Unido, que la incorporó en 2019 [156].

Hipótesis y objetivos generales



El notable incremento de las principales infecciones de transmisión sexual (ITS) bacterianas durante los últimos años pone de manifiesto la necesidad de implementar estrategias para su control. Estas estrategias deben abordar el problema desde un punto de vista integral, englobando la prevención, el diagnóstico rápido con alta sensibilidad y especificidad, la adecuada administración del tratamiento antibiótico en todos los pacientes diagnosticados, así como la monitorización de los casos y la epidemiología molecular.

La hipótesis general de esta Tesis es que el linfogranuloma venéreo (LGV), ITS asociada a los genotipos L de *C. trachomatis*, se está dispersando en la población con pocas medidas destinadas a mejorar el diagnóstico, la monitorización de los casos o a comprender la evolución de las variantes, lo que tiene un impacto negativo en la eliminación de la epidemia en nuestro entorno.

Esta Tesis tiene como objetivo principal comprender y mejorar nuestro conocimiento sobre la dispersión de los microorganismos de transmisión sexual, tomando como modelo el LGV. Para ello, se realizará un abordaje desde dos grandes aspectos: mejorar el conocimiento de la epidemiología molecular y aumentar el diagnóstico de los casos.

En cuanto a la epidemiología, se intentará resolver dos problemas principales. Por un lado, la limitada información disponible sobre la epidemiología del LGV en nuestro entorno y, por otro, la escasa disponibilidad de herramientas moleculares para resolver con suficiente precisión la epidemiología molecular de los genotipos L de *C. trachomatis*. En los dos primeros capítulos se analizará la epidemiología del LGV durante un periodo de 10 años (**primer objetivo**) y posteriormente, el impacto de la pandemia por SARS-CoV-2 en la evolución de la epidemia de LGV (**segundo objetivo**). Como **tercer objetivo**, se planteó el desarrollo de un nuevo esquema de tipado molecular que nos permita resolver con mayor precisión las redes sexuales asociadas a la transmisión del LGV.

La mejora diagnóstica de los casos de LGV es esencial para reducir su propagación a través de cadenas de transmisión. Tanto la población no diagnosticada (fundamentalmente asintomática), como la no correcta detección de los genotipos L (que impacta en una menor duración del tratamiento, especialmente en población sintomática), contribuye al mantenimiento de la epidemia. Para ello, como **cuarto objetivo** se propuso el desarrollo de una nueva PCR para la detección de los genotipos L que nos permitiera aumentar la sensibilidad.

Capítulo I

Caracterización molecular de la epidemia de linfogranuloma venéreo en Madrid

*“Si un reto vale la pena,
sólo que lo intentes ya te hace
mejor”*

Ada E. Yonath



ANTECEDENTES

1. Infecciones causadas *C. trachomatis*

Los miembros del orden Chlamydiales son patógenos intracelulares obligados que dependen de células huésped eucariotas para completar su ciclo biológico [157], y cuya evolución ha sido en base al tropismo específico por estas células. *C. trachomatis* infecta exclusivamente a los humanos [158], causando la ITS bacteriana más frecuente a nivel global [17]. En base al tropismo de las diferentes variantes, se identifican tres patologías causadas por *C. trachomatis*:

- Tracoma: representa la principal causa de ceguera por causa infecciosa en el mundo, considerándose endémica en África y Oriente Medio. Se asocia a los serovares A, B y C de *C. trachomatis*, que infectan las células epiteliales conjuntivales. El tracoma está relacionado con inadecuadas condiciones higiénico-sanitarias, que favorecen las infecciones de repetición. Cada nueva infección causa un engrosamiento inflamatorio de la conjuntiva en la que tejido fibroso va sustituyendo a la conjuntiva y, poco a poco, a una opacificación de la córnea y a una ceguera irreversible [159].
- Infección urogenital no invasiva: causada por los serovares D-K de *C. trachomatis*, que infectan las células epiteliales del tracto genital. Los principales cuadros clínicos son cervicitis en mujeres y uretritis en hombres. Estos genotipos también pueden causar infección ocular, especialmente en neonatos o adultos que han estado en contacto con secreciones genitales.
- Linfogranuloma venéreo (LGV) o infección urogenital invasiva: causada por los genotipos L1, L2 y L3 de *C. trachomatis*. Éstos son capaces de invadir no sólo a las células epiteliales del tracto urogenital, sino también los macrófagos, propagándose sistémicamente a través de los ganglios linfáticos [160].

Mientras que el tracoma se transmite fundamentalmente a través del contacto con secreciones oculares bien persona-persona o a través de fómites [159], la infección urogenital no invasiva y el LGV son consideradas ITS.

1.1. Diversidad de *C. trachomatis*: aclaración de la nomenclatura

En 1998, se publicó el primer genoma de *C. trachomatis*, perteneciente al genotipo D [161]. El genoma de *C. trachomatis* es pequeño, de aproximadamente 1 Mb, constituyendo, junto a los micoplasmas, las especies bacterianas con los genomas más pequeños. Además, *C. trachomatis* posee un plásmido críptico de 7,5 Kb que ha

coevolucionado con el cromosoma [162]. Tradicionalmente, se ha considerado que la tasa de recombinación en *C. trachomatis* es baja debido a su ciclo biológico y a sus escasas oportunidades de intercambio genético; sin embargo, la secuenciación de genomas completos ha revelado que su genoma es resultado de múltiples eventos de recombinación, revelando una alta capacidad para generar nuevas variantes [163]. Esta capacidad tiene su máximo exponente en la selección y dispersión de la variante hipervirulenta resultado de una recombinación extensa de los genotipos L2 y D [164], la cual se ha ido dispersando por varios países [165,166]. No obstante, hay que tener en cuenta que la variabilidad por mutación es hasta 70 veces más frecuente que la recombinación, y que, por tanto, también contribuye significativamente a la diversificación [163].

Históricamente, se han aplicado una gran variedad de términos para dirigirse a un determinado tipo de clamidia, como variante, biovar, serovar, genotipo, o serotipo, entre otras. Esto se debe fundamentalmente a los sucesivos métodos que han ido surgiendo para el tipado de *C. trachomatis* (Capítulo III). Los métodos de tipado de *C. trachomatis* se han basado fundamentalmente en la caracterización del gen *ompA*, que codifica para la proteína principal de membrana externa (MOMP), zona que ha demostrado ser altamente recombinogénica [167,168].

La gran diversidad observada en *C. trachomatis* y los múltiples métodos de tipado ha dado lugar a una gran confusión en la nomenclatura usada. Así, el Subcomité de Taxonomía de Chlamydiae establece la utilización de **genotipo** y **genovariantes** derivadas de éstos cuando la identificación se realiza por técnicas moleculares basados en pocos genes; y los términos **genomotipo** y **genomovariante** cuando se realiza mediante secuenciación de genomas completos. Los términos serovar y serotipos se reservan cuando la asignación se realiza por técnicas serológicas, mientras que el uso de biovares ha quedado eliminado [169].

2. Linfogranuloma venéreo

El linfogranuloma venéreo (LGV) es la ITS causada por los genotipos L (L1-L3) de *C. trachomatis*, que, a diferencia del resto de genotipos, tienen una naturaleza invasiva.

2.1. Presentación clínica

El periodo de incubación del LGV varía entre 3 y 15 días [170]. El curso clínico de la enfermedad puede dividirse en tres etapas principales. La primera etapa se caracteriza por la aparición de una lesión en el lugar de la inoculación, de tamaño variable (1-5 mm)

e indolora, que suele desaparecer de forma espontánea; esta etapa suele pasar desapercibida. Entre 2 y 6 semanas después de la aparición de la lesión primaria, se produce la invasión de los ganglios linfáticos próximos. Clásicamente, esta etapa se manifiesta como una linfadenopatía grave de los ganglios inguinales o femorales conocidos como bubones, normalmente unilaterales y muy dolorosos, si bien esta fase también puede cursar de una manera asintomática. Aunque la mayoría de los pacientes suelen recuperarse sin secuelas, en algunos casos, y sobre todo en ausencia de tratamiento, pueden aparecer complicaciones más graves. La linfadenitis crónica puede dar lugar a fibrosis, pudiendo causar la obstrucción linfática (estenosis) del trato genital y elefantiasis [171].

2.2. Antecedentes históricos y epidemiológicos

En 1833, Wallace describe por primera vez la enfermedad como “bubón tropical”, pensando inicialmente que la infección era de origen climático [172], y no siendo hasta casi un siglo después, en 1912, cuando Rost estableció el origen venéreo de esta enfermedad [173]. En 1913, Nicolas y Favre describen por primera vez el LGV como una condición clínica diferente, clasificándola como una nueva entidad a la que denominaron “linfogranulomatosis” [174]. En 1922, Phylactos estableció que un único agente infeccioso podía causar las diferentes etapas y manifestaciones clínicas del LGV: úlcera genital, proctitis y formación de bubones [175]. El descubrimiento del agente etiológico fue finalmente atribuido en 1927 a Gay-Prieto [176].

En 1925, Frei desarrolló una prueba cutánea para el diagnóstico de LGV. El cultivo del agente etiológico se consiguió en 1935, facilitando el desarrollo de un antígeno estandarizado para las pruebas cutáneas y el diagnóstico serológico [177]. Sin embargo, hasta la llegada de las técnicas moleculares, el diagnóstico de LGV se basó fundamentalmente en la presencia de unas manifestaciones clínicas determinadas.

Durante el siglo XX y principios del XXI el LGV casi estaba restringido a regiones tropicales y subtropicales [178]. Sin embargo, en las zonas endémicas de África, Asia, América Central y del Sur, la verdadera prevalencia del LGV no era bien conocida, y en los pocos estudios disponibles, las prevalencias variaban entre el 4% y el 18% [179,180]. La mayoría de los casos descritos fuera de estas áreas eran considerados casos importados asociados a los movimientos migratorios [181], notificándose en su mayoría como casos esporádicos [182]. Durante la década de los 80 se describieron varias series de casos en países industrializados. Una de las mayores series es la publicada en París, con un acúmulo de 27 casos durante un periodo de 6 años [183]. En esta serie la mayoría de los pacientes procedían de un país distinto a Francia, la mayoría cursaron con adenopatías

y solo dos pacientes cursaron con proctitis. Durante los años 1982-1983 en Estados Unidos se detectó un brote en HSH, todos ellos causados por la misma variante, L1 [184]. En 1987, se comunicaron en Sicilia un total de 6 casos de LGV [185]. En 1988 se identificaron varios casos en Florida asociados a la prostitución [186]. Sin embargo, ninguna de estas entradas esporádicas generó cadenas de transmisión en la población.

2.3. Epidemia actual de linfogranuloma venéreo

2.3.1. El inicio de la epidemia: brote en los Países Bajos

En febrero de 2003 se describió en Rotterdam, Países Bajos, un caso de LGV en un varón que había mantenido relaciones sexuales con otro varón en Ámsterdam [187], lo que podría indicar una cadena de transmisión no detectada. A finales de ese mismo año, las autoridades sanitarias de Rotterdam comunicaron un acúmulo de 15 casos de proctitis en HSH [188]. Como consecuencia de esa alerta, se realizaron esfuerzos para aumentar la concienciación entre los profesionales sanitarios, diagnosticándose 17 casos más de forma retrospectiva. En septiembre de 2004, ya eran 92 los casos confirmados en la ciudad [189].

Todos los casos diagnosticados en Rotterdam eran HSH con edades comprendidas entre 26 y 48 años. La mayoría era pacientes VIH-positivos y presentaban otras ITS de manera concomitante. En las encuestas epidemiológicas realizadas a los casos, todos ellos notificaron contactos sexuales sin protección, muchos anónimos o con individuos procedentes de otras nacionalidades, lo que dificultaba el rastreo de los contactos [190].

Desde junio de 2003, la ESSTI permitió a los epidemiólogos y microbiólogos compartir información y lanzar alertas sobre ITS emergentes o brotes de ITS a través de ESSTI-ALERT [135]. Esta plataforma se utilizó en enero de 2004 para difundir información y medidas de control para el LGV como consecuencia de los nuevos casos detectados. Poco después de la descripción de los primeros casos en Países Bajos, fueron varios los países que empezaron a notificar casos y pequeños brotes en pacientes HSH, tanto en Europa, como en Estados Unidos y Australia.

2.3.2. La propagación de la epidemia en Europa

El LGV no era una enfermedad de declaración obligatoria en muchos países europeos; sin embargo, y como consecuencia de la alerta emitida a través de ESSTI, varios países implementaron medidas adicionales. En enero de 2004, Países Bajos estableció una vigilancia reforzada. Ese mismo año, Alemania (en mayo) y Reino Unido (en octubre) establecieron una vigilancia centinela de LGV. En Suecia, la comunicación de los casos

se inició también en 2004 a través del sistema obligatorio de notificación del laboratorio de *Chlamydia*. En Francia, la vigilancia centinela se introdujo en enero de 2005 [191]. Sin embargo, otros estados miembros de la Unión Europea (UE) no modificaron sus sistemas nacionales de notificación de ITS y los casos de LGV se comunicaron mediante observaciones clínicas o de laboratorio rutinarias.

Como consecuencia de esta rápida acción en varios países europeos, en marzo de 2005 eran más de 350 los casos notificados en un total de 8 países [192], siendo Países Bajos, Francia y Reino Unido los países con mayor número de casos comunicados [193–195]. En los años sucesivos siguieron detectándose casos de LGV; sin embargo, y sobre todo gracias a los países que tenían implementada una adecuada vigilancia de la infección, como Reino Unido, se observó una aparente estabilidad desde 2006 (Figura 18), que incluso llevó a algunos autores a pensar que el brote podría desaparecer [196].

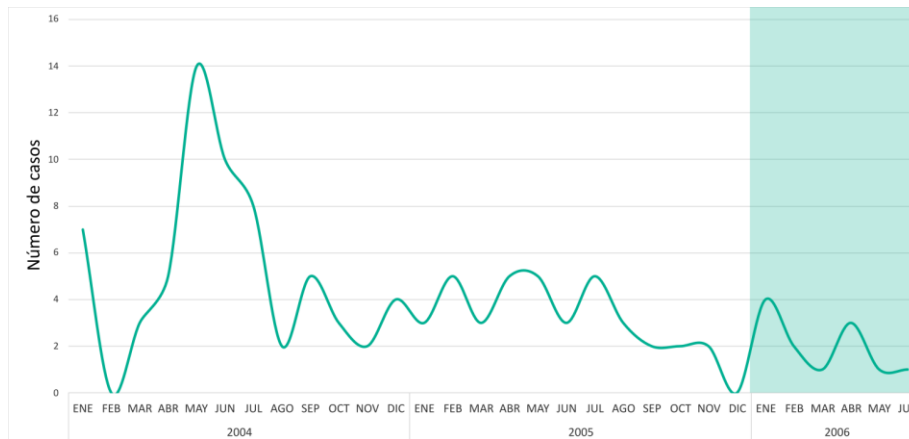


Figura 18. Número de casos notificados por Reino Unido en el periodo 2004-2006. Tras el brote inicial, se observa una estabilización de los casos en 2006 [193].

Atendiendo a las fechas de comunicación de los casos, se observó una dispersión radial de los casos de LGV desde Países Bajos al resto de países europeos (Figura 19). En primer lugar, se observó una dispersión inicial a Bélgica, Francia y Reino Unido, y posteriormente de éstos a Irlanda, España e Italia. Poco a poco más países se sumaron a la detección de casos de LGV: Dinamarca en 2007 [191], Italia [197], Portugal [198] y Austria [199] en 2008, Noruega [200] e Irlanda [201] en 2010, República Checa [202] en 2011, y Croacia [203] y Finlandia [204] en 2012.

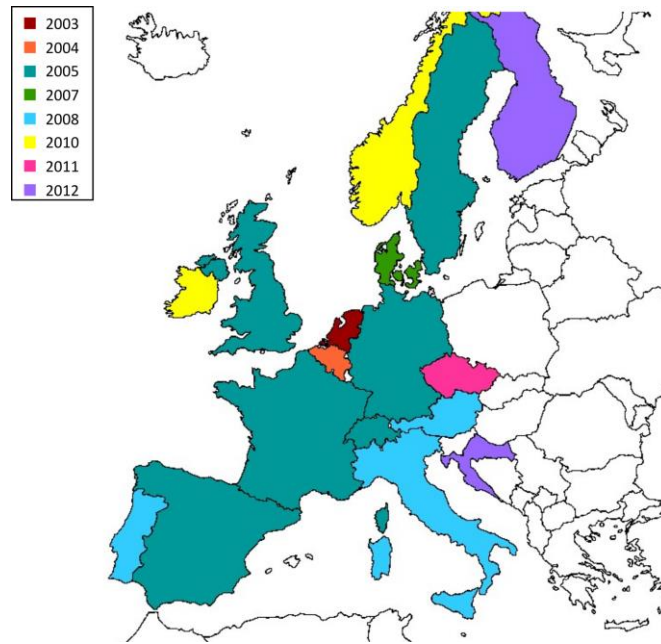


Figura 19. Dispersión radial de los casos de LGV desde Países Bajos hacia el resto de los países europeos durante el periodo 2003-2012. Adaptado de Rodríguez-Domínguez, 2015.

Desde 2010, el número de casos de LGV notificados en Europa fue aumentando año tras año, desde 728 casos en 2010 a 3.112 casos en 2019 [58], lo que supone un incremento del 327,5% (Figura 20). En el Informe Epidemiológico Anual del ECDC de 2019, se observa un incremento del 30% en el número de casos respecto al año 2018, observándose los mayores incrementos en Eslovenia (131%), Bélgica (67%), Países Bajos (50%) y Reino Unido (49%) [58]. Hasta 2016, fueron notificados 10.105 casos en 15 países; sin embargo, el 89% fueron notificados únicamente por tres: Países Bajos, Francia y Reino Unido [205].

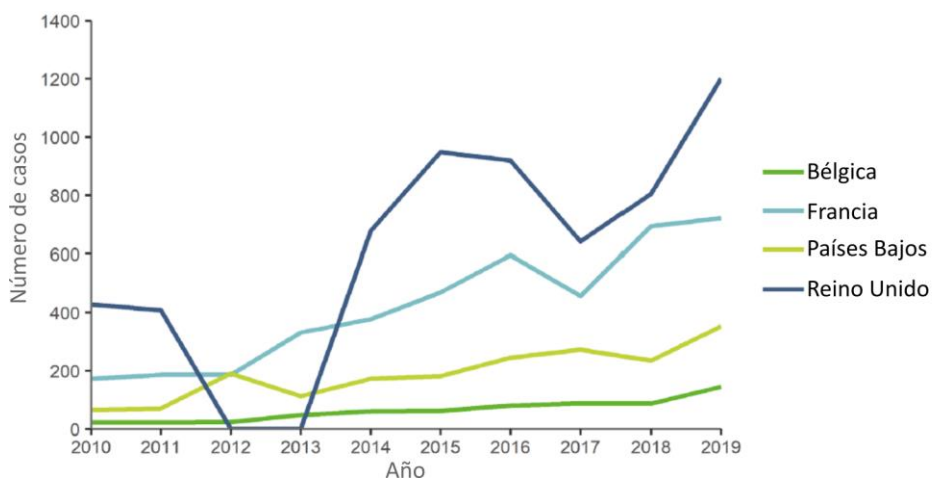


Figura 20. Evolución temporal de los casos de LGV en el periodo 2010-2019 en los países con mayor número de casos acumulados. Obtenido de ECDC, 2022 [58].

Desde 2013, las guías europeas recomiendan el cribado sistemático de LGV en HSH que hayan tenido prácticas sexuales de riesgo en los 6 meses previos [206]. Desde 2015, el ECDC aconsejó el cribado sistemático en pacientes con VIH al menos una vez al año, o más frecuentemente, si presentan una infección por *C. trachomatis* [207].

En 2017, España se sumó a la notificación de los casos de LGV [208], aportando datos de los dos años previos. A partir de ese momento, España pasó a ser, junto con Francia, Países Bajos y Reino Unido, uno de los países que más casos de LGV notifica. Esto pone de manifiesto que el número de casos de LGV en España posiblemente esté infraestimado. Esta sospecha es extensible a otros países europeos ya que muy pocos países cuentan con un sistema de notificación bien implementado. Asimismo, las técnicas moleculares necesarias para la correcta detección de los genotipos L no está ampliamente extendida por todo el continente. Pese a las recomendaciones europeas, en el año 2013, sólo 14 laboratorios de 11 países realizaban el diagnóstico molecular de la infección por los genotipos L [209], lo que dificulta conocer la magnitud exacta de la epidemia.

2.3.3. La propagación de la epidemia fuera de Europa

En Estados Unidos, tras el inicio del brote en 2003, se han publicado varias series de casos. En Florida, se detectó un caso en 2009, sumándose 7 más en 2010 [210]. En Michigan, desde agosto de 2015 a abril de 2016 se diagnosticaron 21 casos [211]. En la ciudad de Nueva York, donde el LGV es una EDO [212], se observó un aumento tanto en el número de casos como en el porcentaje de casos de LGV respecto al número de muestras positivas para *C. trachomatis* en el periodo 2008-2015 [213] (Figura 21).

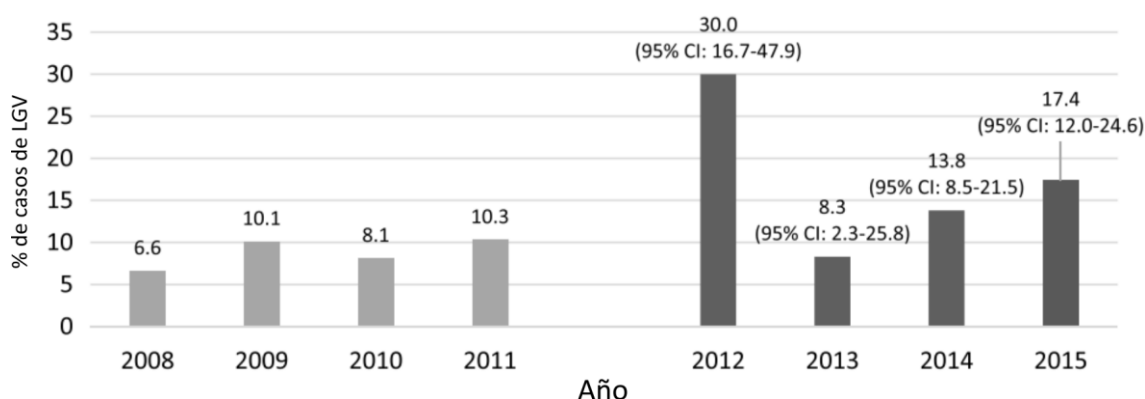


Figura 21. Evolución temporal de los casos de LGV diagnosticados en Estados Unidos (2008-2015) [213].

Sin embargo, en Estados Unidos no está establecida una vigilancia sistematizada de los casos de LGV, y la mayoría de los informes disponibles tienden a centrarse en casos esporádicos o brotes, por lo que existen pocos datos sobre la epidemiología real. En un estudio retrospectivo llevado a cabo en 8 laboratorios de Salud Pública del país, se realizó la detección de genotipos L en todas las muestras rectales remanentes recogidas entre 2015 y 2018, encontrándose una proporción de casos asociados a estos genotipos del 14%. A pesar de que se encontraron diferencias entre las distintas áreas geográficas, con prevalencias entre el 0% y el 21%, estos datos ponen de manifiesto la circulación de LGV en Estados Unidos [214].

En Canadá, los primeros casos se diagnosticaron en 2004, detectándose un total de 13 casos desde enero de 2004 a marzo de 2005, todos ellos correspondientes a la genovariente responsable del brote en Europa, L2b [215]. Una serie posterior de 2003 a 2012, ponía de manifiesto que la infección causada por los genotipos L estaba convirtiéndose en endémica en la población HSH [216]. Desde 2005, la Agencia de Salud Pública de Canadá inició una vigilancia reforzada del LGV, recogiendo de forma sistemática todos los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes. Los datos más recientes disponibles indican una reemergencia del LGV en Canadá desde 2013 (Figura 22).

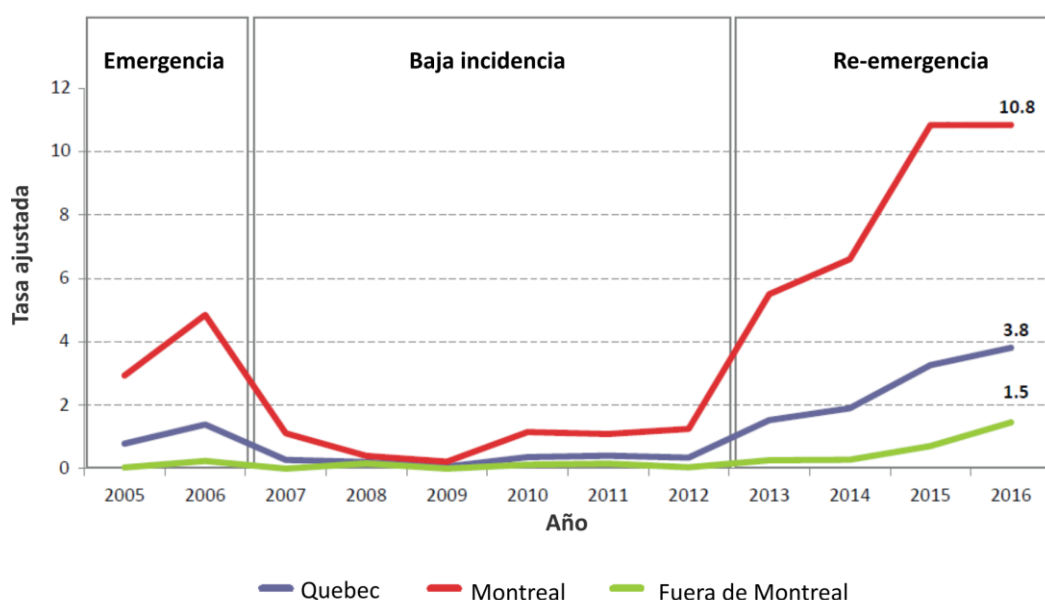


Figura 22. Evolución de la tasa ajustada por cada 100.000 habitantes y año de los diagnósticos de LGV en Canadá. Obtenido de Boutin y cols., 2018 [217].

En Australia, los primeros casos de LGV tras la descripción del brote en Países Bajos se notificaron en 2005 y en 2006 [218,219], sumándose 4 casos más ese mismo año [220]. En una de las series más largas llevadas a cabo en Australia se notificaron 208 casos de LGV durante un periodo de 10 años (2006-2015), poniendo de manifiesto el aumento de la infección rectal por *C. trachomatis* a lo largo de los años, con una proporción de casos de LGV que alcanzó hasta el 8% durante 2009 (Figura 23A). Los datos más recientes disponibles, gracias al informe de la “Estrategia frente a las infecciones de transmisión sexual de Nueva Gales del Sur”, ponen de manifiesto un descenso en el número de casos desde 2018 (Figura 23B). Sin embargo, estos datos hay que tomarlos con precaución porque de nuevo la notificación de los casos es muy irregular entre regiones.

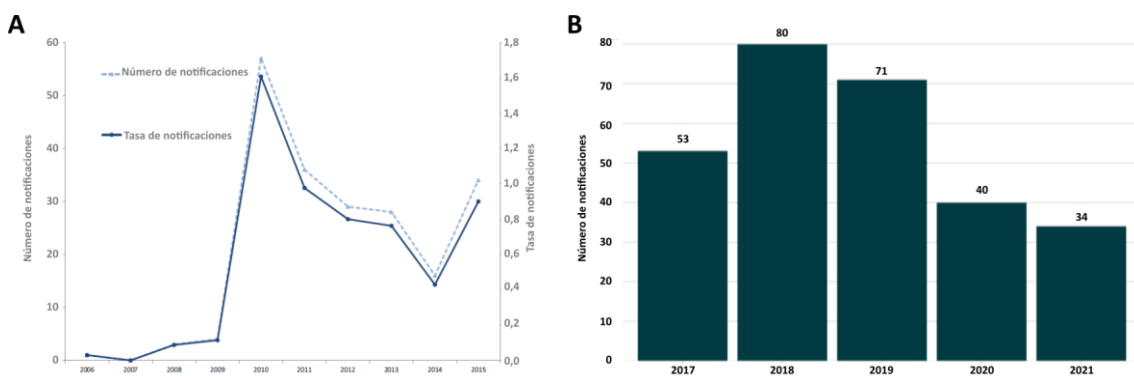


Figura 23. Número de casos de LGV en Nueva Gales del Sur (Australia). **A)** Periodo 2006-2015. **B)** Periodo 2017-2021.[222].

2.3.4. Linfogranuloma venéreo en España

El primer caso de LGV comunicado en España fue diagnosticado en septiembre de 2004 en Barcelona [223]. Se trataba de un paciente HSH, cuya pareja había sido diagnosticada de LGV en Ámsterdam. Tres meses después, en diciembre, un segundo caso de LGV fue diagnosticado en la misma ciudad [224]. Sin embargo, no es hasta 2007 cuando se detectan nuevos casos en España, de nuevo en Barcelona, detectándose 21 casos en un periodo de 8 meses (septiembre-2007 a abril-2008) [225]. Desde 2007 el LGV fue incluido como EDO en Cataluña [226], por lo que los casos detectados debían ser notificados a la Dirección General de Salud Pública de Cataluña. Así, desde 2007 hasta 2011, fueron notificados un total de 146 casos, de los cuales 72 (49%) fueron diagnosticados y notificados en 2011 [227] (Figura 24).

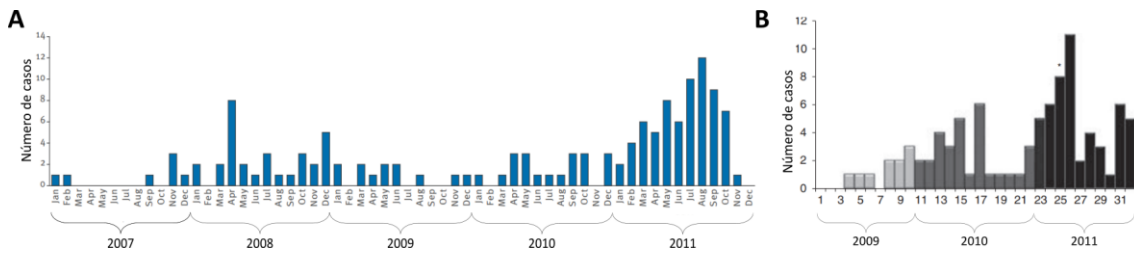


Figura 24. Casos de LGV diagnosticados en España. **A)** Barcelona, periodo 2007-2011 [227]. **B)** Madrid, periodo 2009-2011 [228].

En Madrid, el primer caso de LGV fue detectado en 2009 [229]; posteriormente, se publicó una serie de 102 casos en el periodo 2000-2011 [228] (Figura 24B). De modo similar a lo observado en Cataluña, se observó un mayor acúmulo de casos en el último año de seguimiento, 2011. En los años sucesivos, el número de casos en Cataluña siguió en aumento, detectándose 77, 67, 147 y 132 casos en 2012, 2013, 2014 y 2015, respectivamente [230]; en Madrid se sumó una nueva serie de 26 casos en 2014 [231]. Sin embargo, en el resto de las Comunidades Autónomas, la notificación de casos ha sido mucho más esporádica. En Bilbao, se describieron dos casos en una pareja en 2008 [232], detectándose un caso más un año después [233]. En Asturias, se describieron dos casos de LGV en 2011 [234]. Durante el periodo 2013-2015, se describieron un total de 13 casos en Andalucía [235], sumando 13 casos más en el periodo 2016-2019 [236].

Aunque en Cataluña el LGV es EDO desde 2007, no es hasta 2015 cuando se establece el LGV como EDO para el resto de España. La notificación es individualizada y deben recogerse determinadas variables clínicas y epidemiológicas que quedaron establecidas en los protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, aprobados en 2013 por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud [139,237]. Desde su inclusión como EDO, el número de casos notificados ha ido en aumento, desde 249 casos en 2016 a 417 casos en 2019, lo que supone un incremento del 67,5% [58]. Gracias a la incorporación de LGV como EDO, España es junto a Países Bajos, Francia y Reino Unido, responsable de la notificación de más del 80% de los casos de LGV en Europa. Sin embargo, pese a esos buenos datos, como ocurre en otros países de Europa, las herramientas diagnósticas necesarias para la detección de los genotipos L no están implementadas en todos los laboratorios del territorio nacional, por lo que posiblemente el número de casos real sea mucho mayor al que se notifica [238].

2.3.5. Características clínicas y epidemiológicas de la epidemia de LGV

El brote de LGV en Europa fue acompañado de un cambio en la presentación clínica de los casos, de modo que las manifestaciones típicas del LGV, como son las adenopatías o bubones, solamente fueron observadas en una pequeña parte de los pacientes, siendo la proctitis la manifestación clínica más frecuente [188]. En esta nueva presentación de la enfermedad los síntomas más comunes son dolor, tenesmo, secreción mucopurulenta y sangrado; además, en algunas ocasiones puede ir acompañado de ulceraciones o pólipos rectales, lo que puede llevar a confundirla con otras patologías intestinales como enfermedad inflamatoria intestinal o carcinoma rectal [239], con el consiguiente retraso en el diagnóstico.

Desde inicio del brote, los casos estaban prácticamente restringidos a HSH [240] y, aunque se han descrito casos en mujeres y población no HSH [241], éstos son esporádicos, por lo que la epidemia sigue restringida a esta población. De hecho, en el Informe Epidemiológico Anual del ECDC de 2019, el 99,1% de los casos estaban vinculados a HSH [58]. Por otro lado, se han detectado genotipos L en muestras de localización extrarrrectal como exudados endocervicales/vaginales [242], exudados uretrales [243] o muestras faríngeas [244]. No obstante, las infecciones urogenitales y faríngeas son una minoría en los datos de vigilancia, lo que puede deberse a la falta de muestreo, así como a un mayor porcentaje de casos asintomáticos asociados a estas localizaciones [245].

Los casos de LGV detectados en el comienzo del brote estaban altamente asociados a la infección por VIH. En un metaanálisis realizado en 2011, varios años después del inicio de la epidemia, se observó que la prevalencia de la infección por VIH en los casos de LGV oscilaba entre el 67% y el 100% de los casos [246]; además, en muchas ocasiones, sin recibir tratamiento antirretroviral y altas cargas virales, lo que podría contribuir a la cotransmisión de VIH y LGV. Sin embargo, series posteriores han observado que el porcentaje de población no VIH entre los pacientes diagnosticados de infección por LGV es cada vez mayor (Figura 25), lo cual puede ser consecuencia de la disponibilidad de intervenciones médicas contra la transmisión del VIH [247], como la mejora en las herramientas diagnósticas que permite un tratamiento antirretroviral temprano o la disponibilidad de la PrEP, entre otras.

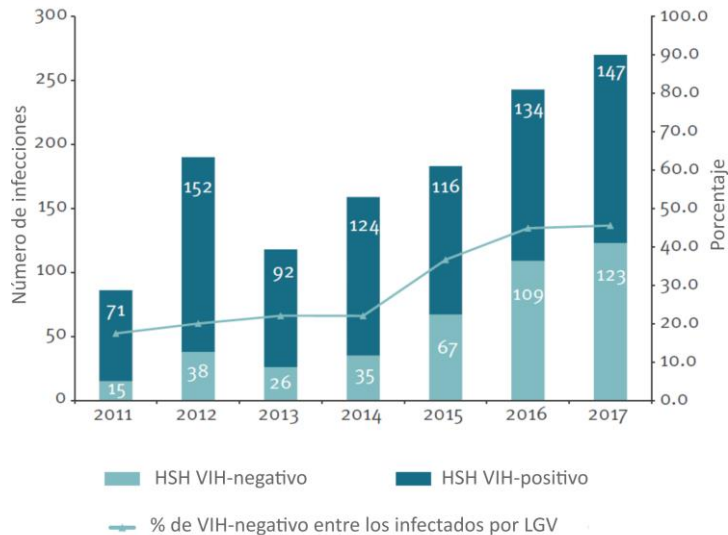


Figura 25. Casos de LGV en pacientes VIH positivos y negativos, y proporción de pacientes VIH negativos entre la totalidad de los casos de LGV diagnosticados en población HSH. Países Bajos, periodo 2011-2017 [248].

2.3.6. Epidemiología del LGV basada en *ompA*

Los primeros estudios moleculares realizados al inicio de la epidemia revelaron que la genovariente responsable del brote era L2b, caracterizada por un cambio de serina por aspártico en la posición 162 de la proteína codificada por el gen *ompA* (Figura 26). Estudios retrospectivos realizados *a posteriori* revelaron que L2b ya estaba circulando en Ámsterdam en el año 2000, así como en los años 80 en San Francisco [249].

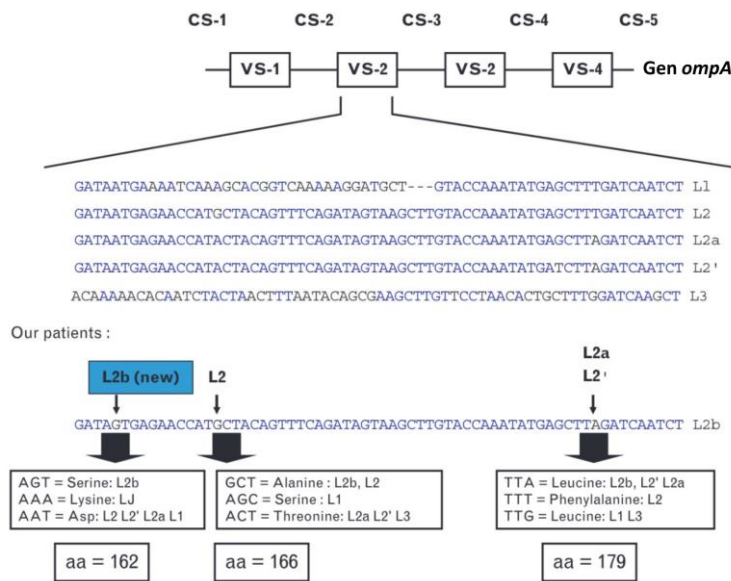


Figura 26. Representación esquemática del gen *ompA* de *C. trachomatis*. En detalle, se muestra el segmento variable II (VS-II) donde se muestran las diferencias nucleotídicas de las genovariantes L2a, L2', L2 y la nueva genovariente L2b [250].

Durante los primeros años de la epidemia, los casos de LGV detectados en Europa, así como en Norteamérica y Australia, estuvieron asociados fundamentalmente a la genovariante causante del brote, L2b. Sin embargo, en Madrid se comunicó por primera vez la cocirculación de dos genovariantes en base a la secuencia de *ompA*, L2b y L2 [228]. Posteriormente, varios países europeos observaron una asociación entre la diseminación del LGV junto a la circulación de otras genovariantes distintas a la variante L2b [251]. En un estudio realizado en Francia durante el periodo 2010-2015, detectaron 6 genovariantes diferentes causando la epidemia de LGV [252]. En un estudio más reciente en Italia, se detectaron 7 genovariantes diferentes [253]. En 2021, en uno de los estudios más completos acerca de la epidemiología molecular del LGV en el que participaron 7 países europeos y Australia, se detectaron un total de 16 genovariantes [166].

En los últimos años, se ha detectado la presencia de genotipos diferentes, como L1. En Reino Unido en 2021 se detectaron 3 casos de genotipos L1 [254]; en el estudio multicéntrico europeo de ese mismo año, fueron 4 los genotipos L1 detectados [166], no detectándose en ninguno de los dos estudios genotipos L3. Estos datos sugieren la posibilidad de nuevas introducciones, lo que podría dar lugar a nuevos brotes epidémicos que se sumarían al escenario actual.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Según los últimos informes epidemiológicos internacionales, en los últimos años se está produciendo un aumento progresivo en el número de casos asociados a los genotipos L. Sin embargo, la falta de sistemas de notificación bien implementados y la escasa disponibilidad de las herramientas moleculares necesarias para la detección de los casos, podrían indicar que el LGV está infradiagnosticado. Esto conlleva que la epidemiología en nuestro entorno no sea bien conocida, lo cual es esencial para comprender la dispersión de la infección en poblaciones con alto grado de exposición, identificar cadenas de transmisión en esas poblaciones y la posible diseminación a otras poblaciones vulnerables con un menor grado de exposición.

Los **objetivos** de este capítulo fueron los siguientes:

1. Analizar la evolución temporal de los casos de LGV en Madrid en diferentes contextos epidemiológicos, incluyendo clínicas especializadas en ITS y hospitales generales.
2. Caracterizar las genovariantes de LGV mediante secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*.
3. Evaluar la selección y propagación de nuevas genovariantes de LGV a lo largo del periodo de estudio desde un contexto epidemiológico y social.
4. Analizar las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con infección por genotipos L.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Centros participantes y periodo de estudio

En el estudio realizado en este capítulo participaron cuatro centros diferentes: dos centros especializados en el diagnóstico y tratamiento de las ITS (Centro Sanitario Sandoval y el Centro Montesa), y dos hospitales públicos (Hospital Universitario Ramón y Cajal y Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla), todos ellos localizados en la Comunidad de Madrid (CAM).

El Centro Sanitario (CS) Sandoval es un centro de referencia en la CAM en el diagnóstico de las ITS, integrado desde 2018 en la estructura asistencial del Hospital Clínico San Carlos. Este centro atiende anualmente a más de 25.000 pacientes de forma anónima y gratuita, donde se realizan más de 50.000 determinaciones microbiológicas cada año encaminadas al diagnóstico y seguimiento de las ITS, tanto de origen bacteriano como de origen viral. Además, desde enero de 2020 este centro fue autorizado para la prescripción de la PrEP para la prevención de la infección por VIH en personas con alto riesgo de exposición al virus, siendo el único centro en Madrid autorizado para ello hasta enero de 2022, momento en el cual la autorización se extendió a varios hospitales de la Comunidad. Las poblaciones atendidas en este centro son fundamentalmente HSH y otras poblaciones vulnerables, como hombres y mujeres que ejercen la prostitución.

El Centro Montesa forma parte del Programa de Prevención de SIDA/ITS del Ayuntamiento de Madrid. La consulta de ITS del centro realiza más de 10.000 consultas anuales, atendiendo mayoritariamente a población heterosexual, con prácticamente la misma proporción de hombres y mujeres. La población atendida engloba grupos vulnerables, incluyendo población HSH, aunque en menor proporción que en el CS Sandoval. Cada año en este centro se procesan más de 30.000 muestras para el diagnóstico de las principales ITS.

El Hospital Universitario Ramón y Cajal es un hospital terciario de gestión pública e integrado en el Servicio Madrileño de Salud (SERMAS). Cuenta con más de 900 camas y es centro de referencia para más de 650.000 habitantes del área 4 de la CAM. El hospital cuenta con una unidad específica dedicada al diagnóstico y tratamiento de las ITS, así como una unidad para el seguimiento de los pacientes con diagnóstico de VIH. El Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla es un hospital de gestión pública dependiente del Ministerio de Defensa que desde 2007 mantiene un acuerdo con el SERMAS, por el cual presta atención sanitaria a población civil y se establece como hospital

universitario. Cuenta con unas 500 camas y es centro de referencia para 100.000 habitantes en los distritos de Carabanchel y Latina.

En el CS Sandoval, el periodo de estudio tuvo una duración de 10 años, desde 2010 hasta 2019. Para el resto de los centros el periodo de estudio fue de 3 años, desde 2017 a 2019.

2. Muestras incluidas en el estudio y detección de *C. trachomatis*

En todos los centros la toma de muestras para la búsqueda de *C. trachomatis* se realizó en base a la sintomatología y/o las prácticas de riesgo del paciente independientemente de la presencia de signos o síntomas. Las muestras recogidas correspondieron a orinas, exudados uretrales, exudados cervicales/vaginales, exudados rectales y exudados faríngeos.

El diagnóstico inicial de la infección por *C. trachomatis* se realizó en cada uno de los centros mediante diferentes técnicas comerciales. El CS Sandoval y el Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla emplearon el sistema m2000 Abbott RealTime CT/NG assay (Abbott Molecular Diagnostics, Des Plaines, IL, USA); el Hospital Universitario Ramón y Cajal utilizó la técnica Allplex™ STI Essential assay (Seegene®, Seoul, South Korea) y el Centro Montesa empleó el sistema Cobas® CT/NG (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA).

El sistema Abbott RealTime CT/NG es una PCR a tiempo real (qPCR) que permite la detección cualitativa y simultánea de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*. Las regiones diana consisten en dos fragmentos diferentes del plásmido críptico para *C. trachomatis* y una región del gen *opa* para *N. gonorrhoeae*, para lo cual emplea tres parejas de cebadores y tres sondas. La extracción del material genético se realizó en el m2000sp, sistema automatizado basado en la utilización de partículas magnéticas.

La técnica Allplex™ STI Essential assay consiste en una qPCR que permite la detección cualitativa y simultánea de siete patógenos causantes de ITS: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *T. vaginalis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Este sistema emplea una tecnología denominada MuDT™ (Multiple Detection Temperature), propiedad de Seegene®, que permite la detección de múltiples dianas en un único canal de fluorescencia [255]. La extracción del material genético se llevó a cabo mediante el sistema automatizado Microlab NIMBUS™ (Hamilton, Bonaduz, Suiza) utilizando el kit STARMag™ Universal Cartridge (Seegene®,

Seoul, South Korea). Esta extracción utiliza proteinasa K para la lisis celular seguido del empleo de partículas magnéticas.

La técnica Roche Cobas® CT/NG consiste en la extracción y amplificación en el mismo sistema (en este caso utilizando el sistema cobas 4800), que permite la detección cualitativa y simultánea de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*. Las regiones diana para *C. trachomatis* son dos, una situada en el cromosoma y otra en el plásmido críptico. Para *N. gonorrhoeae*, se utilizan dos parejas de cebadores dirigidos a la región de repetición directa y altamente conservada DR-9.

3. Detección de los genotipos L asociados a linfogranuloma venéreo

Todas las muestras positivas para *C. trachomatis* fueron enviadas en las condiciones adecuadas de refrigeración al laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, donde se realizó una nueva extracción del material genético. Para ello, se utilizó la plataforma NucliSENS® EasyMag® (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France), sistema automatizado basado en la utilización de partículas magnéticas, empleándose un volumen de partida de 300 µL y un volumen final de elución de 50 µL.

La detección de los genotipos L se realizó mediante una qPCR basada en la delección de 36 pares de bases (pb) del gen *pmpH* presente únicamente en los genotipos asociados a LGV [256]. Además, la presencia de *C. trachomatis* se confirmó en todas las muestras mediante una qPCR dirigida a una región conservada del gen *ompA* presente en todos los genotipos de *C. trachomatis*. Los cebadores y las sondas utilizadas para este ensayo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores y sondas utilizados para la confirmación de la presencia de *C. trachomatis* y la detección de los genotipos L.

Cebador/sonda	Secuencia (5´-3´)	Tamaño amplicón	Gen diana
LGV-F	CTGTGCCAACCTCATCATCAA	69 pb	<i>pmpH</i>
LGV-R	AGACCCTTCCGAGCATCACT		
LGV-sonda	FAM-CCGCCTGCTCCAACAGTTAGTGATG-BHQ1		
CT-F	GGT TTC GGC GGA GAT CCT	61 pb	<i>ompA</i>
CT-R1	AGT AAC CAA CAC GCA TGC TGA T		
CT-R2	AGT AAC CCA TAC GCA TGC TGA T		
CT-sonda	FAM-CTT GCA CCA CTT GGT GTG ACG C-BHQ1		

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 12,5 µl de 2x Taqman Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems), una concentración final de 150 nM para los cebadores y 100 nM para las sondas, y 5 µl del ADN previamente extraído. Para las qPCR se emplearon termocicladores 7500 Fast Real Time (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación de la polimerasa a 94°C durante 1 min, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos para la desnaturalización de las hebras de ADN y 60°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores y sondas y posterior elongación. La adquisición de la señal de fluorescencia se realizó durante el paso de hibridación y elongación a 60°C.

4. Amplificación y secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*

Una vez detectados los genotipos L, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*. Para el gen *pmpH* se realizó la secuenciación de un fragmento de 404 pb para confirmar que la clasificación realizada mediante la qPCR basada en la delección permitía diferenciar correctamente los genotipos L del resto de genotipos de *C. trachomatis*. A continuación, se secuenció un fragmento de 990 pb del gen *ompA* para establecer las posibles relaciones filogenéticas entre los genotipos L detectados. Los cebadores utilizados para este fin se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*.

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tamaño amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
<i>pmpH</i> -F	AAACCGTGAGTATTTCCGGA	404	57
<i>pmpH</i> -R	ATATGCCTCCTTCATTGTCTT		
<i>ompA</i> -F1	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG	1.124	52
<i>ompA</i> -R1	ACT GTA ACT GCG TAT TTG TCT		
<i>ompA</i> -F2	AACCAAGCCTTATGATCGACGGAAT	990	58
<i>ompA</i> -R2	CAATACCGCAAGATTTTCTAGATTCA		

La amplificación los genes *pmpH* y *ompA* se realizó mediante PCR convencional en un volumen final de 50 µl utilizando las siguientes concentraciones finales de los reactivos: tampón de reacción (10x), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2mM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP), cebadores directo y reverso (0,6mM cada uno) y la enzima AmpliTaq Gold ADN

polimerasa (1,5U). Se utilizaron 5 µl de ADN molde en todas las PCR. Para la amplificación de *ompA* se realizó una PCR anidada, realizando una primera PCR con los cebadores *ompA*-F1 y *ompA*-R1, seguido de una segunda PCR utilizando como molde el producto de amplificación de la primera con los cebadores *ompA*-F2 y *ompA*-R2. Para ello, se emplearon las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación a 94°C, 12 min, seguido de 40 ciclos de 94°C, 30 segundos, hibridación durante 30 segundos (las temperaturas de hibridación para cada PCR se muestran en la Tabla 2), elongación a 72°C, 1 min y, por último, una elongación final de 72°C, 10 minutos.

Para la visualización de los productos de PCR se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Preparación del gel de agarosa mediante la disolución de 1 g (para el gen *ompA*) o 1,5 g (para el gen *pmpH*) de agarosa D-1 Low EEO (Pronadisa) en 100 ml de TBE 0,5 x, obteniéndose una concentración final del 1% y del 1,5%, respectivamente.
- Electroforesis en corriente continua: en primer lugar, se mezclaron 5 µl de cada producto de PCR junto con la misma cantidad de colorante de carga 6x (Thermo Scientific). A continuación, se depositaron los 10 µl en cada uno de los pocillos del gel. La separación de los fragmentos se llevó a cabo en una cubeta horizontal con tampón TBE 0,5 x a 80-100V durante 30-40 minutos. En cada electroforesis se incluyó un estándar de 100 pb (ThermoFisher).
- Visualización de los productos: los geles se sumergieron en una solución de GelRed 3x (Biotium, California, Estados Unidos) durante 10 minutos, visualizándose posteriormente mediante el uso del transiluminador de luz UV ChemiDoc™ XRS (BioRad).

Los productos de PCR se purificaron mediante purificación enzimática utilizando el ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp, Cleveland, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos, ya purificados, se secuenciaron utilizando el secuenciador automático 3130 (Applied Biosystems) basado en el método Sanger.

4.1. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados de *pmpH* y *ompA* se analizaron y ensamblaron utilizando los softwares Chromas 2.6.6 (Technelysium, Queensland, Australia) y Vector NTI Advance (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia), respectivamente. Para descartar posibles errores de secuenciación, las secuencias se alinearon y editaron junto a las secuencias de referencia disponibles en la base de datos pública de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA 7.0 [257].

4.2. Análisis filogenético

Para la selección del modelo de sustitución nucleotídica se utilizó el software jModelTest 1.0 [258], seleccionándose dos modelos distintos para *pmpH* y *ompA*: HKY (Hasegawa Kishino-Yano) para *pmpH* y GTR+G+I (“General Time Reversible” + distribución gamma + proporción de tasas invariables) para *ompA* y el combinado *ompA-pmpH*. Posteriormente, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud utilizando el software PhyML 3.0 [259]. Para la detección de posibles eventos de recombinación, las secuencias se analizaron utilizando el programa RDPv4.13.

Finalmente, se construyeron redes (median-joining network) utilizando las secuencias de *ompA* mediante el software Network v4.6.1.0 (www.fluxus-technology.com) [260]. Este software permite conectar cada secuencia de *ompA* con su secuencia más relacionada, permitiendo establecer nuevas variantes de los genotipos L.

5. Datos clínicos y epidemiológicos

Durante el estudio se recogieron los datos clínicos y epidemiológicos de las historias clínicas de aquellos pacientes en los que se detectaron los genotipos L. Se recogieron varios datos, entre ellos, edad, sexo, nacionalidad, síntomas y signos, estado serológico frente al VIH y VHC, ITS previas y concomitantes y tratamiento recibido. Además, se recopiló la información relacionada con las prácticas sexuales y el consumo de drogas o alcohol.

6. Análisis estadístico

Los datos recogidos se analizaron con el programa estadístico STATA 13.0 (StataCorp LP, Texas, Estados Unidos). Para determinar la asociación entre cada uno de los genotipos y las distintas variables clínicas y epidemiológicas, se utilizó el test Chi-cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher, este último cuando la frecuencia esperada era inferior a 5. Se consideró estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Evolución temporal de los casos de LGV en el CS Sandoval (2010-2019)

De manera global, durante el periodo de estudio, un total de 8.325 muestras clínicas que rindieron amplificación positiva para *C. trachomatis* se analizaron para la detección de genotipos relacionados con LGV, de las cuales 1.171 (14,1%) fueron identificadas como genotipos L. El número de casos detectados se incrementó casi 7 veces durante el periodo 2010-2019, pasando de 30 casos en 2010 a 225 casos en 2019. Atendiendo a la Figura 27, es posible distinguir dos periodos de tiempo: 2010-2014 y 2015-2019. Durante el periodo 2010-2014 se observó un continuo aumento anual en el número de casos; sin embargo, el incremento porcentual en número de detecciones de cada año respecto al año previo fue progresivamente disminuyendo (80%, 40,7%, 19,7% y 9,9% en 2011, 2012, 2013 y 2014, respectivamente). De hecho, en 2015, se observó un descenso significativo en el número de casos diagnosticados respecto al año 2014 (73 frente a 100 casos). A partir de ese momento, en el periodo 2015-2019, el número de casos volvió a aumentar. La acumulación de nuevos diagnósticos en este período fue mayor que en el periodo anterior, de modo que la pendiente de la curva durante este segundo periodo casi dobló a la del primero. El año de mayor aceleración de la epidemia se observó en 2016, con un aumento del 106,8% en el número de casos respecto a 2015 (151 frente a 76 casos).

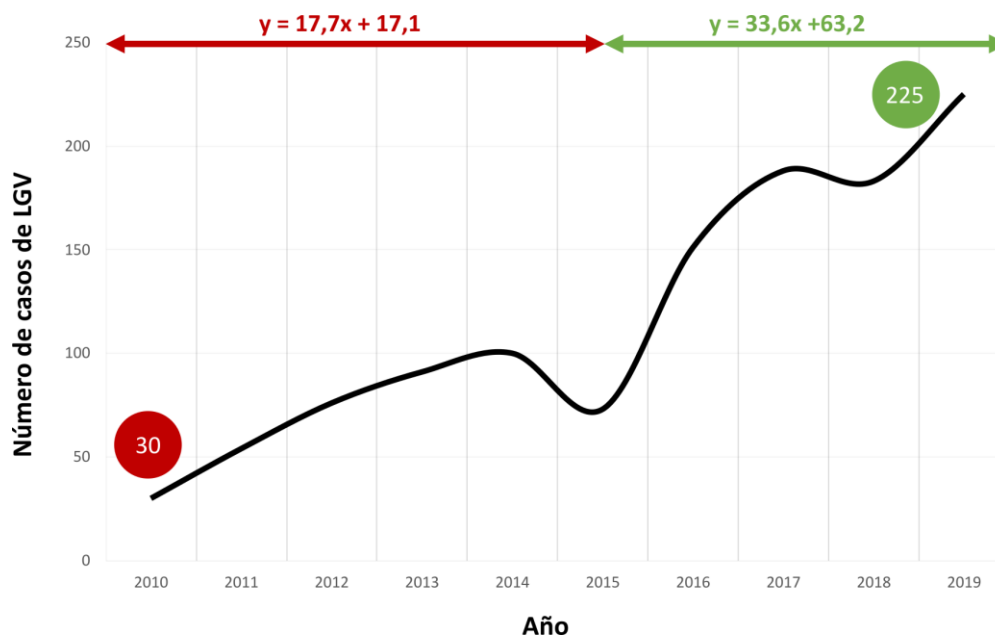


Figura 27. Evolución de los nuevos diagnósticos de LGV en el CS Sandoval durante el periodo 2010-2019. Se representa la ecuación de la recta para cada uno de los periodos (2010-2014 y 2015-2019).

El aumento progresivo en el número de casos detectados podría ser consecuencia del aumento en el número de muestras cribadas, ya que este número también aumentó de 5.276 en 2010 a 14.011 en 2019, con un incremento medio anual de 900 muestras. Sin embargo, a pesar del aumento en el número de muestras cribadas, el porcentaje de muestras positivas para *C. trachomatis* fue prácticamente constante durante todo el periodo de estudio, oscilando entre el 8,3% y 10,9% durante el primer periodo y entre el 8,4% y el 10,2% durante el segundo. Por el contrario, no ocurrió lo mismo con la proporción de genotipos L respecto al total de muestras positivas para *C. trachomatis*, que se vio incrementada en 2,28 veces, siendo mayor durante el periodo 2015-2019 que durante el periodo 2010-2014 (16,1% y 10,0%, respectivamente, $p < 0,00001$) (Figura 28). Asimismo, el porcentaje global de genotipos L respecto al total de muestras analizadas aumentó del 0,57% al 1,61%.

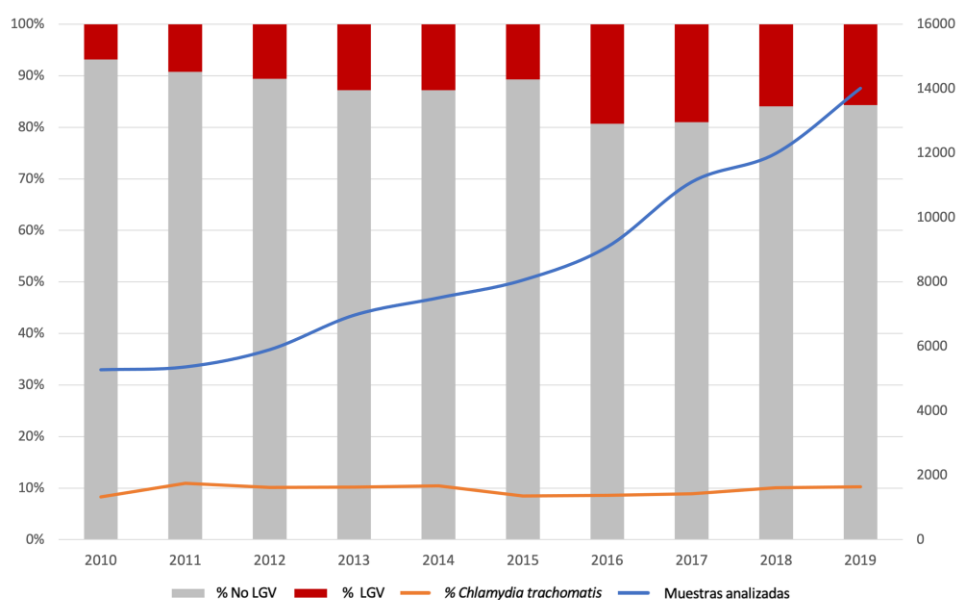


Figura 28. Evolución del número de muestras analizadas y proporción de casos de infección por *C. trachomatis* y de LGV en el CS Sandoval durante el periodo 2010-2019. El porcentaje de *C. trachomatis* se refiere al porcentaje sobre el total de muestras analizadas mientras que el porcentaje de casos de LGV está calculado sobre el total de muestras positivas para *C. trachomatis*.

2. Evolución temporal de los casos de LGV en el resto de centros (2017-2019)

Como consecuencia del incremento observado en el número de casos en el CS Sandoval, centro que, tal y como se describe en el apartado de Material y métodos, atiende a una población mayoritariamente HSH, a partir de 2017 se incluyeron tres centros adicionales que representaban otros contextos sociales y epidemiológicos con el objetivo de conocer la circulación de LGV en otras poblaciones.

En el centro de ITS Montesa, se obtuvo un resultado positivo para *C. trachomatis* en un total de 1.522 muestras de 24.572 analizadas (6,2%), de las cuales 44 (2,9%) se identificaron como genotipos L. Durante los tres años de seguimiento, el número de muestras analizadas aumentó un 113,2%, de 4.901 en 2017 a 10.449 en 2019. Sin embargo, y de igual modo que lo observado en el CS Sandoval, el porcentaje de muestras positivas para *C. trachomatis* se mantuvo constante (6,1%-6,3%), mientras que el número de casos de LGV detectados aumentó de 6 casos en 2017 a 24 casos en 2019, con un incremento del 81,9% en la proporción de genotipos L respecto al total de muestras positivas para *C. trachomatis*, pasando del 1,9% (2017) al 3,6% (2019) (Figura 29A).

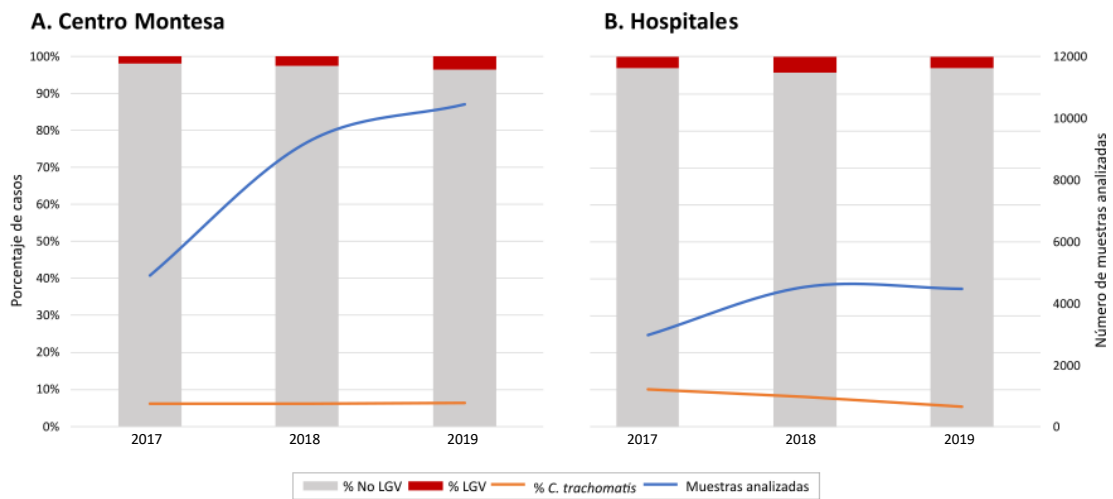


Figura 29. Evolución del número de muestras analizadas y proporción de casos de infección por *C. trachomatis* y de LGV en el resto de centros. **A)** Centro Montesa y **B)** Hospital Universitario Ramón y Cajal y Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. El porcentaje de *C. trachomatis* se refiere al porcentaje sobre el total de muestras analizadas mientras que el porcentaje de casos de LGV está calculado sobre el total de muestras positivas para *C. trachomatis*.

En los centros hospitalarios, se observó un incremento en el cribado de *C. trachomatis* a lo largo del periodo de estudio, pasando de 2.980 muestras analizadas en 2017 a 4.477 en 2019, lo que supone un aumento del 50,2%. Sin embargo, se observó un descenso en el porcentaje de muestras positivas para *C. trachomatis*, evolucionando del 10,1% al 5,5%, mientras que los casos de LGV y el porcentaje de genotipos L detectados respecto al total de muestras positivas para *C. trachomatis* se mantuvo más o menos constante (Figura 29B).

3. Secuenciación y análisis filogenético de los genes *pmpH* y *ompA*

La clasificación de los genotipos L mediante qPCR se comprobó mediante secuenciación del gen *pmpH* en 599/1.252 (47,8%) muestras seleccionadas de forma aleatoria. Para la confirmación se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud del gen *pmpH* utilizando las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank, confirmándose la correcta asignación en todas nuestras muestras.

La amplificación y secuenciación del gen *ompA* se realizó en 803/1.252 muestras (64,1%). Para los análisis filogenéticos se utilizó un fragmento de 919 pb, evitando así posibles errores de secuenciación. De forma global, la genovariante principal de *ompA* fue L2 (400/803, 49,8%), seguido de L2b (199/803, 24,8%), genovariantes que se diferencian en un único cambio aminoacídico (N162S). En cuanto al análisis temporal, durante el periodo 2010-2014 la variante L2 fue predominante sobre la variante L2b, con prevalencias del 57,4% y 24,6%, respectivamente. Además, la proporción de L2b fue disminuyendo cada año hasta incluso no detectarse durante el año 2014, coincidiendo con una proporción de L2 del 73,3%. No obstante, la variante L2b reapareció en el año 2015 y su proporción fue aumentando durante los años sucesivos, hasta el punto de que ambas variantes volvieron a detectarse en proporciones similares durante el año 2019 (42,3% y 42,7%) (Figura 30).

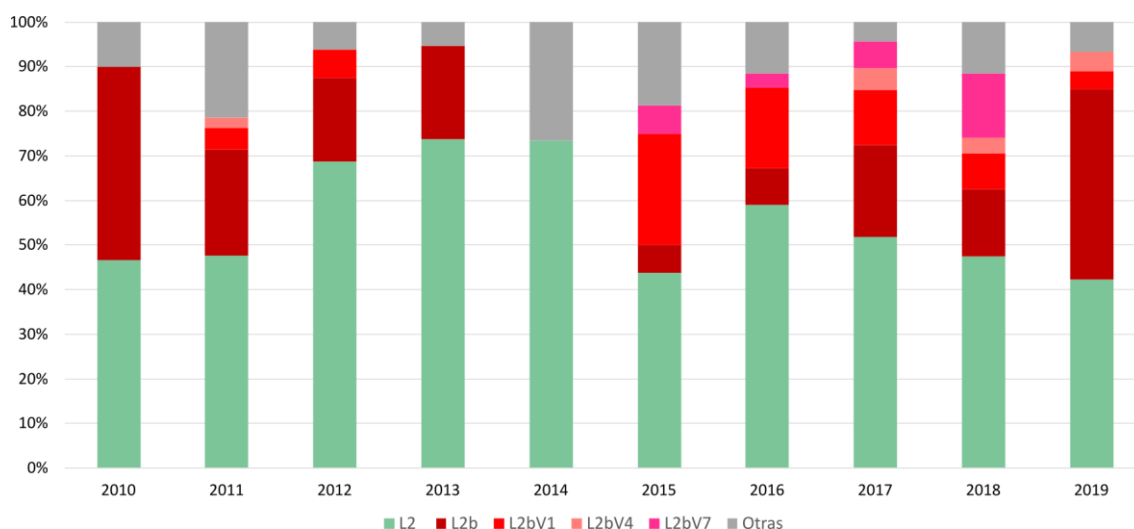


Figura 30. Distribución de las genovariantes de los genotipos L basados en la secuenciación del gen *ompA* durante el periodo 2010-2019. Se incluyen las muestras de los cuatro centros participantes (n=803).

A lo largo del tiempo las genovariantes no-L2 no-L2b fueron aumentando, dando lugar a un escenario cada vez más diversificado. Globalmente, las genovariantes no clasificadas ni como L2 ni como L2b representaron el 25,4% (204/803), detectándose tres genovariantes mayoritarias. Estas variantes corresponden a L2bV1 (número de acceso de GenBank JX971936), L2bV4 (número de acceso de GenBank KU518892) y L2bV7 (número de acceso de GenBank LR882815). La primera, L2bV1, que se detectó en una proporción del 8,2% (66/803), presenta una mutación no sinónima respecto a L2b (L173I). La segunda, L2bV4, que alcanzó una proporción del 3,4% (27/803), presenta dos mutaciones no sinónimas respecto a L2b (A91T y H165N); y la tercera, L2bV7, con una proporción del 5,6% (45/803), presenta una mutación no sinónima también respecto a L2b (N333S). La genovariante L2bV1 se detectó durante el primer periodo de forma esporádica, pero a partir de 2015 se detectó en mayor proporción, alcanzando el 26,7% y el 18,6% de los casos durante 2015 y 2016, respectivamente. Durante los años sucesivos, el número de casos relacionados con esta genovariante disminuyó, representando el 3,9% de los casos en el último año. De forma similar, un único caso causado por L2bV4 fue detectado en el primer periodo; sin embargo, se detectó de forma significativa en 2016 (4,9%), con una proporción similar durante los años sucesivos. L2bV7 fue detectada durante el periodo 2015-2018, alcanzando la prevalencia máxima en el año 2018, con un 14,5% de los casos. Sin embargo, en 2019 no se detectó ningún caso asociado a esta genovariante.

Asumiendo frecuencia de detección con frecuencia de transmisión, durante el periodo 2010-2014, se identificaron dos principales nodos de transmisión, correspondientes a las genovariantes L2 y L2b (Figura 31A), y coincidiendo con los descrito previamente [228]. Sin embargo, durante el segundo periodo (2015-2019) a esas dos genovariantes mayoritarias se sumaron L2bV1, L2bV4 y L2bV7, constituyendo un total de cinco nodos de transmisión (Figura 31B). De manera global, las 5 genovariantes supusieron el 90,9% del total de las muestras secuenciadas.

En las 73 muestras restantes con una secuencia de *ompA* no incluida en ninguno de los nodos principales descritos, se identificaron 19/73 y 16/73 secuencias aminoacídicas derivadas de L2b y L2, respectivamente. En cuanto a las mutaciones detectadas, un total de 22 posiciones aminoacídicas estaban implicadas en cambios no sinónimos, de los cuales 12 (54,5%) se encontraron en los dominios variables I a IV, dominios expuestos a la superficie implicados en la adhesión y la respuesta inmune. Además, 3/73 variantes derivaron de L1, y 4/73 correspondieron a variantes *ompA* no relacionadas con los genotipos L (2 D, 1 J y 1 K), aunque la secuenciación del gen *pmpH* permitió clasificarlas

como tales. Finalmente, se detectaron 31/73 secuencias correspondientes a una forma recombinante en el gen *ompA* entre los genotipos L2 y D (Figura 31B), presente únicamente durante el segundo periodo.

Además, se detectaron cuatro infecciones mixtas: dos entre las variantes L2 y L2b durante los años 2013 y 2017, y otras dos entre L2 y L2bV1 durante los años 2016 y 2017.

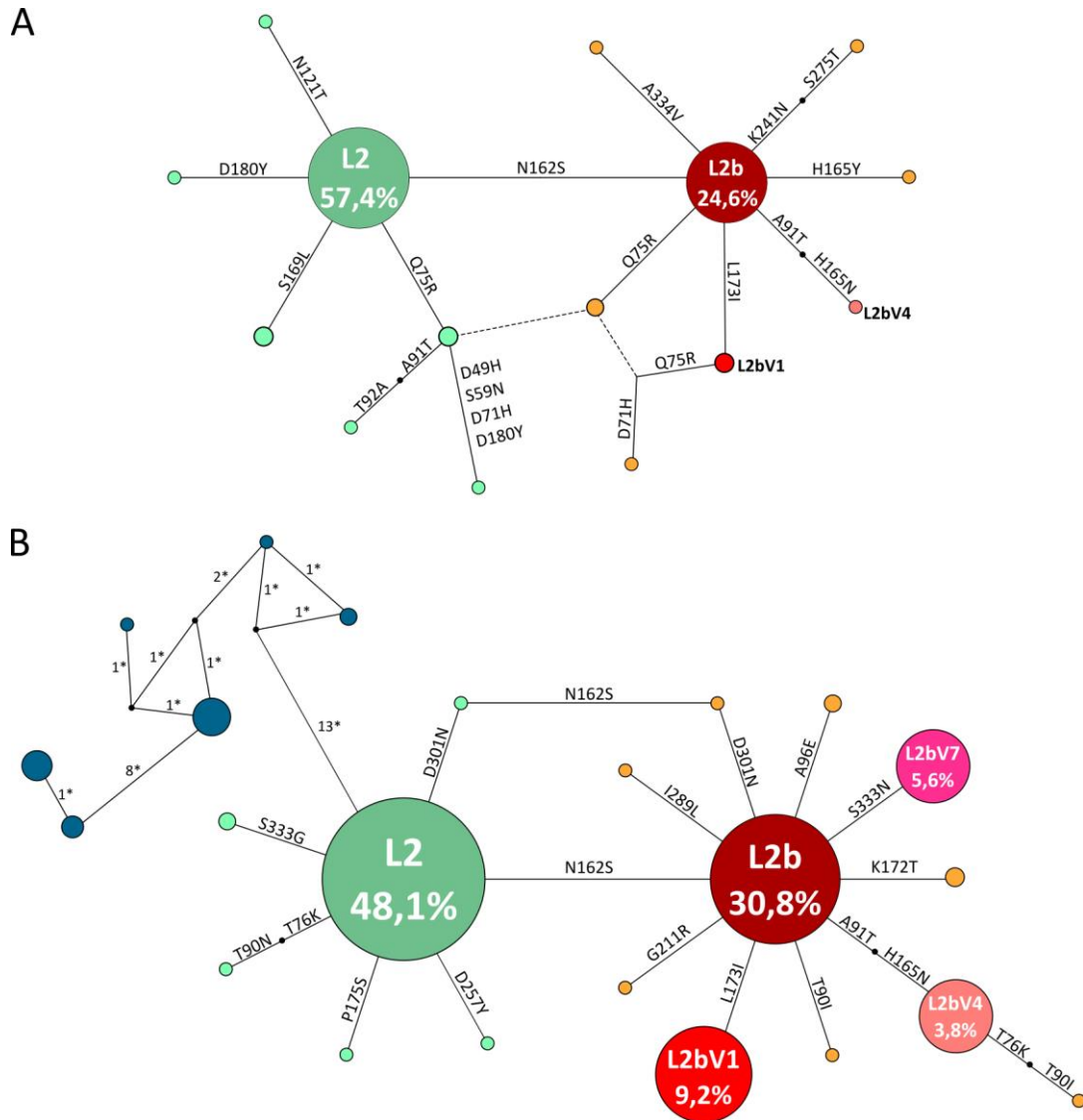


Figura 31. Diagrama de redes de las secuencias aminoacídicas de las genovariantes de LGV obtenidas en Madrid durante el periodo 2010-2019. **A)** Periodo 2010-2014 y **B)** Periodo 2015-2019. Los cambios aminoacídicos se indican en cada rama referidos a la cepa L2/434/Bu (NC_010287). En color azul se representan la genovariantes recombinantes entre L2 y D. *Número de mutaciones no sinónimas.

4. Patrones clínicos y epidemiológicos asociados a cada variante

Se revisaron un total de 428 de las 730 historias clínicas correspondientes a los pacientes infectados con una de las cinco genovariantes más prevalentes, aunque no siempre fue posible disponer de todos los datos clínicos y epidemiológicos. Las principales características clínicas y epidemiológicas por genovariante se muestran en la Tabla 3.

Globalmente, la mediana de edad fue de 34 años, con un rango intercuartílico entre 29 y 41 años. La mayoría eran HSH (308/316; 97,5%), seguido de población bisexual (6/318, 1,9%) y 2/316 (0,6%) eran hombres que tienen sexo con mujeres (HSM). En cuanto a otros comportamientos sexuales, 29/316 (9,2%) eran trabajadores masculinos del sexo (TMS), la mayoría de ellos HSH (28/29). Antes de la inclusión del Centro Montesa y los hospitales, el porcentaje de HSH era del 100%; sin embargo, durante el periodo 2017-2019, al incorporarse el resto de centros, ese porcentaje disminuyó ligeramente, siendo del 97,1%.

La mayoría de los pacientes eran de España (251/415; 60,5%), seguidos por los pacientes procedentes de Sudamérica (137/415; 33,0%). Por genovariante, no hubo diferencias entre las genovariantes L2, L2b y L2bV1; sin embargo, la proporción de pacientes procedentes de países de América del Sur fue mayor para las genovariantes L2bV4 (11/26; 42,3%) y L2bV7 (12/31; 38,7%), aunque este hallazgo no fue estadísticamente significativo (Figura 32).

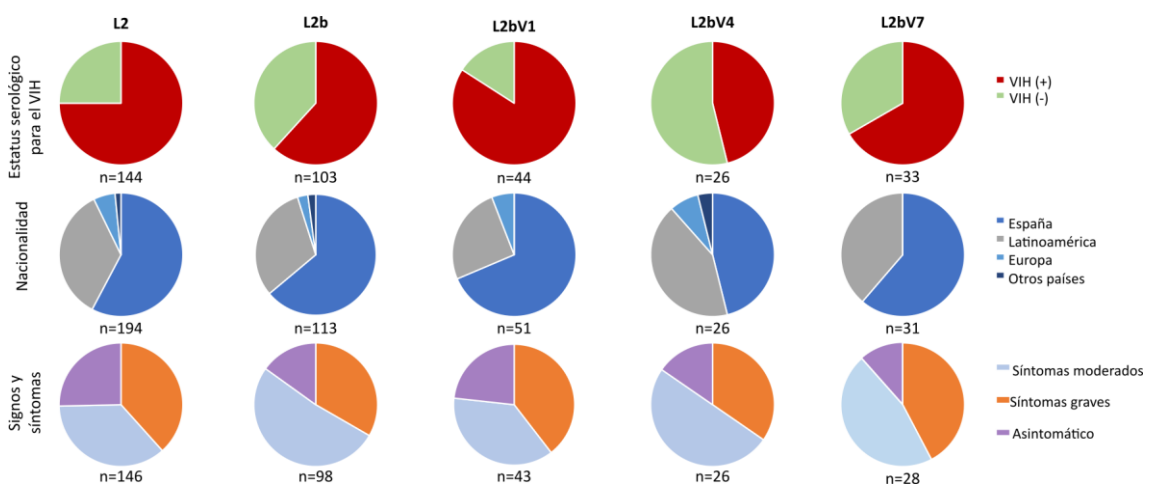


Figura 32. Patrones clínicos y epidemiológicos de los pacientes infectados por alguna de las cinco genovariantes mayoritarias.

En general, el 68,9% de los pacientes (241/350) estaban infectados por el VIH, la mayoría de ellos con una infección bien controlada y una carga viral indetectable (134/181; 74%). La infección por VIH fue más frecuente en los pacientes infectados por las genovariantes L2 (75%) y L2bV1 (84,1%) que en los infectados por L2b (61,8%) y L2bV4 (46,2%) ($p=0,001$). Además, el porcentaje de pacientes infectados por VIH fue disminuyendo a lo largo del periodo de estudio; durante el periodo 2010-2016, el porcentaje de pacientes VIH era del 84,3%; sin embargo, durante 2017-2019, ese porcentaje era del 66,2%.

Los pacientes se clasificaron según la presencia de síntomas y signos en asintomáticos, moderadamente sintomáticos y severamente sintomáticos. La proporción de síntomas graves (edema y hemorragia) fue mayor en los pacientes infectados por las genovariantes L2b y L2bV4 (54,1% y 50,0%, respectivamente, $p=0,055$), seguidos muy de cerca por la genovariante L2bV7 (46,2%) (Figura 32).

Tabla 3. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes infectados por alguna de las genovariantes mayoritarias.

	L2 (%)	L2b (%)	L2bV1 (%)	L2bV4 (%)	L2bV7 (%)	P value
Síntomas/signos	N = 146	N = 98	N = 42	N = 26	N=28	
Dolor	45.2	55,1	50.0	46.2	46,4	0.255
Secreción purulenta	34.2	51	21.4	19.2	32,1	0.233
Hemorragia	35.6	32,7	30.9	23.1	39,3	0.429
Edema	31.5	36,7	42.9	34.6	39,3	0.409
Úlcera	7.5	6,1	11.3	11.5	10,7	0.573
Ninguno	25.3	15,3	23.8	15.4	17,9	0.225
Estatus serológico frente al VIH	N = 144	N = 103	N = 44	N = 26	N=33	
Positivo	75	60,2	84.1	46.2	66,7	0.001
Estatus serológicos frente al VHC	N = 97	N = 87	N = 36	N = 26	N=30	
Positivo	21.6	12.6	13.9	7.7	13,3	0.273
ITS concomitantes	N = 101	N = 91	N = 40	N = 25	N=27	
Sífilis	45.5	48,4	40	48	37	0.911
<i>N. gonorrhoeae</i>	16.8	16,5	15	12	0	0.852
<i>C. trachomatis</i>	29.7	29,7	30	32	29,3	0.996
LGV	5.9	1,1	0	8	3,7	0.600
Otros (VPH, VHS-2)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	0.9	8,8	0	8	7,4	0.017
ITS previas	N = 81	N = 85	N = 26	N = 25	N=23	
Sífilis	83.9	87,1	73.1	96	91,3	0.114
<i>N. gonorrhoeae</i>	66.7	61,2	53.8	48	78,3	0.292
<i>C. trachomatis</i>	45.7	45,9	38.5	84	47,8	0.003
LGV	24.7	18,8	19.2	36	26,1	0.376
Otros (VPH, VHS-2)	13.6	8,2	3.8	12	0	0.499
	24.7	22,4	15.4	20	8,7	0.462
Procedencia	N = 194	N = 113	N = 51	N = 26	N=31	
España	57.7	64,6	68.6	46.2	61,3	0.175
Latinoamérica	35.1	29,2	25.5	42.3	38,7	0.409
Europa	5.7	3,5	5.9	7.7	0	0.394
Otros	1.5	2,7	0	3.8	0	0.474
Uso de drogas	N = 76	N = 79	N = 26	N = 26	N=22	
	50.0	64.6	61.5	61.5	72,8	0.179

DISCUSIÓN

En este capítulo se caracteriza la evolución de los casos de LGV en Madrid durante un periodo de 10 años, desde 2010 hasta 2019. Este estudio constituye una de las series más largas, pues incluye más de 1.000 casos de LGV diagnosticados y más de 800 muestras secuenciadas en una misma ciudad. El estudio comenzó en 2010 en el CS Sandoval, uno de los principales centros de ITS de Madrid que atiende fundamentalmente población HSH. Sin embargo, el aumento en el número de casos observado en el año 2016 hizo que a partir de 2017 se incluyeran tres centros más, con el objetivo de extender la vigilancia del LGV a otras poblaciones vulnerables.

En los dos centros de ITS, el número de casos de LGV aumentó durante el periodo de estudio al mismo tiempo que aumentó el cribado de *C. trachomatis*. Sin embargo, la proporción de LGV respecto a las muestras positivas para *C. trachomatis* también aumentó en ambos centros, 2,28 veces en el caso del CS Sandoval y 1,82 veces en el Centro Montesa. Esto sugiere que el aumento observado en el número de casos podría no estar relacionado exclusivamente con una mejora en el cribado. Por otro lado, en los centros hospitalarios el cribado de *C. trachomatis* también aumentó a lo largo del periodo de estudio, pero la relación entre los casos de LGV y los de *C. trachomatis* se mantuvo más o menos constante (cambio de 1,05 veces), lo que sugiere que un aumento en el número de casos podría estar más relacionado con un incremento en el cribado de *C. trachomatis* que con una difusión del LGV al tipo de población atendida en estos centros.

Por lo tanto, el aumento global observado en el número de casos de LGV podría estar más relacionado con una mayor circulación del agente infeccioso entre las poblaciones más vulnerables que acuden a los centros de ITS, especialmente entre la población HSH, observándose una lenta propagación hacia otras poblaciones con alto riesgo de exposición a ITS. En nuestro análisis, el 99,4% de los casos estuvieron asociados a población HSH o bisexual. Esto es concordante con lo observado en el último informe epidemiológico europeo, donde el 99,1% de los casos observados en el año 2019 estaban asociados a HSH, detectándose sólo 10 casos en mujeres [58]. Sin embargo, en el periodo 2017-2019, el porcentaje de HSH en nuestro estudio bajó al 97,1%, algo inferior al dato del ECDC, lo que podría representar un cambio de tendencia o una particularidad de España.

El análisis temporal en el único centro en el que se realizó el seguimiento durante todo el periodo de estudio reveló que mientras en el periodo 2010-2014 se observaba una

progresiva desaceleración de los casos detectados coincidiendo con una pérdida de diversidad de genovariantes, en el periodo 2015-2019 se observó una nueva aceleración en el número de casos, casi duplicando la del periodo anterior. El protocolo de cribado en este centro se mantuvo sin cambios durante ambos periodos, pese a lo cual el número de muestras para cribado fue aumentando año tras año. Este hallazgo sugiere un posible cambio epidemiológico, al que varios factores podrían haber contribuido. Uno de esos posibles factores son los flujos migratorios. Según el Instituto Nacional de Estadística, el porcentaje de población inmigrante en Madrid oscila entre el 12,2% y el 16,7% [261]; sin embargo, en nuestro estudio la población inmigrante representa el 40,5%, revelando la vulnerabilidad de este grupo de población. Atendiendo al origen de la población inmigrante, la procedente de Sudamérica representa el 4,1% de la población total de Madrid, mientras que en nuestra serie ese porcentaje es del 33%. En el caso de los ciudadanos europeos, éstos representan el 5,6% de la población de Madrid, y un 4,2% en nuestra serie. Para el resto de las nacionalidades, mientras que en la población total representan un 4,3%, en nuestra serie es el 2,1%. La sobrerrepresentación de diagnósticos de LGV en población procedente de Sudamérica indican el posible impacto de la población migrada de Sudamérica en la epidemia de LGV en Madrid. En el periodo 2010-2015, el balance migratorio en España (inmigración-emigración) fue negativo, mientras que a partir de 2016 ese balance fue positivo [262]. Durante el primer periodo, la mayor reducción de la población inmigrante residente en España se observó para las personas procedentes de Sudamérica [263], disminuyendo del 6,2% al 3% en el periodo descrito. Por el contrario, durante el segundo periodo se observó un progresivo balance positivo, siendo la población de Sudamérica la principal contribuyente a ese cambio de tendencia [264]. Si comparamos la población procedente de Sudamérica en nuestra serie, ésta aumentó ligeramente, del 29% en el primer periodo, al 34% en el segundo periodo.

A pesar de los datos, nuestra opinión es que el incremento es multifactorial y otros factores pueden haber contribuido para explicar el aumento de casos de LGV detectados durante el segundo periodo. En este sentido, la velocidad de propagación podría haberse visto afectada por el uso de aplicaciones móviles de citas, cuyo uso ha aumentado significativamente en los últimos años. Por ejemplo, el número de usuarios de Tinder aumentó exponencialmente desde 2015 [265] y el número de usuarios de Grindr pasó de 5 millones en 2014 a 27 millones en 2017, lo que supone un aumento del 440%. Varios estudios han observado que los usuarios de estas aplicaciones tienen mayor tendencia a practicar sexo en grupo, lo que aumenta las posibilidades de

transmisión de las ITS [83]. Además, un porcentaje significativo de usuarios suele usar más de una aplicación con este fin, con el consiguiente efecto amplificador.

En estudios previos realizados en España y en otros países europeos se identificaron sólo dos genovariantes mayoritarias, correspondientes a L2 y L2b [228], resultados también observados en Países Bajos, origen de la actual epidemia [166]. Sin embargo, en este capítulo se han detectado que al menos cinco variantes L son ahora responsables de la epidemia de LGV en Madrid. L2bV1 y L2bV4 se han detectado de forma esporádica en otros países europeos. L2bV1 se ha identificado en Francia [266], Italia [267] y Austria [268]; por otro lado, L2bV4 se ha notificado en Francia, Italia [267] y Reino Unido [268]. Sin embargo, L2bV7 se ha detectado únicamente en España [166]. De igual manera, los primeros casos de L2bV1 y L2bV4 se describieron también en España [166,228]. Asumiendo que un mayor número de transmisiones conlleva un mayor número de replicaciones genómicas y mayores probabilidades de generar diversidad, estos resultados sugieren una alta tasa de transmisión del LGV en nuestro país. Por otro lado, la alta diversificación de las variantes L observada podría contribuir a su vez a mantener la situación epidémica, pues aumentan las posibilidades de seleccionar variantes con diferente tropismo o estrategias de evasión inmunológica relacionadas con cambios en *ompA* o eventos recombinogénicos a lo largo del genoma.

Durante el primer periodo se observó una disminución progresiva de la proporción de la genovariante L2b, llegando incluso a desaparecer durante el año 2015, momento en el cual la proporción de L2 superaba el 70%. Por el contrario, durante el segundo periodo, L2b fue aumentando al mismo tiempo que disminuía L2bV1, llegando a alcanzar la misma proporción que L2 en el año 2019. Estos cambios epidemiológicos podrían estar relacionados con la entrada de nuevas variantes, nuevas cadenas de transmisión relacionadas con cambios de los comportamientos sociales, o ambas. Un dato relevante es que tanto la nueva genovariante L2bV4 (detectada desde 2017) como la genovariante L2b se asociaron significativamente a un mayor número de pacientes VIH negativos. El Ministerio de Sanidad español, en su informe sobre la monitorización del objetivo 90-90-90 establecido por ONUSIDA [269], publicó que en el periodo 2017-2019 el 87% de los pacientes VIH conocería su diagnóstico, el 97,3% de éstos habría iniciado el tratamiento antirretroviral, y el 90,4% de los pacientes en tratamiento tendrían carga viral indetectable, mejorando en 5 puntos respecto al año 2013. Además, desde el año 2016, en el “Documento de consenso de GESIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana” se recomienda el inicio del tratamiento antirretroviral

independientemente del valor de los CD4 [270]. En nuestra serie, durante los primeros años de la epidemia, la mayoría de los pacientes VIH infectados con genotipos L tenían carga viral detectable [228]; sin embargo, el 83,4% de los pacientes VIH diagnosticados durante los últimos 3 años del nuestro estudio tenían carga viral indetectable. El mejor control de la infección por VIH, sumado a la introducción de la PrEP podrían favorecer aún más en el futuro un cambio en el patrón epidemiológico del LGV en su asociación con el VIH. Así lo confirman varias series temporales internacionales en las que se ha observado que la prevalencia de la infección por VIH en pacientes con diagnóstico de LGV es cada vez menor, consecuencia probablemente de mejoras en el diagnóstico, el tratamiento y la implementación de la PrEP [248].

Otro hallazgo interesante de este capítulo fue la detección de infecciones mixtas entre dos genovariantes L, la identificación de variantes resultantes de eventos de recombinación previos, así como la detección de otros genotipos L, como los genotipos L1. Estos resultados confirman la facilidad de *C. trachomatis* para generar nuevas variantes por mutación o recombinación pero también posibles nuevas entradas en nuestra población [166]. Por tanto, estos datos ponen de manifiesto la necesidad de establecer una vigilancia continua que nos permita detectar variantes altamente transmisibles y/o más patógenas, así como conocer la dinámica temporal de la epidemiología molecular en una determinada región.

El estudio realizado en este capítulo tiene varias limitaciones. Por un lado, sólo se analizaron los genes *pmpH* y *ompA*, y aunque éste último es uno de los genes más variables de *C. trachomatis*, nos podría ofrecer una visión epidemiológica limitada. Además, la detección del gen *ompA* asociado al genotipo L2 no implica necesariamente que el resto del genoma corresponda a L2 [166]. Otras limitaciones son la desproporción en la secuenciación del gen *ompA* durante el primer y el segundo periodo (35% frente al 83%), y los datos clínicos y epidemiológicos, no disponibles en todos los casos.

En conclusión, este capítulo muestra la evolución temporal de la epidemia de LGV desde los primeros años del brote en Madrid, encontrándose una alta tasa de variabilidad, con al menos cinco nodos de transmisión. Aunque la epidemia de LGV puede haber estado en remisión hasta 2015, las posibles introducciones de nuevas variantes han dado lugar a nuevos nodos de transmisión. Estos hallazgos, junto con las redes sexuales altamente interconectadas y la alta proporción de casos asintomáticos, hacen que la erradicación del LGV sea cada vez más difícil. La combinación de las altas incidencias de LGV, la alta diversidad de variantes y la detección precoz de nuevas genovariantes en comparación

con otros países de nuestro entorno convierten a España en una de las áreas geográficas en las que es más fácil conocer la evolución de la epidemia de LGV.

Capítulo II

Impacto de la pandemia
por SARS-CoV-2 en
los diagnósticos de
linfogranuloma venéreo

*“No temas a las dificultades,
lo mejor surge de ellas”*
Rita Levi-Montalcini



ANTECEDENTES

1. Emergencia y expansión de un nuevo virus

En diciembre de 2019, varios hospitales de Wuhan (provincia de Hubei, China) notificaron un aumento de casos de neumonía de causa desconocida [271]. Poco después, el 8 de enero de 2020, científicos chinos identificaron la primera secuencia genómica del agente causal del brote, correspondiente a un nuevo virus de la familia *Coronaviridae* [272]. En un primer momento el nuevo virus fue nombrado como “nuevo coronavirus de 2019” y más tarde, el 11 de febrero de 2020, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) lo denominó Coronavirus de tipo 2 causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) [273,274]. Ese mismo día, la OMS denominó a la enfermedad COVID-19 [275].

Los primeros casos descritos en Wuhan estaban epidemiológicamente relacionados con el mercado de Huanan. Sin embargo, poco después, aparecieron casos no relacionados con el mercado, lo que evidenciaba la posible transmisión persona-persona del nuevo virus [276–278]. Tras Wuhan, pronto aparecieron casos en otras ciudades de la provincia de Hubei y a finales de enero ya se había extendido a 31 provincias de China [279] (Figura 33). Para evitar la expansión del virus, el gobierno chino cerró la ciudad de Wuhan y limitó la entrada y salida de la provincia de Hubei [280]. Las actividades comerciales y sociales se vieron reducidas en todo el país y se promocionaron las medidas de prevención personal como el uso de mascarilla y la higiene de manos [281]. Gracias a estas medidas, a partir del mes de febrero el número de casos comenzó a disminuir en todo el país [282] (Figura 34).

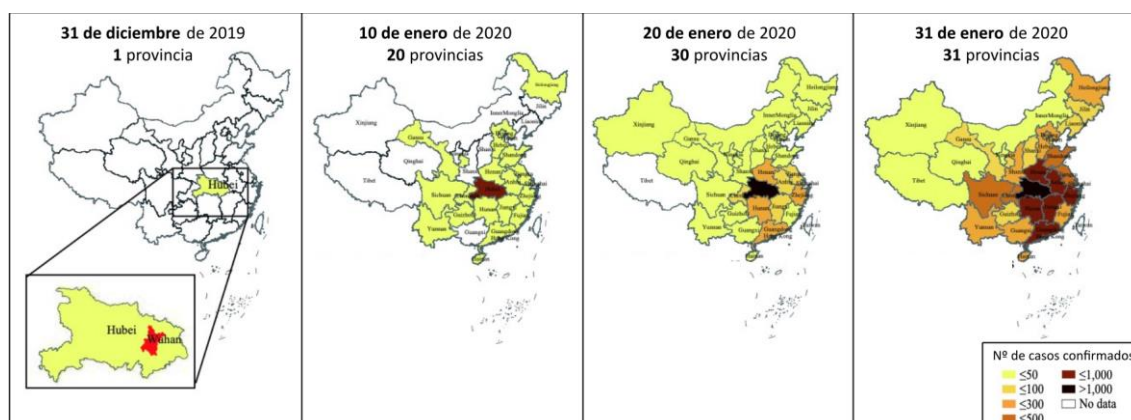


Figura 33. Propagación espaciotemporal del SARS-CoV-2 en China desde el 31 de diciembre de 2019 hasta el 31 de enero de 2020. En sólo un mes, el nuevo virus se extendió a 31 provincias, afectando a más de 1.000 condados. Adaptado de *Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2020* [279].

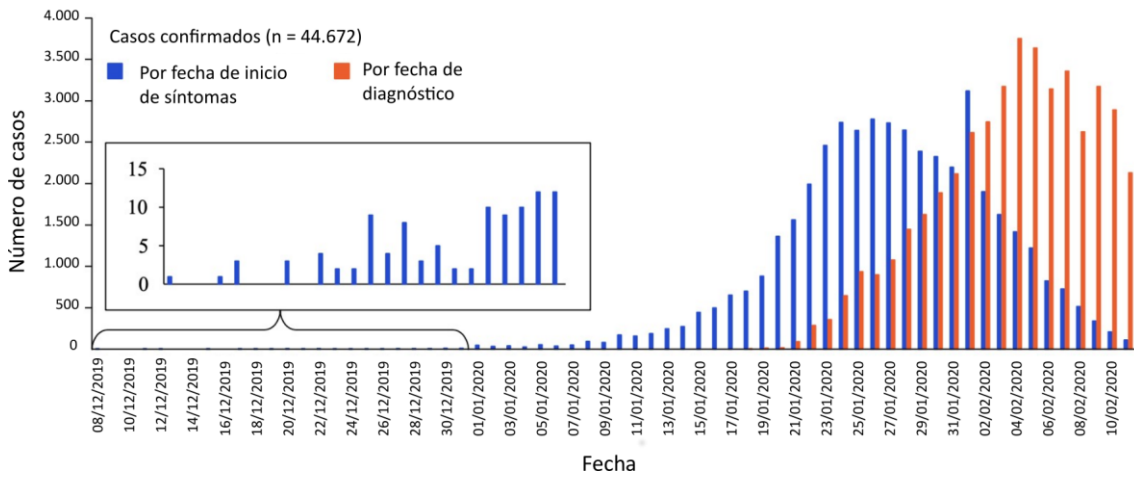


Figura 34. Número de casos de infección por SARS-CoV-2 diagnosticados por día en China desde el 8 de diciembre de 2019 hasta el 11 de febrero de 2020. Adaptado de *Chinese Center for Disease Control and Prevention*, 2020 [279].

Sin embargo, el SARS-CoV-2 continuó su expansión fuera de China y, en consecuencia, el 30 de enero de 2020 la OMS declaró al brote una emergencia de salud pública de importancia internacional [283] (Figura 35).



Figura 35. Países que habían notificado casos de infección por SARS-CoV-2 hasta el 30 de enero de 2020, momento en el cual la OMS declaró la emergencia de salud pública internacional. Entre paréntesis se indica el número de casos notificados por cada país.

El 11 de febrero, eran 27 los países que habían notificado algún caso, varios de ellos sin ningún nexo epidemiológico con el país de origen [284]. En Europa, los primeros casos fueron detectados el 24 de enero en Francia [285,286] y casi un mes después, el 21 de febrero de 2020, el número de casos diagnosticados en el continente sumaban un total

de 47, detectados en 9 países diferentes [287]. Sin embargo, ese mismo día, Italia notificó el primer caso autóctono de un paciente sin historia de viajes ni contactos con casos conocidos o probables en la ciudad de Codogno (región de Lombardía) [288]. Este hallazgo coincidió simultáneamente con la detección de un brote en Vo' Euganeo (Padua) y la primera muerte por COVID-19 en Italia [289]. Al día siguiente, el 22 de febrero, se notificaron más grupos de casos en varios municipios de la región de Lombardía y también en las regiones de Veneto y Piedmont, sumándose al día siguiente la región de Emilia-Romagna [290]. La situación epidemiológica en Italia ponía de manifiesto la transmisión local del virus y alertaba de la posible expansión del virus en Europa.

A partir de ese momento, el número de casos comenzó a aumentar rápidamente, tanto en Italia como en el resto del continente. El 11 de marzo de 2020, la OMS declaró oficialmente el brote de COVID-19 como pandemia [291]. A 10 de diciembre de 2022, el SARS-CoV-2 ha sido responsable de más de 650 millones de infecciones y más de 6,6 millones de muertes en todo el mundo.

2. Primer año de pandemia en España y en la Comunidad de Madrid

Los dos primeros casos de infección por SARS-CoV-2 en España fueron diagnosticados el 31 de enero y el 9 de febrero en las islas de La Gomera y Mallorca, respectivamente, tratándose ambos de casos importados [292]. No fue hasta el 26 de febrero, casi un mes después del primer diagnóstico en España, cuando se confirmó el primer caso de transmisión comunitaria en el país [293]. A partir de ese momento, el número de casos aumentó rápidamente, alcanzándose más de 3.000 casos el 9 de marzo de 2020, día en el que se instauraron las primeras medidas de distanciamiento [294,295].

Durante el mes de marzo, el número de casos aumentó exponencialmente, alcanzando el pico máximo el 20 de marzo, con más de 10.000 casos en un solo día [296]. En cuanto a la distribución de casos en función de la gravedad de la enfermedad, el mayor número de ingresos hospitalarios o en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) fue alrededor del 24 de marzo [297]. Tras el pico alcanzado durante las últimas semanas de marzo, el número de casos fue descendiendo y la primera ola se dio por finalizada el 10 de mayo de 2020. Hasta ese momento, el número total de casos confirmados por PCR eran 224.390 y los fallecimientos alcanzaban la cifra de 26.621 [298,299], lo que representaba un 11,9% de los diagnósticos.

Tras casi tres meses en los que la incidencia se mantuvo en niveles bajos, tuvieron lugar, de forma casi consecutiva, dos olas más. La segunda ola tuvo lugar desde el 22 de agosto

al 22 de noviembre de 2020 y la tercera desde el 20 de diciembre de 2020 al 20 febrero de 2021 (Figura 36). Las características de la segunda y la tercera ola fueron distintas a las de la primera. Por un lado, las infecciones fueron menos graves en general, lo que probablemente fue debido a diversas causas. Entre ellas, el mayor acceso al diagnóstico, que permitió una detección más temprana de los casos, la menor edad de los pacientes y un mayor conocimiento de la enfermedad, con las consiguientes mejoras en el tratamiento y manejo de los pacientes. Por otro lado, el número de casos fue significativamente mayor durante la segunda y tercera ola, alcanzando las cifras de 1.207.976 y 1.250.512 casos, respectivamente [300]. Esto se debe a que durante la primera ola la capacidad diagnóstica fue significativamente inferior a la de las olas sucesivas y, además, el diagnóstico microbiológico se priorizó para los casos más graves y los trabajadores esenciales, por lo que la mayoría de los casos leves o asintomáticos no fueron confirmados. Tras el primer año de pandemia, el número total de casos ascendía a 3.153.971 y los fallecidos alcanzaban la cifra de 67.636 [301].

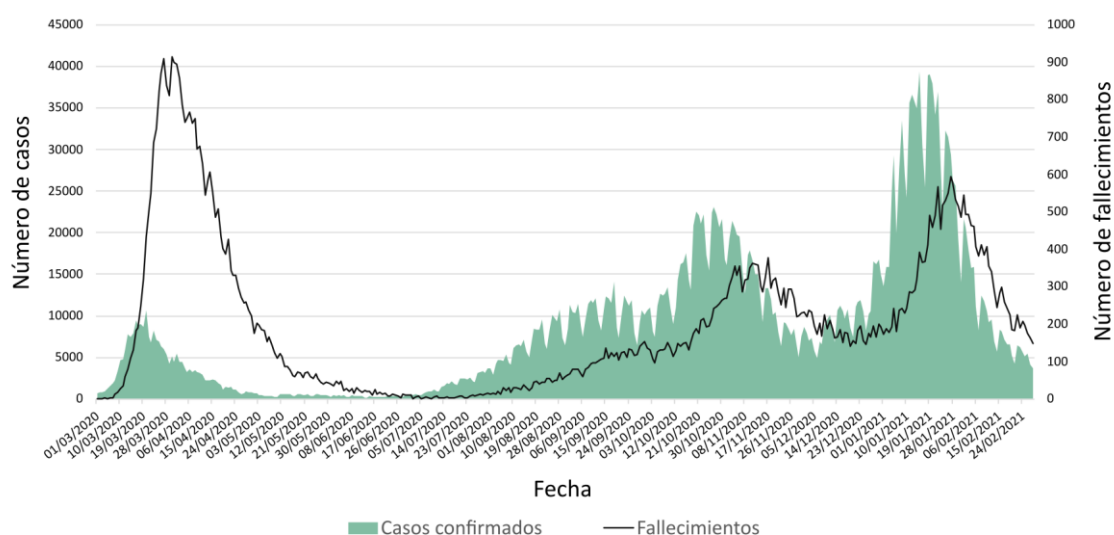


Figura 36. Número de casos y número de fallecimientos diarios por SARS-CoV-2 en España durante el primer año de pandemia. Primera ola: 11-marzo-2020 a 10-mayo-2020; segunda ola: 22-agosto-2020 a 22-noviembre-2020; tercera ola: 20-diciembre-2020 a 20-febrero-2021.

Fuente: <https://cneccovid.isciii.es>.

La Comunidad de Madrid constituyó el epicentro de la pandemia en España, especialmente durante la primera ola, concentrando hasta casi la mitad de los nuevos casos del territorio nacional durante las primeras semanas de marzo (Figura 37). El rápido crecimiento en el número de casos desde principios de marzo llevó a colapsar los hospitales de la Comunidad, especialmente las UCI. Además, el elevado número de casos obligó a la apertura de nuevas camas en todos los hospitales y se habilitó un

hospital provisional en IFEMA (Feria de Madrid) con capacidad para 5.000 pacientes, aumentando su capacidad total en un 145% [302].

Los datos oficiales indican un número total de casos confirmados de 63.401, 235.831 y 196.735 durante la primera, segunda y tercera ola, respectivamente. Sin embargo, estudios realizados tras la primera ola revelaron una prevalencia de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 en torno al 11% (5% a nivel nacional) [303], y, teniendo en cuenta que la población actual de la Comunidad de Madrid es de 6,6 millones, el número de infecciones podría haber sido superior a 700.000, lo que es más de 10 veces el número de casos notificados durante la primera ola y casi 3 veces más el número de casos notificados durante las olas sucesivas. Respecto al total nacional, el porcentaje de casos durante las tres primeras olas en la Comunidad de Madrid fue del 28,1%, 19,5% y el 15,7%, respectivamente.

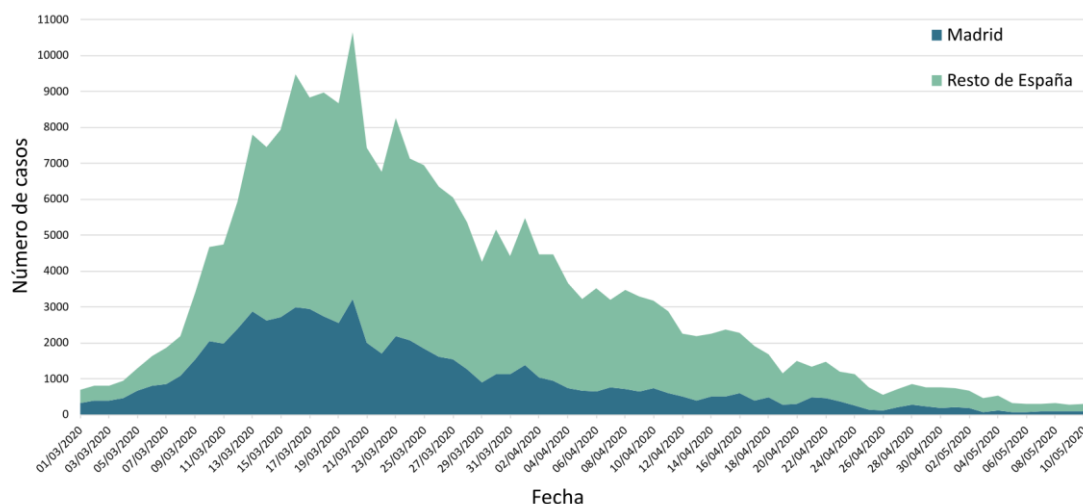


Figura 37. Número de casos de SARS-CoV-2 diagnosticados en España y en la Comunidad de Madrid durante la primera ola (1-marzo-2020 a 10-mayo-2020). Fuente: <https://cnecovid.isciii.es>.

Globalmente, la Comunidad de Madrid registró un exceso de mortalidad del 51,9% durante el primer año de pandemia, llegando a alcanzar el 195,2% durante la primera ola [304]. El exceso de mortalidad en España durante ese mismo periodo fue del 67,1%. Además, el número de fallecidos por cada 100.000 habitantes durante la primera ola en la Comunidad de Madrid fue de 130,4 frente al 57,7 de la media nacional. Sin embargo, durante la segunda y tercera ola la tasa de mortalidad en la Comunidad de Madrid fue 41,4 y 43,3 por cada 100.000 habitantes, respectivamente, valores similares o incluso inferiores a la media nacional, que fueron de 42,3 y 54 para los mismos periodos de tiempo [305].

2.1. Medidas adoptadas

Como consecuencia de la propagación del SARS-CoV-2, las autoridades sanitarias de cada país pusieron en marcha varias medidas con el fin de limitar la expansión del virus [306]. Aunque hubo diversidad en las medidas adoptadas, la mayoría de ellas tenían como objetivo principal disminuir el número de contactos sociales y reducir así las probabilidades de transmisión del virus. En España, las primeras medidas con impacto en la población fueron implementadas el 9 de marzo de 2020 en Madrid y en las ciudades de Vitoria y Labastida en el País Vasco [295]. Éstas consistieron en el cierre de colegios y universidades, así como en la promoción del trabajo desde casa y la limitación de aforo en ciertos eventos. Hasta ese momento, sólo se habían aplicado medidas menores, basadas fundamentalmente en recomendaciones y distribución de información a la población, especialmente entre los viajeros [302].

Sin embargo, el avance del nuevo virus llevó a la implementación de medidas más restrictivas, y el 14 de marzo de 2020, se declaró el estado de alarma y se instauró el confinamiento en todo el territorio español, con una duración inicial estimada de 2 semanas. Sin embargo, éste se prolongó durante 98 días más, hasta el 21 de junio. Durante este periodo se establecieron importantes medidas restrictivas tanto en el ámbito social como económico: cierre de establecimientos comerciales (a excepción de tiendas de alimentación y otros artículos de primera necesidad), locales de ocio y de hostelería, colegios, etc. Además, la libertad de movimiento quedó limitada en todo el territorio, permitiéndose solamente circular para la adquisición de alimentos y otros productos de primera necesidad, asistencia a los centros sanitarios o a los lugares de trabajo, entre otros [307].

El 14 de abril de 2020 la OMS estableció una serie de principios para tener en cuenta a la hora de plantear la relajación de las medidas aplicadas y, en base a ello, el Gobierno Nacional estableció un Plan de desescalada por fases a partir del 28 de abril, caracterizado por un incremento progresivo en las actividades socioeconómicas y la movilidad de la población [296]. El plan completo estaba constituido por cinco fases, desde la fase 0 hasta la fase de nueva normalidad. La desescalada se produjo de forma asimétrica, adaptándose al contexto local de cada Comunidad Autónoma (CA) en función de criterios de salud pública, económicos, sociales y de movilidad [308] (Figura 38). Durante el proceso, que duró un total de 8 semanas, la situación epidemiológica mejoró considerablemente, pasando de una incidencia acumulada de 86,3 al inicio de la desescalada a 8,3 casos por cada 100.000 habitantes al final de ésta [309,310]. En el caso

de la Comunidad de Madrid, la desescalada tuvo lugar en cuatro fases, siendo una de las comunidades que más lentamente avanzó hacia la nueva normalidad.

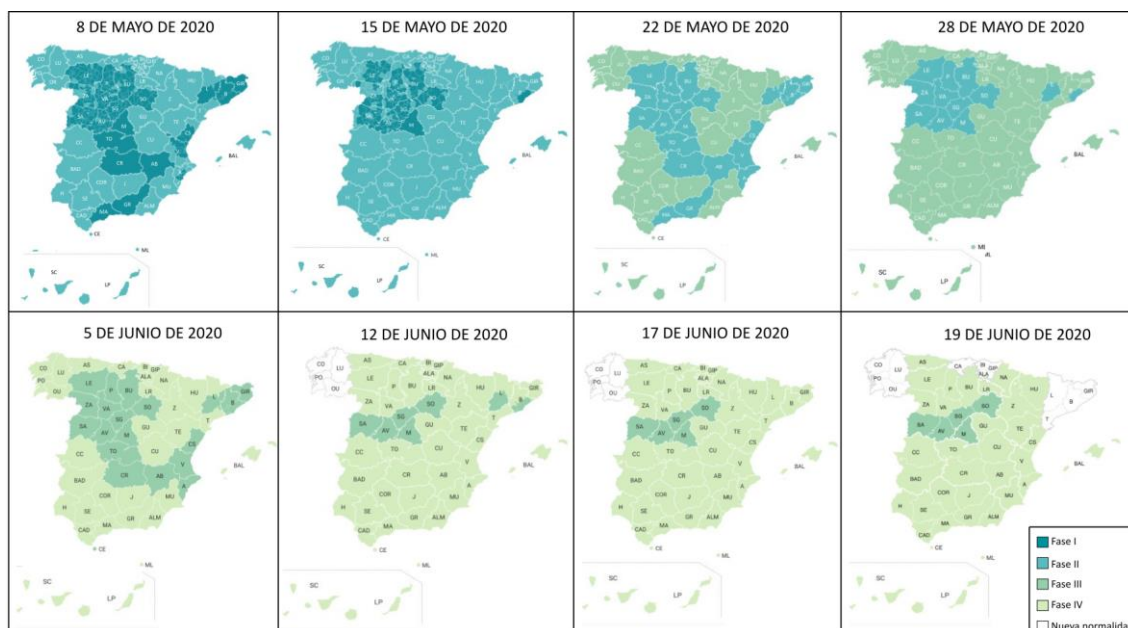


Figura 38. Situación semanal de cada territorio durante la fase de desescalada en España. Fuente: <https://www.lamoncloa.gob.es/covid-19/Paginas/mapa-fases-desescalada.aspx>.

3. Impacto del confinamiento

3.1. Impacto en la salud de la población

El confinamiento fue una de las medidas más utilizadas por todos los países del mundo para evitar la propagación del SARS-CoV-2 [306,311]. Éste ha demostrado ser una de las intervenciones más eficaces en la reducción del R_0 (número de casos secundarios respecto al caso índice) [312,313], y el incremento del tiempo de duplicación de casos [314], especialmente si se adopta de manera temprana [315]. Sin embargo, la pandemia y el confinamiento han tenido un importante impacto a nivel económico, social y sobre la salud de la población.

A nivel social, uno de los resultados derivados de la pandemia y el confinamiento fue el aumento global de la violencia de género [316], incluyendo las violaciones y las agresiones sexuales contra las mujeres. El aislamiento social y familiar, con la consiguiente imposibilidad de evitar a la pareja maltratadora, así como la limitación de acceso a los sistemas de protección y apoyo son los factores que se han relacionado con este aumento [317,318]. Diversos países como China, Reino Unido, Francia o Estados Unidos han notificado un incremento de los casos de violencia de género [319]. En España, a pesar de que el número de denuncias por violencia de género descendió un

40% desde el inicio del confinamiento [317], el número de llamadas al teléfono de ayuda 016 se vio incrementado un 10,5% [320].

Una de las poblaciones probablemente más afectadas haya sido la población anciana, ya no sólo por la mayor gravedad de la enfermedad y las mayores tasas de mortalidad, sino también debido al aislamiento social y la soledad que muchos de ellos han experimentado durante el confinamiento, lo que ha tenido consecuencias en su salud física y mental [321]. Los efectos descritos en esta población están relacionados fundamentalmente con la salud mental, especialmente en pacientes con deterioro cognitivo previo, pues se ha observado que el confinamiento ha supuesto un empeoramiento de síntomas como la agitación y la apatía, entre otros [322]. Además, la soledad y el aislamiento social se han relacionado con un mayor riesgo de mortalidad [323].

El confinamiento ha tenido también un fuerte impacto en la salud mental de otros sectores de la población, especialmente los más jóvenes, donde la falta de contacto social, el aburrimiento, la frustración, el miedo al contagio o la incertidumbre son factores que han influido en el aumento de casos de depresión y ansiedad durante la pandemia [324,325]. De hecho, en una revisión sistemática, las prevalencias de ansiedad y depresión en niños y adolescentes fueron del 34,5% y del 41,7%, respectivamente; en el caso de sus cuidadores, las prevalencias para esos mismos trastornos fueron del 52,3% y 27,4%. Además, casi en un 80% de los niños con trastornos previos, como autismo o trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), los síntomas se agravaron como consecuencia del confinamiento [326]. Otro sector especialmente afectado por la pandemia fue el de los trabajadores sanitarios. Los principales trastornos notificados fueron estrés, ansiedad, depresión e insomnio [327,328], cuyas prevalencias, aunque variables según los diversos estudios, aumentaron durante la pandemia [329], especialmente entre los profesionales sanitarios que trabajaron en unidades COVID-19 [330]. Asimismo, la prevalencia de estos síntomas en el personal de enfermería fue mayor que otros profesionales sanitarios, probablemente por el mayor tiempo de contacto con los pacientes que otras categorías profesionales.

Otro de los efectos colaterales de la pandemia fue que todos los recursos sanitarios fueron dirigidos al COVID-19, y toda actividad no relacionada directamente con la pandemia fue reducida al mínimo. A nivel hospitalario, se cancelaron todas las cirugías e ingresos programados, las consultas externas no preferentes y las pruebas diagnósticas no urgentes, generando un descenso de las hospitalizaciones por causas distintas a la infección por SARS-CoV-2 [331–333]. En el informe sobre el impacto de

COVID-19 en las personas con enfermedad crónica, se pudo constatar que el 69% de las consultas fueron aplazadas por decisiones de los profesionales [334]. En los Servicios de Urgencias, hubo una reducción en las consultas de todas las categorías diagnósticas [335], especialmente dermatológicas, genitourinarias, oftalmológicas y neurológicas [336]. En el caso de las emergencias cardiovasculares, varios estudios observaron un descenso en el número de ingresos debido a estas causas durante las primeras semanas de la pandemia [333,337]; sin embargo, estas patologías llevaron asociadas una mayor mortalidad [338]. Los casos de apendicitis también descendieron durante la pandemia; no obstante, se notificó un aumento del tiempo desde el inicio de síntomas hasta el diagnóstico, un mayor número de apendicitis complicadas y un aumento de la estancia hospitalaria y de las complicaciones postoperatorias [339,340]. El volumen de hospitalizaciones por ictus y otros accidentes cerebrovasculares también se vio disminuido durante la pandemia [341], aunque no fue así para los casos de ictus isquémico grave y hemorragias subaracnoideas [342]. Todos estos datos podrían estar relacionados con el temor de los pacientes a adquirir la infección en los centros hospitalarios [334]. Además, las recomendaciones por parte de las autoridades sanitarias de permanecer en casa para evitar la propagación del virus podrían haber favorecido el retraso en la búsqueda de la atención médica [338]. Esto quedó constatado en el informe sobre el impacto de COVID-19 en las personas con enfermedad crónica, pues el 10% de los encuestados decidió aplazar sus consultas y el 22,8% decidió, aun presentando sintomatología, no acudir a los centros hospitalarios por miedo al contagio [334]. En Atención Primaria, las consultas no urgentes eran atendidas por teléfono y se priorizó la atención domiciliaria. Los centros de especialidades también cancelaron todas las consultas no urgentes y se dirigió la actividad hacia la atención y diagnóstico de los pacientes con SARS-CoV-2 [343].

3.2. Impacto en la vigilancia de enfermedades transmisibles

Estas medidas tuvieron un importante impacto en otras cuestiones sanitarias, que, debido a la pandemia, pasaron a un segundo plano. Es el caso de programas de cribado de agentes infecciosos como VPH, VIH o VHC. Esto, junto con el descenso en el número de derivaciones desde Atención Primaria, supuso un descenso en los nuevos diagnósticos [344], y un retraso en el tratamiento y seguimiento de los pacientes con cribado positivo [345].

Varios estudios a nivel nacional comunicaron un descenso en las determinaciones diagnósticas de VIH y hepatitis virales durante el primer año de pandemia [346], con descensos del 22,6% y el 22,5% para el VIH y VHC, respectivamente [347]. Como era de

esperar, el número de nuevos diagnósticos también se vio reducido en el año 2020 respecto al año 2019 [348]. Los informes realizados por el CDC y ECDC sobre el impacto de COVID-19 en los sistemas de notificación de VIH y hepatitis virales indicaron descensos significativos en los nuevos diagnósticos (Figura 39). En el caso de VIH, estos descensos fueron del 17% y 20% en Estados Unidos y Europa, respectivamente [349,350]. En cuanto a las hepatitis, los descensos en la notificación de casos fueron más drásticos en Europa, con descensos del 61%, 52,4% y 64% para VHA, VHB y VHC respectivamente [351–353] (Figura 40), mientras que en Estados Unidos los descensos fueron del 47% y el 32% para VHA y VHB respectivamente, si bien hubo un aumento del 15% para VHC [354].

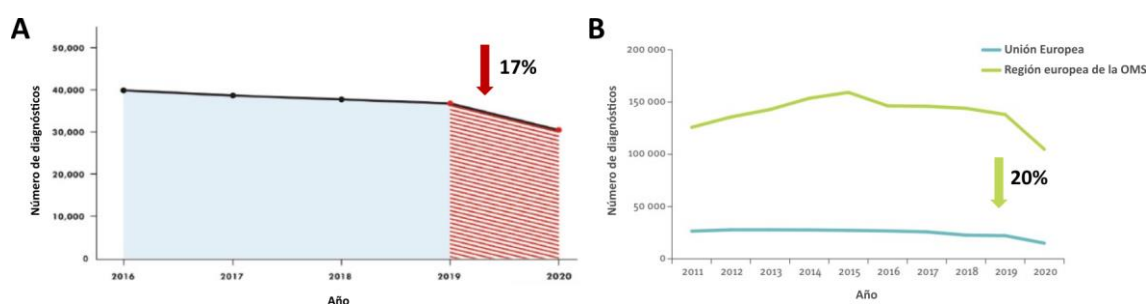


Figura 39. Impacto de la pandemia por COVID-19 en la notificación de nuevos diagnósticos de VIH. **A)** Estados Unidos, donde se observa un descenso del 17% respecto al año 2020 [349]. **B)** Europa, donde el descenso fue del 20% respecto al año 2020 [350].

Sin embargo, los diagnósticos tardíos de VIH, determinados por los niveles de CD4 inferiores a 350 células/mm³ [355], aumentaron en un 25% [347], al igual que el número de hospitalizaciones por condiciones definitorias de SIDA, como neumonía por *Pneumocystis jirovecii* [348]. En la región europea, el diagnóstico tardío de la infección por VIH aumentó del 49,7% al 51%. En el caso de la hepatitis C, modelos matemáticos han pronosticado que esta situación podría llevar a la pérdida de más de 900.000 nuevos diagnósticos, así como a un exceso de mortalidad de más de 70.000 casos durante la próxima década [356], lo que podría poner en riesgo el alcance de los objetivos de eliminación en el año 2030 propuestos por la OMS [357,358].

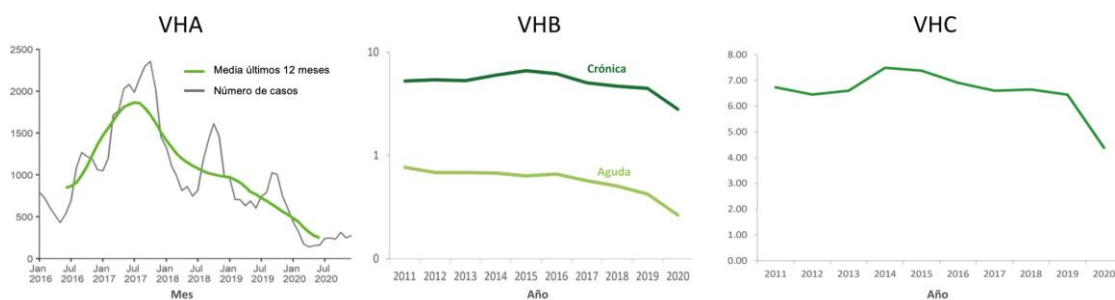


Figura 40. Impacto de la pandemia por COVID-19 en la notificación de nuevos casos de las hepatitis virales en Europa durante 2020 respecto a los años previos [351–353]. En el caso de VHA es más difícil de cuantificar el descenso pues se observa un progresivo descenso desde el brote de 2017-2018.

Por otro lado, ni el CDC ni el ECDCC tienen un registro de los casos de VPH, centrándose exclusivamente en la vacunación. Un estudio realizado en Madrid analizó el descenso de nuevos diagnósticos de genotipos de VPH de alto riesgo durante las primeras seis olas pandémicas. El descenso más significativo se observó durante la primera ola, describiéndose una reducción de hasta el 76% en el número de peticiones [347]. Aunque el descenso fue menor en las sucesivas olas, éste fue acompañado por una reducción en la detección de genotipos de alto riesgo [347], con el consiguiente retraso diagnóstico (Figura 41).

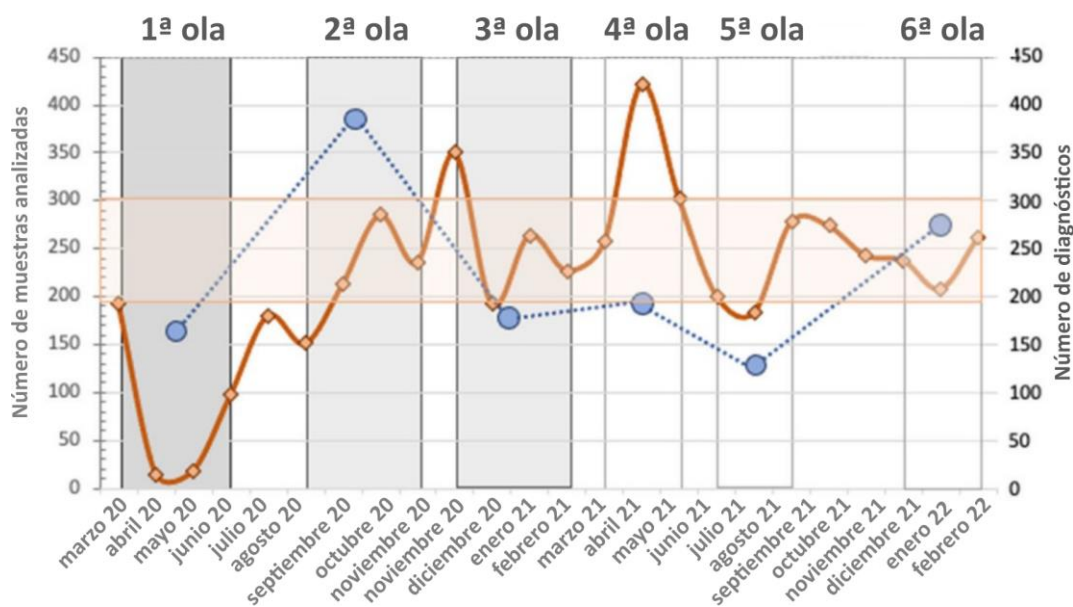


Figura 41. Impacto de la pandemia por COVID-19 en el número de solicitudes y nuevos diagnósticos para VPH. Los círculos azules se corresponden a los pacientes con genotipos de alto riesgo. Adaptado de Romero-Hernández y cols. [347].

La interrupción del acceso a los centros hospitalarios potencialmente también podría impedir el acceso al tratamiento antirretroviral. En un estudio realizado en China, un tercio de los encuestados afirmaron estar en riesgo de ver interrumpido su tratamiento como consecuencia de la pandemia [359]. Sin embargo, en Australia, no se notificó un descenso en el acceso al tratamiento antirretroviral respecto a los años previos, aunque sí hubo un aumento significativo en el envío de la medicación para el VIH a través de correo postal [360] y hasta un 50% de los pacientes tuvo dificultades para acceder al tratamiento [361]. En España, las pruebas diagnósticas de VIH y otras ITS fueron paralizadas, pero el acceso al tratamiento antirretroviral de los pacientes en seguimiento no se vio afectado [346].

3.3. Impacto en la vigilancia de las ITS

Los datos sobre el impacto del confinamiento en la notificación de las ITS son escasos. Recientemente, el CDC ha publicado los resultados preliminares en Estados Unidos [362], no disponiendo aún de datos de Europa. Conforme a estos datos, se observa un descenso de los casos notificados de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum* (Figura 42A), cuya cuantificación respecto al 2019 puede observarse en la Figura 42B. El descenso más significativo y prolongado en el tiempo se observó para *C. trachomatis*, mientras que para *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum* el impacto estuvo fundamentalmente asociado a la primera ola pandémica y el confinamiento estricto. Esto probablemente se deba al mayor porcentaje de casos asintomáticos de la infección por *C. trachomatis*.

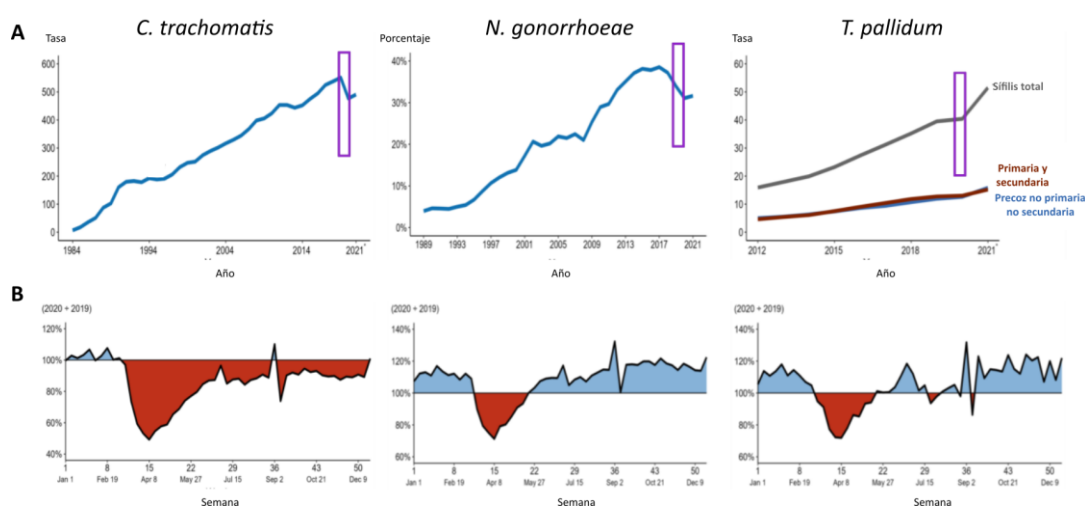


Figura 42. Impacto de la pandemia por COVID-19 en la vigilancia de las principales ITS en Estados Unidos. **A)** Evolución temporal de las tasas o porcentajes de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum*. El rectángulo morado marca el impacto de la pandemia por COVID-19. **B)** Casos de cada uno de los tres microorganismos antes mencionados notificados en 2020 expresado como porcentaje de los del 2019, resultando en un aumento o un descenso en la notificación. Adaptado de Pagaoa y cols., 2021 [362].

3.4. Impacto en las prácticas sexuales

Durante el confinamiento más estricto, correspondiente al periodo de tiempo entre el inicio del estado de alarma (14 de marzo de 2020) hasta el inicio de la desescalada (28 de abril de 2020), las prácticas habituales de la población se vieron afectadas [324], incluyendo las prácticas sexuales. Varios estudios, la mayoría de ellos basados en cuestionarios *on-line*, han evaluado cómo las medidas de distanciamiento social han influido en el comportamiento sexual de la población. En el caso de España, hasta un 75% de la población ha visto alterada su vida sexual de algún modo durante la pandemia por COVID-19, lo que ha tenido un importante impacto en la salud sexual [363].

La mayoría de los estudios revelaron un descenso en la actividad sexual más que un aumento, sobre todo en personas con parejas no estables [363–365]; en aquellas ocasiones en las que se comunicó un aumento, se observó fundamentalmente en mujeres y en población que vivía en pareja durante el confinamiento, aunque acompañado en la mayoría de los casos de un descenso en la calidad de la vida sexual [366]. Por otro lado, estudios realizados en HSH y/o bisexuales, aunque también se observó un descenso en la frecuencia de parejas sexuales [365,367], otros autores no observaron diferencias [368] o incluso comunicaron un aumento medio de hasta 2,3 parejas sexuales respecto al periodo previo al confinamiento [369]. Además, en un estudio realizado en Reino Unido, hasta el 62,6% de los HSH encuestados comunicaron haber tenido sexo físico durante el confinamiento a pesar de las restricciones, más de la mitad con una o más parejas nuevas [370].

En cuanto a las prácticas sexuales, un 23% y un 30% de los encuestados comunicaron un aumento del consumo de pornografía y de la masturbación durante la pandemia, respectivamente [363]. Por ejemplo, en el estudio de Ballester-Arnal y cols. la masturbación diaria aumentó desde un 12,5% antes de la pandemia a un 25,8% durante la misma [371]. Respecto al uso del preservativo durante las relaciones sexuales, la mayoría de los estudios no comunicaron diferencias en su uso antes y durante el confinamiento [368,369,372], aunque en algunas ocasiones sí se observó un aumento [373] o un descenso [363]. Lo mismo ocurre con el consumo de alcohol o drogas durante las relaciones sexuales, observándose diversidad de resultados [363].

Varios estudios han evaluado si el consumo de la PrEP para el VIH se ha visto modificado durante la pandemia. El estudio de Chow y cols. reveló que hasta el 30% de los usuarios de PrEP cambiaron su forma de usarla durante el confinamiento, dejando de tomarla la mayor parte de ellos (80,7%) [367]. Algo similar se observó en el estudio de Reyners y cols., en el que el 47% de los usuarios de PrEP dejaron de tomarla durante el

confinamiento [365]. Los motivos más frecuentes para realizar dichos cambios fue el descenso en el número de relaciones y parejas sexuales.

El uso de aplicaciones móviles de citas también se vio afectado por la pandemia, aunque con resultados diversos. En un estudio realizado en Australia, el uso de aplicaciones móviles disminuyó durante el confinamiento, pasando del 42,1% en el 2019 al 27,3% durante la pandemia. Sin embargo, hubo diferencias en cuanto a la motivación para su uso; su utilización para chatear o para la práctica de sexo virtual se vio incrementada, mientras que el uso para citas en persona se vio disminuido [364]. Por otro lado, un estudio a nivel europeo notificó un incremento del 27% en el uso de aplicaciones móviles de citas como Tinder, OkCupid o PlentyOfFish, así como un aumento del 30% en su tiempo de uso respecto a los meses previos, aunque ese aumento fue más sustancial para hablar o para la práctica de sexo virtual [371,374]. Sin embargo, en el caso de la población HSH, el estudio de Sánchez y cols. [368] desveló que, aunque el uso de aplicaciones para citas en persona disminuyó más que aumentó, su uso no se vio modificado durante el confinamiento hasta en el 44,9% de los encuestados.

Todos los datos anteriores demuestran que la pandemia ha tenido un importante impacto en las prácticas sexuales de la población. En consecuencia, los cambios en los hábitos sexuales podrían tener a su vez un impacto en las ITS [375]. El descenso en la frecuencia y el número de parejas sexuales durante el confinamiento podría tener como efecto inmediato una disminución en la transmisión del VIH y otras ITS. Sin embargo, el acceso a las pruebas para el diagnóstico de VIH y otras ITS se vio interrumpido durante la pandemia [376]. Asimismo, el acceso a la PrEP también se vio interrumpido en algunas ocasiones [369]. Esto podría tener como resultado un aumento en la incidencia de las ITS, especialmente en poblaciones vulnerables, como HSH [368].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La pandemia por COVID-19 ha tenido un importante impacto en los programas de vigilancia de enfermedades crónicas y agudas, tanto infecciosas como no infecciosas, así como en los comportamientos sociales de la población. Las ITS constituyen uno de los principales problemas de salud pública, con incrementos significativos durante los últimos años a nivel local, nacional e internacional. Hoy en día, no sabemos cómo la pandemia por COVID-19 podría afectar a la incidencia de nuevos casos de infección por los genotipos L de *C. trachomatis*.

Los **objetivos** de este capítulo fueron:

1. Evaluar el impacto del confinamiento en España y las medidas instauradas en el diagnóstico de nuevos casos de LGV durante el primer año tras el inicio de la pandemia por COVID-19.
2. Comparar el número de diagnósticos de LGV durante las tres primeras olas de la pandemia por COVID-19 con el mismo periodo del año previo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Centros participantes y periodo de estudio

El estudio se realizó en el CS Sandoval, situado en la CAM, cuyas principales características se detallan en el Capítulo I. Es importante destacar que desde enero de 2020 el CS Sandoval fue autorizado para la prescripción de la PrEP para la prevención de la infección por VIH.

Durante la primera ola y el confinamiento la actividad habitual del CS Sandoval se vio interrumpida, y sólo eran atendidos aquellos pacientes que acudían por algún motivo de urgencia. Además, el centro se dedicó también al diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, por lo que muchos de sus recursos materiales y personales se utilizaron para cubrir las necesidades que la situación de excepción requería. La actividad normal del centro se fue recuperando poco a poco tras el fin del confinamiento y durante la fase de desescalada, alcanzándose en octubre de 2020 los niveles de actividad previos a la pandemia.

El estudio se realizó durante el primer año de pandemia, desde marzo de 2020 hasta febrero de 2021, momento en el que la tercera ola se dio por finalizada. Los resultados obtenidos fueron comparados con el mismo periodo del año previo, desde marzo de 2019 hasta febrero de 2020.

2. Diagnóstico microbiológico de *C. trachomatis* y detección de genotipos L

El diagnóstico inicial de la infección por *C. trachomatis* se realizó en el CS Sandoval mediante técnicas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos. El sistema empleado fue Abbott RealTime CT/NG (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) (Ver descripción de la técnica en el Capítulo I).

Todas las muestras con resultado positivo para *C. trachomatis* en el cribado inicial fueron enviadas, en las condiciones adecuadas, al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Allí se llevó a cabo una nueva extracción de los ácidos nucleicos mediante el sistema Nuclisens EasyMag (bioMérieux, Inc, Durham, NC, USA), de igual forma a lo descrito en el Capítulo I. La detección de los genotipos asociados a LGV (genotipos L1, L2 y L3) se realizó mediante una qPCR basada en la delección de 36 pb del gen *pmpH*. Además, en todas las muestras se confirmó la presencia de *C. trachomatis* mediante la amplificación de un fragmento del gen *ompA* presente en todos los genotipos de *C. trachomatis* [256]. Los cebadores y las sondas utilizadas para este fin se describen en el Capítulo I (Tabla 1).

RESULTADOS

Desde el inicio de la pandemia hasta el final de la tercera ola (marzo 2020-febrero de 2021), se diagnosticaron un total de 1.156 infecciones causadas por *C. trachomatis*, de las cuales 284 fueron identificadas como genotipos L, lo que representa el 24,6%. Los genotipos asociados a LGV se encontraron fundamentalmente en muestras rectales (276/284; 97,2%), seguido por exudados uretrales (6/284; 2,1%) y orina (2/284; 0,7%). La mayoría de los casos fueron detectados en HSH (281/284; 98,9%) y la asociación con VIH fue detectada en 145/284 pacientes, lo que representa el 51,1%. Durante el mismo periodo del año anterior (marzo 2019-febrero 2020) se identificaron 252 casos de genotipos asociados a LGV entre las 1.526 muestras positivas para *C. trachomatis*, lo que supone un 16,5%. De manera similar, la mayoría de las muestras donde se encontraron los genotipos L fueron de origen rectal (245/252; 97,2%), seguido por exudados uretrales (4/252; 1,6%), orina (2/252; 0,8%) y exudados faríngeos (1/252; 0,4%).

En la Figura 43 se muestra la evolución del número de casos de LGV diagnosticados durante el periodo de estudio. Durante la primera ola, que coincidió con el confinamiento más estricto, el número de casos de LGV descendió drásticamente respecto a los meses previos, pasando de 24,5 a 9,7 casos al mes. La proporción de casos de LGV con respecto al total de muestras positivas para *C. trachomatis* durante este periodo fue superior que durante el periodo previo al confinamiento (1 enero-14 marzo 2020), pasando de 13,1% (49/375) a 16,6% (29/175) (Figura 44). Una vez finalizada la primera ola, coincidiendo con el final del confinamiento y el periodo estival, la proporción de casos de LGV respecto a los de *C. trachomatis* alcanzó el 30% (84/280), alcanzando una media de 28 casos al mes durante los meses de junio, julio y agosto.

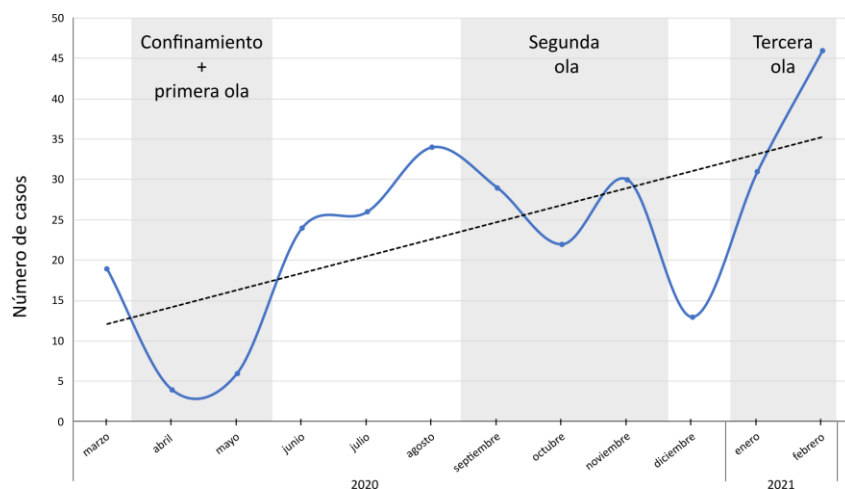


Figura 43. Evolución de los casos de linfogranuloma venéreo detectados durante el primer año de la pandemia por COVID-19 en Madrid (marzo-2020 a febrero-2021).

Durante la segunda ola, el porcentaje de casos de LGV respecto a las muestras positivas para *C. trachomatis* fue del 21,8% (81/371), ligeramente inferior a lo observado en el periodo estival; sin embargo, el número de casos de LGV se mantuvo elevado, con una media de 27 casos al mes. El impacto de LGV durante el intervalo de tiempo entre la segunda y tercera ola no se evaluó debido a que ambas olas prácticamente se sucedieron en el tiempo, con apenas un mes de diferencia. Además, coincide con un mes con pocos días laborables, por lo que las cifras podrías verse alteradas. Durante la tercera ola se detectó un importante aumento en el número de casos de LGV diagnosticados, con una media de 38,5 casos al mes y alcanzando 46 nuevos diagnósticos en febrero. Durante este mes se alcanzó el número más alto de casos de LGV durante el transcurso de la pandemia. Además, el porcentaje de casos respecto a las muestras positivas para *C. trachomatis* también alcanzó el valor más alto de la pandemia durante este mes, del 32,9% (46/140).

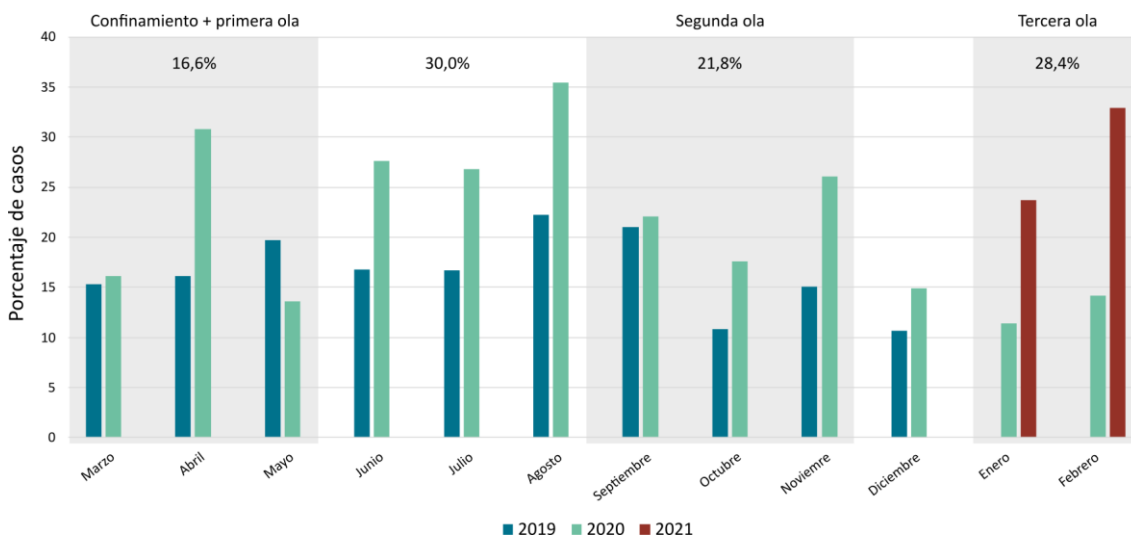


Figura 44. Porcentajes mensuales de los casos de linfogranuloma venéreo respecto al total de muestras positivas para *C. trachomatis* por año (marzo-2019 a febrero-2021).

De manera global, si comparamos los primeros meses del año 2020, justo antes del inicio de la pandemia, con los primeros meses de 2021, la media de casos se incrementó de 24,5 a 38,5 casos al mes. Asimismo, también se observó un aumento significativo en el porcentaje de casos de LGV respecto a *C. trachomatis*, evolucionando del 13,1% al 28,4% ($p < 0,00001$). Además, esa proporción desde el fin del confinamiento fue siempre superior a la del año previo (Figura 44).

DISCUSIÓN

En este capítulo analizamos cómo la pandemia por COVID-19 y las medidas de distanciamiento social aplicadas durante la misma afectaron a los nuevos diagnósticos de LGV. El descenso en el número de casos de LGV durante el confinamiento es coincidente con el observado para otras patologías [377]. Esto puede deberse a una combinación de diferentes factores. Por un lado, las medidas de distanciamiento social aplicadas durante la primera ola, así como las diversas recomendaciones relacionadas con el comportamiento sexual [378], podrían haber influido en el aparente cambio epidemiológico. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que las autoridades sanitarias tomaron la decisión de reducir al mínimo las actividades sanitarias no dedicadas al COVID-19, como la actividad presencial en los centros de atención primaria y las clínicas especializadas en ITS [379], lo cual supuso un descenso en el número de consultas [376] y en el número de pruebas de laboratorio [380], y, por tanto, en el número de diagnósticos. Por ejemplo, en el estudio de Stephenson y cols. [369], hasta un tercio de la población encuestada comunicó la imposibilidad de realizarse una prueba diagnóstica de VIH o de otras ITS, hecho de especial importancia en el caso de poblaciones vulnerables [381]. Como consecuencia, probablemente sólo los pacientes con sintomatología más grave pudieron acudir a los centros sanitarios. En el estudio de Chow y cols. se observó un descenso en el número global de consultas, pero el número de consultas relacionadas con eventos más graves, como enfermedad pélvica inflamatoria, fue similar al periodo previo al confinamiento [376]. Esta situación podría proporcionar más oportunidades para la transmisión de las ITS, incluida la infección causada por *C. trachomatis*, y, por tanto, del LGV.

El descenso observado en el número de diagnósticos de LGV se ajusta con lo observado para otras ITS. En nuestro centro se observó un descenso global en el número de diagnósticos para todas las ITS entre marzo y junio de 2020 respecto al mismo periodo del año 2019. Este descenso se situó entre el 33,9% (proctitis por *C. trachomatis*) y el 81,1% (sífilis) [382]. Para los nuevos casos de LGV el descenso fue del 58,5%. En Cataluña, el número de ITS diagnosticadas durante el confinamiento fue un 51% menor al esperado, siendo ese descenso mayor para *C. trachomatis* (71%) y menor para la sífilis (33%). Para el LGV, el descenso fue del 48%, dato muy similar al de nuestro estudio [383].

Tras la primera ola y el fin del confinamiento estricto, tanto el número de casos de LGV como su proporción respecto a las muestras positivas para *C. trachomatis* se vieron incrementados. La relajación de las medidas de distanciamiento (fase de desescalada) y la reanudación de los contactos sociales junto con la reapertura de los centros de diagnóstico de ITS explicaría en parte el aumento observado. También hay que tener en cuenta que, a pesar de que la mayoría de los estudios notificaron un descenso tanto en el número de parejas sexuales [367] como en la frecuencia de las relaciones sexuales [364] durante el confinamiento más estricto, porcentajes no despreciables mantuvieron la misma actividad sexual previa al confinamiento [368], lo que sumado a lo anteriormente expuesto pudo haber acelerado el aumento de los casos de LGV tras el confinamiento. Además, aunque los resultados son variables en cuanto al uso de aplicaciones móviles, también es destacable que en población HSH, una de las poblaciones más vulnerables, un 44,9% no modificó su uso para citas en persona a pesar de las restricciones [368], lo que ha podido también tener impacto en la transmisión del LGV durante el confinamiento.

La actividad clínica en nuestro centro fue aumentando progresivamente y pocos meses después de su reapertura se alcanzaron los niveles previos a la pandemia. Durante la segunda y tercera ola, finalizada la fase de desescalada en todo el territorio nacional, las medidas aplicadas por partes de las autoridades sanitarias fueron menos estrictas, al igual que en otros países europeos [384]. En el caso de la Comunidad de Madrid se estableció un plan de confinamiento selectivo, y, aunque existían medidas para restringir los contactos sociales, las reuniones de hasta 10 personas (6 en zonas básicas de salud confinadas) estuvieron siempre permitidas durante las sucesivas olas, lo que podría explicar que la incidencia de LGV se mantuviera alta.

La proporción de casos respecto a las muestras positivas para *C. trachomatis* durante la primera ola fue ligeramente superior que durante el periodo inmediatamente anterior al confinamiento (16,6% frente a 13,1%). Esto posiblemente se deba a que, a pesar de que globalmente el número de casos fue menor (29 frente a 49), los pacientes infectados por genotipos L suelen tener más sintomatología que los pacientes infectados por genotipos no L [385], y, por tanto, fueron los únicos pacientes que acudieron a los centros para su diagnóstico durante el confinamiento más estricto.

Además, durante este periodo los pacientes podrían haber pospuesto la visita a los centros médicos, lo que podría haber provocado síntomas más graves y complicaciones adicionales en ausencia de tratamiento [386,387]. Sin embargo, a pesar de que la actividad se recuperó casi por completo poco tiempo después de la primera ola, la

proporción siguió aumentando, siendo siempre superior al mismo mes del año previo, lo que evidencia la continua propagación durante el periodo de estudio. Además, es importante señalar los niveles preocupantes alcanzados al final de la tercera ola, con más de 40 nuevos diagnósticos y una proporción del 32,9% respecto al total de infecciones causadas por *C. trachomatis*.

El temor al COVID-19 pudo condicionar la accesibilidad de los ciudadanos a las consultas de ITS. Así, en el periodo entre las dos primeras olas la capacidad diagnóstica se fue recuperando poco a poco; sin embargo, en la segunda ola, aun con medidas más relajadas, se observa un descenso en el número de muestras analizadas y nuevos diagnósticos de LGV. Por el contrario, esta situación no se observa en la tercera ola, cuando la vacuna contra COVID-19 empieza a administrarse a la población, lo que podría generar cierto optimismo y un menor temor a la infección.

Hay que tener en cuenta que, además del impacto de la pandemia, desde finales de 2019 el CS Sandoval fue autorizado para la prescripción de la PrEP para la prevención del VIH, lo que pudo impactar en los diagnósticos de LGV como consecuencia de un aumento del cribado. Sin embargo, el aumento del cociente LGV/*C.trachomatis* confirma un aumento de los casos de LGV entre este grupo poblacional. En los años previos, el máximo cociente LGV/*C. trachomatis* alcanzó el 19,2% en el 2016, mientras que durante la última ola se alcanza un 28,4%, lo que supone un aumento del 1,7 veces respecto al periodo 2015-2019 y de 2,8 veces respecto al periodo 2010-2014.

Los resultados expuestos en este capítulo revelan la falta de control de la epidemia de LGV durante la pandemia por COVID-19. A pesar de las medidas de distanciamiento social aplicadas, los contactos sexuales se mantuvieron. Esto, junto a la limitación de acceso a los centros de diagnóstico tuvo como consecuencia la mayor dispersión de la infección, lo que se puso de manifiesto en los meses sucesivos, cuando la actividad asistencial y diagnóstica fue recuperando sus niveles normales.

Este capítulo destaca el impacto que la pandemia ha tenido en la propagación de las ITS, ejemplarizada en la dispersión de LGV en poblaciones vulnerables. Las redes sexuales son cada vez más complejas, lo que favorece el mantenimiento y dispersión de cualquier agente infeccioso de transmisión sexual [388], escenario en el que la pandemia podría haber contribuido como factor acelerador.

La situación epidemiológica expuesta en los Capítulos I y II de esta Tesis confirman el reto actual que supone para la Salud Pública las ITS y redonda en la necesidad de incrementar su diagnóstico a través de cribados activos, aconsejando adecuadamente a

los pacientes y contactos, aun siendo asintomáticos, para que se sometan a las pruebas diagnósticas, mantener la vigilancia de los casos de LGV y realizar estudios de epidemiología molecular en tiempo real.

Anexo I



The silent epidemic of lymphogranuloma venereum inside the COVID-19 pandemic in Madrid, Spain, March 2020 to February 2021

Laura Martínez-García^{1,2}, Mario Rodríguez-Domínguez^{1,2}, Clara Lejarraga³, María Concepción Rodríguez-Jiménez¹, José María González-Alba¹, Teresa Puerta³, Matilde Sánchez-Conde⁴, José Manuel Hermida⁴, Beatriz Romero-Hernández¹, Juan Carlos Galán^{1,2}

1. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain
2. Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain
3. Centro Sanitario Sandoval, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain
4. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

Correspondence: Juan Carlos Galán (juancarlos.galan@salud.madrid.org)

Citation style for this article:

Martínez-García Laura, Rodríguez-Domínguez Mario, Lejarraga Clara, Rodríguez-Jiménez María Concepción, González-Alba José María, Puerta Teresa, Sánchez-Conde Matilde, Hermida José Manuel, Romero-Hernández Beatriz, Galán Juan Carlos. The silent epidemic of lymphogranuloma venereum inside the COVID-19 pandemic in Madrid, Spain, March 2020 to February 2021. Euro Surveill. 2021;26(18):pii=2100422. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.18.2100422>

Article submitted on 17 Apr 2021 / accepted on 05 May 2021 / published on 06 May 2021

Despite social distancing measures implemented in Madrid to prevent the propagation of SARS-CoV-2, a significant increase (57.1%; 28.5 to 38.5 cases/month) in cases of lymphogranuloma venereum was detected during the COVID-19 pandemic. This unusual scenario might have accelerated a shift in *Chlamydia trachomatis* (CT) epidemiology towards a higher proportion of L genotypes compared with non-L genotypes in CT-positive samples. Our data underscore the importance of surveillance of sexually transmitted infections during the pandemic, in particular among vulnerable populations.

In 2020, in response to the emergence and global spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), different measures were undertaken in an attempt to control and stop the propagation of the infection. One of the measures widely used was strict social distancing with lockdowns [1]. Several studies have explored the impact of coronavirus disease (COVID-19)-related lockdowns on sexual practices [2,3]. The social changes reported could potentially decrease the risk of acquiring a sexually transmitted infection (STI). We aimed to address the impact of a national COVID-19-related lockdown in Spain during the pandemic waves on the diagnosis of new cases of lymphogranuloma venereum (LGV), an invasive STI caused by L genotypes of *Chlamydia trachomatis* in a large STI centre in Madrid.

National health system responses to the pandemic waves in Madrid

A nationwide lockdown started in Spain on 14 March 2020 and, after 2 weeks, was extended for an additional 98 days to 21 June. Of note, a de-escalation strategy was started on 28 April, with differences between the autonomous regions of the country. In Madrid, one of the cities most affected by the COVID-19 pandemic, limited social contact (≤ 10 people) was permitted from 24 May. During the successive pandemic waves, different control measures were adopted, but restricted social gatherings were always allowed. The time periods for the three pandemic waves were defined as follows: first wave from 10 March to 10 May 2020 (the first COVID-19 cases were diagnosed at the end of February), second wave from 22 August to 22 November 2020 and third wave from 20 December 2020 to 20 February 2021.

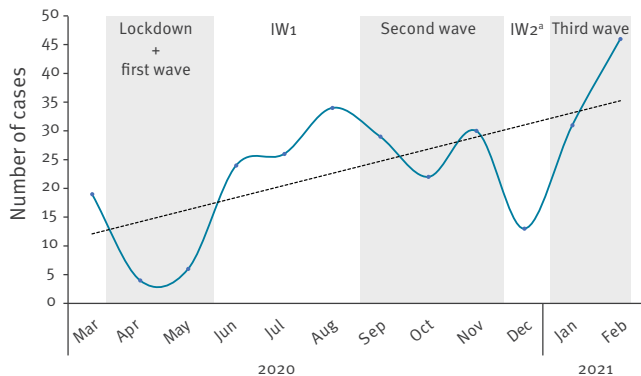
Evolution of the lymphogranuloma venereum epidemic

Our centre sees more than 25,000 patients annually, and is the only authorised centre for prescription of pre-exposure prophylaxis for HIV in Madrid, following 1,200 patients regularly. We analysed data from January 2020 to February 2021.

During the period of the pandemic from March 2020 to February 2021, a total of 284 LGV cases were diagnosed, of whom 51.1% (145/284) were HIV-infected patients and 98.9% (281/284) were men who have sex with men (MSM). An LGV case was defined in this study as a person with laboratory confirmation: among all *C. trachomatis*-positive samples, a real-time PCR

FIGURE 1

Evolution of lymphogranuloma venereum cases during the COVID-19 pandemic, Madrid, Spain, March 2020–February 2021 (n = 284)



COVID-19: coronavirus disease; IW1: interwave period 1; IW2: interwave period 2.

^a Analysis of IW2 was not performed because of a short timeframe.

Blue line: number of lymphogranuloma venereum cases; dashed line: trend line.

based on *pmpH* gene deletion was used for detection of L genotypes associated to LGV cases [4]. We tested urine, urethral, pharyngeal and rectal swabs. The majority of LGV cases were detected in rectal samples. In the first pandemic wave, coinciding with the strict lockdown, the number of cases decreased dramatically compared with the previous 2 months (24.5 cases/month to 9.7 cases/month) (Figure 1). However, the proportion of LGV cases with respect to the positive samples for *Chlamydia trachomatis* (CT) during this period (16.6%, 29/175) was higher compared with the pre-lockdown period (13.1%; 49/375; 7 January–14 March) (Figure 2). In the period between the first and second wave (June–August 2020), the number of LGV cases increased rapidly, reaching an average of 28 cases per month, with a proportion of 30.0% LGV-positive of the CT-positive samples (84/280).

During the second wave, the number of LGV cases remained high, with an average of 27 cases per month, and the LGV-positive per CT-positive proportion was 21.8% (81/371), which was slightly lower than in the interwave period. The period between the second and third pandemic wave was very short, and we were unable to quantify the impact of LGV. During the third wave, a notable increase in the number of cases was observed (38.5 cases/month), reaching 46 new diagnoses in February 2021, which was the highest number observed during the pandemic. Moreover, the percentage of LGV cases with respect to the CT-positive samples also reached one of the highest values during this month (32.9%, 46/140). Comparing the first months of the study (coinciding with the pre-lockdown

period) with the same months in 2021 (the last period of the study), the number of cases increased from 24.5 to 38.5 per month. In addition, we observed a significant increase in the percentage of LGV cases, evolving from 13.1% to 28.4% (chi-square test; $p < 0.00001$). Furthermore, it is also of note that the proportion of LGV to CT after the lockdown was always higher than in 2019 (Figure 2).

Ethical statement

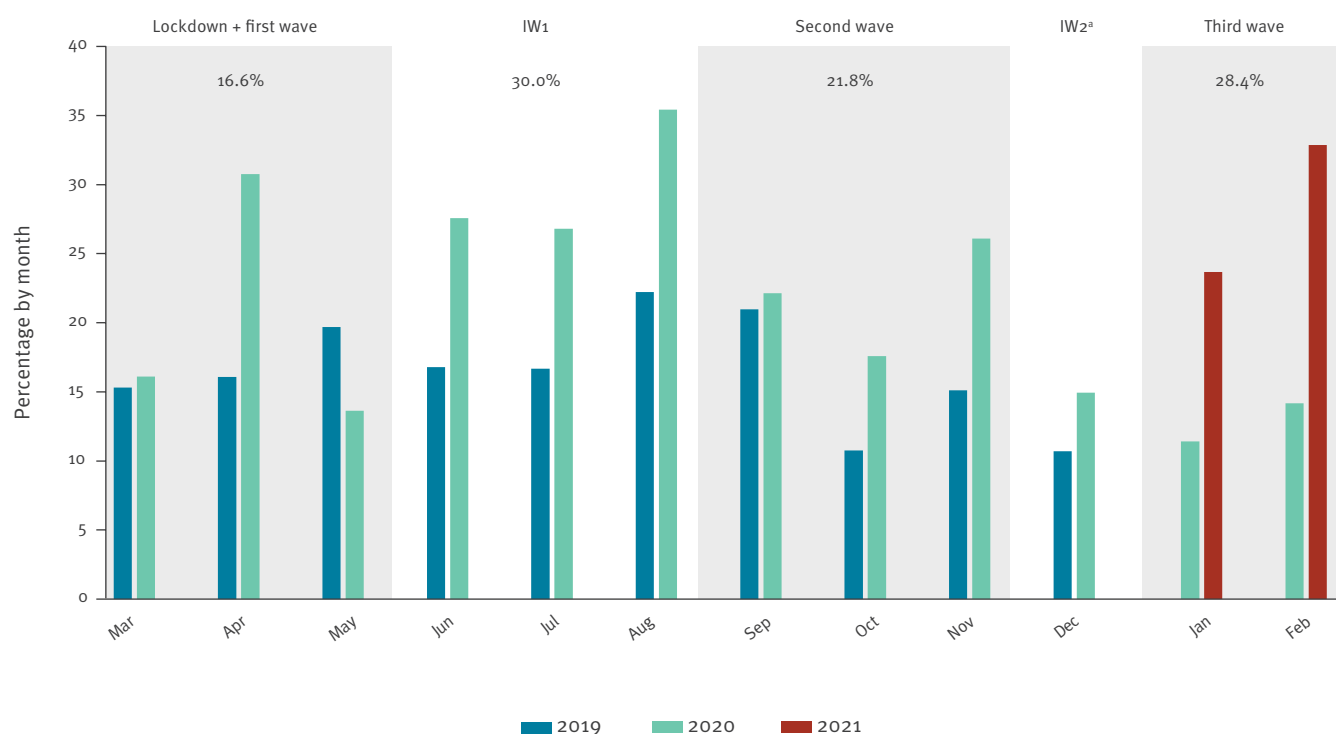
This study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) (Reference 012/17).

Discussion

The decrease in the number of LGV cases during the strict lockdown is in agreement with other studies [5]. This outcome was probably related to the Spanish government's decision to minimise all healthcare activities that were not dedicated to COVID-19 in primary care centres, such as STI clinics. As other authors have reported, this led to a reduction in the number of consultations [6] and in testing volume [7], since only patients with LGV symptoms were able to access the centres. In fact, a similar drop has been reported for a wide range of communicable diseases [5]. During this period, patients may have postponed visiting any medical centres, which may have caused more severe symptoms and additional complications in the absence of treatment [8]. This consequently provided more opportunities for transmission of CT infection, facilitating the spread of LGV. Moreover, a European study suggests that access to STI testing for vulnerable populations may have been reduced during the pandemic [7]. As expected, a reduction in the number of sexual partners [9] and sex frequency [10] has been reported; of note, an increase by 27.0% in the use of mobile sex apps during the strict lockdown was also detected [11]. These data could explain the significant increase in the number of LGV cases and the proportion with respect to the CT-positive samples following the first wave. Nonetheless, the resumption of social gatherings, including sexual activities, together with an increase in the asymptomatic screening in the reopened STI centres [6] might also have led to the subsequent increase in LGV cases after the lockdown. However, the clinical activity in our centre increased progressively and, now in 2021, has reached the same levels as in the pre-pandemic period. During the second and third waves, the measures were less strict, as in other countries [12]. In Madrid, although social contact was still limited, gatherings up to 10 people were continuously allowed, which may explain why LGV incidence remained high. However, throughout the different periods of the pandemic, a progressive increase was observed, reaching concerning levels in the final days of the third pandemic wave. The proportion of LGV of total CT during first pandemic wave was higher compared with the pre-lockdown period. This is probably because patients infected by L genotypes are more likely to have symptoms than patients infected by

FIGURE 2

Monthly percentages of lymphogranuloma venereum cases with respect to *Chlamydia trachomatis*-positive samples by year, Madrid, Spain, March 2019–February 2021 (n = 536)



IW1: interwave period 1; IW2: interwave period 2.

* Analysis of IW2 was not performed because of a short timeframe.

The percentages represent the average of each pandemic wave period.

non-L genotypes [13], and therefore are among the only patients to receive care during the strictest lockdown. Nonetheless, it is important to note that the proportion of LGV represented 32.9% of all CT infections during February 2021, highlighting that the LGV epidemic seemed to be challenging to control, continuing its spread and replacement of non-invasive CT genotypes among vulnerable populations.

Conclusion

Our data revealed that the restrictions (including lockdown) have had no impact on reducing LGV transmission. It is important to make efforts to improve LGV diagnosis and surveillance, focusing on high-risk groups, such as MSM and other populations participating in dense sexual networks both during and after the COVID-19 pandemic.

Acknowledgements

We thank Mrs. Mary Harper for English correction of the article.

Funding: This work was supported by the Carlos III Health Institute (Spain) co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF, A Way to Achieve Europe programme (PI16/01242, PI20/01397, CB06/02/0053)).

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

LMG, MRD and JCG wrote the manuscript. CL and MCRJ performed the laboratory testing. LMG, MRD, JMGA, TP, MSC, JMH, BRH and JCG participated in the data interpretation. All authors reviewed the article.

References

1. Han E, Tan MMJ, Turk E, Sridhar D, Leung GM, Shibuya K, et al. Lessons learnt from easing COVID-19 restrictions: an analysis of countries and regions in Asia Pacific and Europe. *Lancet*. 2020;396(10261):1525-34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32007-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32007-9) PMID: 32979936
2. Li G, Tang D, Song B, Wang C, Qunshan S, Xu C, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on partner relationships and sexual and reproductive health: Cross-sectional, online survey study. *J Med Internet Res*. 2020;22(8):e20961. <https://doi.org/10.2196/20961> PMID: 32716895

3. Hammoud MA, Maher L, Holt M, Degenhardt L, Jin F, Murphy D, et al. Physical distancing due to COVID-19 disrupts sexual behaviors among gay and bisexual men in Australia: Implications for trends in HIV and other sexually transmissible infections. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020;85(3):309-15. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002462> PMID: 32740374
4. Schaeffer A, Henrich B. Rapid detection of Chlamydia trachomatis and typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. *BMC Infect Dis*. 2008;8(1):56. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-56> PMID: 18447917
5. Lai C-C, Chen S-Y, Yen M-Y, Lee P-I, Ko W-C, Hsueh P-R. The impact of the coronavirus disease 2019 epidemic on notifiable infectious diseases in Taiwan: A database analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2021;40:101997. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.101997> PMID: 33640476
6. Chow EPF, Hocking JS, Ong JJ, Phillips TR, Fairley CK. Sexually transmitted infection diagnoses and access to a sexual health service before and after the national lockdown for COVID-19 in Melbourne, Australia. *Open Forum Infect Dis*. 2020;8(1):ofaa536. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa536> PMID: 33506064
7. Simões D, Stengaard AR, Combs L, Raben D, EuroTEST COVID-19 impact assessment consortium of partners. Impact of the COVID-19 pandemic on testing services for HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections in the WHO European Region, March to August 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(47):2001943. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.47.2001943> PMID: 33243354
8. Stoner BP, Cohen SE. Lymphogranuloma venereum 2015: Clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis*. 2015;61(Suppl 8):S865-73. <https://doi.org/10.1093/cid/civ756> PMID: 26602624
9. Chow EPF, Hocking JS, Ong JJ, Schmidt T, Buchanan A, Rodriguez E, et al. Changing the use of HIV pre-exposure prophylaxis among men who have sex with men during the COVID-19 pandemic in Melbourne, Australia. *Open Forum Infect Dis*. 2020;7(7):ofaa275. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa275> PMID: 32704518
10. Coombe J, Kong FYS, Bittleston H, Williams H, Tomnay J, Vaisey A, et al. Love during lockdown: findings from an online survey examining the impact of COVID-19 on the sexual health of people living in Australia. *Sex Transm Infect*. 2020;sextrans-2020-054688. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2020-054688> PMID: 33203737
11. European Society for Sexual Medicine (ESSM). Sexual relationships during the lockdown: Adjusting sex counselling and therapy to the restriction of quarantine. Belgium: ESSM. [Accessed: 7 Apr 2021]. Available from: <https://www.essm.org/adjusting-sex-therapy-to-the-restriction-of-quarantine/>
12. World Health Organization Regional Office for Europe (WHO/Europe). COVID-19 health system response monitor. Denmark: WHO/Europe. [Accessed: 7 Apr 2021]. Available from: <https://www.covid19healthsystem.org/mainpage.aspx>
13. Peuchant O, Touati A, Laurier-Nadalié C, Hénin N, Cazanave C, Bébéar C, et al. Prevalence of lymphogranuloma venereum among anorectal Chlamydia trachomatis-positive MSM using pre-exposure prophylaxis for HIV. *Sex Transm Infect*. 2020;96(8):615-7. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2019-054346> PMID: 32303577

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2021.

Capítulo III

Nueva combinación
de marcadores
moleculares para la
caracterización de la
epidemia de
linfogranuloma venéreo

*“En la vida no hay
cosas que temer,
sólo que comprender”*

Marie Curie



ANTECEDENTES

Los métodos de tipificación molecular constituyen una herramienta esencial para la vigilancia epidemiológica global e investigación de brotes, definir la estructura poblacional de un microorganismo, así como para conocer la evolución genética de las distintas especies. Estas técnicas están basadas en el estudio de los ácidos nucleicos, ofreciendo, de manera general, un mayor poder de discriminación y una mayor reproducibilidad que las técnicas fenotípicas (prácticamente en desuso). Clásicamente, estas técnicas pueden clasificarse en tres tipos [389]:

- Métodos basados en el estudio de los **perfiles de restricción del ADN**: se fundamenta en la digestión del material genético con una enzima específica y el posterior análisis de los fragmentos en geles de agarosa mediante electroforesis convencional (RFLP) o en campo pulsado (PGFE).
- Métodos basados en la **amplificación** de ácidos nucleicos: se basan en la utilización de cebadores arbitrarios (RAPD, *random amplification polymorphic DNA*) o de cebadores que hibridan de forma específica con secuencias de ADN repetitivas (rep-PCR), y posterior análisis de los productos de PCR en gel de agarosa. También se incluyen las técnicas que estudian el polimorfismo en la longitud de los fragmentos obtenidos tras digestión de los productos de PCR (PCR-RFLP).
- Métodos basados en **secuenciación** de ácidos nucleicos: estas técnicas incluyen la secuenciación de un número determinado de marcadores moleculares, como las técnicas de MLST (*multilocus sequence typing*) o MLVA (*multilocus variable-number tandem repeat analysis*), y las técnicas de secuenciación de genomas completos. Estas aproximaciones nos aportan mayor poder discriminatorio que las dos propuestas anteriores, siendo la secuenciación de genomas completos la de mayor poder de resolución y discriminación gracias a que proporciona información sobre la totalidad de los genes presentes en un microorganismo [389,390].

1. Esquemas de tipado en *C. trachomatis*

Los métodos para la caracterización de los microorganismos son una herramienta fundamental para resolver cuestiones clínicas, evolutivas y epidemiológicas. En el caso concreto de *C. trachomatis*, es necesario disponer de esquemas de tipado que nos permitan tener un conocimiento más adecuado de la epidemiología local o global. Además, estos métodos también pueden ayudar a resolver situaciones clínicas relativamente frecuentes como es la persistencia (consecuencia de un fracaso en el tratamiento) o las reinfecciones [250], así como para monitorizar la aparición de nuevas genovariantes que puedan tener implicación en las técnicas diagnósticas. El mejor ejemplo de esto último es el caso de la llamada variante sueca (nvCT), la cual presenta una deleción en el plásmido que impedía su detección mediante las técnicas comerciales disponibles en ese momento [391].

Si bien los esquemas de tipado para *C. trachomatis* se han utilizado fundamentalmente para caracterizar la diversidad bacteriana en un área determinada, debe profundizarse en el objetivo de resolver las redes formadas por individuos infectados por las mismas variantes que se transmiten por contacto sexual.

1.1. Métodos de tipificación serológicos

Desde 1960, la clasificación de *C. trachomatis* se ha basado en la caracterización de la proteína MOMP (proteína principal de membrana externa), codificada por el gen *ompA* (anteriormente *omp1*). Esta proteína representa el 60% del peso total de las proteínas de membrana externa [392], con un peso molecular de 40-45 kDa, y cuyas funciones principales son la de actuar como adhesina y porina [393]. Además, constituye una de las proteínas con mayor capacidad inmunogénica, y, por tanto, sometida a una elevada presión de selección y alta variabilidad [394]. La proteína MOMP consta de 4 dominios variables (VD I-IV) flanqueados por 5 dominios constantes (CD I-V) altamente conservados. Estudios inmunológicos basados en la proteína MOMP supusieron la base para la identificación de los distintos serotipos o serovares de *C. trachomatis* [395,396], estableciéndose un total de 18 serovares (A, B/Ba, C, D/Da, E, F, G/Ga, H, I/Ia, J, K, L1, L2 y L3), y siendo las diferencias antigénicas presentes en los dominios variables las principales responsables de la diferenciación de los mismos. Además, en base a la relación serológica, los serovares se dividieron en tres serogrupos: serogrupo B (serovares B/Ba, D/Da, E, L1 y L2), serogrupo C (serovares A, C, H, I/Ia y J) y serogrupo intermedio (serovares F, G/Ga, K y L3) [397].

En un primer momento, el serotipado se realizaba con técnicas de microinmunofluorescencia utilizando sueros polivalentes [398,399]. Más adelante se comenzaron a utilizar anticuerpos monoclonales [400]. Sin embargo, estos métodos requieren el cultivo celular de la bacteria, convirtiéndolos en técnicas difíciles de implementar y, además, con bajo poder discriminatorio (Tabla 4).

1.2. Métodos de tipificación molecular

1.2.1. Tipificación molecular basada en *ompA*

Con la llegada de la era genómica, la secuenciación del gen *ompA* permitió establecer los genotipos de *C. trachomatis* en base a las diferencias nucleotídicas de este gen, siguiendo la misma nomenclatura establecida por los métodos serológicos. El gen *ompA* es un gen cromosómico con un tamaño de 1,2 kb, cuya secuencia se divide, paralelamente a lo descrito para la proteína MOMP, en 4 segmentos variables (VSI-IV) y 5 segmentos constantes (CSI-V), siendo los segmentos variables VSI y VSII los que ofrecen mayor poder de discriminación [401,402]. Alternativamente a la secuenciación, se desarrollaron diversas técnicas para la tipificación molecular de *C. trachomatis* basadas en la amplificación de este gen, como PCR-RFLP, hibridación, o el análisis de curvas de *melting*. Actualmente la mayoría de estas técnicas están en desuso.

1.2.1.1. PCR-RFLP

Estas técnicas consisten en la amplificación del gen *ompA* seguido de la digestión con un enzima de restricción. Posteriormente, los fragmentos obtenidos tras la digestión se separan mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, obteniéndose un patrón de bandas característico para cada genotipo (Figura 45A). Este método ha sido ampliamente utilizado, habiendo demostrado ser una técnica sencilla; sin embargo, su poder de discriminación es limitado. Por otra parte, la necesidad de utilizar diferentes tipos de enzimas de restricción o la necesidad de dobles digestiones para algunos genotipos dificulta un abordaje rápido y eficaz [403,404].

1.2.1.2. Métodos de hibridación

Estos métodos consisten fundamentalmente en dos pasos: 1) amplificación de las regiones variables VSI-VSII o sólo VSII del gen *ompA*, 2) posterior hibridación reversa mediante el uso de sondas específicas para cada genotipo (Figura 45B). Estas técnicas, a pesar de que permiten la detección de infecciones mixtas [405], son metodológicamente laboriosas.

1.2.1.3. Análisis de curvas de *melting*

Este método se basa en la amplificación de la región variable VSII del gen *ompA* mediante PCR a tiempo real utilizando un agente intercalante del ADN. Seguidamente, la obtención de las curvas de *melting* tiene lugar gracias a la fusión (o *melting*) del producto amplificado mediante una rampa de temperaturas desde 72°C a 95°C [406] (Figura 45C). Sin embargo, no tiene un buen poder de resolución, ya que el análisis crudo de las curvas no permite diferenciar todos los genotipos y pequeñas diferencias en la secuencia nucleotídica del gen *ompA* pueden dar lugar a perfiles de *melting* muy similares. Años después, se propuso el uso de esta misma técnica, pero incluyendo la amplificación de dos fragmentos, *ompA*, y un gen que codifica para una proteína hipotética de membrana, dando lugar al método conocido como CtGEM (*Chlamydia trachomatis genotyping by melting*), de mayor resolución [407].

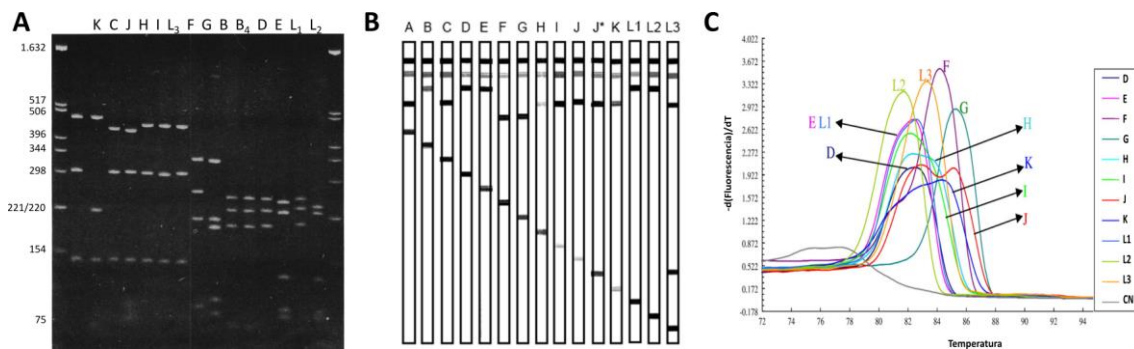


Figura 45. Métodos moleculares basados en *ompA* para la identificación y genotipado de *C. trachomatis*. **A)** PCR-RFLP [408], **B)** Hibridación [409] y **C)** Curvas de *melting* [410].

Los métodos basados en el gen *ompA* tienen una importante limitación, y es que, tal y como se evidenciaba mediante el serotipado basado en la proteína MOMP, los distintos genotipos asignados en función de la secuencia nucleotídica del gen *ompA* no se correlacionan adecuadamente con el tropismo tisular de los tres principales patotipos: ocular, genital e invasivo (Figura 46).

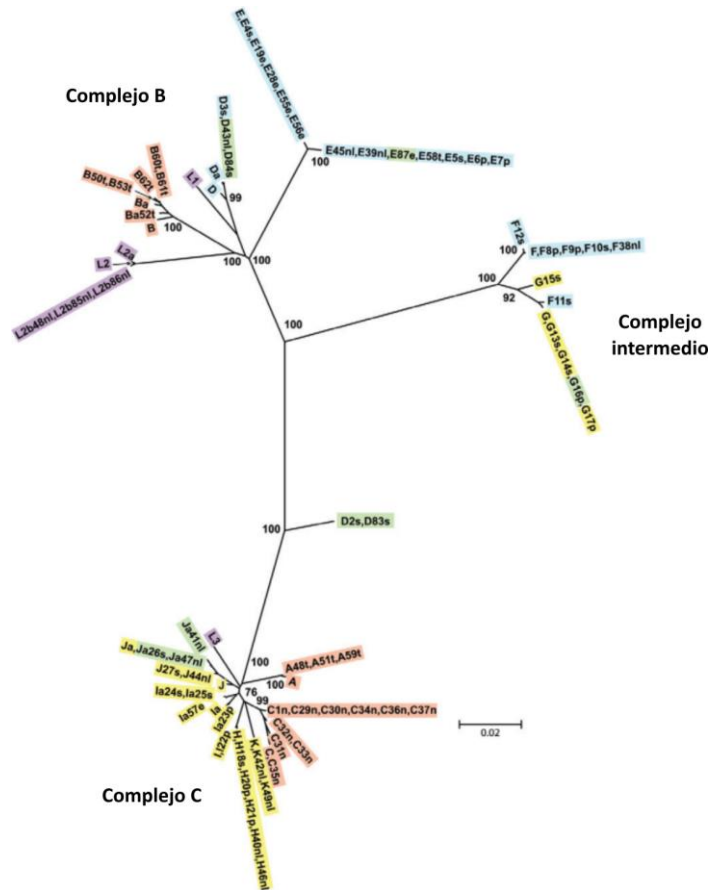


Figura 46. Árbol filogenético de mínima evolución basado en la diversidad del gen *ompA*. En naranja, los genotipos asociados a tracoma; en amarillo y azul, los relacionados con la infección urogenital no invasiva; en lila, los genotipos asociados a linfogranuloma venéreo [411].

1.2.2. Tipificación molecular basada en los genes *pmpH* y *ompA*

Debido a las limitaciones de *ompA*, se llevó a cabo la búsqueda de otros genes que permitieran establecer un paralelismo entre genotipo y tropismo tisular, siendo las proteínas polimórficas de membrana (PMP) unas las seleccionadas por mostrar esta capacidad [412,413]. Las PMP en *C. trachomatis*, codificadas por los genes *pmpA-pmpI*, forman un grupo de 9 proteínas localizadas en la membrana externa, cuyo papel fundamental es la adhesión, pero también actúan como proteínas autotransportadoras [414] y tienen capacidad inmunogénica. Su secuencia nucleotídica es altamente diversa, de modo que ninguno de los genes *pmp* se parece más de un 52% a otro [415]. Las reconstrucciones filogenéticas mostraron que 6 de los 9 genes *pmp* se agrupaban en función del tropismo tisular. Esto fue especialmente evidente para *pmpF* y *pmpH* y, en menor medida, para *pmpB*, *pmpC*, *pmpG* y *pmpI* (Figura 47).

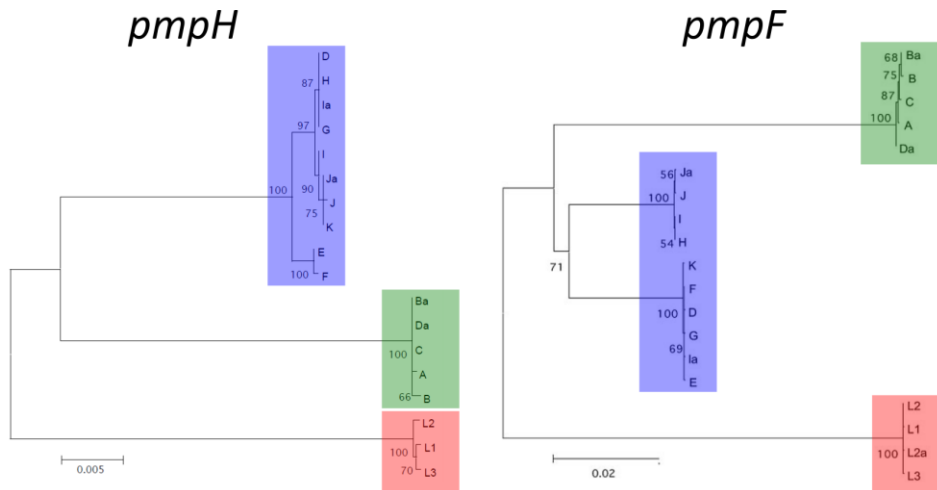


Figura 47. Reconstrucción filogenética de la secuencia nucleotídica de los genes *pmpH* y *pmpF*. En verde, se identifican los genotipos asociados a tracoma; en azul, los genotipos relacionados con la infección urogenital no-invasiva, y en rojo se identifican los genotipos asociados a la infección urogenital invasiva (LGV). Adaptado de Gomes y cols., 2006 [412].

Diversos estudios han demostrado la capacidad de estos genes para agrupar los distintos genotipos en función de sus características patogénicas, siendo el gen *pmpH* uno de los mejores candidatos, ya que presenta suficiente divergencia entre patotipos, pero con pocas diferencias entre los miembros de un mismo grupo [416]. Además, *pmpH* permite diferenciar L2 de L1-L3, lo cual no ocurre utilizando *pmpF* (Figura 47).

Por estas razones, clásicamente la estrategia más utilizada para el genotipado de *C. trachomatis* ha sido la realización de una primera PCR específica dirigida al gen *pmpH* que discrimine los patotipos principales [417], seguido de la caracterización del gen *ompA* para establecer las posibles relaciones entre los miembros de un mismo genotipo [418]. La presencia de una delección específica de 36 pb exclusiva de los miembros del genotipo L ha permitido su uso como diana en técnicas diagnósticas. Para el gen *ompA*, se ha propuesto el uso de PCR anidadas para mejorar la sensibilidad, ya que sólo existe una copia del gen y la carga bacteriana en las muestras suele ser baja [419].

1.2.3. Tipificación molecular de alta resolución

Si bien la combinación de *pmpH* y *ompA* han resultado de gran utilidad para la correcta asignación de genotipos, posiblemente sea una estrategia con poco poder de discriminación para estudios precisos de epidemiología molecular [420]. Por ello, se han desarrollado diversos métodos basados en varios segmentos del genoma que nos ofrecen un mayor poder de resolución epidemiológica.

1.2.3.1. *Multilocus sequence typing (MLST)*

El MLST es un método muy utilizado en el tipado molecular de los microorganismos; éste se basa en la amplificación y secuenciación de varios fragmentos génicos (o alelos), con un tamaño entre 300 y 500 pb. Así, la secuencia obtenida de cada fragmento es asignada a un número dando lugar a una combinación o perfil específico denominado secuenciotipo (ST). Estos esquemas permiten la comparación entre laboratorios, proporcionando una buena discriminación y precisión. En el caso de *C. trachomatis*, se han propuestos tres esquemas MLST, dos de ellos basados en genes *housekeeping* o genes altamente conservados [411,421] y uno basado en regiones hipervariables [422].

a) *Esquemas basados en genes housekeeping*

El primer esquema MLST fue propuesto por Pannekoek y cols., basándose en 7 genes *housekeeping* del orden Chlamydiales, y válido tanto para *C. trachomatis* como para *C. pneumoniae* [421]. Los genes que incluye este esquema son: *gatA* (subunidad A de la asparti/glutamil amidotransferasa), *oppA-3* (proteína de unión a oligopéptidos), *hflX* (proteína de unión a GTP), *gidA* (tRNA-uracil-5-metiltransferasa), *enoA* (enolasa), *hemN* (coproporfirinógeno III oxidasa) y *fumC* (fumarato hidratasa). Sin embargo, la variación observada en estos genes fue limitada, siendo 4 el número máximo de cambios no sinónimos observados (en *fumC*). El análisis filogenético del concatenado de los genes permitió agrupar las cepas en tres complejos clonales, pero no relacionados con los tres patotipos (Figura 48A).

Un año después, Dean y cols. propusieron un segundo esquema MLST, en el que los genes seleccionados fueron de nuevo 7: *glyA* (serina hidroximetil transferasa), *mdhC* (malato deshidrogenasa), *pdhA* (piruvato deshidrogenasa), *yhbG* (proteína de unión al ATP del transportador ABC), *pykF* (piruvato quinasa), *lysS* (lisil-ARNt sintetasa) y *leuS* (leucil-ARNt sintetasa) [411]. Estos genes, la mayoría de ellos codificantes de enzimas metabólicas esenciales, estaban localizados en regiones cromosómicas alejadas entre sí, lo que hacía improbable que un evento de recombinación introdujera más de un gen seleccionado. El análisis del concatenado de estos genes también permitió la diferenciación de tres complejos clonales, esta vez relacionados con los tres patotipos (Figura 48B).

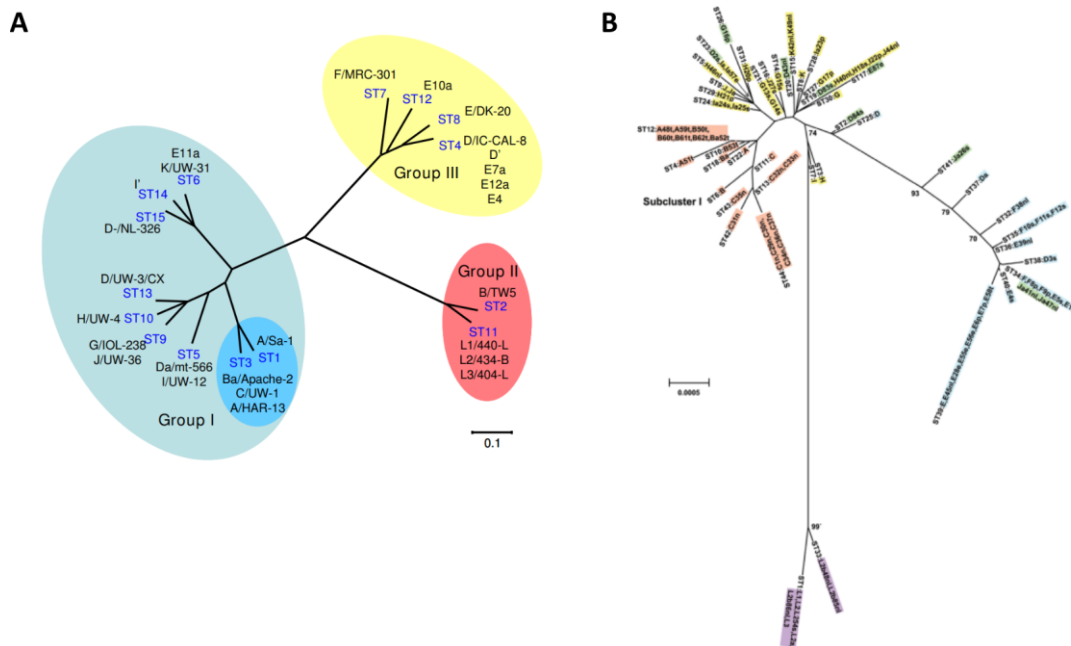


Figura 48. Reconstrucción filogenética de los fragmentos génicos utilizados en los esquemas MLST basados en los genes *housekeeping* de *C. trachomatis*. **A)** Esquema propuesto por Pannekoek y cols. [421]. **B)** Esquema propuesto por Dean y cols. [411].

b) Esquemas basados en genes hipervariables

El esquema MLST propuesto por Klint y cols. fue el primer esquema que propuso la utilización de zonas altamente polimórficas en lugar de genes altamente conservados, con el objetivo de aumentar la resolución. Este esquema fue diseñado utilizando 16 secuencias de referencia [422], seleccionándose un total de 5 fragmentos genéticos: CT046 (gen *hctB*, que codifica para una proteína de unión al ADN), CT058 (proteína hipotética), CT144 (proteína hipotética), CT172 (proteína hipotética) y CT682 (gen *pbpB*, que codifica para la proteína de unión a la penicilina). A pesar de que el nivel de polimorfismos detectados en estos genes fue inferior al de *ompA* (excepto para *pbpB*), el uso de la combinación ha demostrado tener un mayor poder discriminatorio que *ompA*, proporcionando una buena herramienta para los estudios epidemiológicos de *C. trachomatis*.

1.2.3.2. Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)

Este método consiste en el análisis del número de repeticiones en tándem presentes en múltiples loci denominados VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*). Esto da lugar a distintas longitudes en ese fragmento, lo que proporciona diferencias entre las cepas. Estas repeticiones se generan normalmente por errores durante la replicación del ADN [423]. Para realizar esta técnica normalmente se realiza un primer paso de amplificación

del fragmento en cuestión, seguido de una electroforesis capilar que ayuda a determinar el tamaño del amplicón o bien, más frecuentemente, seguido de secuenciación [424].

En el caso de *C. trachomatis*, se ha propuesto un esquema MLVA dirigido frente a tres regiones VNTR: CT1291, CT1299 y CT1335 [425], para su uso en combinación con el gen *ompA*. Este esquema ha demostrado tener un alto poder discriminatorio en comparación con la secuenciación del gen *ompA* [426].

Estudios comparativos entre los distintos esquemas propuestos para *C. trachomatis* han demostrado que este esquema, junto con el esquema MLST basado en genes hipervariables, son los que proporcionan un mayor poder de discriminación [426] (Tabla 4). También han surgido modificaciones del esquema MLST de Klint y cols. y del esquema MLVA-*ompA*, así como la combinación de ambos, con mayores poderes de discriminación [427].

Tabla 4. Resumen de las características de los principales esquemas para el tipado de *C. trachomatis*.

	NÚMERO DE LOCI	PODER DE DISCRIMINACIÓN (D)
Serotipado	-	0,5
Secuenciación de <i>ompA</i>	1	0,82
MLST (genes <i>housekeeping</i>)	7	0,81
MLST (genes hipervariables)	5	0,95
MLVA-<i>ompA</i>	4	0,97
MLST + MLVA	8	0,99

2. Secuenciación de genomas completos en *C. trachomatis*

En los últimos años, el desarrollo de las técnicas de secuenciación ha permitido que la obtención de las secuencias de genoma completo sea cada vez más accesible, favoreciendo su aplicación para casi cualquier especie microbiana [390]. Hasta hace relativamente poco, la secuenciación de genomas completos en *C. trachomatis* requería el cultivo previo para conseguir grandes cantidades de material genético, técnica laboriosa que requiere tiempo y consumo de recursos. Estas dificultades hacen que el número de secuencias disponibles en bases de datos públicas sea muy inferior al de otras especies, para las cuales ese número ha aumentado extraordinariamente en los últimos años (Figura 49).

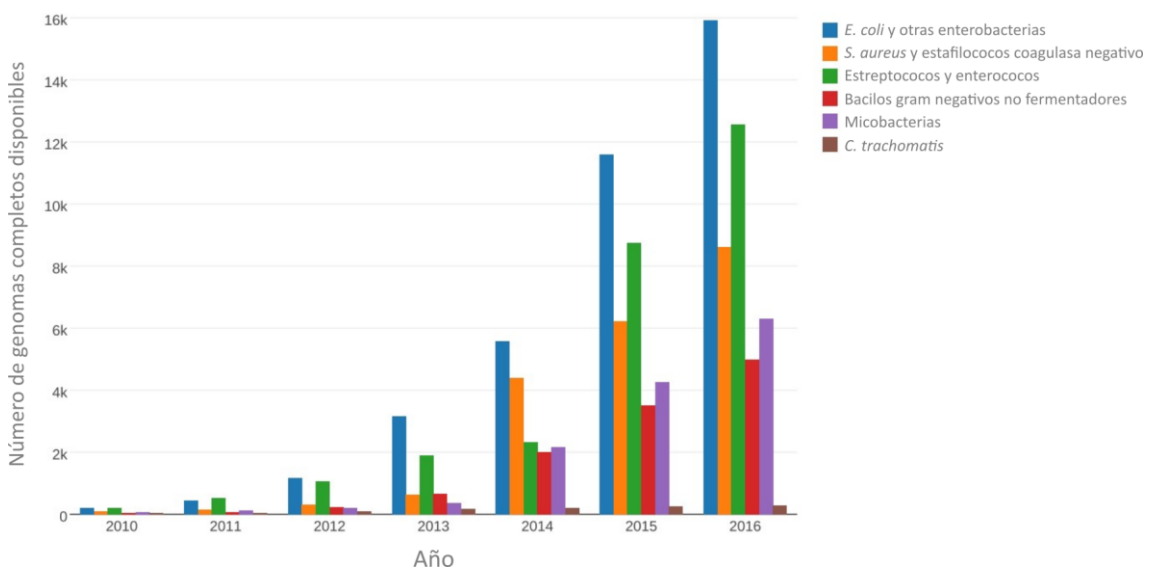


Figura 49. Número de genomas completos disponibles en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology*) por año [428].

Por ello, se han propuesto diversos métodos independientes de cultivo que permiten la secuenciación directamente a partir de la muestra [429]. Estos métodos se dividen en métodos no dirigidos y dirigidos. Los primeros incluyen la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) y métodos de agotamiento-enriquecimiento, basados en la separación del ADN metilado del no metilado. En los métodos dirigidos se incluyen la separación inmunomagnética-MDA, captura de secuencias mediante tecnología SureSelect^{XT} (Agilent Technologies) y PCR multiplex en microgotas.

Los métodos basados en captura de secuencias son uno de los más utilizados. Éstos son capaces de aumentar hasta un 91% el número de secuencias obtenidas que pueden ser “mapeadas” contra el genoma de referencia [430]. Sin embargo, el rendimiento es

variable según los estudios. Por ejemplo, en el estudio realizado por Bowden y cols. se logró secuenciar el 100% de las muestras [431]; Christiansen y cols. secuenciaron de forma óptima el 80% de las muestras de orinas y exudados vaginales [430]. Sin embargo, Borges y cols. únicamente lograron secuenciar 15/25 muestras rectales (60%) [432]. En un estudio reciente en el que participaron varios países europeos y Australia, se logró secuenciar de forma adecuada solamente 95 de 321 muestras (29,6%), ya que el resto no cumplía los requisitos necesarios para aplicar la técnica [166]. Estos datos ponen de manifiesto que, a pesar de la disponibilidad de los métodos independientes de cultivo, éstos no son aún eficientes para llevar a cabo de forma óptima la secuenciación de *C. trachomatis* a partir de muestra directa.

3. Aplicación de los esquemas de tipado molecular a la epidemiología de los genotipos L

La secuenciación del gen *ompA* ha sido la técnica más utilizada para el genotipado de *C. trachomatis*, incluyendo a los genotipos L. La secuenciación de este gen en las primeras cepas obtenidas del brote iniciado en Países Bajos reveló que dicha variante presentaba un cambio aminoacídico en la posición 162 (N162S) respecto al genotipo L2, genovariante a la que denominaron L2b. A partir de ese momento, estudios epidemiológicos basados en *ompA* revelaron que la dispersión de la epidemia estaba asociada fundamentalmente a la cocirculación de dos genovariantes: L2b y L2 [228]. Sin embargo, el poder de discriminación de *ompA* es limitada, encontrándose demasiada homogeneidad entre las cepas de LGV. Además, la secuenciación parcial de *ompA* podría impedir la detección de variantes recombinantes más virulentas, como la variante recombinante L2c (recombinante entre los genotipos L2 y D, y cuyo gen *ompA* es idéntico al de L2) [164].

Las técnicas MLST disponibles para *Chlamydia* han demostrado resultados variables para los genotipos L. El MLST diseñado para el orden Chlamydiales no es capaz de diferenciar ningún genotipo L, englobando a L1, L2 y L3 en un único ST (Figura 48A). El MLST propuesto por Dean y cols., también basado en genes *housekeeping*, sólo es capaz de discriminar L2b del resto de genotipos L (Figura 48B). El esquema más ampliamente utilizado ha sido sin duda el esquema MLST basado en genes hipervariables [422], aunque con resolución también limitada en los genotipos L. En un estudio realizado en Europa y Estados Unidos, todas las cepas compartían idéntico ST a pesar de las diferencias geográficas [433]. Lo mismo fue descrito en Suecia, en el que todas las cepas de LGV pertenecían al ST58 [434]. El esquema MLVA-*ompA* propuesto por Pedersen y cols. también se ha aplicado al estudio de la epidemiología molecular de LGV. Uno de

los estudios más amplios ha sido realizado en Reino Unido, en el que se caracterizaron un total de 162 genotipos L, detectándose un total de 6 genotipos MLVA-*ompA* [254]. La baja diversidad observada mediante la aplicación de estos métodos puede deberse al bajo grado de diversidad genética en *C. trachomatis*, con más de un 98% de identidad de secuencia entre los distintos genotipos [435], siendo todavía menor en los genotipos L [436].

La secuenciación de genomas completos supone la técnica definitiva como herramienta epidemiológica. Además, nos proporciona información sobre posibles eventos de recombinación y mutación, lo que nos ayuda a conocer la evolución de los genotipos L. Uno de los hallazgos más importantes gracias a los estudios de secuenciación de genomas completos es que los genotipos L causantes de la epidemia actual comparten el mismo “esqueleto molecular”, correspondiente a la genovariante L2b [166], lo cual pone de manifiesto el éxito y la expansión de este linaje. Sin embargo, la viabilidad de implementar estas técnicas de manera generalizada no es asumible hoy en día por su baja eficiencia, la tecnología requerida y los requerimientos económicos. Por ello, es necesario implementar nuevas estrategias específicas para conocer con mejor precisión la epidemiología molecular de LGV.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La aplicación limitada de los esquemas MLST para la caracterización de la diversidad de genovariantes de los genotipos L, junto con las dificultades metodológicas observadas en la implementación de las técnicas de secuenciación masiva, hacen necesario la disponibilidad de esquemas de tipado específicos para los genotipos L. Además, dada la baja diversidad observada, se requieren esquemas que prioricen la selección de genes altamente polimórficos que nos ofrezcan un mayor grado de resolución.

Los **objetivos** de este capítulo fueron:

1. Identificar una nueva combinación de marcadores moleculares basados en la variabilidad genética de los genotipos L.
2. Inferir mediante análisis *in silico* el poder de discriminación del nuevo esquema y el de las estrategias ya disponibles para la caracterización molecular de los genotipos L de *C. trachomatis*.
3. Comparar el poder de discriminación del nuevo esquema propuesto con el esquema de tipado que mejores resultados rinda *a priori* del análisis anterior mediante la utilización de muestras previamente identificadas como genotipos L.
4. Aplicar el nuevo esquema para mejorar nuestro conocimiento de la actual epidemia de LGV en Madrid mediante un análisis espacial y temporal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Conjunto de datos y análisis de diversidad

En primer lugar, se descargaron todas las secuencias de genoma completo de los genotipos L de *C. trachomatis* disponibles en la base de datos pública del NCBI (n=29) (ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genbank/bacteria/?/latest_assembly_versions).

El listado de los genomas utilizados se detalla en la Tabla 5. La última actualización del conjunto de datos fue en enero de 2019.

Tabla 5. Listado de cepas utilizadas para el análisis de diversidad (n=29).

NOMBRE	NÚMERO DE ACCESO
L2b/UCH-1/proctitis	NC_010280
434/Bu	NC_010287
L2c	NC_015744
L1/115	NC_020929
L2/25667R	NC_020930
L2b/UCH-2	NC_020931
L2b/Ams1	NC_020933
L2b/Ams2	NC_020934
L2b/Canada1	NC_020935
L2b/Ams5	NC_020936
L1/440/LN	NC_020937
L2b/795	NC_020938
L2b/8200/07	NC_020945
L1/224	NC_020973
L3/404/LN	NC_020974
L2b/LST	NC_020975
L2b/CV204	NC_020976
L2b/Ams3	NC_020977
L2b/Ams4	NC_020978
L2/434/Bu(i)	NC_021050
L2/434/Bu(f)	NC_021052
L2tet1	NZ_ACUI01000001
L2b/CS19/08	NZ_CP009923
L2b/CS784/08	NZ_CP009925
434Bu isolate cdu1::Tn chromosome	NZ_CP019385
434Bu isolate Hefty_Parental chromosome	NZ_CP019386
434Bu isolate 383/384 IGR::Tn chromosome	NZ_CP019387
LGV913	NZ_CVNC01000001
LGV1339	NZ_CVND01000001

Con la herramienta de búsqueda de alineación básica local (BLAST) disponible en el NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se encontraron un total de 878 genes utilizando la secuencia L2b/UCH-1/proctitis (NC_010280) como referencia. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el software MAFFT [437], permitiendo eliminar todas aquellas posiciones que contenían gaps o no tenían datos de secuenciación. A continuación, se estimó para cada uno de los genes la diversidad evolutiva media (índice D), definida como el número de sustituciones nucleotídicas por sitio a partir del promedio de la población, para lo que se utilizó el modelo de Tamura-Nei [438]. Los análisis evolutivos se realizaron utilizando el software MEGA 7.0 [257]. Para los genes con mayor diversidad entre los genotipos L, se repitió el mismo análisis, pero en este caso utilizando solamente las secuencias del linaje L2b, por ser el único con más de dos secuencias disponibles. Aquellos genes con mayor índice D fueron seleccionados para el nuevo esquema.

Posteriormente se realizó el mismo análisis *in silico* para los genes utilizados en los esquemas de tipado previamente descritos para *C. trachomatis*: dos esquemas MLST, correspondientes a Klint y cols. y Dean y cols. [411,422], y el esquema MLVA-*ompA* de Pedersen y cols. [425], con el objetivo de inferir el poder de discriminación de estos esquemas para los genotipos L de *C. trachomatis*. Por tanto, se estimó el índice D para los genes *glyA*, *mdhC*, *pdhA*, *yhbG*, *pykF*, *lysS* y *leuS*, correspondientes a los genes del esquema de Dean y cols., así como para las regiones hipervariables CT046 (*hctB*), CT058, CT144, CT172 y CT682 (*pbpB*) del esquema de Klint y cols., y se evaluó la diversidad en el número de las repeticiones en tándem de las regiones CT1291, CT1299 y CT1335 junto con la de *ompA*, correspondientes al esquema MLVA-*ompA* de Pedersen y cols.

2. Selección de muestras

Una vez definidos los genes para el nuevo esquema, se seleccionaron 68 muestras clínicas de forma aleatoria en las que previamente se habían detectado genotipos L. Esas muestras fueron obtenidas entre julio de 2017 y septiembre de 2018 procedentes de 68 pacientes atendidos en el Hospital Universitario Ramón y Cajal y el CS Sandoval. La detección de los genotipos L se realizó mediante qPCR basada en la delección de 36 pb del gen *pmpH* presente exclusivamente en los genotipos L, seguido de una posterior secuenciación de dicho gen, tal y como se describe en el Capítulo I de esta Tesis. Según la localización, 59/68 (86,8%) correspondieron a exudados rectales, 7/68 (10,3%) fueron úlceras, 1 procedente de la punción de una adenopatía y 1 correspondiente a un exudado endocervical.

3. Amplificación y secuenciación de los genes a estudio

Inicialmente se realizó la extracción del material genético de todas las muestras utilizando la plataforma NucliSENS® EasyMag® (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France), tal y como se ha descrito en el Capítulo I.

En una primera ronda, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de los genes seleccionados para el esquema propuesto en este capítulo (CTLon_0054, CTLon_0087, CTLon_0243 y CTLon_0301) junto a los genes correspondientes al esquema MLST propuesto por Klint y cols. en 28 de las 68 muestras seleccionadas, con el objetivo de comparar el poder de discriminación entre ambas estrategias. En una segunda ronda, solamente se amplificaron y secuenciaron los genes seleccionados en las 40 muestras restantes. Además, se amplificó/secuenció un fragmento de 990 pb del gen *ompA* en todas las muestras, utilizando los cebadores y condiciones descritas en el Capítulo I (Tabla 1). Los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes seleccionados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones y cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes seleccionados en este capítulo.

Región	Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tª hibridación (°C)	Tiempo elongación	Tamaño amplicón (pb)
CTLon_0054	CTLon_0054_F	ATGCTTCATCTATGTGATGT	54	1 min	768
	CTLon_0054_R	TTACTCCTGGGTAACGACAT			
CTLon_0087	CTLon_0087_F	GCTTTATGGAGTGAGTACACT	58	1 min	574
	CTLon_0087_R	CCTGAAGAAATGAAGAGTGCT			
CTLon_0243	CTLon_0243_F	TCGAAACCAGTTCTTATCTCT	57	1 min 15 seg	1.020
	CTLon_0243_R	GAGATCATTCAAAGCGTCTGT			
CTLon_0301	CTLon_0301_F	TGGAACCCTAATAAAGTAGT	54	1 min 30 seg	1600
	CTLon_0301_R	TTGCCTTAGTAATTTCTCCT			

La amplificación de los genes seleccionados se realizó mediante PCR convencional en un volumen final de 50 µl utilizando las siguientes concentraciones finales de los reactivos: tampón de reacción (10x), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2mM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP), cebadores directo y reverso (0,6mM cada uno) y la enzima AmpliTaq Gold ADN polimerasa (1,5U). Se utilizaron 5 µl de ADN molde en todas las PCR. Las condiciones

empleadas fueron las siguientes: 1 ciclo de activación a 94°C, 12 min, seguido de 40 ciclos de 94°C, 1 min, hibridación durante 1 min (las temperaturas de hibridación para cada PCR se muestran en la Tabla 6), elongación a 72°C (los tiempos para cada gen se muestran en la Tabla 6) y, por último, una elongación final de 72°C, 10 minutos.

La amplificación de los fragmentos CT046 (*hctB*), CT058, CT144, CT172 y CT682 (*pbpB*) se llevó a cabo mediante PCR convencional siguiendo el esquema desarrollado por Klint y cols. [422] (Tabla 7). Las mezclas de reacción contenían 1,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,4 µM de cada cebador y 0,5U de la enzima AmpliTaq Gold ADN polimerasa, en un volumen final de 25 µl, utilizándose 5 µl de ADN molde para todas las PCR. Los programas de temperaturas fueron iguales para todas las regiones: desnaturalización inicial durante 12 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización durante 45 segundos a 94°C, hibridación durante 45 segundos a 60°C y elongación durante 90 segundos a 72°C. La amplificación finalizó con una elongación durante 10 minutos a 72°C.

Tabla 7. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes del esquema MLST basado en genes hipervariables [422].

Región	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
CT046 (<i>hctB</i>)	Hctb39F	CTCGAAGACAATCCAGTAGCAT	686-904
	Hctb794R	CACCAGAAGCAGCTACACGT	
CT058	CT222F	CTTTTCTGAGGCTGAGTATGATT	1.499
	CT1678R	CCGATTCTTACTGGGAGGGT	
CT144	CT144:248F	ATGATTAACGTGATTTGGTTTCCTT	799
	CT144:1046R	GCGCACCAAAACATAGGTACT	
CT172	Four268F	CCGTAGTAATGGGTGAGGGA	378-685
	Four610R	CGTCATTGCTTGCTCGGCTT	
CT682 (<i>pbpB</i>)	pbpB1F	TATATGAAAAGAAAACGACGCACC	2.377
	pbpB2366R	TGGTCAGAAAGATGCTGCACA	

La visualización de los productos de PCR, la purificación enzimática y la secuenciación se realizó siguiendo lo descrito en el apartado 4 de la sección Material y métodos del Capítulo I.

3.1. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas de los genes secuenciados en el apartado anterior se analizaron y ensamblaron utilizando los softwares Chromas 2.6.6 (Technelysium, Queensland, Australia) y Vector NTI Advance (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia), respectivamente. Para descartar posibles errores de secuenciación, las secuencias se alinearon y editaron junto a las secuencias de referencia disponibles en la base de datos pública de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA 7.0 [257], eliminándose también las mutaciones presentes en los extremos.

3.2. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Las secuencias de cada uno de los genes hipervariables del esquema MLST de Klint y cols. obtenidas para cada genotipo L se introdujeron en la base de datos de MLST de Chlamydiales (<https://pubmlst.org/organisms/chlamydiales-spp>) y se compararon con los alelos ya descritos. Se obtuvo un alelo (denominado con un número) para cada uno de los 5 fragmentos cuya combinación generó un perfil alélico al que se le asignó una secuencia tipo (ST).

3.3. Análisis filogenético

Para realizar el análisis filogenético, en primer lugar, se obtuvo la secuencia concatenada de todos los genes para cada uno de los esquemas evaluados. El tamaño del fragmento obtenido del concatenado de CTLon_0054, CTLon_0087, CTLon_0243, CTLon_0301 y *ompA* fue 4.042 pb, mientras que el tamaño del fragmento compuesto por los genes CT046 (*hctB*), CT058, CT144, CT172 y CT682 (*pbpB*) fue 2.682 pb. Posteriormente, las secuencias concatenadas para cada una de las muestras se alinearon mediante el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA 7.0 [257]. El modelo de sustitución nucleotídica para cada gen se seleccionó utilizando el software jModelTest [258]. A continuación, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud tanto para los concatenados de los fragmentos de cada uno de los esquemas como para las secuencias de genoma completo obtenidas del NCBI mediante el software PhyML 3.0 y basándose en el modelo GTR+G+I (“General Time Reversible” + distribución gamma + proporción de tasas invariables). Para el cálculo del soporte de cada rama se empleó la prueba estadística aLRT (*approximate likelihood ratio test*) basado en el procedimiento de Shimodaira-Hasegawa [439]. Los valores superiores al 90% fueron considerados estadísticamente significativos.

Utilizando el concatenado de los genes propuestos para el nuevo esquema se construyeron redes de transmisión mediante el software Network v4.6.1.0 (www.fluxus-technology.com) [260], basándose en el método de máxima parsimonia y asumiendo la cepa L2b reportada en Países Bajos en el año 2003 como el origen de la epidemia. Este software nos permitió conectar cada secuencia concatenada con su secuencia más relacionada. El método de máxima parsimonia considera los nodos internos como secuencias sin muestrear o genotipos ancestrales extinguidos.

RESULTADOS

1. Análisis de diversidad y selección de los genes para el nuevo esquema

El análisis de diversidad inicial realizado con las secuencias de genoma completo de los genotipos L disponibles en las bases de datos públicas permitió identificar los genes con mayor índice D y por tanto con mayor variabilidad (Figura 50).

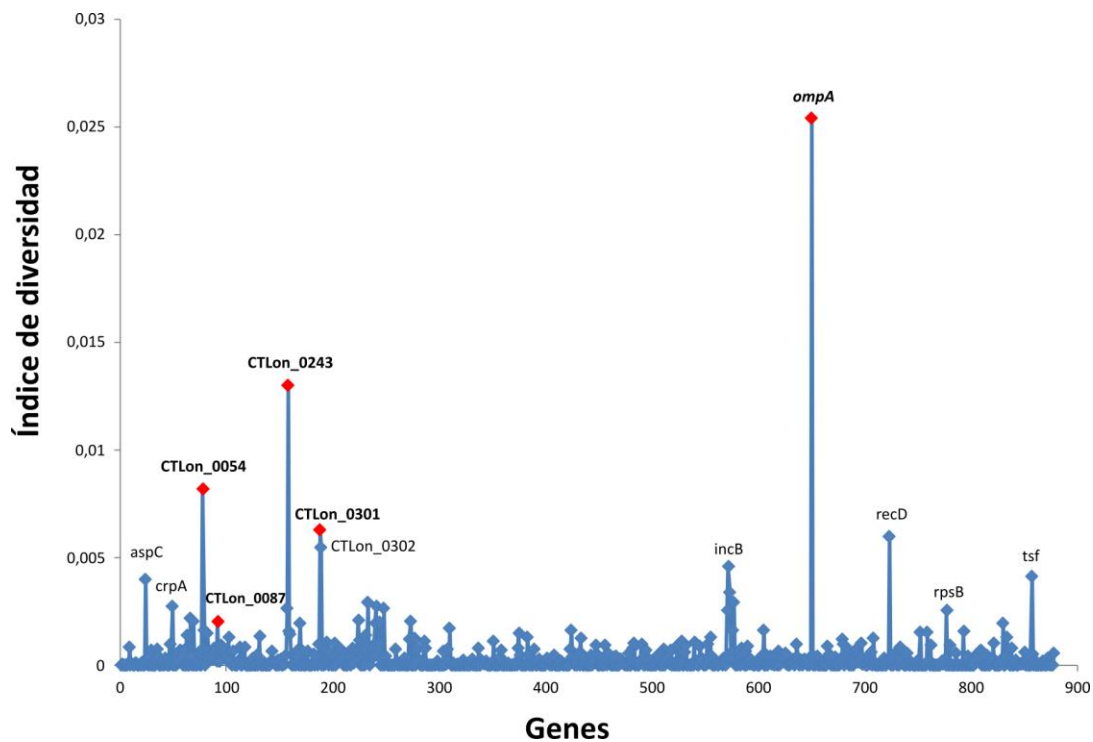


Figura 50. Diversidad evolutiva media (índice D) de los genes del genoma *core* de los genotipos L de *C. trachomatis*. Se analizaron un total de 878 genes mediante el modelo de Tamura Nei [438]. En rojo, los genes seleccionados para el esquema propuesto en este capítulo.

De acuerdo al índice D obtenido y utilizando la cepa L2b/UCh-1/proctitis (NC_010280) como cepa de referencia, los genes seleccionados para el nuevo esquema fueron cuatro: CTLon_0054, que codifica para la proteína de unión al ATP del transportador ABC, CTLon_0087, que codifica para una proteína hipotética conservada, CTLon_0243, que codifica para una proteína putativa que contiene el dominio catalítico C-terminal de la superfamilia de las peptidasas C48 y CTLon_0301, que codifica para una proteína hipotética conservada. Estos genes se seleccionaron para su combinación con el gen *ompA*, gen que mostró el mayor índice de diversidad. Tal y como se observa en la Figura 50, el fragmento CTLon_0087 presentaba un índice de diversidad más bajo que el de otros genes; sin embargo, éste fue seleccionado junto con el resto ya que todos ellos eran los únicos capaces de discriminar el recombinante L2c [164].

2. Inferencia del poder de discriminación de cada una de las estrategias mediante análisis *in silico*

El mismo análisis de diversidad se realizó para los 12 marcadores moleculares de los dos esquemas MLST descritos previamente. Estos índices, junto con los calculados para los genes seleccionados, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Diversidad evolutiva media (índice D) para cada uno de los marcadores de los esquemas MLST descritos previamente y el propuesto en este capítulo obtenidos en base a los 29 genomas completos disponibles.

Esquema MLST	Marcador molecular	Índice D para los genotipos L
Dean y cols., 2009	<i>glyA</i>	0
	<i>leuS</i>	0
	<i>lysS</i>	0
	<i>mdhC</i>	0
	<i>pdhA</i>	0
	<i>pykF</i>	0
	<i>yhbG</i>	0
Klint y cols., 2007	<i>hctB</i>	0,001
	CT058	0,001
	CT144	0,007*
	CT172	0,001
	<i>pbpB</i>	0,001
Este capítulo	CTLon_0054	0,008
	CTLon_0087	0,002
	CTLon_0243	0,013
	CTLon_0301	0,006
	<i>ompA</i>	0,025

Basándose en los genomas completos y según los resultados de la Tabla 8, el esquema de Dean y cols. no es adecuado para la caracterización molecular de la epidemiología de LGV puesto que no ofrece ningún poder discriminatorio entre los genotipos L (el índice D fue 0 en todos los genes) y, en consecuencia, fue excluido en los sucesivos análisis. En el caso del esquema MLVA-*ompA* propuesto por Pedersen y cols. los fragmentos CT1299 y CT1335 fueron idénticos en todos los genotipos L, pero en el fragmento CT1291 identificamos tres patrones, siendo el número de repeticiones en tándem 7C, 8C y 9C. A pesar de ello, este esquema tampoco se utilizó en los análisis sucesivos porque sólo el fragmento CT1291 (y excluyendo a *ompA*) mostró cierta variabilidad entre los genotipos L. Por el contrario, todos los marcadores moleculares del esquema MLST propuesto por Klint y cols. mostraron cierta variabilidad entre los genotipos L, y, por tanto, fueron utilizados en la siguiente etapa para su comparación con el esquema propuesto en este capítulo. El fragmento CT144, con índice D=0,007, no fue incluido en nuestro esquema porque en el análisis posterior realizado exclusivamente con las secuencias pertenecientes al genotipo L2, ese índice fue 0.

3. Comparación del poder de discriminación del nuevo esquema con el esquema MLST de genes hipervariables

Para el análisis comparativo se construyeron tres árboles de máxima verosimilitud: el árbol resultante del concatenado de genes según esquema de Klint y cols. (Figura 51A), el árbol filogenético según del concatenado de los genes propuestos en esta Tesis (Figura 51B) y la reconstrucción basada en el análisis de genomas completos (Figura 51C), utilizado como referencia. En los árboles construidos con los concatenados se utilizaron tanto las secuencias disponibles en el NCBI como las obtenidas de la secuenciación de 28 muestras clínicas.

Las tres aproximaciones discriminaron los principales linajes definidos por Harris y cols. [436], así como los nuevos linajes de Sudáfrica, correspondientes a los ensamblajes 7054_3#87 y 7054_3#88. En la Figura 51 podemos observar que todas las secuencias usadas en el modelo de Klint y cols. fueron idénticas (Figura 51A), mientras que, en el esquema propuesto en esta Tesis, aunque sin soporte estadístico, se intuyen las tres diversificaciones (Figura 51B) que se observan en el árbol de genomas completos (Figura 51C).

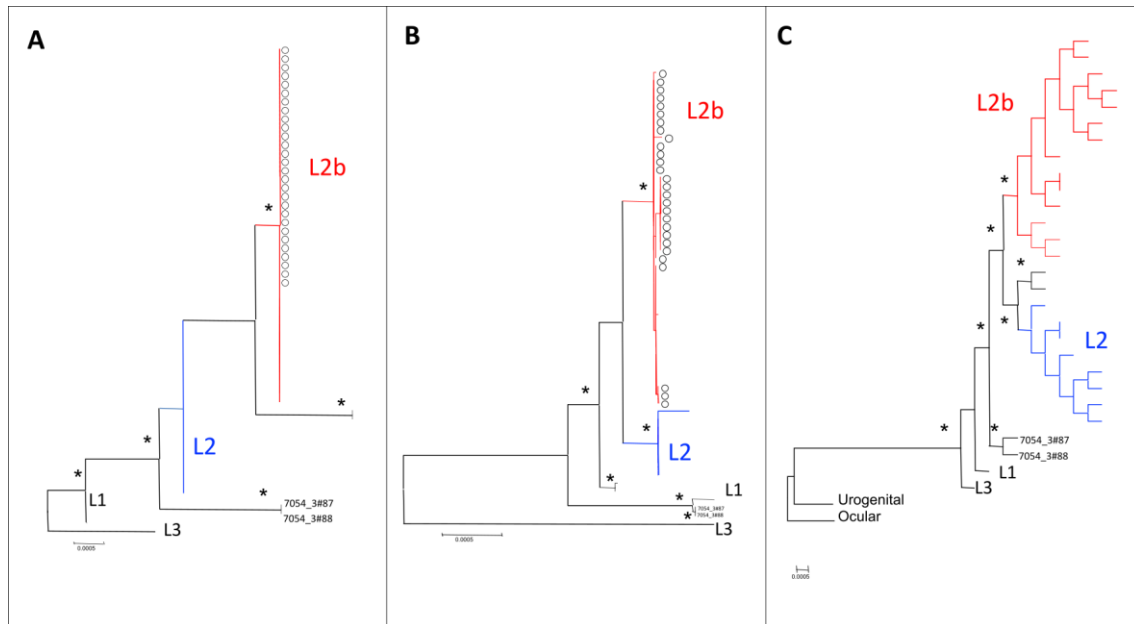


Figura 51. A) Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado el concatenado de genes del esquema de Klint y cols. **B)** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado el concatenado de genes propuesto en este capítulo. **C)** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias de genomas completos disponibles en el NCBI (n=29). Los círculos corresponden a las muestras secuenciadas (n=28).

Además, utilizando tanto el esquema propuesto por Klint y cols. como el propuesto en este capítulo, las 28 muestras analizadas fueron asignadas al linaje L2b. Sin embargo, la mitad de ellas (14/28) tenían un gen *ompA* perteneciente al genotipo L2. Por otro lado, utilizando el esquema MLST de Klint y cols. todas las muestras fueron asignadas a un único clon, el ST58, cuya combinación de alelos fue la siguiente: alelo 27 (CT046/*hctB*), alelo 13 (CT058), alelo 17 (CT144), alelo 13 (CT172) y alelo 28 (CT682/*pbpB*) (Figura 52A). Sin embargo, utilizando nuestro esquema se identificaron un total de 7 variantes distribuidas en tres ramas principales y correspondientes, según la secuenciación del gen *ompA*, a las variantes L2bV1 (JX971936), L2bV7 (LR882815) y L2 (desde ahora L2b/*ompA*-L2) (Figura 52B).

De manera global, utilizando nuestro esquema se detectaron 14 cambios nucleotídicos, 9 de ellos no sinónimos. Estas mutaciones se localizaron en el gen *ompA* (S162N, L173I y N333S), y en el gen CTLon_0301 (N65I, G92V, D125Y, S160P, H417P y R487S).

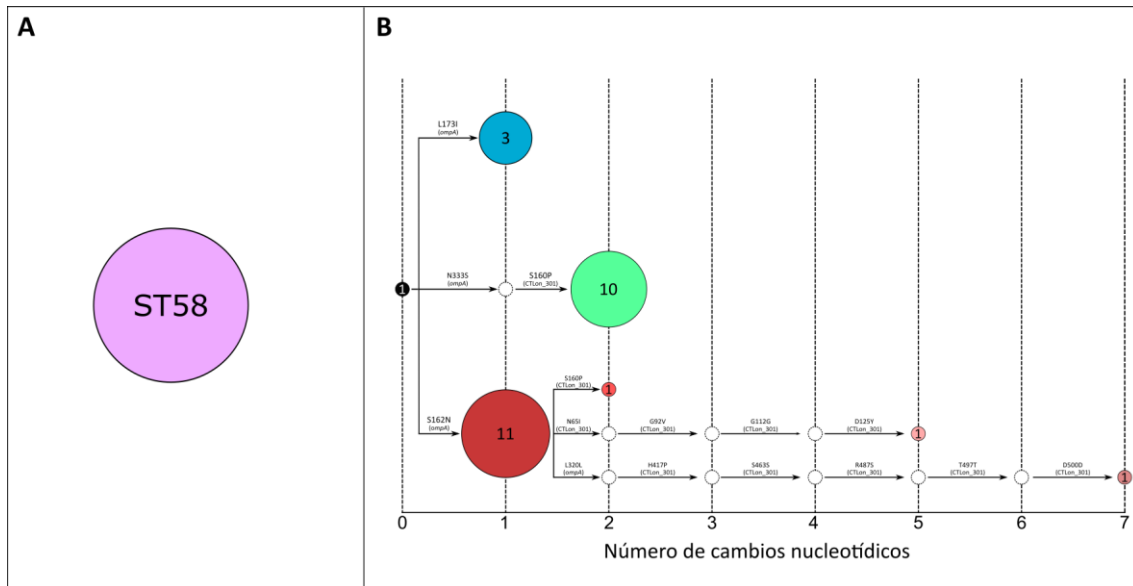


Figura 52. Comparación de los diagramas de redes obtenidos utilizando el esquema MLST de genes hipervariables y el propuesto en este capítulo. **A)** Análisis del diagrama de redes obtenido del concatenado de genes del esquema MLST propuesto por Klint y cols. (2.682 pb), en el que todas las muestras pertenecen al ST58 (círculo morado). **B)** Análisis de diagrama de redes obtenido del concatenado de los fragmentos génicos propuestos en este capítulo (4.042 pb). El número dentro de cada círculo representa el número de muestras incluidas en cada nodo. Cada color representa una genovariante. Los círculos blancos corresponden a ancestros hipotéticos; el círculo negro corresponde a la variante L2b identificada en los Países Bajos; los círculos de tonos rojos corresponden a genovariantes L2b/*ompA*-L2; los círculos de tonos azules corresponden a genovariantes L2bV1 y los círculos de tonos verdes corresponden a genovariantes L2bV7. Los cambios de aminoácidos se indican en cada brazo referido a L2b/UCH-1 (NC_010280), y el gen donde se localiza cada mutación se muestra entre paréntesis.

4. Aplicación del nuevo esquema a la caracterización de la epidemia de LGV

Una vez que el esquema propuesto demostró una mayor capacidad de discriminación que los esquemas descritos anteriormente, obtuvimos la secuencia concatenada de 40 muestras adicionales, lo que supuso un número total de 68 muestras (procedentes de 68 pacientes).

La red de transmisión construida a partir del concatenado de las 68 secuencias nos permitió determinar la dispersión y diversificación de variantes en Madrid a lo largo de 15 meses (Figura 53). El análisis confirmó la presencia de las tres cadenas de transmisión principales observadas en la Figura 52, aunque con una mayor diversidad de variantes, que evolucionaban tanto de la variante L2b más ancestral relacionada con los Países Bajos, como de las tres variantes principales implicadas en las respectivas cadenas de transmisión, L2bV1, L2bV7 y L2b/*ompA*-L2. Una de las cadenas estaba compuesta por

40 pacientes, de los cuales 27 estaban infectados por la variante fundadora (L2b/*ompA*-L2); la segunda cadena estaba formada por 12 individuos, 10 de ellos infectados por la variante fundadora (L2bV7); y la tercera estaba compuesta por 12 pacientes, 9 de ellos correspondientes a la variante fundadora (L2bV1) (Figura 53).

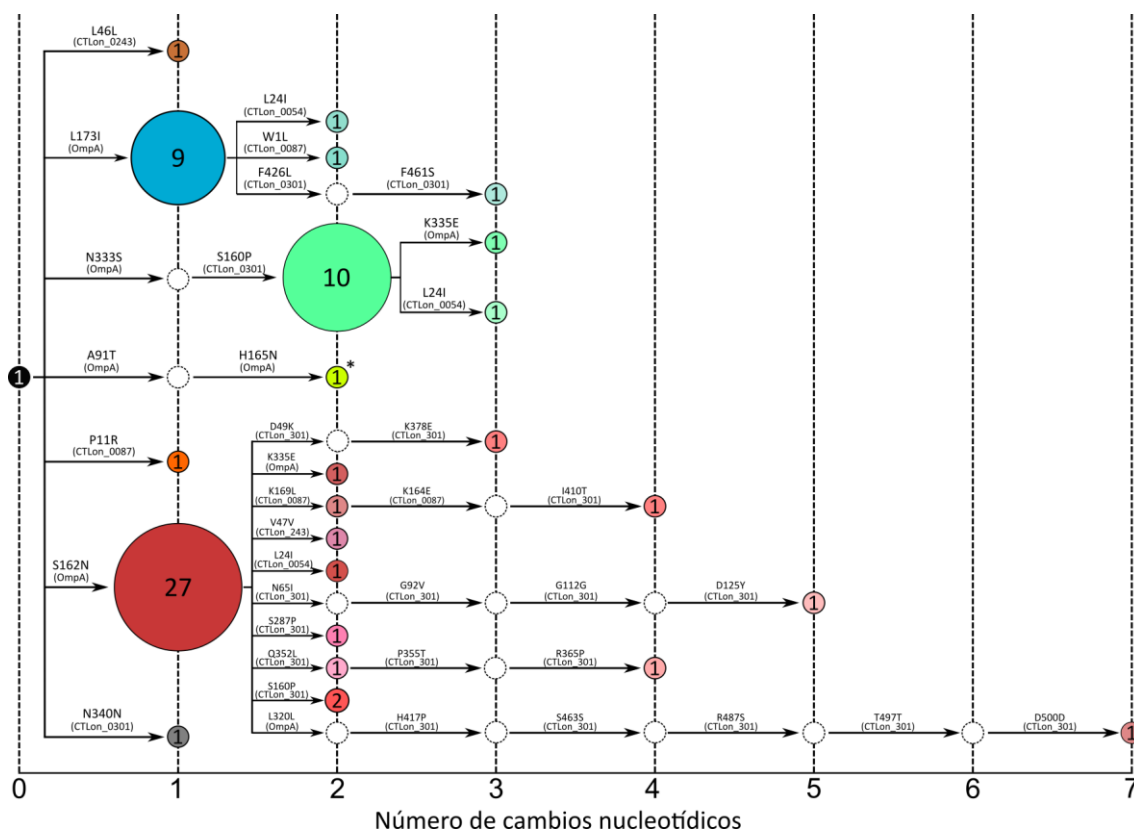


Figura 53. Análisis diagramas de redes obtenidos utilizando el esquema propuesto en este capítulo (4.042 pb) (n=68). El número dentro de cada círculo representa el número de muestras incluidas en cada nodo. Cada color representa una genovariante. Los círculos blancos corresponden a ancestros hipotéticos; el círculo negro corresponde a la variante L2b notificada en los Países Bajos; los círculos de tonos rojos corresponden a genovariantes L2b/*ompA*-L2; los círculos de tonos azules corresponden a genovariantes L2bV1 y los círculos de tonos verdes corresponden a genovariantes L2bV7. Los cambios de aminoácidos se indican en cada brazo referido a L2b/UCH-1 (NC_010280), y el gen donde se localiza cada mutación se muestra entre paréntesis. *Genovariante L2bV4.

Según los resultados obtenidos en el Capítulo I, durante el mismo periodo de tiempo se secuenciaron 218 muestras, obteniéndose un total de 15 variantes diferentes en base a la secuenciación de *ompA*. Utilizando el nuevo esquema, con la secuenciación de 68 muestras obtuvimos un total de 25 variantes. Además, en este análisis identificamos representantes de todos los nodos de transmisión detectados en el Capítulo I, pero con mayor diversidad de variantes. De forma global, se detectaron 34 mutaciones

diferentes, 26 de ellas correspondientes a mutaciones no sinónimas. Los genes *ompA* y CTLon_0301 fueron los genes donde se encontró un mayor número de mutaciones, con 7 (6 no sinónimas) y 20 (15 no sinónimas), respectivamente. En la Tabla 9 se detallan los cambios aminoacídicos detectados.

Tabla 9. Cambios aminoacídicos detectados en los genes seleccionados en este estudio (68 muestras).

Cambio aminoacídico respecto a L2b (NC_010280)	Gen en el que aparece	Número de variantes que portan el cambio
L24I	CTLon_0054	3
W1L	CTLon_0087	1
P11R	CTLon_0087	1
K164E	CTLon_0087	1
K169L	CTLon_0087	2
L46L*	CTLon_0243	1
V47V*	CTLon_0243	1
D49K	CTLon_0301	1
N65I	CTLon_0301	1
G92V	CTLon_0301	1
G112G*	CTLon_0301	1
D125Y	CTLon_0301	1
S160P	CTLon_0301	14
S287P	CTLon_0301	1
N340N*	CTLon_0301	1
Q352L	CTLon_0301	2
P355T	CTLon_0301	1
R365P	CTLon_0301	1
K378E	CTLon_0301	1
I410T	CTLon_0301	1
H417P	CTLon_0301	1
F426L	CTLon_0301	1
F461S	CTLon_0301	1
S463S*	CTLon_0301	1
R487S	CTLon_0301	1
T497T*	CTLon_0301	1
D500D*	CTLon_0301	1
A91T	<i>ompA</i>	1
S162N	<i>ompA</i>	40
H165N	<i>ompA</i>	1
L173I	<i>ompA</i>	12
L320L*	<i>ompA</i>	1
N333S	<i>ompA</i>	12
K335E	<i>ompA</i>	2

*Cambios sinónimos

4.1. Análisis espacial y temporal de la epidemia de LGV

En el análisis temporal se analizaron los genotipos L detectados trimestralmente siguiendo el esquema propuesto previamente (Figura 54), con el fin de identificar la aparición y selección de variantes. La genovariante L2b/*ompA*-L2 se incrementó a partir del tercer trimestre (enero-marzo de 2018) y desde entonces se fue diversificando progresivamente. La genovariante L2bV7 también aumentó a partir del cuarto trimestre (abril-junio de 2018), mientras que la presencia de la genovariante L2bV1 se mantuvo durante todo el periodo de estudio, aunque con un nivel de transmisión bajo. Además, en el último trimestre, detectamos una variante L2b idéntica al L2b original identificado en Países Bajos en 2003 (NC_010280).

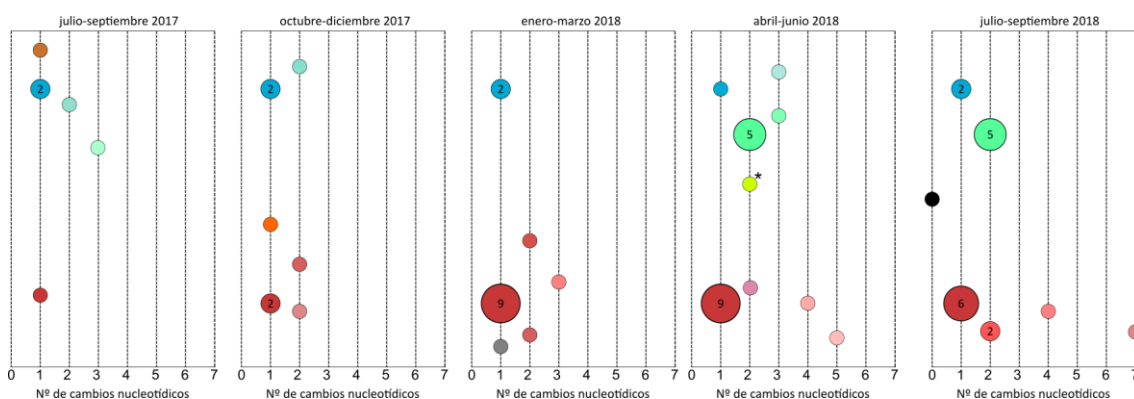


Figura 54. Representación trimestral de las variantes detectadas utilizando los genes concatenados del esquema propuesto en este capítulo (4.042 pb) desde julio de 2017 hasta septiembre de 2018 (n=68). El número dentro de los círculos corresponde al número de muestras incluidas en cada nodo. Si no se representa ningún número, corresponde a una única muestra. El círculo negro corresponde a la variante L2b notificada en los Países Bajos; los círculos de tonos rojos corresponden a genovariantes L2b/*ompA*-L2; los círculos de tonos azules corresponden a genovariantes L2bV1 y los círculos de tonos verdes corresponden a genovariantes L2bV7. *Genovariante L2bV4.

Para el análisis espacial, que permitió conocer la capacidad dispersión de las genovariantes identificadas, se realizó una representación de las genovariantes en función de los códigos postales de la Comunidad de Madrid dónde fueron aisladas (Figura 55).

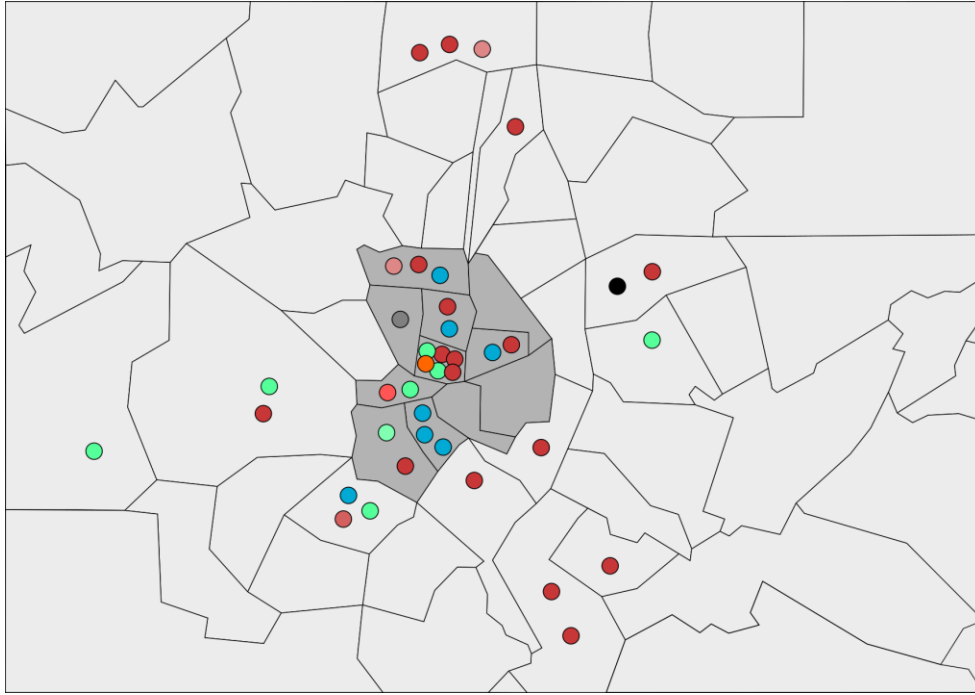


Figura 55. Representación esquemática de los distritos de Madrid donde se identificaron casos de LGV. Cada color representa una genovariante diferente. El círculo negro corresponde a la variante L2b notificada en Países Bajos; el círculo negro corresponde a la variante L2b notificada en los Países Bajos; los círculos de tonos rojos corresponden a genovariantes L2b/*ompA*-L2; los círculos de tonos azules corresponden a genovariantes L2bV1 y los de tonos verdes corresponden a genovariantes L2bV7. El distrito central de Madrid se identifica en fondo gris más oscuro.

Las variantes correspondientes al clúster L2b/*ompA*-L2 (en tonos rojos) fueron detectadas en muchos distritos del área metropolitana. Por otra parte, la variante L2bV1 (en color verde) se detectó en cinco códigos postales del centro y el suroeste, mientras que la variante L2bV7 (en color azul) se encontró en siete códigos postales de la zona centro y oeste. En la zona correspondiente al distrito centro (en color gris más oscuro) se encontraron todas las variantes, mientras que en los distritos periféricos la diversidad fue menor.

DISCUSIÓN

Desde la década de los 60, el genotipado de *C. trachomatis* se ha basado fundamentalmente en la caracterización del gen *ompA*, principalmente debido a su alta tasa de variabilidad genética [440]. Sin embargo, la secuenciación exclusiva de este gen puede no ser una buena estrategia ya que se encuentra en una región altamente recombinogénica [168], por lo que la asignación de genotipos puede ser errónea. Además, pese a su alta frecuencia de mutación, su poder discriminatorio es muy limitado, identificando un número limitado de genovariantes, lo que restringe la cantidad de información epidemiológica que puede obtenerse [441]. Hoy en día, las técnicas de secuenciación de genomas completos constituyen la estrategia con mayor poder discriminatorio para los estudios de epidemiología molecular. Sin embargo, su implementación no es fácil en algunos casos, como en los microorganismos no cultivables o cuyo cultivo requiere técnicas laboriosas para conseguir suficiente material genético. Éste es el caso de *C. trachomatis*, microorganismo intracelular obligado, cuya caracterización se ha visto dificultada debido a este requisito. A pesar de que se han desarrollado varios esquemas de secuenciación independientes de cultivo para *Chlamydia* [429], su aplicación hoy en día es todavía limitada debido a sus dificultades técnicas y su moderado éxito [166]. Por todas estas razones, se ha recurrido al uso de otros métodos clásicos ampliamente utilizados para el estudio de la epidemiología molecular en una gran variedad de microorganismos, como son los esquemas MLST o MLVA. Estas estrategias se han utilizado ampliamente en los estudios de epidemiología molecular de *C. trachomatis*. Sin embargo, la utilidad de estos esquemas para el estudio de la epidemiología de los genotipos L es muy limitada [433].

Para abordar esta limitación, en este capítulo se propone el uso de una nueva combinación de genes diseñada específicamente para los genotipos L. Utilizando el análisis de diversidad a partir de las secuencias de genomas completos disponibles, seleccionamos cuatro genes con alta diversidad entre los genotipos L, CTLon_0054, CTLon_0087, CTLon_0243 y CTLon_0301, para usarlos en combinación con el gen *ompA*. La resolución de nuestro esquema se comparó con el esquema propuesto por Klint y cols. utilizando 28 aislados de genotipos L procedentes de 28 pacientes. Aunque el esquema de Klint y cols. fue el que más diversidad mostró entre los genotipos L, todas las muestras fueron asignadas al ST58. Esto es coincidente con estudios previos que aplicaron dicho esquema para la caracterización de los aislados de LGV [434]. Por el contrario, el uso de nuestro esquema utilizando esas mismas muestras reveló la existencia de 7 variantes, lo que revela un mayor poder discriminatorio.

Posteriormente, el esquema propuesto se utilizó para la caracterización de la epidemiología de LGV en Madrid durante un periodo de 15 meses, para lo cual se amplió el número de muestras secuenciadas hasta un total de 68. El análisis realizado con estas muestras reveló la existencia de 25 variantes diferentes, agrupadas en tres nodos principales.

Los resultados obtenidos en este capítulo son sólo comparables con el trabajo de Manning y cols. sobre la epidemiología de LGV en Reino Unido [254]. En este estudio utilizaron el esquema MLVA-*ompA*; mientras que las secuencias de CT1335 y CT1299 fueron idénticas en todas las muestras, en CT1291 se encontraron dos patrones, con 8C y 9C. Esto, junto a *ompA*, que permitió discriminar L1, L2 y L2b, supuso la identificación de 6 patrones. Aunque no es posible comparar los resultados obtenidos en dos series diferentes, estos resultados nos permiten tener una idea aproximada respecto la resolución de ambas estrategias, con un mayor poder discriminatorio a favor de nuestra combinación.

Además, la aplicación de este esquema para el estudio de la distribución temporal y espacial podría ayudarnos a mejorar la percepción de la situación del LGV en Madrid. Por ejemplo, la diversificación progresiva L2b/*ompA*-L2 revela que es una cadena de transmisión muy activa, o la detección de una variante L2b idéntica a la variante detectada en los Países Bajos puede sugerir reintroducciones desde otras regiones. Además, la repentina acumulación de casos asociados a L2bV7 a partir de abril de 2018 puede sugerir nuevos brotes asociados a redes sexuales. La distribución de los casos en la Comunidad de Madrid sugiere que el distrito central es un punto caliente importante para la expansión del LGV en la ciudad.

Antes de que los métodos de tipificación molecular estuvieran disponibles, el análisis de las redes de transmisión en las ITS se realizaba fundamentalmente mediante el rastreo de contactos. Gracias a la disponibilidad de técnicas de tipificación molecular de alta resolución, como la propuesta en este capítulo, y junto con una adecuada encuesta epidemiológica, las redes sexuales podrían revelarse con mayor precisión. Además, estos esquemas también podrían utilizarse para la diferenciación entre reinfección y persistencia [250], o para evaluar el fracaso del tratamiento, situaciones clínicas que han causado controversia en el manejo de los pacientes.

Otro hallazgo importante que pudimos observar en el análisis filogenético del concatenado de los genes del esquema de Klint y cols. y de nuestros genes, es que todas las variantes pertenecían al linaje L2b, aunque algunas de ellas presentaban un gen

ompA distinto de L2b. Esto es coincidente con el análisis filogenético de los genomas completos de los genotipos L [166], incluyendo el realizado en este capítulo. Diversos estudios concluyen que *ompA* o partes de *ompA* pueden intercambiarse entre las diversas cepas mediante recombinación [436]. Sin embargo, un estudio reciente sobre la diversificación de las variantes L reveló que los SNP (*single nucleotide polymorphism*) presentes en el linaje LGV surgieron por mutación [166].

Este estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, el número de muestras incluidas no es muy elevado, y, por tanto, no nos permite tener una visión más completa de la epidemia del LGV en Madrid. Además, la disponibilidad de secuencias de genomas completos en el momento del análisis fue limitada, y el análisis de diversidad final se realizó utilizando sólo las secuencias de L2, ya que sólo se disponía de una secuencia de L1 y de L3.

En resumen, aunque la secuenciación de genomas completos es la mejor herramienta para los estudios de epidemiología molecular y para establecer relaciones filogenéticas, actualmente requiere una infraestructura y un análisis complejos que suponen costes más elevados. Además, aunque existen métodos independientes del cultivo para *C. trachomatis* [429], estas técnicas aún no son fáciles de aplicar. Nuestro esquema ha demostrado ser útil para una adecuada discriminación de las variantes asociadas a LGV, revelando que la distribución del LGV es más compleja de lo que se pensaba, con diferentes variantes circulando en poblaciones de alto riesgo. Además, este método podría utilizarse para una resolución detallada de la diversidad local en un corto periodo de tiempo, el seguimiento de la terapia y el rastreo de contactos.

Anexo II





OPEN ACCESS

EDITED BY

Svetlana Khaiboullina,
University of Nevada,
Reno, United States

REVIEWED BY

Phil Giffard,
Charles Darwin University,
Australia
Martin James Holland,
University of London,
United Kingdom

*CORRESPONDENCE

Juan Carlos Galán
juancarlos.galan@salud.madrid.org

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 29 September 2022

ACCEPTED 09 November 2022

PUBLISHED 20 December 2022

CITATION

Martínez-García L, González-Alba JM,
Puerta T, Comunión A,
Rodríguez-Jiménez MC, Orviz E,
Sánchez-Conde M,
Rodríguez-Domínguez M, Cantón R and
Galán JC (2022) Specific high-resolution
scheme to improve understanding of the
spatio-temporal dispersion of
lymphogranuloma venereum epidemic.
Front. Microbiol. 13:1056216.
doi: 10.3389/fmicb.2022.1056216

COPYRIGHT

© 2022 Martínez-García, González-Alba,
Puerta, Comunión, Rodríguez-Jiménez,
Orviz, Sánchez-Conde, Rodríguez-
Domínguez, Cantón and Galán. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Specific high-resolution scheme to improve understanding of the spatio-temporal dispersion of lymphogranuloma venereum epidemic

Laura Martínez-García^{1,2}, José María González-Alba³, Teresa Puerta⁴, Alicia Comunión⁵, María Concepción Rodríguez-Jiménez¹, Eva Orviz⁴, Matilde Sánchez-Conde^{6,7}, Mario Rodríguez-Domínguez^{1,2}, Rafael Cantón^{1,7} and Juan Carlos Galán^{1,2*}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain, ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain, ⁴Centro Sanitario Sandoval, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, ⁵Centro Montesa, Madrid, Spain, ⁶Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain, ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Madrid, Spain

Introduction: Lymphogranuloma venereum (LGV) is already endemic in vulnerable populations in several European countries; however, molecular epidemiology data with improved accuracy are necessary to better understand LGV epidemic in these countries. Current strategies to study the molecular epidemiology of LGV cases involve schemes based on a few genetic fragments of *Chlamydia trachomatis*, which have demonstrated limited discriminatory power for LGV. Therefore, this study aimed to propose a new combination of molecular markers based on the most variable genes of L-genotype genomes to improve the characterization of the current LGV epidemic in Madrid, Spain.

Methods: Four genes were selected according to their diversity index (CTLon_0054, CTLon_0087, CTLon_0243 and CTLon_0301) for use in combination with *ompA*. *In silico* and experimental studies were performed to compare the previously described multilocus sequence typing (MLST) schemes with our proposal. Moreover, the proposed scheme was applied ($n=68$) to analyze the spatio-temporal spread of the LGV cases.

Results: Our proposal demonstrated higher diversity allowing the identification of three main groups compared to the previously published MLST based on hypervariable genes wherein only a single sequence type was identified. The temporal analysis showed that the major cluster was progressively diversifying, revealing a very active transmission chain. Furthermore, an L2b genome identical to that of the origin of the epidemic was detected, suggesting reintroductions or a low screening rate in vulnerable populations. The spatial

distribution suggests that the selection and spread of new variants occurs from the central district to the peripheral regions.

Discussion: The scheme proposed in this study has proven to be useful for appropriate discrimination of LGV strains. This study, to our knowledge for the first time, demonstrates a spatio-temporal spread that increases our understanding and identifies areas with special susceptibility for maintenance of the endemic situation of LGV.

KEYWORDS

Chlamydia trachomatis, lymphogranuloma venereum, MLST, surveillance, molecular epidemiology

Introduction

Chlamydia trachomatis (CT) is the most common bacterial sexually transmitted infection (STI), causing numerous new infections every year (World Health Organization, 2018). The broad spectrum of diseases caused by CT is related to different genotypes with varying rates of invasiveness. L-genotypes (L1, L2, and L3) are responsible for lymphogranuloma venereum (LGV), whose clinical presentation is associated with inguinal and femoral lymphadenopathies, proctitis, proctocolitis and ulcers, among others (Ceovic and Jerkovic Gulin, 2015; Stoner and Cohen, 2015). Traditionally, LGV was an endemic in tropical areas, but LGV is already currently endemic in several European countries and cases have also been reported in Australia and North America (Hal et al., 2007; Totten et al., 2015; Donachie et al., 2018), mainly associated to men who have sex with men (MSM). In countries with well-established surveillance programs, the incidence is increasing (Marangoni et al., 2021); however, the true extent of the LGV epidemic is not well known. This is due to the atypical clinical presentations, whereby a high proportion are asymptomatic infections (van Aar et al., 2020). In addition, the limited surveillance and notification to public health authorities across the different countries may give rise to a substantial under diagnosis (Cole et al., 2020). Furthermore, data on accurate molecular epidemiology is scarce. These problems contribute to the silent spread of this microorganism (Martínez-García et al., 2021). Therefore, improved screening (Rodríguez-Domínguez et al., 2022) and discovery of new genetic markers, which can be easily implemented in molecular surveillance, could help better understand the LGV epidemic (Borges et al., 2021).

The most common strategy for studying the molecular epidemiology of the LGV epidemic is based on *ompA* (Dean et al., 1991) and *ompA-pmpH* (Rodríguez-Domínguez et al., 2014) sequence analysis. Studies implementing multilocus sequence typing (MLST; Wang et al., 2011) or multilocus variable number tandem-repeat analysis (MLVA) schemes (Pedersen et al., 2008; Bom et al., 2011), which increase the resolution in CT, have been reported; however, these schemes had limited success in

LGV due to the low discriminatory power. This could possibly result from the low level of diversity in L-genotypes, which is considerably lower than the genetic diversity in CT, whose diversity is also low (Harris et al., 2012; Patiño et al., 2018). Studies based on whole-genome sequencing (WGS) were published at the beginning of the LGV epidemic (Thomson et al., 2008). This could probably be because this strategy is still expensive and difficult to implement in the laboratory. Therefore, new methods are needed to improve LGV surveillance through the design of an MLST scheme based on the most variable genes of L-genotypes. This new approach should provide a precise view of the dynamic spread of LGV cases because of its expected higher resolution compared to previous strategies. This study aims to propose a new combination of molecular markers that allow the identification of short-time scale evolutionary changes and to perform a spatio-temporal distribution to improve the characterization of the current LGV epidemic in Madrid to help in defining Public Health measures.

Materials and methods

Dataset and genes selection

All available complete genome sequences of the L-genotypes of CT (n=29) were downloaded from the NCBI database.¹ Accession numbers for the genomes used are: NC_010280; NC_010287; NC_015744; NC_020929; NC_020930; NC_020931; NC_020933; NC_020934; NC_020935; NC_020936; NC_020937; NC_020938; NC_020945; NC_020973; NC_020974; NC_020975; NC_020976; NC_020977; NC_020978; NC_021050; NC_021052; NZ_ACUI01000001; NZ_CP009923; NZ_CP009925; NZ_CP019385; NZ_CP019386; NZ_CP019387; NZ_CVNC01000001; NZ_CVND01000001. The last update of the dataset was in January 2019.

¹ ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genbank/bacteria/?latest_assembly_versions

We used the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and identified 878 genes with AM884177 (L2b/UCH-1) as reference. The sequences were aligned using the multiple alignment fast fourier transform (MAFFT). The mean evolutionary diversity (D), defined as the number of base substitutions per site from the average of the entire population, was estimated for each gene using the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993). Evolutionary analyses were conducted using MEGA 7. For genes with greater diversity in L-genotypes, the same analysis was repeated for the L2b lineage as it was the only lineage with more than two sequences available. Genes with the highest D index were selected for the new scheme.

We also studied the genes used in two previously described MLST schemes (Klint et al., 2007; Dean et al., 2009) and the MLVA scheme (Pedersen et al., 2008), using an *in silico* approach to infer the discrimination power of these schemes for L-genotypes. The scheme proposed by Dean et al. (2009) is a CT MLST scheme that includes *glyA*, *mdhC*, *pdhA*, *yhbG*, *pykF*, *lysS*, and *leuS* genes; the MLST scheme proposed by Klint et al. (2007) contains CT046 (*hctB*), CT058, CT144, CT172, and CT682 (*pbbB*) regions, which are considered hypervariable genes, and MLVA scheme includes the variable number tandem repeats of loci CT1291, CT1299 and CT1335 together with *ompA* (Pedersen et al., 2008).

Sample selection, amplification, and sequencing of proposed genes

The study was carried out using 68 clinical samples obtained from July 2017 to September 2018 from 68 patients who visited the Hospital Universitario Ramón y Cajal and an STI center attending mainly MSM population (CS Sandoval) in whom L-genotypes had been previously detected. Most of the samples were rectal swabs (59/68), followed by 7/68 ulcers, 1/68 adenopathy, and 1/68 cervical samples. The L-genotypes detection was performed using a real time PCR based on 36bp deletion in *pmpH* gene that was confirmed by *pmpH* sequencing (Rodríguez-Domínguez et al., 2014). This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario Ramón y Cajal (reference no. 012/17).

In the first round, fragments of the selected genes (CTLon_0054, CTLon_0087, CTLon_0243 and CTLon_0301) together with the corresponding genes to MLST of Klint et al. (2007), were amplified and sequenced in 28/68 samples to compare the discrimination power between these strategies. In the second round, only the selected genes were sequenced from the remaining samples (40/68). Moreover, a 990 bp fragment of *ompA*, encoding the major outer membrane protein (MOMP), was also sequenced in all samples. The primers used for the amplification of each proposed gene and *ompA* are shown in Table 1, and the PCR conditions are described in the Supplementary material. Amplification and sequencing of the genes included in the MLST scheme described by Klint et al. (2007) were performed using the previously published conditions. Sanger sequencing was performed using a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Phylogenetic analysis

For phylogenetic reconstructions, the amplified concatenated nucleotide sequence for each gene included in each MLST scheme was used. The genes chosen for each scheme were aligned, concatenated, and edited using the ClustalW algorithm implemented in MEGA 7. A nucleotide substitution model for each gene was selected using the jModeltest1.0 software. Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed using PhyML 3.0. The bootstrap test (1,000 replicates) was used to calculate branch support. Support values >90% were considered statistically significant. ML phylogenetic trees were constructed using MEGA 7 based on the general time reversible model. A consensus tree was generated using the TreeAnnotator software. To avoid introducing sequencing errors, mutations at the ends of the sequenced fragments were not considered. In our scheme (selected genes and *ompA*) the phylogenetic analysis was performed using 4,042 bp.

Transmission networks were constructed based on the maximum parsimony method using the reconstructed evolutionary tree and assuming that the L2b strain reported in Netherlands (2003) was the origin of the global epidemic.

TABLE 1 Primers used for amplification and sequencing of the selected genes and *ompA* gene.

Region	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
CTLon_0054	CTLon_0054_F	ATGCTTCATCTATGTGATGT	768
	CTLon_0054_R	TTACTCCTGGGTAACGACAT	
CTLon_0087	CTLon_0087_F	GCTTTATGGAGTGAGTACACT	574
	CTLon_0087_R	CCTGAAGAAATGAAGAGTGCT	
CTLon_0243	CTLon_0243_F	TCGAAACCAGTTCTTATCTCT	1,020
	CTLon_0243_R	GAGATCATTCAAAGCGTCTGT	
CTLon_0301	CTLon_0301_F	TGGAACCCTAATAAAGTAGT	1,600
	CTLon_0301_R	TTGCCTTAGTAATTTCTCCT	
<i>ompA</i>	<i>ompA</i> _F	AACCAAGCCTTATGATCGACGGAAT	990
	<i>ompA</i> _R	CAATACCGCAAGATTTCTAGATTCA	

Results

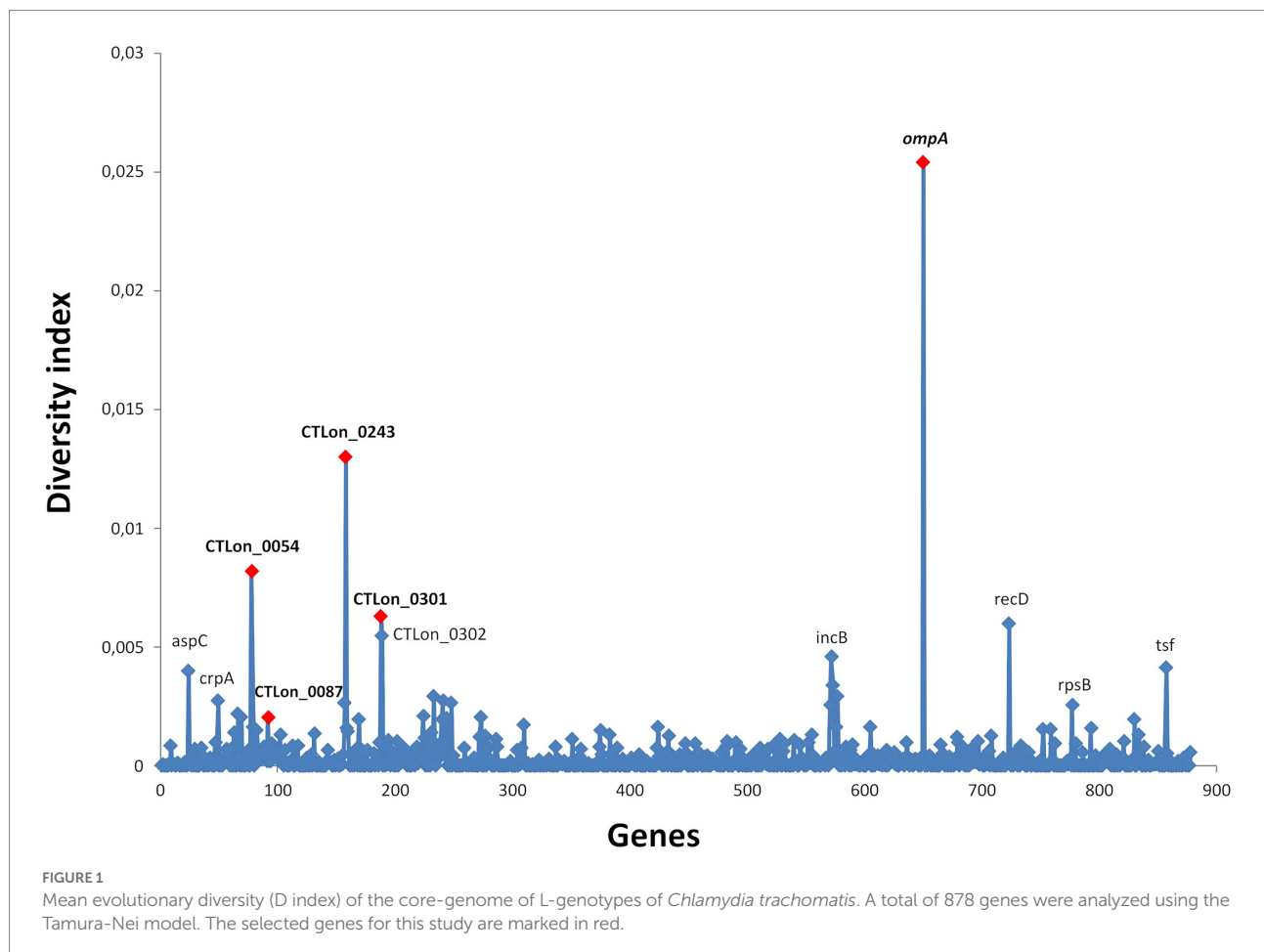
Diversity analysis and selected genes

The initial diversity analysis performed using the complete genome sequences available in public databases allowed the identification of the most variable genes (Figure 1). According to the D index obtained and using AM884177 as reference strain, the new genes selected were CTLon_0054 (ABC transporter ATP-binding protein), CTLon_0087 (conserved hypothetical protein), CTLon_0243 (putative membrane protein that contains the catalytic C-terminal domain of peptidase_C48 superfamily) and CTLon_0301 (conserved hypothetical protein), used in combination with *ompA*. Although the D index of CTLon_0087 was lower than that of the other genes, this gene was still selected alongside the other genes, as they were the only genes capable of discriminating the recombinant L2c (analysis not shown). The D indices for each molecular marker included in the proposed scheme and the 12 molecular markers of the two previously described CT MLST schemes are shown in Table 2. Based on the complete genomes, the scheme of Dean et al. (1991) is not suitable for the molecular characterization of LGV epidemiology because it does not have sufficient discriminatory power among

L-genotypes, and consequently, it was excluded in subsequent analyses. For the scheme proposed by Pedersen et al., CT1299 and CT1335 were identical in all L-genotypes; however, using CT1291, we identified three patterns (7C, 8C and 9C in the VNTR). However, this scheme was not used in the successive analyses because only one fragment (excluding *ompA*) showed some variability among the L-genotypes. In contrast, all the genes from the scheme proposed by Klint et al. (2007) showed variability among the L-genotypes. Therefore, the genes belonging to this scheme and our proposed scheme were sequenced in a selection of samples in the subsequent experiments.

Comparison between the different strategies for the resolution by phylogenetic reconstruction

Three ML trees were constructed using the concatenated sequences of the selected genes from 28 clinical samples used in the scheme proposed by Klint et al. (2007) (Supplementary Figure S1A), the scheme proposed in this study (Supplementary Figure S1B), and the whole genomes available in GenBank, which was considered a reference strategy because of



its highest resolution (Supplementary Figure S1C). The three approaches discriminated the main lineages defined by Harris et al. (2012), and a new lineage from South Africa (assembly 7054_3#87 and 7054_3#88). Using the scheme proposed in this study and the scheme proposed by Klint et al. (2007), all our samples were assigned to the L2b genotype. While using the scheme described by Klint et al. (2007), all sequences were allocated to a single clone (ST58). However, our proposal identified seven variants distributed in three main branches (Figure 2), corresponding to L2bV1, L2bV7, and L2 variants (according to the *ompA* sequence).

Once our scheme demonstrated higher discrimination capacity than previously described schemes using 28 samples, we obtained the concatenated sequence for 40 additional samples, resulting in a total of 68 samples (from 68 patients). An evolutionary reconstruction allowed us to determine the dispersion and diversification of variants in Madrid over 15 months (Figure 3). The analysis confirmed the presence of the three major transmission chains; however, a higher diversity of variants was observed evolving from the most ancestral L2b variant related to Netherlands and the three main variants involved in the respective transmission chains. One of the chains was composed of 40 patients, of whom 27 were infected by the founder variant (L2b-*ompA* L2); the second chain was composed of 12 individuals, of whom 10 were infected by the founder variant (L2bV7); and the third chain was composed of 12 patients, of whom 9 were infected with to the founder variant (L2bV1).

TABLE 2 Mean evolutionary diversity (D index) for each marker of the previous MLST schemes and the one proposed in this study.

MLST scheme	Molecular marker	D index in L-genotypes
Dean et al. (2009)	<i>glyA</i>	0
	<i>leuS</i>	0
	<i>lysS</i>	0
	<i>mdhC</i>	0
	<i>pdhA</i>	0
	<i>pykF</i>	0
	<i>yhbG</i>	0
Klint et al. (2007)	<i>hctB</i>	0.001
	CT058	0.001
	CT144	0.007*
	CT172	0.001
	<i>pbpB</i>	0.001
This study	CTLon_0054	0.008
	CTLon_0087	0.002
	CTLon_0243	0.013
	CTLon_0301	0.006
	<i>ompA</i>	0.025

These values were obtained based on 29 available whole-genome sequences. The mean distance across the chlamydial genome was estimated in 0.0003 (SD ± 0.0012) with a 95% confident interval (95%CI) of 0–0.0026. According to the data showed in this table, all selected genes are into normal distribution, except *ompA*. *The molecular marker CT144 from the scheme proposed by Klint et al. (2007) was not included in our scheme because D = 0 when the analysis was performed using L2 sequences.

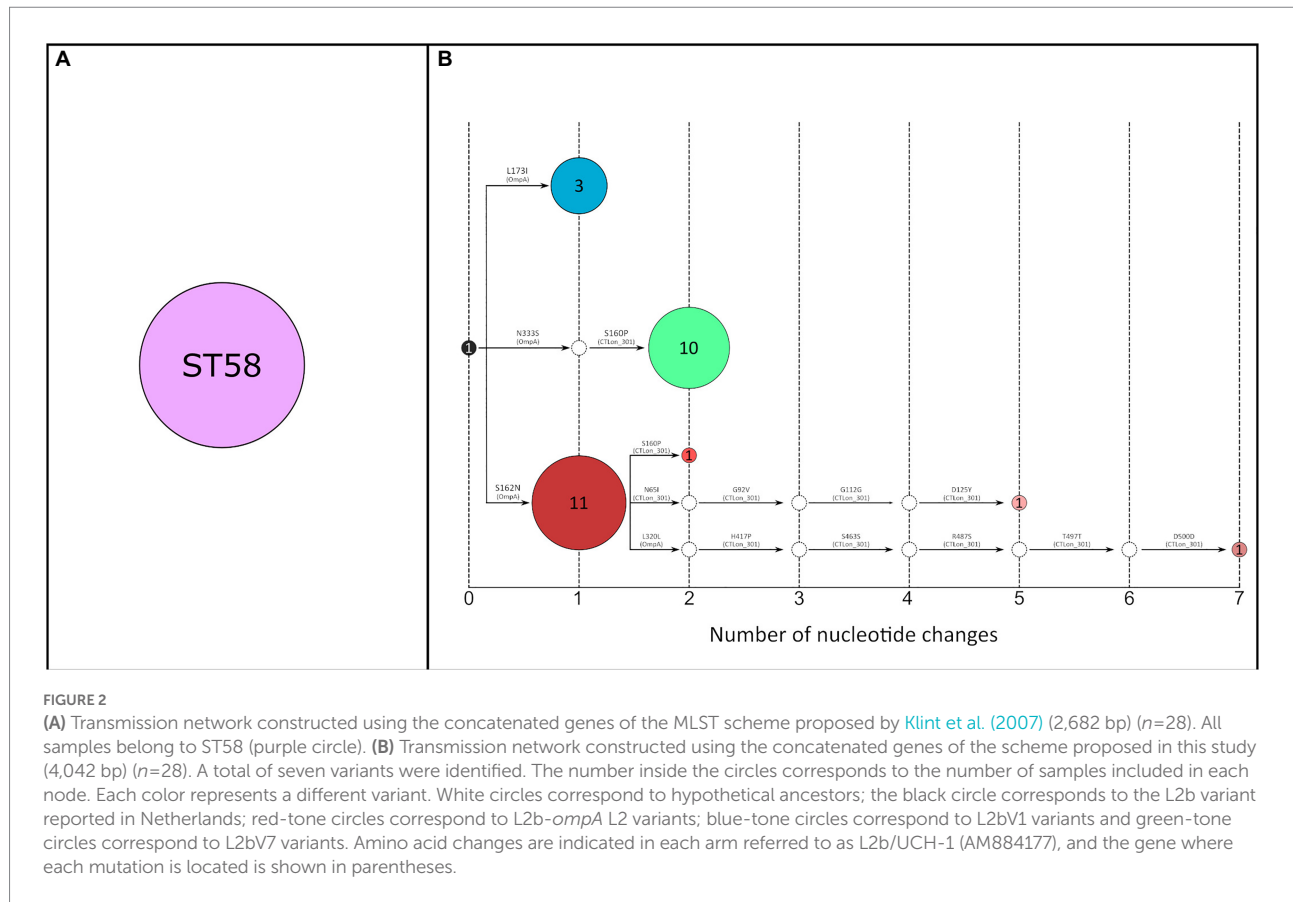
Molecular characterization of lymphogranuloma venereum epidemic in Madrid

To better understand the spread of the variants identified in the study period, temporal and spatial evolution were analyzed. The detected L-genotypes were represented quarterly, following the proposed scheme in the previous section (Figure 4). The L2b-*ompA* L2 variant increased from the third trimester and since then this cluster has been progressively diversifying. L2bV7 also increased from the fourth trimester, whereas L2bV1 was maintained during the entire study period, but with a low transmission level. Notably, in the last trimester, we detected an L2b identical to the original L2b identified in Amsterdam in 2003 (AM884177).

Based on the spatial distribution of cases detected according to the postal codes (Figure 5), the L2b-*ompA* L2 variant and its evolved variants were detected around many districts in the metropolitan area. In contrast, L2bV1 was detected in five postal codes in the central and southwestern areas, whereas L2bV7 variants were detected in seven postal codes in the central and western areas. In the central districts, all variants were identified, whereas in the peripheral districts, the diversity of the variants decreased.

Discussion

Since the 1960s, genotyping of CT has been based on characterizing *ompA*, which has been successfully used for the typing of this organism, but with a low discriminatory power from an epidemiological perspective. MLST schemes based on the sequencing of housekeeping genes are classically used in molecular epidemiology studies for different pathogens and may be useful in cases where the ultimate resolution of the WGS is not easy to implement, such as in non-cultivable or non-easily cultivable microorganisms, such as CT. WGS is the strategy with the most discriminatory power; however, the moderate success and technical difficulties of this strategy for this microorganism are hindering its generalization in many clinical laboratories. Therefore, tree different MLST schemes for *Chlamydia* have been proposed (Klint et al., 2007; Pannekoek et al., 2008; Dean et al., 2009) and are frequently used. However, their application to L-genotypes is limited. For example, the MLST of Pannekoek et al. (2008) grouped all L-genotypes into an identical MLST type. The scheme described by Dean et al. (2009) only discriminates L2b from other L-genotypes. The study of Klint et al. (2007), proposed for the first time the use of highly polymorphic genetic regions for typing instead of the conserved household genes (Klint et al., 2007) based on all CT genotypes. However, previous studies, including samples from different parts of the world (Christerson et al., 2010; Isaksson et al., 2017; Levy et al., 2018), confirm that this model does not have enough discriminatory power for LGV isolates. Recently, the MLVA-*ompA* strategy (Pedersen et al., 2008)



developed for CT (Labiran et al., 2016), was used in the LGV epidemic (Manning et al., 2021), identifying five different variants among 230 samples collected over 17 months.

To address this limitation, we proposed a new combination of genes with high diversity among L-genotypes. Using diversity analysis of the WGS available, we selected four genes with high diversity among L-genotypes (CTLon_0054, CTLon_0087, CTLon_0243 and CTLon_0301) for use in combination with *ompA*. The resolution of our scheme was compared with the scheme proposed by Klint et al. (2007), using 28 patient samples. Although this was the only MLST scheme whose genes showed diversity among L-genotypes, all samples were classified as ST58, and the concatenated sequence did not reveal any differentiation (Supplementary Figure S1A). By contrast, using the same samples, our scheme indicated the existence of seven variants (Figure 2), revealing improved discriminatory power. This discriminatory power was used to analyze the LGV epidemiology in a short period, for which the sample size was extended to a total of 68 samples. The analysis revealed 24 different variants, most of which were grouped into three main nodes. These results are better than those of the MLVA-*ompA* employed for LGV epidemic in UK (Manning et al., 2021), yielding lower discrimination power.

Before molecular typing methods became available, transmission network analysis of STIs was performed using contact tracing. Owing to the availability of high-resolution

typing techniques such as those proposed in this study and with an epidemiological survey, the sexual networks might be unveiled with higher precision. Moreover, schemes with great discrimination power offer the possibility of differentiating between reinfection and persistence (de Vries et al., 2015), which are clinical situations that have caused controversy in the management of the patients and the risk of treatment failure.

In contrast, the spatio-temporal distribution of L-variants identified in this study could help increase our perception of the endemic situation in Madrid. The temporal detection of L-variants provided new information. For instance, the progressive diversification L2b-*ompA* L2 revealed a very active transmission chain, or the detection of L2b identical to ancestral variant suggests re-introductions from other regions or low screening in high-risk populations. Moreover, the sudden increase in L2bV7 cases in April 2018 would suggest new outbreaks associated with sexual networks. The spatial distribution of L-variants revealed the radial spreading from the central district to the peripheral regions. Therefore, the central district was a crucial hotspot in the LGV endemic situation in Madrid.

The phylogenetic analysis of concatenated genes of Klint et al. (2007) scheme and our proposed genes revealed that all variants belonged to the L2b lineage, even though some of them have an *ompA* other than L2b. Moreover, the whole-genome analysis of L-genotypes revealed that all variants belonged to L2b regardless

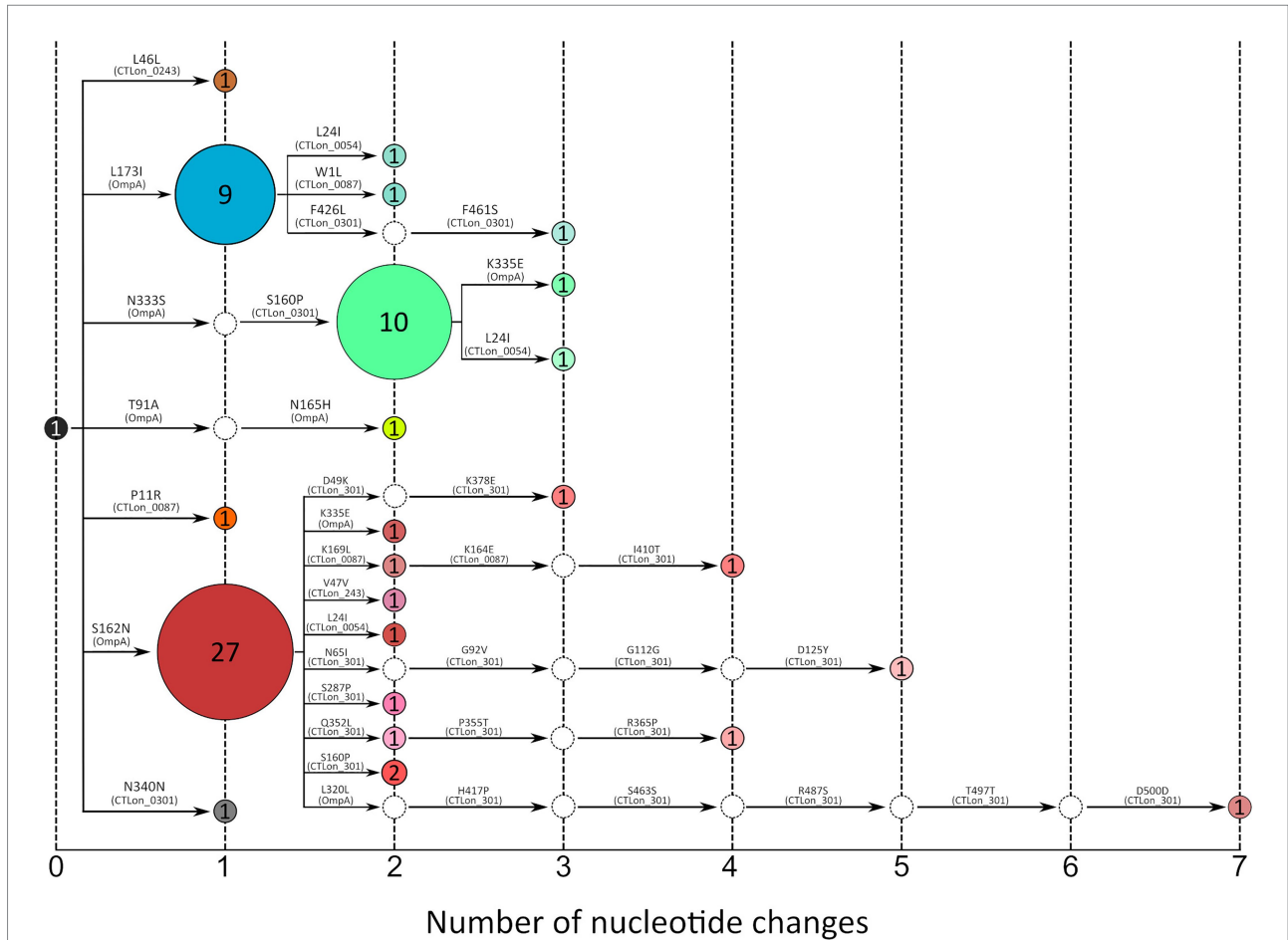


FIGURE 3 Transmission network constructed using the concatenated genes of the scheme proposed in this study (4,042 bp) ($n=68$). The number inside the circles corresponds to the number of samples included in each node. Each color represents a different variant. White circles correspond to hypothetical ancestors; the black circle corresponds to the L2b variant reported in Netherlands; red-tone circles correspond to L2b-ompA L2 variants; blue-tone circles correspond to L2bV1 variants and green-tone circles correspond to L2bV7 variants. Amino acid changes are indicated in each arm referred to as L2b/UCH-1 (AM884177), and the gene where each mutation is located is shown in parentheses.

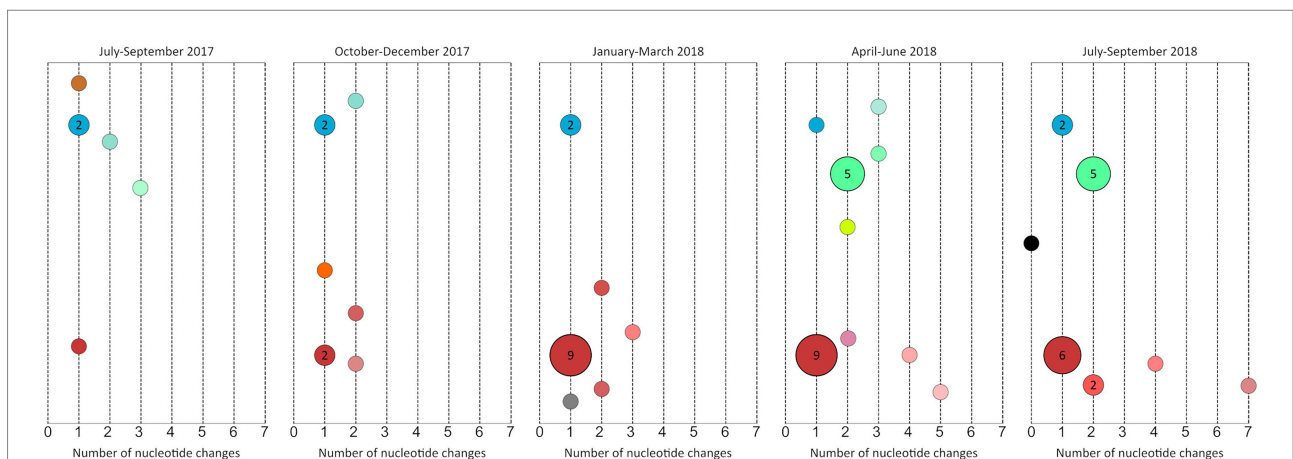


FIGURE 4 Quarterly representation of the variants detected using the concatenated genes of the scheme proposed in this study (4,042 bp) from July 2017 to September 2018 ($n=68$). The number inside the circles corresponds to the number of samples included in each node. If no number is represented, it corresponds to one sample. The black circle corresponds to the L2b variant reported in Netherlands; red-tone circles correspond to L2b-ompA L2 variants; blue-tone circles correspond to L2bV1 variants and green-tone circles correspond to L2bV7 variants. The x-axis represents the number of nucleotide changes in each variant with respect to L2b/UCH-1 (AM884177).

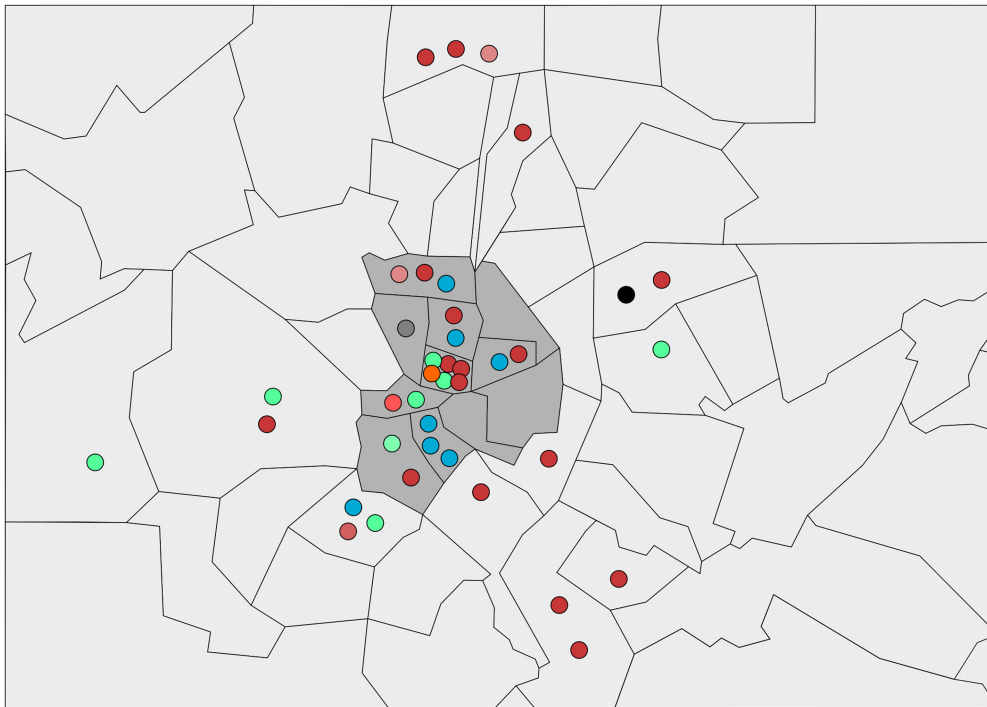


FIGURE 5

Schematic representation of the districts of Madrid where LGV cases were identified. The different circles correspond to the L2b variants detected in the study. Each color represents a different variant. The black circle corresponds to the L2b variant reported in Netherlands; red-tone circles correspond to L2b-*ompA* L2 variants; blue-tone circles correspond to L2bV1 variants and green-tone circles correspond to L2bV7 variants. The central district is identified in grey background.

of *ompA* (Seth-Smith et al., 2021). Previous studies reported that *ompA* or parts of *ompA* may be exchanged between CT strains by recombination (Harris et al., 2012; Labiran et al., 2012). However, a recent study on the diversification of L-variants revealed that the single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in the LGV lineage arose by mutation (Seth-Smith et al., 2021).

Our study has several limitations. First, the low number of sequenced samples did not allow us to obtain a more complete view of the LGV epidemic. Moreover, the availability of whole genomes sequences was limited, and the final diversity analysis was performed using L2 sequences, as only one whole-genome sequence from L1 and L3 was available.

In summary, although WGS (whole genome sequencing) is the best tool for improving the understanding of phylogenetic relationships, it currently requires a more complex infrastructure and analysis with higher costs. Although culture-independent methods are available (Taylor-Brown et al., 2018) for CT, their application remains difficult. Our scheme has proven to be useful for appropriate discrimination of LGV strains, revealing a more complex distribution of LGV than previously thought, with different variants circulating in high-risk populations. Moreover, this method can be used for a detailed resolution of local diversity in a short period, monitoring therapy and contact tracing.

Data availability statement

The sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession numbers: OP611811 to OP611878 (*ompA*), OP611879 to OP611946 (CTLon_0054), OP611947 to OP612014 (CTLon_0087), OP612015 to OP612082 (CTLon_0243) and OP612083 to OP612150 (CTLon_0301).

Author contributions

JG-A and JG: conceptualization. LM-G, MR-D, JG-A, and JG: methodology. LM-G, JG-A, and JG: formal analysis and writing—original draft. LM-G, MR-J, and MR-D: experimental investigation. EO, TP, AC, and MS-C: clinical investigation. LM-G, JG-A, TP, AC, MR-J, EO, MS-C, MR-D, RC, and JG: writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), PI16/01242, PI20/01397, co-funded by the European

Union; and also supported by the Spanish Network CIBERESP (CB06/02/0053).

Acknowledgments

We thank Mary Harper and Vicky Ascorve for the English correction of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Bom, R. J. M., Christerson, L., Schim van der Loeff, M. F., Coutinho, R. A., Herrmann, B., and Bruisten, S. M. (2011). Evaluation of high-resolution typing methods for chlamydia trachomatis in samples from heterosexual couples. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2844–2853. doi: 10.1128/JCM.00128-11
- Borges, V., Isidro, J., Correia, C., Cordeiro, D., Vieira, L., Lodhia, Z., et al. (2021). Transcontinental dissemination of the L2b/D-Da recombinant *chlamydia trachomatis* lymphogranuloma venereum (LGV) strain: need of broad multi-country molecular surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 73, e1004–e1007. doi: 10.1093/cid/ciab067
- Ceovic, R., and Jerkovic Gulin, S. (2015). Lymphogranuloma venereum: diagnostic and treatment challenges. *Drug Resist* 8, 39–47. doi: 10.2147/IDR.S57540
- Christerson, L., de Vries, H. J. C., de Barbeyrac, B., Gaydos, C. A., Henrich, B., Hoffmann, S., et al. (2010). Typing of lymphogranuloma venereum *chlamydia trachomatis* strains. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1777–1779. doi: 10.3201/eid1611.100379
- Cole, M. J., Field, N., Pitt, R., Amato-Gauci, A. J., Begovac, J., French, P. D., et al. (2020). Substantial underdiagnosis of lymphogranuloma venereum in men who have sex with men in Europe: preliminary findings from a multicentre surveillance pilot. *Sex. Transm. Infect.* 96, 137–142. doi: 10.1136/sextrans-2019-053972
- de Vries, H. J. C., Schim van der Loeff, M. F., and Bruisten, S. M. (2015). High-resolution typing of chlamydia trachomatis: epidemiological and clinical uses. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28, 61–71. doi: 10.1097/QCO.0000000000000129
- Dean, D., Bruno, W. J., Wan, R., Gomes, J. P., Devignot, S., Mehari, T., et al. (2009). Predicting phenotype and emerging strains among *chlamydia trachomatis* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1385–1394. doi: 10.3201/eid1509.090272
- Dean, D., Patton, M., and Stephens, R. S. (1991). Direct sequence evaluation of the major outer membrane protein gene variant regions of chlamydia trachomatis subtypes D¹, I¹, and L2¹. *Infect. Immun.* 59, 1579–1582. doi: 10.1128/iai.59.4.1579-1582.1991
- Donachie, A., Spiteri, G., Barbara, C., Melillo, T., Hadad, R., Gauci Farrugia, A., et al. (2018). Lymphogranuloma venereum (LGV) in men who have sex with men (MSM): a re-emerging problem, Malta, 2018. *Euro Surveill* 23, 1800541. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800541
- Hal, S. J., Hillman, R., Stark, D. J., Harkness, J. L., and Marriott, D. (2007). Lymphogranuloma venereum: an emerging anorectal disease in Australia. *Med. J. Aust.* 187, 309–310. doi: 10.5694/j.1326-5377.2007.tb01251.x
- Harris, S. R., Clarke, I. N., Seth-Smith, H. M. B., Solomon, A. W., Cutcliffe, L. T., Marsh, P., et al. (2012). Whole-genome analysis of diverse chlamydia trachomatis strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat. Genet.* 44, 413–419. doi: 10.1038/ng.2214
- Isaksson, J., Carlsson, O., Airell, Å., Strömdahl, S., Bratt, G., and Herrmann, B. (2017). Lymphogranuloma venereum rates increased and chlamydia trachomatis genotypes changed among men who have sex with men in Sweden 2004–2016. *J. Med. Microbiol.* 66, 1684–1687. doi: 10.1099/jmm.0.000597
- Klint, M., Fuxelius, H.-H., Goldkuhl, R. R., Skarin, H., Rutemark, C., Andersson, S. G. E., et al. (2007). High-resolution genotyping of *chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1410–1414. doi: 10.1128/JCM.02301-06
- Labiran, C., Clarke, I. N., Cutcliffe, L. T., Wang, Y., Skilton, R. J., Persson, K., et al. (2012). Genotyping markers used for multi locus VNTR analysis with ompA

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1056216/full#supplementary-material>

(MLVA-ompA) and multi sequence typing (MST) retain stability in chlamydia trachomatis. *Front. Cell. Infect. Microbiol* 2:68. doi: 10.3389/fcimb.2012.00068

Labiran, C., Marsh, P., Zhou, J., Bannister, A., Nicholas Clarke, I., and Goubet, S. (2016). Highly diverse MLVA-ompA genotypes of rectal chlamydia trachomatis among men who have sex with men in Brighton, UK and evidence for an HIV-related sexual network. *Sex. Transm. Infect.* 92, 299–304. doi: 10.1136/sextrans-2015-052261

Levy, I., Gefen-Halevi, S., Nissan, I., Keller, N., Pilo, S., Wieder-Finesod, A., et al. (2018). Delayed diagnosis of colorectal sexually transmitted diseases due to their resemblance to inflammatory bowel diseases. *Int. J. Infect. Dis.* 75, 34–38. doi: 10.1016/j.ijid.2018.08.004

Manning, C., O'Neill, C., Clarke, I. N., Rebec, M., Cliff, P. R., and Marsh, P. (2021). High-resolution genotyping of lymphogranuloma venereum (LGV) strains of chlamydia trachomatis in London using multi-locus VNTR analysis-ompA genotyping (MLVA-ompA). *PLoS One* 16:e0254233. doi: 10.1371/journal.pone.0254233

Marangoni, A., Foschi, C., Tartari, F., Gaspari, V., and Re, M. C. (2021). Lymphogranuloma venereum genovariants in men having sex with men in Italy. *Sex. Transm. Infect.* 97, 441–445. doi: 10.1136/sextrans-2020-054700

Martínez-García, L., Rodríguez-Domínguez, M., Lejarraga, C., Rodríguez-Jiménez, M. C., González-Alba, J. M., Puerta, T., et al. (2021). The silent epidemic of lymphogranuloma venereum inside the COVID-19 pandemic in Madrid, Spain, march 2020 to February 2021. *Euro Surveill* 26:2100422. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.18.2100422

Pannekoek, Y., Morelli, G., Kusecek, B., Morré, S. A., Ossewaarde, J. M., Langerak, A. A., et al. (2008). Multi locus sequence typing of Chlamydiales: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria chlamydia trachomatis. *BMC Microbiol.* 8:42. doi: 10.1186/1471-2180-8-42

Patiño, L. H., Camargo, M., Muñoz, M., Ríos-Chaparro, D. I., Patarroyo, M. A., and Ramírez, J. D. (2018). Unveiling the multilocus sequence typing (MLST) schemes and Core genome phylogenies for genotyping chlamydia trachomatis. *Front. Microbiol.* 9:1854. doi: 10.3389/fmicb.2018.01854

Pedersen, L. N., Pødenphant, L., and Møller, J. K. (2008). Highly discriminative genotyping of chlamydia trachomatis using omp1 and a set of variable number tandem repeats. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 644–652. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02011.x

Rodríguez-Domínguez, M., Casabona, J., and Galán, J. C. (2022). A challenging future in the sexually transmitted infection diagnostics landscape: chlamydia trachomatis as model. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.:S0213005X22000933*. doi: 10.1016/j.eimce.2022.03.015

Rodríguez-Domínguez, M., Puerta, T., Menéndez, B., González-Alba, J. M., Rodríguez, C., Hellín, T., et al. (2014). Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 219–225. doi: 10.1111/1469-0691.12256

Seth-Smith, H. M. B., Bénard, A., Bruisten, S. M., Versteeg, B., Herrmann, B., Kok, J., et al. (2021). Ongoing evolution of chlamydia trachomatis lymphogranuloma venereum: exploring the genomic diversity of circulating strains. *Microb. Genom* 7:000599. doi: 10.1099/mgen.0.000599

- Stoner, B. P., and Cohen, S. E. (2015). Lymphogranuloma venereum 2015: clinical presentation, diagnosis, and treatment: table 1. *Clin. Infect. Dis.* 61, S865–S873. doi: 10.1093/cid/civ756
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
- Taylor-Brown, A., Madden, D., and Polkinghorne, A. (2018). Culture-independent approaches to chlamydial genomics. *Microb. Genom.* 4:e000145. doi: 10.1099/mgen.0.000145
- Thomson, N. R., Holden, M. T. G., Carder, C., Lennard, N., Lockey, S. J., Marsh, P., et al. (2008). *Chlamydia trachomatis*: genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. *Genome Res.* 18, 161–171. doi: 10.1101/gr.7020108
- Totten, S., MacLean, R., Payne, E., and Severini, A. (2015). Chlamydia and lymphogranuloma venereum in Canada: 2003–2012 summary report. *CCDR* 41, 20–25. doi: 10.14745/ccdr.v41i02a01
- van Aar, F., Kroone, M. M., de Vries, H. J., Götz, H. M., and van Benthem, B. H. (2020). Increasing trends of lymphogranuloma venereum among HIV-negative and asymptomatic men who have sex with men, Netherlands, 2011 to 2017. *Euro Surveill* 25:1900377. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.1900377
- Wang, Y., Skilton, R. J., Cutcliffe, L. T., Andrews, E., Clarke, I. N., and Marsh, P. (2011). Evaluation of a high resolution genotyping method for chlamydia trachomatis using routine clinical samples. *PLoS One* 6:e16971. doi: 10.1371/journal.pone.0016971
- World Health Organization. (2018). *Report on global sexually transmitted infection surveillance 2018*. Geneva: World Health Organization Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/277258> [Accessed April 14, 2022].

Capítulo IV

Diseño de una
nueva PCR a tiempo
real para la detección
de los genotipos L
de *C. trachomatis*

*“No es necesario ser
nadie más que
uno mismo”*

Virginia Woolf



ANTECEDENTES

1. Infecciones extragenitales causadas por *C. trachomatis*

Si bien las infecciones causadas por *C. trachomatis* son en su mayoría infecciones de localización genital (uretritis, cervicitis, salpingitis), también puede causar infecciones en localizaciones no genitales, como a nivel rectal y faríngeo. En los últimos años, diversos estudios han observado un aumento de la prevalencia de las infecciones extragenitales [442], especialmente de la infección anorrectal [443]. Esto puede ser reflejo de un cambio en las prácticas sexuales de la población, pues se han notificado aumentos tanto en la proporción de sexo oral como anal en los últimos años [444].

Sin embargo, aunque las diferentes guías internacionales recomiendan un cribado generalizado en muestras extragenitales en función de las prácticas sexuales e independientemente de la sintomatología, estas recomendaciones no tienen la universalización deseada. Así, en 2022, un estudio del CDC indicaba que sólo el 30% de los ginecólogos y un 60% de los médicos de Atención Primaria solicitaban estudios para la detección de ITS en muestras extragenitales [445]. Por otro lado, estas guías sólo recomiendan el cribado extragenital en población HSH [446], cuando en otros grupos poblacionales las prácticas de sexo oral y anal superan el 40% y el 35%, respectivamente; muchas veces sin uso del preservativo [447]. Además, un estudio realizado en población masculina heterosexual reveló que más del 80% de las infecciones extragenitales por *C. trachomatis* no hubieran sido detectadas siguiendo las actuales recomendaciones del CDC [448].

En cuanto a la validez de las pruebas moleculares para el cribado de las infecciones extragenitales, en 2016 la OMS afirmaba que a pesar de que no estaban aprobadas para su uso en este tipo de muestras, habían demostrado suficiente confianza para la detección de la infección rectal y faríngea [449]. No fue hasta 2019 cuando se aprobó el primer ensayo para muestras extragenitales [450]. Hasta entonces, el diagnóstico en estas localizaciones se ha realizado con plataformas en las que aceptamos una alta especificidad, como demuestran los estudios de detección y secuenciación genómica, pero no tenemos constancia del valor predictivo negativo de las mismas.

1.1. Infección anorrectal por *C. trachomatis*

La prevalencia de la infección anorrectal en mujeres varía ampliamente en función de los diversos estudios, del 2% al 77,3% (mediana del 8,7%) [451]. En HSH, una revisión de 53 estudios puso de manifiesto una prevalencia media del 8,9% [452]. En HSM la prevalencia para la localización rectal oscila entre el 0 y el 11,8% (mediana del 7,7%).

Aunque en mujeres la infección genital por *C. trachomatis* es la más frecuente, no ocurre lo mismo en HSH [451], en los que la prevalencia de la infección anorrectal suele ser mayor que en el de resto de localizaciones [453]. En un estudio reciente realizado en Tailandia, de la totalidad de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, casi la mitad de las infecciones se localizaron a nivel rectal, seguido de la infección uretral y la faríngea [454] (Figura 56).

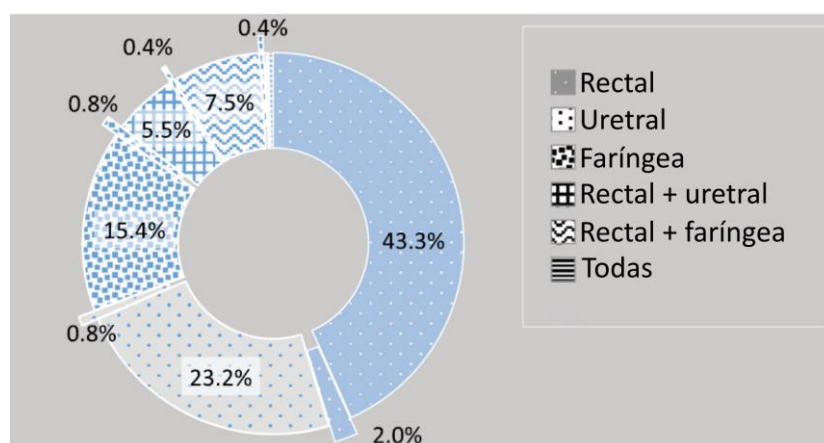


Figura 56. Porcentaje de infecciones causadas por *C. trachomatis* por localización anatómica en HSH. Adaptado de Tongtoyai y cols., 2015 [454].

En HSH, aunque la infección anorrectal se transmite principalmente a través del sexo anal receptivo sin preservativo [455], otras prácticas sexuales se han asociado a la localización anorrectal de *C. trachomatis*, como el *fisting*, el *fingering* o el uso de juguetes sexuales [456]. Sin embargo, estudios realizados en mujeres no encuentran una asociación clara entre la presencia de *C. trachomatis* anorrectal y el sexo receptivo anal [457], lo que hace pensar en otras hipótesis para la adquisición de la infección rectal. Se han propuesto varias causas, como la infranotificación del sexo anal en mujeres o la autoinoculación a partir de las secreciones vaginales [458]. No obstante, recientemente se ha demostrado que este proceso podría ser bidireccional [459], y, por tanto, con importantes implicaciones si no se realiza el cribado rectal en mujeres. Asimismo, el aclaramiento espontáneo de *C. trachomatis* es menos frecuente en mujeres con

infección concomitante genital y rectal que en infecciones únicas en cualquiera de las dos localizaciones [460], lo que apoya la afirmación anterior. Por otro lado, la persistencia de *C. trachomatis* a nivel rectal puede oscilar entre 2 y 42 semanas, con un tiempo medio de 13 semanas, lo que es superior al aclaramiento en muestras genitales (salvo en casos de infecciones simultáneas en dos localizaciones) y superior a la persistencia de la infección rectal por *N. gonorrhoeae* [461]. Esto podría explicar la mayor prevalencia de *C. trachomatis* en muestras rectales comparado con *N. gonorrhoeae* [462].

1.2. Infección orofaríngea por *C. trachomatis*

La prevalencia de la infección orofaríngea por *C. trachomatis* es baja, cuyas cifras son muy variables en función de la población estudiada y las prácticas sexuales de esas poblaciones. Globalmente, en mujeres el rango de prevalencia es del 0,2% al 3,2% con una mediana de 1,7%; en HSM la mediana es del 1,6% [451]. En la población HSH es donde encontramos mayor variabilidad. Así, se han comunicado prevalencias que oscilan entre el 0,5% y el 3,6%, pero se han observado prevalencias del 6,3% en individuos en PrEP y hasta del 17,7% en trabajadores sexuales [463] (Figura 57).

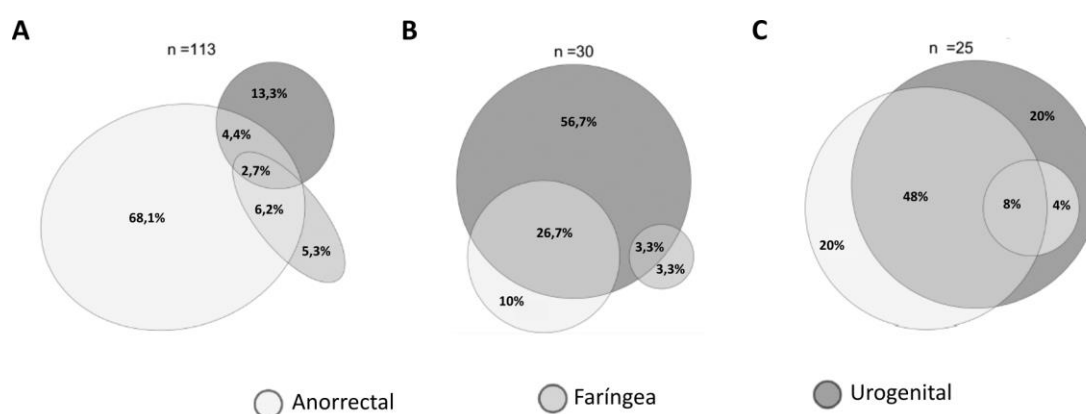


Figura 57. Distribución de la infección anorrectal, faríngea y urogenital por *C. trachomatis* por ubicación anatómica. **A)** HSH y mujeres transgénero. **B)** Hombres cis-heterosexuales. **C)** Mujeres cis-heterosexuales. Adaptado de Man y cols., 2021 [464].

Sin embargo, todos esos estudios coinciden en señalar que la prevalencia de *C. trachomatis* en localización faríngea es inferior a la de *N. gonorrhoeae*, cuando la prevalencia en localización genital y rectal de *C. trachomatis* es 5 y 2 veces superior a la de *N. gonorrhoeae*, respectivamente [462,465]. Esto podría deberse a que *C. trachomatis* posee más afinidad por el epitelio columnar que por el epitelio escamoso, que es el que fundamentalmente cubre la orofaringe [466], lo que podría explicar

también las bajas prevalencias observadas. Sin embargo, esto no quiere decir que la infección orofaríngea no se produzca, sino que posiblemente esto suponga una menor carga bacteriana que podría dificultar su detección por los sistemas convencionales.

Por otra parte, diversos estudios han evaluado la velocidad de aclaramiento de *C. trachomatis* de la orofaringe, aunque con resultados variables. En un estudio realizado en el año 2015, el 36% de los pacientes aclararon *C. trachomatis* de la orofaringe de forma espontánea transcurridos 10 días [467]. Sin embargo, otros estudios observaron que la infección orofaríngea por *C. trachomatis* podría mantenerse entre 42 y 100 días [468] (Figura 58). Estos autores detectaron casos con resultados positivos intermitentes, lo que podría estar relacionado con una menor carga bacteriana en esta localización cercana al umbral de detección de las plataformas moleculares, y proporcionándonos una percepción errónea del rápido aclaramiento [469].

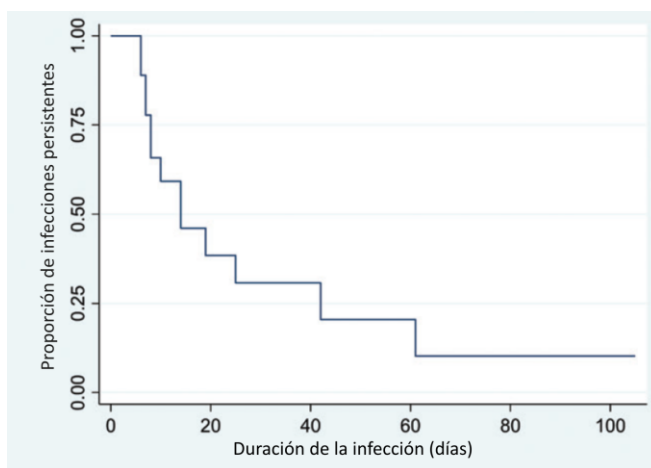


Figura 58. Curvas Kaplan-Meier de la duración de *C. trachomatis* en faringe [468].

Varios autores han evaluado los factores de riesgo asociados a la infección orofaríngea por *C. trachomatis*. En HSH, el sexo oral receptivo con eyaculación se ha asociado significativamente a un riesgo 5,3 veces mayor que los que no realizaban este tipo de prácticas [470]. En mujeres, el sexo oral receptivo se asoció a un mayor riesgo de infección [471]. Otros estudios han asociado la infección orofaríngea con un número elevado de parejas sexuales [453] o historia de ITS previas [472]. Esta información ayudaría a definir con más evidencia qué poblaciones deberían ser cribadas para optimizar una estrategia coste-efectiva.

1.3. Impacto de las infecciones extragenitales causadas por *C. trachomatis*

1.3.1. Impacto en la salud sexual y reproductiva

Las infecciones extragenitales causadas por *C. trachomatis* cursan de manera asintomática en un porcentaje considerable de los pacientes, tanto hombres como mujeres, por lo que su detección depende fundamentalmente del cribado asintomático. En mujeres, hasta el 100% de los casos orofaríngeos son asintomáticos, mientras que, para la infección rectal, esos porcentajes varían del 36% al 100% [451]. En HSH, los datos también son variables. En un estudio realizado en San Francisco, el porcentaje de infección rectal asintomática fue del 85% [473]; sin embargo, en un estudio realizado en Ohio hasta un 42% de los casos cursaron con síntomas [474]. En aquellos casos que cursan con síntomas, en la infección orofaríngea los síntomas más frecuentes son faringitis, linfadenopatías localizadas e inflamación de la cavidad oral; en la infección rectal, los más comunes son prurito, secreción rectal, inflamación, dolor y eritema [453].

Es bien conocido que la infección urogenital por *C. trachomatis* no tratada puede dar lugar a complicaciones a largo plazo, como enfermedad pélvica inflamatoria, endometritis u orquitis, entre otras. No obstante, el riesgo de complicaciones tardías por infecciones rectales y faríngeas causadas por *C. trachomatis* es desconocido, aunque posiblemente sea bajo [475]. Sin embargo, la transmisión bidireccional de *C. trachomatis* entre el recto y el tracto genital femenino puede contribuir a una cronificación de la enfermedad [460] y, por tanto, a mayor riesgo de complicaciones. Además, la infección rectal puede en ocasiones confundirse con enfermedades que consumen recursos, como neoplasias, colitis ulcerosa o enfermedad de Chron [239].

Por otra parte, la infección por *C. trachomatis* se ha asociado a un mayor riesgo de adquisición de VIH. En un metaanálisis en el que se incluyeron 26 estudios, encontraron que el riesgo era dos veces mayor para los HSH infectados por *C. trachomatis* en comparación con los que no lo estaban [476]. Además, el antecedente de dos o más infecciones rectales por *C. trachomatis* se ha asociado con un riesgo 8 veces mayor para la adquisición de VIH [477].

1.3.2. Impacto en la transmisión y el mantenimiento de la epidemia

El alto porcentaje de casos asintomáticos pone de manifiesto que un cribado basado exclusivamente en síntomas puede dar lugar a un importante infradiagnóstico [478] y, por tanto, al mantenimiento de la epidemia. Además, un importante número de infecciones extragenitales podrían pasar desapercibidas si la detección de *C. trachomatis* sólo se realiza en localización genital. Se estima que el cribado selectivo

impediría la detección de entre el 50 y el 75% de las infecciones rectales y faríngeas [451,479]. En las mujeres, hasta el 25% de las infecciones afectan únicamente a una localización anatómica extragenital [464], con un rango del 5-25% para la localización rectal y hasta un 20% de las infecciones en localización faríngea [467]. En HSH, la proporción de infecciones que afectan a un único sitio anatómico extragenital es mayor que en el caso de las mujeres, variando del 63% al 86% [480]. En un estudio de cohortes retrospectivo realizado en Países Bajos, que incluyó a más de 100.000 HSH, el porcentaje de infecciones únicas en localización rectal y faríngea fue casi del 60% y el 5%, respectivamente [481]. Factores como ser trabajador del sexo, tener relaciones sexuales exclusivamente con hombres y la ausencia de síntomas urogenitales se han asociado significativamente con la infección rectal única por *C. trachomatis* [480].

Las infecciones extragenitales podrían actuar como reservorios, contribuyendo a la transmisión de la infección por *C. trachomatis*. Modelos matemáticos sugieren que para explicar las elevadas tasas de infección extrarrectal por *C. trachomatis* son necesarias otras rutas de transmisión distintas al sexo oral y anal [482]. Además, se ha estimado que el porcentaje de infecciones causadas por *C. trachomatis* puede variar en función de las prácticas sexuales; el sexo anal causaría entre el 44,7% y 55,9% de las infecciones, el sexo oral-anorrectal entre el 15,6% y 36,1%, mientras que el sexo oral-uretral causaría entre el 8,7% y el 19,2% de las infecciones. Sin embargo, hay que tener en cuenta que durante los actos sexuales suelen producirse múltiples prácticas sexuales [483], lo que dificulta delimitar claramente qué prácticas sexuales específicas son responsables de la transmisión entre localizaciones anatómicas [484].

En definitiva, conocer las dinámicas de transmisión es crucial para poner en marcha intervenciones eficaces para mejorar el control de las infecciones causadas por *C. trachomatis*, y en general, el control de las ITS. Sin embargo, la transmisión de las ITS sigue patrones complejos, con redes sexuales altamente interconectadas, lo que hace especialmente difícil conocer la epidemiología con exactitud.

2. Infecciones causadas por los genotipos L de *C. trachomatis*

2.1. Infección anorrectal por genotipos L

A diferencia de las infecciones causadas por los genotipos no L de *C. trachomatis*, actualmente las infecciones causadas por los genotipos L son principalmente de localización rectal, que, en el caso de cursar con síntomas, se manifiestan mayoritariamente en forma de proctitis, con síntomas como dolor, tenesmo, secreción mucopurulenta y sangrado.

No obstante, las infecciones anorrectales por los genotipos L son de naturaleza asintomática en una proporción considerable de pacientes. La prevalencia de casos asintomáticos varía en función de los estudios, aunque en la mayoría están en torno al 25% [485]. En nuestra serie, el porcentaje de casos asintomáticos fue del 20,8% (véase Capítulo I). Por otro lado, recientemente se ha comunicado un aumento de la incidencia de LGV asintomático [486], especialmente en personas que viven con VIH [248]. Las causas que podrían explicar este aumento son los cambios en los programas de cribado [487], el aclaramiento más rápido y cuadros menos graves en las reinfecciones, o cambios en los genotipos L circulantes a lo largo del tiempo, pues se han observado síntomas menos graves o ausencia de síntomas en los pacientes infectados por ciertas variantes [228,252].

Según las últimas guías europeas de tratamiento del LGV, el tratamiento de elección de la infección causada por los genotipos L es 100 mg de doxiciclina dos veces al día durante 21 días [488]. Alternativamente, puede utilizarse 1 g de azitromicina 1 vez por semana durante tres semanas. Estos regímenes son los recomendados tanto para la infección sintomática como para la asintomática, incluyendo a los contactos. Sin embargo, en el caso de la infección asintomática, hay cada vez más datos acerca de la posibilidad de utilizar regímenes más cortos, aunque en estos casos es recomendable realizar una prueba de cura tras 4-6 semanas [489].

2.2. Infección extrarrectal por genotipos L

Aunque se han documentado casos de infección causada por genotipos L tanto de localización genital (vaginal/cervical y uretral) como faríngea, las infecciones de localización extrarrectal suponen actualmente una minoría en la epidemiología del LGV. Esto puede deberse al carácter asintomático de estas infecciones o una falta de cribado en estas localizaciones [245].

La infección genital se caracteriza por la presencia de adenopatías inguinales o femorales, unilaterales y muy dolorosas. La infección orofaríngea suele manifestarse en forma de adenopatías cervicales y submandibulares, presencia de exudado faríngeo purulento y en ocasiones con la aparición de úlceras en la cavidad oral [490–492]. A pesar de los datos clínicos, un porcentaje considerable de las infecciones de localización extrarrectal causadas por los genotipos L son asintomáticas, pudiendo alcanzar hasta el 50% de los casos [243,493].

De forma paralela a la infección anorrectal por los genotipos L, se ha planteado que un régimen de tratamiento más corto en las infecciones asintomáticas por genotipos L en localización extrarrectal podría ser suficiente.

2.3. Impacto de las infecciones asintomáticas y extrarrectales por genotipos L

2.3.1. Impacto en el diagnóstico

La detección de los genotipos L es de interés epidemiológico y terapéutico, y debe realizarse de forma temprana, pues el tratamiento suele requerir un régimen de 3 semanas en lugar del régimen habitual de 1 semana para el caso de las infecciones causadas por los genotipos no L de *C. trachomatis* [488].

Actualmente, sólo cuatro ensayos comerciales están disponibles para la detección de los genotipos L de *C. trachomatis* [494]: RealCycler® Universal CHSL-U/CHSL-G (Progenie Molecular, España), RealCycler® Universal ULCGEN-U/ULCGEN-G (Progenie Molecular, España), VIASURE *H. ducreyi* + CT LGV Real-Time PCR Detection Kit (CerTest BIOTEC, España) y Allplex™ Genital Ulcer Assay (Seegene, Corea del Sur). Sin embargo, éstos no han estado disponibles hasta hace relativamente poco; por ello, se propusieron varias estrategias caseras basadas en la amplificación de ácidos nucleicos para su detección. La mayoría de estas estrategias van dirigidas frente a los genes *ompA* y/o *pmpH* [495], aunque la estrategia basada en la delección de 36 pb del gen *pmpH* ha sido la más ampliamente utilizada [256].

Según las últimas guías europeas sobre el manejo del LGV, idealmente la detección de los genotipos L debería estar disponible en todos de los países europeos. Sin embargo, el diagnóstico de LGV no está disponible en la mayoría de los entornos, y habitualmente sólo un centro de referencia a nivel nacional realiza el diagnóstico [209]. En España, sólo el 65% de los laboratorios dispone de técnicas para la adecuada detección de estos genotipos [496].

La carga bacteriana de *C. trachomatis* puede limitar la sensibilidad de los métodos diagnósticos disponibles, pues puede variar en función de distintos factores. Por un lado, las localizaciones anorrectal y faríngea de *C. trachomatis* se han asociado a menores cargas bacterianas que la localización genital [497]. Además, diversos autores han postulado que una mayor carga bacteriana podría estar asociado a una mayor severidad de la infección [498], lo que podría hacer pensar que las infecciones asintomáticas podrían cursar con cargas bacterianas más bajas. Esta afirmación ha sido demostrada en la infección genital, pues la presencia de síntomas como secreción vaginal y uretral

se han asociado consistentemente con una mayor carga bacteriana [499]. Sin embargo, no se ha visto asociación en la infección anorrectal por *C. trachomatis* [500]. Asimismo, se ha observado que las cargas bacterianas en infecciones urogenitales de repetición son más bajas [501], lo cual podría estar relacionado con el desarrollo parcial de inmunidad frente a estas infecciones; no obstante, esto no ha quedado demostrado en la infección anorrectal [502]. Estos estudios no diferencian en ningún caso entre genotipos L y no L de *C. trachomatis*, y, por tanto, en el caso de LGV no se puede conocer con exactitud el papel de la carga bacteriana en la detección por los métodos diagnósticos disponibles.

2.3.2. Impacto en el control de la epidemia de LGV

Diversos autores han postulado que las infecciones extrarrectales y asintomáticas por estos genotipos podrían actuar como reservorio contribuyendo al mantenimiento de la epidemia; de hecho, hasta en un 6,8% de las parejas de pacientes con infección anorrectal por genotipos L presentaron infección uretral por estos mismos genotipos [245], revelando el posible papel de esta localización en la transmisión de la infección.

Para el control de la epidemia actual por LGV deben establecerse una serie de medidas que aborden, entre otras, las cuestiones anteriores. Un ejemplo reciente que nos puede ayudar a entender cómo abordar el control de la epidemia causada por los genotipos L es el éxito en el control de mpox en 2022 (Figura 59).

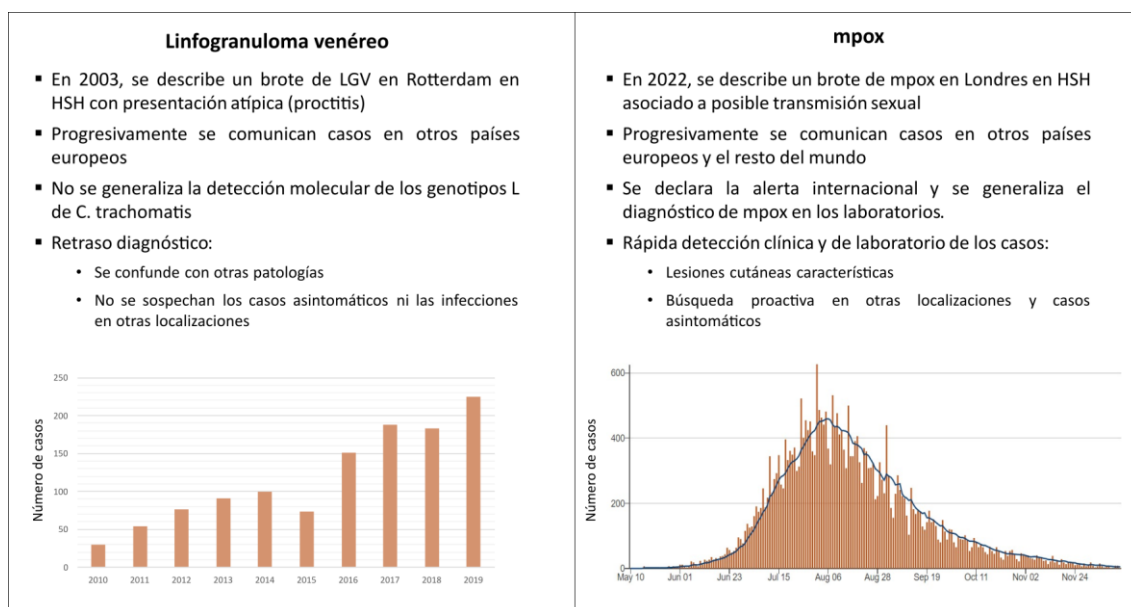


Figura 59. Principales semejanzas y diferencias entre las epidemias asociadas a los genotipos L y mpox [503].

Ambos patógenos tienen en común que, aun siendo endémicos en otras regiones, estaban ausentes en Europa, y ocasionaron una epidemia como consecuencia de una entrada única que se dispersó través de los contactos sexuales, fundamentalmente entre HSH. En el caso de mpox, se declaró la alerta internacional, lo que generó preocupación en la población, las técnicas moleculares se implementaron rápidamente en los laboratorios y se llevó a cabo la búsqueda activa de mpox en varias localizaciones, incluyendo a los individuos asintomáticos; además, se dispone de una vacuna. Por el contrario, el diagnóstico de LGV no se ha implementado en muchos laboratorios, su diagnóstico en ocasiones se realiza con retraso por confusión con otras patologías y no se sospechan las infecciones asintomáticas. Para intentar controlar la epidemia, debemos por tanto extender la disponibilidad de técnicas de genotipado en todos los laboratorios, aumentar la búsqueda activa en población asintomática en muestras extragenitales e incluir el LGV en el diagnóstico diferencial de enfermedades gastrointestinales no infecciosas.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La epidemia actual de LGV afecta fundamentalmente a HSH, con una alta prevalencia en muestras de localización anorrectal. Sin embargo, varios autores han sugerido un infradiagnóstico en muestras no rectales. La elevada proporción de infección asintomática y la menor carga bacteriana en estas localizaciones podría ser una de las causas del mantenimiento de la epidemia y el elevado número de individuos infectados. Conocer la prevalencia de la infección en estas localizaciones es crucial para evaluar el potencial papel que pueden tener este tipo de infecciones en el mantenimiento y control de la epidemia de LGV.

Los **objetivos** de este capítulo fueron:

1. Desarrollo de una nueva PCR a tiempo real anidada que permita aumentar la sensibilidad para la detección de los genotipos L de *C. trachomatis* en casos de baja carga bacteriana.
2. Comparar las sensibilidades de la nueva PCR y la PCR a tiempo real utilizada en la rutina diagnóstica para la detección de los casos de LGV.
3. Reevaluar la prevalencia de genotipos L en muestras de localización extrarrectal y en infecciones asintomáticas mediante el uso de la nueva PCR diagnóstica en muestras clínicas que previamente habían sido clasificadas como negativas para los genotipos L.
4. Evaluar el impacto clínico de la detección de nuevos diagnósticos de LGV.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Extracción del material genético

La extracción del material genético de las muestras utilizadas en este capítulo se llevó a cabo mediante el sistema automatizado NucliSENS® EasyMag® (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un volumen inicial de 300 µL y un volumen de elución de 50 µL.

2. Controles

En todos los ensayos de PCR se utilizaron dos oligonucleótidos sintéticos gBlocks™ (Integrated DNA Technologies, IS, Estados Unidos) diseñados frente a los genes *pmpH* de las cepas de referencia L2/434/Bu (AM884176) y *C. trachomatis* G-9301 (CP0019399) como controles de genotipos L y no L de *C. trachomatis*, respectivamente. La secuencia de estos oligonucleótidos, de 450 pb cada uno, se muestra en la Tabla 10. Además, se utilizaron 10 muestras previamente caracterizadas mediante secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA* como controles adicionales, correspondientes a 5 genotipos L y 5 genotipos no-L.

Tabla 10. Secuencia de los oligonucleótidos sintéticos gBlocks™ utilizados como controles en los experimentos realizados en este capítulo.

Cepa de referencia	Secuencia (5´-3´)
L2/434/Bu (Genotipo L)	AGGGCCAGTTCCTTCAAATTATGCCTTCATTTTCAGCAGGAGAGACACTTACTCTGAG AGATTTTTCGAGTCTGATGTTCTCGAAAAATGTTTCTTGCGGAGAAAAGGGAATGAT CTCCGGGAAAACCGTGAGTATTTCCGGAGCAGGCGAAGTGATTTTCTGGGATAACT CCGTGGGGTATTCTCCTTTATCTACTGTGCCAACCTCATCAACTCCGCTGCTCC AACAGTTAGTGATGCTCGGAAAGGGTCTATTTTTCTGTAGAGACTAGTTTGGAGAT CTCAGGCGTCAAAAAGGGGTCATGTTTCGATAATAATGCCGGGAATTTCCGGAACAG TTTTTCGAGGTAAGAATAATAATAATGCTGGTGGTGGAGGCAGTGGTTCCGCTACA CCATCAAGTACGACTTTTACAGTTAAAAACTGTAAAGGGAAAGTTTCTTTCAC
G-9301 (Genotipo no-L)	AGGGCCAGTTCCTTCAAATTATGCCTTCATTTTCAGCAGGAGAGACACTTACTCTGAA AGATTTTTCGAGTTTGATGTTCTCGAAAAATGTTTCTTGCGGAGAAAAGGGAATGAT CTCAGGGAAAACCGTGAGTATTTCCGGAGCAGGCGAAGTGATTTTCTGGGATAACT CTGTGGGGTATTCTCCTTTGTCTACTGTGCCAGCATCGACTCCAACCTCCTCCAGCACC AGCACCAGCTCCTGCTGCTCAAGCTCTTTATCTCCAACAGTTAGTGATGCTCGGAA AGGGTCTATTTTTCTGTAGAGACTAGTTTGGAGATCTCAGGCGTCAAAAAGGGG TCATGTTTCGATAATAATGCCGGGAATTTCCGGAACAGTTTTTCGAGGTAAGAATAATA ATAATGCTGGTGGTGGAGGCAGTGGTTCCGCTACACCATCAAGTACGACTTT

3. Diseño de la qPCR anidada en un solo tubo

En línea con las estrategias previamente publicadas, se diseñó una nueva PCR basándose en la delección de 36 pb del gen *pmpH* presente exclusivamente en los genotipos L de *C. trachomatis* [256]. Se optó por el diseño de una qPCR anidada en un solo tubo, para lo cual se utilizaron dos pares de cebadores con una amplia diferencia en sus temperaturas de hibridación, de 70°C y 60°C. Los cebadores y la sonda utilizadas para este ensayo se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: cebadores y sonda utilizados para la detección de los genotipos L mediante la qPCR anidada en un solo tubo.

Cebador	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	Tamaño amplicón
LGV-Fext	CCGTGAGTATTTCCGGAGCAGGCGAAGTGA	72,5	227 pb
LGV-Rext	ACCTCGAAAACTGTTCCGAAATCCCGGCA	72,5	
LGV-Fint	TCCGTGGGGTATTCTCCTTT	62,7	125 pb
LGV-Rint	ACGCCTGAGATCTCCAAACT	63,2	
LGV-sonda	FAM-CCGCCTGCTCCAACAGTTAGTGATG-BHQ1	68	-

ext: externos; int: internos.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 15 µl de 2x Taqman Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems), una concentración final de 150 nM para los cebadores y 200 nM para la sonda, y 5 µl del ADN previamente extraído. Esta qPCR se llevó a cabo en termocicladores 7500 Fast Real Time (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación de la polimerasa a 94°C durante 1 min, seguido de 15 ciclos a 94°C durante 5 segundos para la desnaturalización de las hebras de ADN y 70°C durante 45 segundos para la hibridación de los cebadores externos y posterior elongación; a continuación, 40 ciclos a 94°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores internos y la sonda y posterior elongación. La adquisición de la señal de fluorescencia se realizó durante el paso de hibridación y elongación a 60°C.

Una vez seleccionadas las concentraciones óptimas y las condiciones de la qPCR, se determinó la eficiencia (E) y el coeficiente de correlación (R²); para ello, se realizaron 7 diluciones seriadas 1:10 del oligonucleótido sintético gBlocks™ para el gen *pmpH* de la cepa L2/434/Bu, partiendo de una concentración de 10³ ng/ml y utilizando 3 réplicas para cada concentración. Se realizó una recta patrón a partir de los valores de Ct (*cycle*

threshold) obtenidos para cada dilución, calculándose a partir de ella el R^2 y la E , utilizando la siguiente fórmula: $E = \left[\left(10^{\left(\frac{1}{m} \right)} - 1 \right) \right]$, siendo m la pendiente de la recta.

3.1. Evaluación analítica de la qPCR anidada en un solo tubo

Tras la optimización de la qPCR anidada en un solo tubo, ésta se comparó con una qPCR simple, utilizando únicamente la pareja de cebadores internos (Tabla 11).

La reacción de amplificación de la qPCR simple se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo 12,5 μ l de 2x Taqman Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems), una concentración final de 150 nM para los cebadores y 100 nM para la sonda, y 5 μ l del producto amplificado obtenido en la PCR-1. Las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo de activación de la polimerasa a 94°C durante 1 min, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 5 segundos para la desnaturalización de las hebras de ADN y 60°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores internos y posterior elongación. La adquisición de la señal de fluorescencia se realizó durante el paso de hibridación y elongación a 60°C.

La sensibilidad analítica de ambas qPCR se evaluó mediante la utilización de diluciones seriadas 1:10 de los fragmentos gBlocks™ de la cepa L2/434/Bu desde una concentración inicial de 10³ ng/ml hasta 10⁻³ ng/ml. Para el cálculo del límite de detección de cada qPCR se realizaron 20 réplicas de cada dilución, siendo el límite de detección la concentración más baja a la que se obtuvo una amplificación positiva de forma reproducible con una probabilidad del 95%; por tanto, al realizarse 20 réplicas, el límite será la concentración más baja en la que se obtiene un resultado positivo en 19 o 20 réplicas.

Adicionalmente, se compararon los valores de Ct obtenidos mediante el empleo de ambas qPCR en una selección aleatoria de 100 muestras en las que previamente se habían detectado genotipos L de *C. trachomatis* mediante la amplificación y secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*.

3.2. Evaluación clínica

Una vez la qPCR anidada fue evaluada, se seleccionaron retrospectivamente 1.700 muestras en las que se detectó *C. trachomatis* pero que resultaron negativas para los genotipos L mediante el ensayo de qPCR habitual utilizado en la rutina diagnóstica (Capítulo I). Estas muestras procedían de pacientes atendidos en tres centros: Hospital Universitario Ramón y Cajal y los centros especializados en ITS CS Sandoval y Centro

Montesa. Las muestras fueron seleccionadas de forma aleatoria desde enero de 2018 a noviembre de 2019.

Para esta evaluación, se realizaron de forma paralela los ensayos de qPCR anidada en un solo tubo y la qPCR simple. Como los cebadores internos utilizados en este capítulo son distintos a los cebadores utilizados en la rutina diagnóstica habitual de LGV (Tabla 1, Capítulo I), paralelamente a estos ensayos también se realizó la qPCR utilizada en el diagnóstico.

3.2.1. Confirmación de los resultados positivos

Todas las muestras en las que se obtuvo una amplificación positiva para los genotipos L utilizando la qPCR anidada en un solo tubo se volvieron a analizar utilizando la misma PCR, pero esta vez utilizando un agente fluorescente intercalante del ADN en lugar de la sonda; seguidamente, se llevó a cabo el análisis de las curvas de disociación.

Para esta qPCR se empleó un volumen final de 20 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 10 μ L de NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x) (NZYTech, Lisboa, Portugal), una concentración final de las dos parejas de cebadores de 400 nM cada uno y 5 μ L de ADN molde. Estas qPCR se realizaron en termocicladores CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Francia) con las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación de la polimerasa a 95°C durante 3 minutos, seguido de 15 ciclos a 94°C durante 1 minuto para la desnaturalización de las hebras de ADN, 70°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores externos y elongación a 72°C; a continuación, 40 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores internos y la sonda y elongación a 72°C. La adquisición de la señal de fluorescencia se realizó durante el paso elongación a 72°C durante los últimos 40 ciclos. Tras la PCR, las curvas de disociación se obtuvieron mediante la aplicación de un gradiente de temperatura ascendente, de 65°C a 95°C, a una velocidad de 0,5°C/5 seg.

3.2.2. Datos clínicos y epidemiológicos

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes en los que se detectaron genotipos L previamente no diagnosticados, recogiendo datos clínicos y epidemiológicos. Entre ellos, se recogieron edad, sexo, grupo de riesgo, síntomas y signos, estado serológico frente al VIH, ITS concomitantes, tratamiento recibido y controles posteriores al diagnóstico.

RESULTADOS

1. Evaluación analítica

1.1. Eficiencia y rango de linealidad

La curva estándar se construyó utilizando tres réplicas de 7 diluciones, desde una concentración inicial de 10^3 ng/ml a 10^{-5} ng/ml, estableciéndose el rango lineal entre 10^3 - 10^{-2} ng/ml, con un $R^2=0,996$. La eficiencia de la reacción de amplificación en el rango lineal fue del 97,95% (Figura 60).

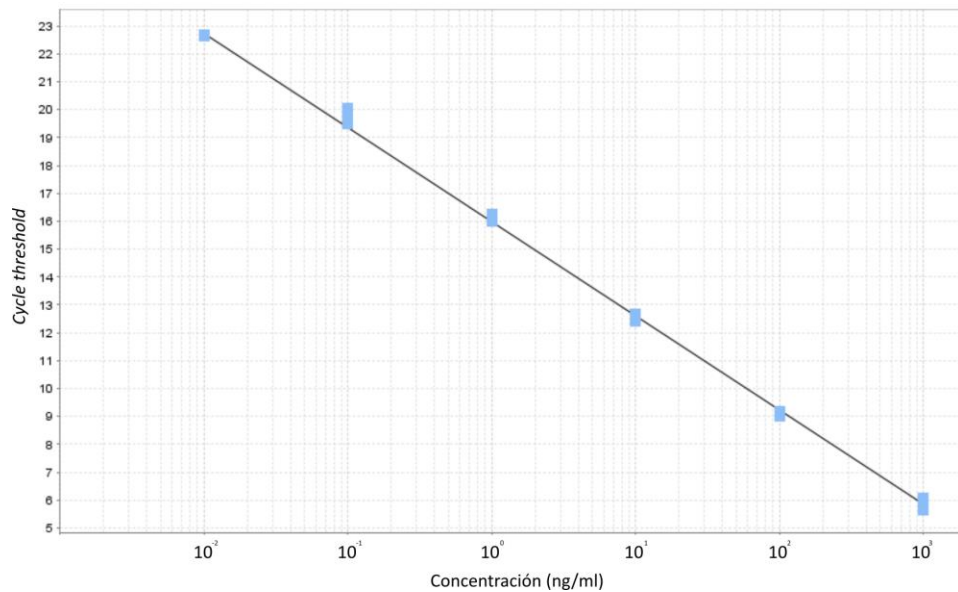


Figura 60. Recta estándar obtenida a partir de las diluciones seriadas (10^3 - 10^{-2} ng/ml) de los fragmentos gBlocks™ de la cepa L2/434/Bu (genotipo L) utilizando la qPCR anidada en un solo tubo.

1.2. Límite de detección

Para el cálculo de los límites de detección se utilizaron las concentraciones de 10^3 ng/ml a 10^{-3} ng/ml, pues en los experimentos previos no se obtuvo ningún resultado positivo con las concentraciones de 10^{-4} y 10^{-5} ng/ml. El límite de detección para las qPCR anidadas en un solo tubo fue 10^{-2} ng/ml, mientras que para la qPCR simple fue de 1 ng/ml, dos diluciones 1:10 menos.

Posteriormente, se compararon los dos ensayos utilizando 100 muestras previamente caracterizadas. Utilizando el ensayo de qPCR anidada en un solo tubo, se obtuvieron valores de Ct más bajos que para la qPCR simple, valor que disminuyó una media de 11,5 ciclos (Figura 61).

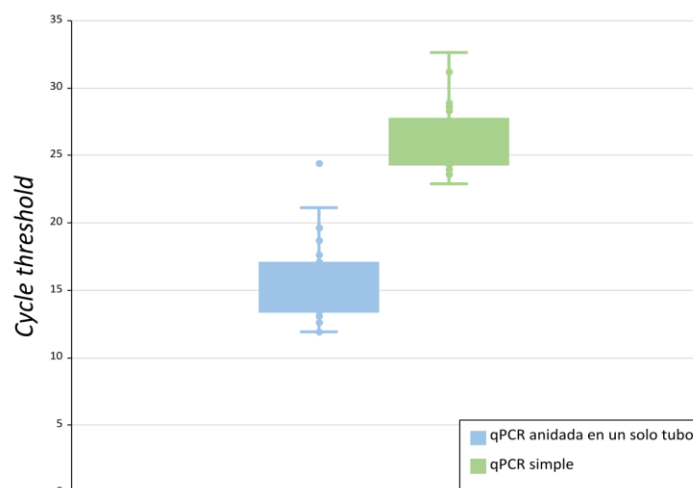


Figura 61. Diagrama de cajas y bigotes obtenido a partir de los valores de Ct para cada una de las qPCR evaluadas. Se utilizaron un total de 100 muestras positivas para los genotipos L.

2. Evaluación clínica: impacto de las infecciones no diagnosticadas

2.1. Nuevos diagnósticos

Se analizaron un total de 1.700 muestras previamente negativas para la detección de genotipos L de *C. trachomatis*. De las muestras analizadas, 595/1.700 (35%) eran muestras rectales, 330/1.700 (19,4%) muestras cervicales, 289/1.700 (17%) muestras uretrales, 254/1.700 (14,9%) orinas, 208/1.700 (12,2%) muestras faríngeas y 24/1.700 (1,4%) úlceras.

Utilizando la qPCR simple tanto con los cebadores internos (Tabla 11) como con los cebadores utilizados a lo largo de esta Tesis (Tabla 1, Capítulo I), no se obtuvo amplificación positiva para los genotipos L de *C. trachomatis*. Sin embargo, utilizando la qPCR anidada en un solo tubo se obtuvo amplificación positiva para los genotipos L en un total de 91 muestras, lo que representa el 5,4% de las muestras testadas. De ellas, 76/91 (83,5%) eran muestras rectales, 6/91 (6,6%) eran úlceras, 4/91 (4,4%) uretrales, 3/91 (3,3%) faríngeas, y 2/91 (2,2%) orinas. Las muestras positivas se analizaron también con el mismo ensayo de qPCR anidado en un solo tubo utilizando un agente intercalante del ADN seguido del análisis de las curvas de disociación. Este análisis reveló que 89/91 (97,8%) muestras amplificaron con un único pico a $81 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, idéntico a los controles positivos incluidos en los ensayos de qPCR y diferente a la temperatura de disociación obtenida para los controles de genotipos no L ($82,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) (Figura 62), confirmándose la presencia de un gen *pmpH* correspondiente a los genotipos L. Sólo 2/91 muestras rectales no se confirmó la presencia de genotipos L mediante la qPCR anidada en un solo tubo.

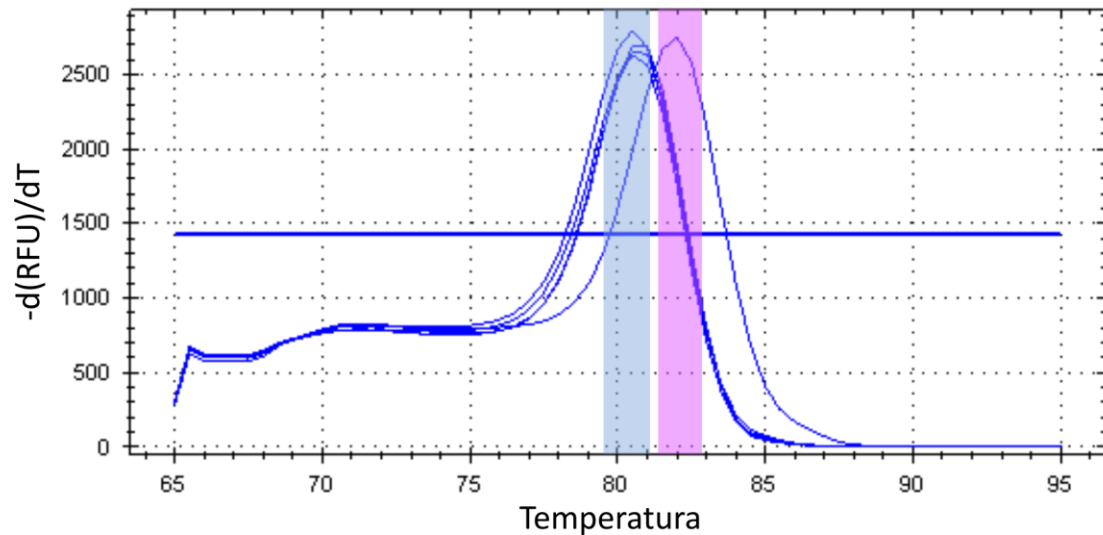


Figura 62. Curvas de *melting* o disociación obtenidas para los genotipos L (en azul, T^a de *melting* = $81 \pm 0,5^\circ\text{C}$) y los genotipos no L (en rosa, T^a de *melting* = $82,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$). RFU: *relative fluorescence units*.

En la rutina diagnóstica habitual, durante el periodo de estudio (23 meses), *C. trachomatis* se detectó en un total de 4.353 muestras procedentes de los pacientes atendidos en los tres centros, correspondientes a 1.711 muestras rectales (39,3%), 807 vagino-cervicales (18,5%), 730 muestras uretrales (18,6%), 635 orinas (16,8%), 377 exudados faríngeos (8,7), 88 úlceras (2%), 3 conjuntivales y 2 adenopatías. Utilizando la qPCR habitual, se detectaron 458 genotipos L, lo que supone una prevalencia global del 10,5%. Aunque sólo se analizaron el 43,6% (1.700/3.895) de la totalidad de las muestras con resultado negativo para los genotipos L, la suma de 89 diagnósticos más de LGV supone una nueva prevalencia del 12,6% (547/4.353), y, por tanto, un aumento del 20%, lo que fue estadísticamente significativo ($p=0,002$).

Atendiendo al tipo de muestra, se observó un aumento del número de genotipos L detectados en todas las muestras, observándose los mayores incrementos en las muestras faríngeas y uretrales (Tabla 12). Cuando evaluamos conjuntamente la infección genital (exudados uretrales, cervicales y orinas), el aumento de la prevalencia fue del 50%.

Tabla 12. Prevalencia de los genotipos L por localización utilizando la qPCR simple y la qPCR anidada en un solo tubo.

Tipo de muestra	Genotipos L detectados mediante qPCR simple (n=4.353)	Genotipos L detectados mediante qPCR anidada en un solo tubo (n=1.700)	Nueva prevalencia	Incremento en la prevalencia
Rectal	392/1.711 (22,9%)	74/594 (12,6%)	466/1.711 (27,2%)	18,9%
Úlcera	51/88 (58,0%)	6/24 (25,0%)	57/88 (64,8%)	11,8%
Uretral	6/730 (0,8%)	4/289 (1,4%)	10/730 (1,4%)	66,7%
Cervical	3/807 (0,4%)	1/331 (0,3%)	4/807 (0,5%)	33,3%
Faríngeo	1/377 (0,3%)	3/208 (1,4%)	4/377 (1,1%)	300,0%
Orina	5/635 (0,8%)	2/254 (0,8%)	7/635 (1,1%)	40,0%
Total	458/4.353 (10,5%)	89/1.700 (5,2%)	547/4.353 (12,6%)	20,0%

2.2. Datos clínicos y epidemiológicos de los nuevos diagnósticos

Las 89 muestras en las que se detectaron los genotipos L mediante la nueva qPCR correspondieron a 86 pacientes diferentes. En dos de los tres pacientes de los que se disponía de dos muestras, esas dos muestras estuvieron separadas por 8 meses en ambos casos. En el paciente restante, las dos muestras correspondieron al mismo episodio, un exudado rectal y una úlcera.

Finalmente, se pudo realizar la revisión de 66/86 historias clínicas, aunque no siempre fue posible disponer de todos los datos clínicos y epidemiológicos. Globalmente, la mediana de edad fue 32 años, 63 eran hombres (95,5%) y 3 eran mujeres. De los hombres, el 100% eran HSH y 6/66 (9,1%) eran trabajadores del sexo. En cuanto a la infección por VIH, el 52,3% (30/57) estaban infectados por el VIH, la mayoría de ellos con una infección bien controlada y una carga viral indetectable (29/30); sólo en un paciente el diagnóstico de *C. trachomatis* coincidió con el diagnóstico de la infección por VIH.

Con respecto a la sintomatología, 29/60 (48,3%) de los pacientes eran asintomáticos en el momento del diagnóstico; 26/54 (48,1%) para la localización rectal, 2/3 (66,7%) en las muestras uretrales y 1/2 (50%) en las faríngeas. Las manifestaciones clínicas más frecuentes a nivel rectal (incluyendo las úlceras rectales) fueron la secreción mucopurulenta (18/25; 72%) y el dolor rectal y abdominal (17/25; 68,0%). De los tres pacientes en los que se detectaron los genotipos en localización faríngea, se pudo obtener los datos clínicos en dos de ellos; uno era asintomático en el momento del

diagnóstico; sin embargo, el otro paciente presentaba adenopatías cervicales bilaterales, dolorosas y odinofagia. En cuanto a las muestras de origen uretral, dos de los pacientes estaban asintomáticos en el momento del diagnóstico y el tercer paciente presentaba una úlcera concomitante. El 62,6% de los pacientes (30/48) presentaban una ITS concomitante a la detección de *C. trachomatis*, en su mayoría *N. gonorrhoeae* (28/30). Sin embargo, no hubo diferencias en la sintomatología en función de la presencia concomitante de *N. gonorrhoeae*, siendo el porcentaje de sintomáticos del 37,5% (6/16) y del 41,7% (5/12) para los pacientes con y sin gonococo concomitante, respectivamente ($p=0,883$).

En cuanto al tratamiento, 42/52 (80,8%) pacientes recibieron una pauta corta; bien con una dosis única de azitromicina de 1 g (37/52; 71,2%) o bien 100 mg de doxiciclina dos veces al día durante 7 días (5/52; 9,6%). Diez pacientes recibieron una pauta larga de 21 días bien con doxiciclina (9/52; 17,3%) o bien con una dosis de azitromicina semanal durante 3 semanas (1/52; 1,9%), debido a la alta sospecha clínica de infección por genotipos L o por persistencia de la clínica tras una semana de tratamiento. Además, 3 pacientes acudieron de nuevo al centro poco tiempo después del diagnóstico de la infección por *C. trachomatis* por persistencia de los síntomas. En resumen, del conjunto de pacientes sintomáticos (31/60; 51,7%), 13 tuvieron que recibir un tratamiento más largo o bien los síntomas persistieron, lo que supone el 41,9% de los casos. Se realizó PCR de control (prueba de cura) en 19 de los 44 pacientes, con amplificación positiva para *C. trachomatis* en 3 casos (uno de ellos identificado como genotipo L).

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha diseñado una nueva PCR con mayor sensibilidad que la PCR utilizada en la rutina diagnóstica habitual para la detección de los genotipos L de *C. trachomatis*. Esta PCR permitió detectar 89 casos más de LGV entre 1.700 muestras previamente clasificadas como negativas para los genotipos L, lo que supuso un aumento en la prevalencia durante el periodo de estudio del 20%, especialmente en la infección genital (50%) y faríngea (300%). En un estudio realizado en Países Bajos, 23 HSH con infección faríngea por *C. trachomatis* habían tenido relaciones sexuales con parejas diagnosticadas de LGV, pero sólo en dos pacientes finalmente se detectaron genotipos L [467], lo que podría indicar que el diagnóstico convencional en este tipo de muestras puede no estar optimizado.

El hecho de que los genotipos L en estas muestras no se detectaran de forma correcta en la rutina diagnóstica habitual podría deberse a varias causas. En primer lugar, podría estar relacionado con una menor carga bacteriana. En estas muestras sí se llevó a cabo de forma correcta la detección de *C. trachomatis*. Esta aparente discrepancia se explica porque las plataformas moleculares utilizadas en rutina van dirigidas frente a varias dianas, tanto en el cromosoma, como en el plásmido, presente en varias copias por célula. Sin embargo, la detección de los genotipos L se llevó a cabo mediante una qPCR casera basada en la delección del gen *pmpH*, gen cromosómico presente en una única copia por cada célula bacteriana. Además, las localizaciones rectal y faríngea de *C. trachomatis* se han asociado a menores cargas bacterianas que la localización genital [469,497], lo que podría hacer más difícil su detección. En segundo lugar, es posible que en estas muestras existiera una coinfección entre genotipos L y no-L de *C. trachomatis*, con una sobrerrepresentación de estos últimos frente a los primeros, lo que podría impedir la correcta detección de los genotipos L. La coinfección entre genotipos L y no-L se ha documentado en varios estudios, con prevalencias variables; en un estudio realizado en España, hasta en un 10,9% de los casos se detectaron simultáneamente genotipos invasivos y no invasivos [167]. Sin embargo, en este capítulo no realizamos la evaluación de la presencia de coinfecciones y no se pudo disponer de los valores de Ct en el diagnóstico inicial de *C. trachomatis*, que nos hubiera ayudado a conocer de forma indirecta la carga bacteriana en esas muestras. En la revisión de las historias clínicas, hasta en 5 ocasiones se documentó que la amplificación observada estaba cerca del *cut off* de la técnica, pero no es suficiente para establecerlo como causa de lo observado.

De manera general, casi la mitad de las infecciones diagnosticadas mediante el uso de la nueva PCR fueron asintomáticas. El porcentaje de asintomáticos en nuestra serie

(Capítulo I) fue del 21% (46/219), muy por debajo del porcentaje de asintomáticos en este subgrupo. En varios estudios se ha relacionado una mayor severidad de la infección con mayores cargas bacterianas [498], y, por tanto, las infecciones asintomáticas podrían cursar con cargas bacterianas más bajas, aunque esto no se ha demostrado para las infecciones anorrectales [500]. Recientemente, la necesidad de la detección de las infecciones asintomáticas por *C. trachomatis*, especialmente en infecciones faríngeas y rectales, está siendo sometida a debate [475]. Uno de los argumentos en contra es el escaso impacto clínico de las infecciones asintomáticas en estas localizaciones, con pocas evidencias de complicaciones a largo plazo. Sin embargo, el LGV en ausencia de tratamiento puede causar importantes secuelas y complicaciones, como proctocolitis, fístulas y estenosis rectal, aunque no existe una evidencia clara de las complicaciones en la infección asintomática.

El tratamiento de la infección asintomática por *C. trachomatis* también ha sido discutido, ya que la incidencia de las ITS en población asintomática no está disminuyendo [504] y el sobretratamiento podría favorecer la selección de microorganismos resistentes a los antibióticos, especialmente en el caso de la de azitromicina [479]. Sin embargo, otros autores abogan que el tratamiento de estas infecciones podría ayudar a limitar la propagación de *C. trachomatis* en la población general, pudiendo reducir la susceptibilidad a la infección por VIH. El tratamiento de elección para la infección causada por los genotipos L supone un régimen más largo que en las infecciones causadas por el resto de los genotipos (3 semanas versus 1 semana). El tratamiento recibido por los pacientes diagnosticados gracias a la nueva PCR fue en su mayoría un tratamiento corto; sin embargo, diez pacientes recibieron un tratamiento de mayor duración como consecuencia de la persistencia de síntomas o por alta sospecha de infección por genotipos L, a pesar del resultado negativo. Además, tres pacientes volvieron voluntariamente por persistencia de síntomas y tres pacientes persistieron con PCR positiva para *C. trachomatis* en las pruebas de cura. Estos datos ponen de manifiesto que el correcto genotipado de las infecciones causadas por *C. trachomatis* es esencial para instaurar el tratamiento óptimo, especialmente en los casos sintomáticos.

Una limitación de la estrategia propuesta en este capítulo es que no sabemos la viabilidad de los genotipos detectados, y si son responsables finales de la clínica observada. Para ello, estrategias futuras basadas en la detección de ARN mediante PCR digital podrían resolver esta cuestión [505].

Las infecciones causadas por los genotipos asociados a LGV posiblemente estén infradiagnosticadas a nivel global. Las principales causas son la falta de sistemas de

vigilancia adecuados en la mayoría de los países, la falta de herramientas diagnósticas apropiadas o la naturaleza asintomática de la infección en una proporción considerable de pacientes [506]. Por tanto, disponer de herramientas diagnósticas adecuadas como la propuesta en este capítulo, es esencial para el control de la infección, especialmente en grupos de alto riesgo [493].

Conclusiones



1. La caracterización molecular de la epidemia de LGV en Madrid durante un periodo de 10 años revela un escenario cada vez más complejo, con al menos 5 nodos de transmisión, un incremento del 740% en el número de casos, y una mayor diversidad de genovariantes y detección de formas recombinantes. Como consecuencia, su control y erradicación serán cada vez más difíciles.
2. El análisis de la epidemia durante estos 10 años permitió identificar 2 periodos. Si bien durante el 2010-2014 la epidemia parecía ralentizarse, en el periodo 2015-2019 se observa una aceleración en el número de casos, duplicando la incidencia del periodo previo.
3. El LGV sigue asociado mayoritariamente a población de hombres que tienen sexo con hombres, aunque se observa una lenta propagación hacia otras poblaciones en riesgo de exposición a infecciones de transmisión sexual.
4. Se observa una disociación entre LGV y VIH a lo largo del tiempo, descendiendo de un 84,3% al comienzo del estudio a un 51,1% a principios de 2021. Esta disociación es especialmente destacada en las nuevas variantes identificadas durante el periodo 2015-2019, como L2bV4, donde tan solo el 46,2% de los pacientes son VIH positivos. Este hallazgo es probablemente consecuencia de una mejora en las estrategias diagnósticas y rápido acceso al tratamiento antirretroviral frente al VIH.
5. La pandemia por COVID-19 y las medidas instauradas tuvieron un impacto negativo a todos los niveles, especialmente el ámbito sociosanitario. Se observó un aumento de los casos diagnosticados de LGV durante el primer año pandémico, pasando de 24,5 a 38,5 casos al mes. Además, el porcentaje de casos respecto al total de muestras positivas para *Chlamydia trachomatis* tras el fin de las medidas más estrictas aumentó desde el 13,1% al 28,4%, revelando como, a pesar de las restricciones de movilidad y distanciamiento social, la pandemia de COVID-19 aceleró la dispersión y descontrol de la epidemia de LGV.

6. El esquema de tipado molecular propuesto en esta Tesis basado en la selección de los genes más variables de los genotipos L proporciona el mayor poder de discriminación comparado con los actuales esquemas disponibles para el tipado de *C. trachomatis*, a excepción de la secuenciación de genomas completos. Se trata por tanto de una herramienta muy útil para conocer con mayor precisión la epidemiología del LGV, así como para evaluar situaciones clínicas como las reinfecciones o el fracaso del tratamiento.
7. El análisis temporal de las genovariantes detectadas mediante el esquema propuesto reveló la selección y éxito adaptativo de las genovariantes responsables de cada nodo de transmisión. Por otro lado, el análisis espacial mostró que la zona centro de Madrid es un área crítica en la transmisión del LGV, donde se observa una mayor acumulación de genovariantes.
8. La nueva PCR anidada para la detección de los genotipos L mostró una sensibilidad superior a las técnicas de diagnóstico habitual, lo que permitió identificar 89 nuevos casos de LGV que no habían sido previamente detectados por las técnicas convencionales. La elevada detección de casos asintomáticos y en muestras de origen no rectal indica que el diagnóstico en estas situaciones puede no estar totalmente optimizado.
9. La detección de casos que habían pasado desapercibidos mediante la utilización de las técnicas diagnósticas habituales revela su posible implicación en el mantenimiento de la epidemia de LGV, por lo que su correcta detección es esencial para abordar el control de la infección causada por estos genotipos.

Bibliografía



- [1] Sexually transmitted infections (STIs) n.d. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)) (accessed December 14, 2022).
- [2] Turovskiy Y, Sutyak Noll K, Chikindas ML. The aetiology of bacterial vaginosis. *J Appl Microbiol* 2011;110:1105–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04977.x>.
- [3] Neal CM, Kus LH, Eckert LO, Peipert JF. Noncandidal vaginitis: a comprehensive approach to diagnosis and management. *Am J Obstet Gynecol* 2020;222:114–22. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.09.001>.
- [4] Magalhães-Barbosa MC de, Prata-Barbosa A, Robaina JR, Raymundo CE, Lima-Setta F, Cunha AJLA da. Trends of the microcephaly and Zika virus outbreak in Brazil, January–July 2016. *Travel Med Infect Dis* 2016;14:458–63. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.09.006>.
- [5] Abbate JL, Murall CL, Richner H, Althaus CL. Potential Impact of Sexual Transmission on Ebola Virus Epidemiology: Sierra Leone as a Case Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016;10:e0004676. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004676>.
- [6] Rapid risk assessment: Increase in extensively-drug resistant *Shigella sonnei* infections in men who have sex with men in the EU/EEA and the UK. European Centre for Disease Prevention and Control 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-increase-extensively-drug-resistant-shigella-sonnei> (accessed December 8, 2022).
- [7] Outbreak of sexually transmitted, extensively drug-resistant *Shigella sonnei* in the UK, 2021–22: a descriptive epidemiological study - The Lancet Infectious Diseases n.d. [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(22\)00370-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(22)00370-X/fulltext) (accessed December 8, 2022).
- [8] Ndumbi P, Freidl GS, Williams CJ, Mårdh O, Varela C, Avellón A, et al. Hepatitis A outbreak disproportionately affecting men who have sex with men (MSM) in the European Union and European Economic Area, June 2016 to May 2017. *Euro Surveill* 2018;23:1700641. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.33.1700641>.
- [9] Fraile M, Barreiro Alonso E, de la Vega J, Rodríguez M, García-López R, Rodríguez M. Acute hepatitis due to hepatitis A virus during the 2017 epidemic expansion in Asturias. Spain. *Med Clin (Barc)* 2019;152:391–4. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.07.009>.
- [10] Graham F. Daily briefing: Mpox — a new name for monkeypox. *Nature* 2022. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-04233-y>.
- [11] Declaración del Director General de la OMS en la rueda de prensa celebrada tras la reunión del Comité de Emergencias del RSI sobre el brote de viruela símica en varios países - 23 de julio de 2022 n.d. <https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-the-press-conference-following-IHR-emergency-committee-regarding-the-multi-country-outbreak-of-monkeypox--23-july-2022> (accessed December 8, 2022).
- [12] Thornhill JP, Palich R, Ghosn J, Walmsley S, Moschese D, Cortes CP, et al. Human monkeypox virus infection in women and non-binary individuals during the 2022 outbreaks: a global case series. *The Lancet* 2022;400:1953–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02187-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02187-0).
- [13] Antinori A, Mazzotta V, Vita S, Carletti F, Tacconi D, Lapini LE, et al. Epidemiological, clinical and virological characteristics of four cases of monkeypox support transmission through sexual contact, Italy, May 2022. *Eurosurveillance* 2022;27:2200421. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.22.2200421>.
- [14] Lapa D, Carletti F, Mazzotta V, Matusali G, Pinnetti C, Meschi S, et al. Monkeypox virus isolation from a semen sample collected in the early phase of infection in a patient with prolonged seminal viral shedding. *Lancet Infect Dis* 2022;22:1267–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00513-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00513-8).
- [15] Curran KG. HIV and Sexually Transmitted Infections Among Persons with Monkeypox — Eight U.S. Jurisdictions, May 17–July 22, 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2022;71. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7136a1>.
- [16] Sexually transmitted infections (STIs) n.d. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted->

- infections-(stis) (accessed December 18, 2022).
- [17] Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS ONE* 2015;10:e0143304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143304>.
- [18] Van Gerwen OT, Muzny CA, Marrazzo JM. Sexually transmitted infections and female reproductive health. *Nat Microbiol* 2022;7:1116–26. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01177-x>.
- [19] Mohammed H, Hughes G, Fenton KA. Surveillance systems for sexually transmitted infections: a global review. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2016;29:64–9. <https://doi.org/10.1097/QCO.00000000000000235>.
- [20] Chlamydia infection - Annual Epidemiological Report for 2019. European Centre for Disease Prevention and Control 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/chlamydia-infection-annual-epidemiological-report-2019> (accessed December 9, 2022).
- [21] Gonorrhoea - Annual Epidemiological Report for 2018. European Centre for Disease Prevention and Control 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2018> (accessed December 8, 2022).
- [22] Syphilis - Annual Epidemiological Report for 2019. European Centre for Disease Prevention and Control 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/syphilis-annual-epidemiological-report-2019> (accessed December 9, 2022).
- [23] Unidad de vigilancia de VIH, ITS y hepatitis B y C. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2019. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública; 2021.
- [24] Zetola NM, Bernstein KT, Wong E, Louie B, Klausner JD. Exploring the relationship between sexually transmitted diseases and HIV acquisition by using different study designs. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50:546–51. <https://doi.org/10.1097/qai.0b013e318195bd2b>.
- [25] Ward H, Rönn M. The contribution of STIs to the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS* 2010;5:305–10. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833a8844>.
- [26] Fox J, Fidler S. Sexual transmission of HIV-1. *Antiviral Research* 2010;85:276–85. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.012>.
- [27] Barbour JD, Sauer MM, Sharp ER, Garrison KE, Long BR, Tomiyama H, et al. HIV-1/HSV-2 Co-Infected Adults in Early HIV-1 Infection Have Elevated CD4+ T Cell Counts. *PLOS ONE* 2007;2:e1080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001080>.
- [28] Scott-Wittenborn N, Fakhry C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Semin Radiat Oncol* 2021;31:286–96. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.04.001>.
- [29] Pimple S, Mishra G. Cancer cervix: Epidemiology and disease burden. *Cytojournal* 2022;19:21. https://doi.org/10.25259/CMAS_03_02_2021.
- [30] Hepatitis B n.d. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (accessed December 9, 2022).
- [31] Congenital Syphilis - STI Treatment Guidelines 2022. <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/congenital-syphilis.htm> (accessed December 9, 2022).
- [32] Kimberlin D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes* 2004;11 Suppl 2:65A-76A.
- [33] Mahant S, Hall M, Schondelmeyer AC, Berry JG, Kimberlin DW, Shah SS, et al. Neonatal Herpes Simplex Virus Infection Among Medicaid-Enrolled Children: 2009-2015. *Pediatrics* 2019;143:e20183233. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-3233>.
- [34] Goulart ACX, Farnezi HCM, França JPBM, Santos AD, Ramos MG, Penna MLF. HIV, HPV and Chlamydia trachomatis: impacts on male fertility. *JBRA Assist Reprod* 2020;24:492–7. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200020>.
- [35] Brunham RC, Gottlieb SL, Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med* 2015;372:2039–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1411426>.
- [36] Reekie J, Donovan B, Guy R, Hocking JS, Kaldor JM, Mak DB, et al. Risk of Pelvic Inflammatory Disease in Relation to Chlamydia and Gonorrhoea Testing, Repeat

- Testing, and Positivity: A Population-Based Cohort Study. *Clin Infect Dis* 2018;66:437–43. <https://doi.org/10.1093/cid/cix769>.
- [37] Committee on Prevention and Control of Sexually Transmitted Infections in the United States, Board on Population Health and Public Health Practice, Health and Medicine Division, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *Sexually Transmitted Infections: Adopting a Sexual Health Paradigm*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2021. <https://doi.org/10.17226/25955>.
- [38] Global Health Sector Strategies n.d. <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/strategies/global-health-sector-strategies> (accessed April 17, 2022).
- [39] Kumar S, Chesson HW, Spicknall IH, Kreisel KM, Gift TL. The Estimated Lifetime Medical Cost of Chlamydia, Gonorrhea, and Trichomoniasis in the United States, 2018. *Sex Transm Dis* 2021;48:238–46. <https://doi.org/10.1097/olq.0000000000001357>.
- [40] Chesson HW, Mayaud P, Aral SO. Sexually Transmitted Infections: Impact and Cost-Effectiveness of Prevention. In: Holmes KK, Bertozzi S, Bloom BR, Jha P, editors. *Major Infectious Diseases*. 3rd ed., Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2017.
- [41] Weatherly H, Drummond M, Claxton K, Cookson R, Ferguson B, Godfrey C, et al. Methods for assessing the cost-effectiveness of public health interventions: key challenges and recommendations. *Health Policy* 2009;93:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2009.07.012>.
- [42] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2020;396:1204–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).
- [43] Cassini A, Colzani E, Pini A, Mangen M-JJ, Plass D, McDonald SA, et al. Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. *Eurosurveillance* 2018;23:17. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.16.17-00454>.
- [44] Chen Y-C, Liu H-Y, Li C-Y, Lee N-Y, Li C-W, Ko W-C, et al. The rising trend of sexually transmitted infections among HIV-infected persons: a population-based cohort study in Taiwan, 2000 through 2010. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015;68:432–8. <https://doi.org/10.1097/QAI.00000000000000477>.
- [45] Shockman S, Buescher LS, Stone SP. Syphilis in the United States. *Clinics in Dermatology* 2014;32:213–8. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.08.005>.
- [46] Burchell AN, Allen VG, Moravan V, Gardner S, Raboud J, Tan DH, et al. Patterns of syphilis testing in a large cohort of HIV patients in Ontario, Canada, 2000–2009. *BMC Infectious Diseases* 2013;13:246. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-246>.
- [47] Bourchier L, Malta S, Temple-Smith M, Hocking J. Do we need to worry about sexually transmissible infections (STIs) in older women in Australia? An investigation of STI trends between 2000 and 2018. *Sex Health* 2020;17:517–24. <https://doi.org/10.1071/SH20130>.
- [48] Syphilis - Annual Epidemiological Report for 2016. European Centre for Disease Prevention and Control 2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/syphilis-annual-epidemiological-report-2016> (accessed December 10, 2022).
- [49] Syphilis Statistics - STD information from CDC 2022. <https://www.cdc.gov/std/syphilis/stats.htm> (accessed December 14, 2022).
- [50] 2014 STDs Reported in the United States | CDC 2019. <https://www.cdc.gov/nchhstp/newsroom/2015/std-surveillance-report.html> (accessed December 14, 2022).
- [51] Hsu P-C, Lin W-H, Kuo T-H, Lee H-M, Kuo C, Li C-Y. A Population-Based Cohort Study of All-Cause and Site-Specific Cancer Incidence Among Patients With Type 1 Diabetes Mellitus in Taiwan. *J Epidemiol* 2015;25:567–73. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20140197>.
- [52] Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2020 2022. <https://www.cdc.gov/std/statistics/2020/default.htm> (accessed December 14, 2022).
- [53] Gonorrhoea - Annual Epidemiological Report for 2014. European Centre for Disease Prevention and Control 2016.

- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2014> (accessed December 14, 2022).
- [54] 2015 STD Surveillance Report, Newsroom 2016 | CDC 2019. <https://www.cdc.gov/nchhstp/newsroom/2016/2015-std-surveillance-report.html> (accessed December 14, 2022).
- [55] Annual Epidemiological Report 2014 – Chlamydia. European Centre for Disease Prevention and Control 2016. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/annual-epidemiological-report-2014-chlamydia> (accessed December 10, 2022).
- [56] Área de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 1995-2013. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología/Subdirección General de Promoción de la salud y Epidemiología - Plan Nacional sobre el Sida; 2015.
- [57] Lymphogranuloma venereum - Annual Epidemiological Report for 2016. European Centre for Disease Prevention and Control 2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/lymphogranuloma-venereum-annual-epidemiological-report-2016> (accessed December 14, 2022).
- [58] Lymphogranuloma venereum Annual Epidemiological Report 2019 2019:5.
- [59] Chow EPF, Grulich AE, Fairley CK. Epidemiology and prevention of sexually transmitted infections in men who have sex with men at risk of HIV. *Lancet HIV* 2019;6:e396–405. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(19\)30043-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(19)30043-8).
- [60] Johnson AM, Gill ON. Evidence for recent changes in sexual behaviour in homosexual men in England and Wales. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1989;325:153–61. <https://doi.org/10.1098/rstb.1989.0080>.
- [61] Kippax S, Crawford J, Davis M, Rodden P, Dowsett G. Sustaining safe sex: A longitudinal study of a sample of homosexual men. *AIDS* 1993;7:257–63. <https://doi.org/10.1097/00002030-199302000-00015>.
- [62] Khosropour CM, Dombrowski JC, Swanson F, Kerani RP, Katz DA, Barbee LA, et al. Trends in Serosorting and the Association With HIV/STI Risk Over Time Among Men Who Have Sex With Men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;72:189–97. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000947>.
- [63] Golden MR, Stekler J, Hughes JP, Wood RW. HIV serosorting in men who have sex with men: is it safe? *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;49:212–8. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31818455e8>.
- [64] Fairley CK, Chow EPF, Simms I, Hocking JS, Ong JJ. Accessible health care is critical to the effective control of sexually transmitted infections. *Sex Health* 2022. <https://doi.org/10.1071/SH22042>.
- [65] Stolte IG, Dukers NHTM, Geskus RB, Coutinho RA, de Wit JBF. Homosexual men change to risky sex when perceiving less threat of HIV/AIDS since availability of highly active antiretroviral therapy: a longitudinal study. *AIDS* 2004;18:303–9. <https://doi.org/10.1097/00002030-200401230-00021>.
- [66] Dukers NH, Goudsmit J, de Wit JB, Prins M, Weverling GJ, Coutinho RA. Sexual risk behaviour relates to the virological and immunological improvements during highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *AIDS* 2001;15:369–78. <https://doi.org/10.1097/00002030-200102160-00010>.
- [67] Brennan DJ, Welles SL, Miner MH, Ross MW, Rosser BRS. HIV TREATMENT OPTIMISM AND UNSAFE ANAL INTERCOURSE AMONG HIV-POSITIVE MEN WHO HAVE SEX WITH MEN: FINDINGS FROM THE POSITIVE CONNECTIONS STUDY. *AIDS Educ Prev* 2010;22:126–37. <https://doi.org/10.1521/aeap.2010.22.2.126>.
- [68] Sullivan PS, Drake AJ, Sanchez TH. Prevalence of treatment optimism-related risk behavior and associated factors among men who have sex with men in 11 states, 2000-2001. *AIDS Behav* 2007;11:123–9. <https://doi.org/10.1007/s10461-006-9100-z>.
- [69] Ekstrand ML, Stall RD, Paul JP, Osmond DH, Coates TJ. Gay men report high rates of unprotected anal sex with partners of unknown or discordant HIV status. *AIDS* 1999;13:1525–33. <https://doi.org/10.1097/00002030-199908200-00013>.
- [70] Closson EF, Mimiaga MJ, Sherman SG, Tangmunkongvorakul A, Friedman RK, Limbada M, et al. Intimacy versus isolation: a qualitative study of sexual practices among sexually active HIV-infected patients in HIV care in Brazil, Thailand, and Zambia. *PLoS One* 2015;10:e0120957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120957>.

- [71] Martin IM, Ison CA. Rise in gonorrhoea in London, UK. *London Gonococcal Working Group. Lancet* 2000;355:623. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)05495-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)05495-1).
- [72] Donovan B, Bodsworth NJ, Rohrsheim R, McNulty A, Tapsall JW. Increasing gonorrhoea reports--not only in London. *Lancet* 2000;355:1908.
- [73] Higgins SP, Sukthankar A, Mahto M, Jarvis RR, Lacey HB. Syphilis increases in Manchester, UK. *Lancet* 2000;355:1466. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74666-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74666-3).
- [74] Fennema JS, Cairo I, Coutinho RA. [Substantial increase in gonorrhoea and syphilis among clients of Amsterdam Sexually Transmitted Diseases Clinic]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000;144:602-3.
- [75] Trends in HIV/AIDS Diagnoses --- 33 States, 2001--2004 n.d. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5445a1.htm> (accessed December 10, 2022).
- [76] Klausner JD, Wolf W, Fischer-Ponce L, Zolt I, Katz MH. Tracing a syphilis outbreak through cyberspace. *JAMA* 2000;284:447-9. <https://doi.org/10.1001/jama.284.4.447>.
- [77] Nguyen TQ, Kohn RP, Ng RC, Philip SS, Cohen SE. Historical and Current Trends in the Epidemiology of Early Syphilis in San Francisco, 1955 to 2016. *Sex Transm Dis* 2018;45:S55-62. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000870>.
- [78] Watchirs Smith L, Guy R, Degenhardt L, Yeung A, Rissel C, Richters J, et al. Meeting Sexual Partners Through Internet Sites and Smartphone Apps in Australia: National Representative Study. *J Med Internet Res* 2018;20:e10683. <https://doi.org/10.2196/10683>.
- [79] Hull P, Mao L, Prestage G, Zablotska I, de Wit J, Holt M. The use of mobile phone apps by Australian gay and bisexual men to meet sex partners: an analysis of sex-seeking repertoires and risks for HIV and STIs using behavioural surveillance data. *Sex Transm Infect* 2016;92:502-7. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2015-052325>.
- [80] Tang W, Tang S, Qin Y, Zhang Y, Zhang W, Liu C, et al. Will Gay Sex-Seeking Mobile Phone Applications Facilitate Group Sex? A Cross-Sectional Online Survey among Men Who Have Sex with Men in China. *PLoS One* 2016;11:e0167238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167238>.
- [81] Lehmiller JJ, Iroerger M. Social networking smartphone applications and sexual health outcomes among men who have sex with men. *PLoS One* 2014;9:e86603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086603>.
- [82] Phillips G, Magnus M, Kuo I, Rawls A, Peterson J, Jia Y, et al. Use of geosocial networking (GSN) mobile phone applications to find men for sex by men who have sex with men (MSM) in Washington, DC. *AIDS Behav* 2014;18:1630-7. <https://doi.org/10.1007/s10461-014-0760-9>.
- [83] Beymer MR, Weiss RE, Bolan RK, Rudy ET, Bourque LB, Rodriguez JP, et al. Sex on demand: geosocial networking phone apps and risk of sexually transmitted infections among a cross-sectional sample of men who have sex with men in Los Angeles County. *Sex Transm Infect* 2014;90:567-72. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051494>.
- [84] Sistemas de Alerta Temprana n.d.
- [85] Dolengevich-Segal H, Rodríguez-Salgado B, Ballesteros-López J. Chemsex. Un fenómeno emergente Chemsex. An emergent phenomenon 2017;29:3.
- [86] European Centre for Disease Prevention and Control., Sigma Research (London School of Hygiene and Tropical Medicine), Robert Koch Institute. EMIS-2017: the European men who have sex with men Internet survey: key findings from 50 countries. LU: Publications Office; 2019.
- [87] Íncera D., Gámez M., Ibarguchi L., García A., Zaro I., Alonso A. Aproximación al Chemsex 2021: Encuesta sobre hábitos sexuales y consumo de drogas en España entre hombre GBHSH. Madrid. Apoyo Positivo e Imagina Más; 2022.
- [88] González-Baeza A, Dolengevich-Segal H, Pérez-Valero I, Cabello A, Téllez MJ, Sanz J, et al. Sexualized Drug Use (Chemsex) Is Associated with High-Risk Sexual Behaviors and Sexually Transmitted Infections in HIV-Positive Men Who Have Sex with Men: Data from the U-SEX GESIDA 9416 Study. *AIDS Patient Care STDS* 2018;32:112-8. <https://doi.org/10.1089/apc.2017.0263>.
- [89] Zaro I, Navazo T, Vázquez J, García A, Ibarguchi L. Aproximación al Chemsex en España 2016. Madrid. Apoyo Positivo e Imagina Más; 2016.
- [90] Travel Medicine - 4th Edition n.d. <https://www.elsevier.com/books/travel->

- medicine/keystone/978-0-323-54696-6 (accessed December 10, 2022).
- [91] Monsel G, Caumes E. Dermatologic presentations of tropical diseases in travelers. *Curr Infect Dis Rep* 2010;12:186–91. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0101-8>.
- [92] Matteelli A, Carosi G. Sexually transmitted diseases in travelers. *Clin Infect Dis* 2001;32:1063–7. <https://doi.org/10.1086/319607>.
- [93] Dashboard de datos turísticos de la OMT n.d. <https://www.unwto.org/es/datos-turismo/resultados-turisticos-globales-regionales> (accessed December 10, 2022).
- [94] Vivancos R, Abubakar I, Hunter PR. Foreign travel, casual sex, and sexually transmitted infections: systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2010;14:e842–851. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.225> 1.
- [95] Cabada MM, Echevarria JI, Seas CR, Narvarte G, Samalvides F, Freedman DO, et al. Sexual behavior of international travelers visiting Peru. *Sex Transm Dis* 2002;29:510–3. <https://doi.org/10.1097/00007435-200209000-00003>.
- [96] Bellis MA, Hale G, Bennett A, Chaudry M, Kilfoyle M. Ibiza uncovered: changes in substance use and sexual behaviour amongst young people visiting an international night-life resort. *Int J Drug Policy* 2000;11:235–44. [https://doi.org/10.1016/s0955-3959\(00\)00053-0](https://doi.org/10.1016/s0955-3959(00)00053-0).
- [97] Mercer CH, Fenton KA, Wellings K, Copas AJ, Erens B, Johnson AM. Sex partner acquisition while overseas: results from a British national probability survey. *Sex Transm Infect* 2007;83:517–22. <https://doi.org/10.1136/sti.2007.026377>.
- [98] Hawkes S, Hart GJ, Bletsoe E, Shergold C, Johnson AM. Risk behaviour and STD acquisition in genitourinary clinic attenders who have travelled. *Genitourin Med* 1995;71:351–4. <https://doi.org/10.1136/sti.71.6.351>.
- [99] Velasco M, Morote S, Aramburu C, Quintó L, Corachán M, Gascón J. Riesgo del comportamiento sexual de los viajeros españoles al extranjero. *Medicina Clínica* 2001;116:612–3.
- [100] Mole RCM, Parutis V, Gerry CJ, Burns FM. The impact of migration on the sexual health, behaviours and attitudes of Central and East European gay/bisexual men in London. *Ethn Health* 2014;19:86–99. <https://doi.org/10.1080/13557858.2013.789829>.
- [101] Muñoz-Laboy M, Hirsch JS, Quispe-Lazaro A. Loneliness as a sexual risk factor for male Mexican migrant workers. *Am J Public Health* 2009;99:802–10. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2007.122283>.
- [102] Nahmias SB, Nahmias D. Society, sex, and STIs: human behavior and the evolution of sexually transmitted diseases and their agents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1230:59–73. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06079.x>.
- [103] gTt-VIH | La FDA aprueba el uso de Truvada como profilaxis preexposición n.d. http://gtt-vih.org/actualizate/la_noticia_del_dia/19-07-12 (accessed December 10, 2022).
- [104] gTt-VIH | Se aprueba el uso de Truvada® como profilaxis preexposición en la Unión Europea n.d. http://gtt-vih.org/actualizate/la_noticia_del_dia/12-09-16 (accessed December 10, 2022).
- [105] Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, et al. Preexposure Chemoprophylaxis for HIV Prevention in Men Who Have Sex with Men. *New England Journal of Medicine* 2010;363:2587–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011205>.
- [106] Golub SA, Kowalczyk W, Weinberger CL, Parsons JT. Preexposure prophylaxis and predicted condom use among high-risk men who have sex with men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;54:548–55. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181e19a54>.
- [107] Traeger MW, Schroeder SE, Wright EJ, Hellard ME, Cornelisse VJ, Doyle JS, et al. Effects of Pre-exposure Prophylaxis for the Prevention of Human Immunodeficiency Virus Infection on Sexual Risk Behavior in Men Who Have Sex With Men: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2018;67:676–86. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy182>.
- [108] Lal L, Audsley J, Murphy DA, Fairley CK, Stoope M, Roth N, et al. Medication adherence, condom use and sexually transmitted infections in Australian preexposure prophylaxis users. *AIDS* 2017;31:1709–14. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001519>.
- [109] Chan PA, Glynn TR, Oldenburg CE, Montgomery MC, Robinette AE, Almonte A, et al. Implementation of Preexposure Prophylaxis for Human Immunodeficiency Virus Prevention Among Men Who Have Sex With Men at a New England Sexually

- Transmitted Diseases Clinic. *Sex Transm Dis* 2016;43:717–23. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000514>.
- [110] Cohen SE, Vittinghoff E, Bacon O, Doblecki-Lewis S, Postle BS, Feaster DJ, et al. High Interest in Pre-exposure Prophylaxis Among Men Who Have Sex with Men at Risk for HIV-Infection: Baseline Data from the US PrEP Demonstration Project. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015;68:439–48. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000479>.
- [111] MSM Screening Study group, Jansen K, Steffen G, Potthoff A, Schuppe A-K, Beer D, et al. STI in times of PrEP: high prevalence of chlamydia, gonorrhoea, and mycoplasma at different anatomic sites in men who have sex with men in Germany. *BMC Infect Dis* 2020;20:110. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4831-4>.
- [112] MANUAL PARA IMPLEMENTACION DE UN PROGRAMA DE PROFILAXIS PREEXPOSICION AL VIH EN ESPAÑA n.d.:15.
- [113] Beymer MR, DeVost MA, Weiss RE, Dierst-Davies R, Shover CL, Landovitz RJ, et al. Does HIV pre-exposure prophylaxis use lead to a higher incidence of sexually transmitted infections? A case-crossover study of men who have sex with men in Los Angeles, California. *Sex Transm Infect* 2018;94:457–62. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2017-053377>.
- [114] Marcus JL, Hurley LB, Hare CB, Nguyen DP, Phengrasamy T, Silverberg MJ, et al. Preexposure Prophylaxis for HIV Prevention in a Large Integrated Health Care System: Adherence, Renal Safety, and Discontinuation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;73:540–6. <https://doi.org/10.1097/QAI.00000000000001129>.
- [115] European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia control in Europe: literature review. LU: Publications Office; 2014.
- [116] 75.^a Asamblea Mundial de la Salud n.d. <https://www.who.int/es/about/governance/world-health-assembly/seventy-fifth-world-health-assembly> (accessed December 10, 2022).
- [117] Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Campbell JD, Wangisi J, et al. Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. *N Engl J Med* 2012;367:399–410. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108524>.
- [118] Antoni G, Tremblay C, Delaugerre C, Charreau I, Cua E, Rojas Castro D, et al. On-demand pre-exposure prophylaxis with tenofovir disoproxil fumarate plus emtricitabine among men who have sex with men with less frequent sexual intercourse: a post-hoc analysis of the ANRS IPERGAY trial. *Lancet HIV* 2020;7:e113–20. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(19\)30341-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(19)30341-8).
- [119] Landovitz RJ, Donnell D, Clement ME, Hanscom B, Cottle L, Coelho L, et al. Cabotegravir for HIV Prevention in Cisgender Men and Transgender Women. *N Engl J Med* 2021;385:595–608. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101016>.
- [120] 2021 UNAIDS Global AIDS Update — Confronting inequalities — Lessons for pandemic responses from 40 years of AIDS n.d. <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021-global-aids-update> (accessed December 10, 2022).
- [121] Centers for Disease Control and Prevention: US Public Health Service: Preexposure prophylaxis for the prevention of HIV infection in the United States—2017 Update: a clinical practice guideline. <https://www.cdc.gov/hiv/pdf/risk/prep/cdc-hiv-prep-guidelines-2017.pdf>. Marzo 2018.
- [122] World Health Organization. HIV drug resistance surveillance in countries scaling up pre-exposure prophylaxis. World Health Organization; 2020.
- [123] Grant JS, Stafylis C, Celum C, Grennan T, Haire B, Kaldor J, et al. Doxycycline Prophylaxis for Bacterial Sexually Transmitted Infections. *Clinical Infectious Diseases* 2020;70:1247–53. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz866>.
- [124] Molina J-M, Charreau I, Chidiac C, Pialoux G, Cua E, Delaugerre C, et al. Post-exposure prophylaxis with doxycycline to prevent sexually transmitted infections in men who have sex with men: an open-label randomised substudy of the ANRS IPERGAY trial. *The Lancet Infectious Diseases* 2018;18:308–17. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30725-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30725-9).
- [125] de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide

- study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048–56. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70230-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70230-8).
- [126] Hartwig S, Baldauf J-J, Dominiak-Felden G, Simonon F, Alemany L, de Sanjosé S, et al. Estimation of the epidemiological burden of HPV-related anogenital cancers, precancerous lesions, and genital warts in women and men in Europe: Potential additional benefit of a nine-valent second generation HPV vaccine compared to first generation HPV vaccines. *Papillomavirus Research* 2015;1:90–100. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2015.06.003>.
- [127] HPV vaccination introduction worldwide and WHO and UNICEF estimates of national HPV immunization coverage 2010–2019 | Elsevier Enhanced Reader n.d. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2020.106399>.
- [128] Immunization coverage n.d. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage> (accessed December 10, 2022).
- [129] Mele A, Ferrigno L, Romanò L, Alfonsi V, D'Angelo F, Crateri S, et al. [An update on the epidemiology of hepatitis A in Italy 2015–2019. Data from the surveillance of acute viral hepatitis SEIEVA]. *Epidemiol Prev* 2021;45:173–80. <https://doi.org/10.19191/EP21.3.P173.062>.
- [130] Kimball A, Torrone E, Miele K, Bachmann L, Thorpe P, Weinstock H, et al. Missed Opportunities for Prevention of Congenital Syphilis - United States, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69:661–5. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6922a1>.
- [131] World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
- [132] Gupta V, Sharma VK. Syndromic management of sexually transmitted infections: A critical appraisal and the road ahead. *NMJI* 2019;32:147. <https://doi.org/10.4103/0970-258X.278691>.
- [133] World Health Organization, editor. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
- [134] Adams DA. Summary of Notifiable Infectious Diseases and Conditions — United States, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017;64. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6453a1>.
- [135] Historical network: ESSTI Project. European Centre for Disease Prevention and Control n.d. <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-work/disease-and-laboratory-networks/european-network-sti-surveillance/historical> (accessed December 10, 2022).
- [136] European Network for STI Surveillance. European Centre for Disease Prevention and Control n.d. <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-work/disease-and-laboratory-networks/european-network-sti-surveillance> (accessed December 10, 2022).
- [137] Enfermedades de declaración obligatoria (EDO). Comunidad de Madrid 2017. <https://www.comunidad.madrid/servicios/salud/enfermedades-declaracion-obligatoria-edo> (accessed December 10, 2022).
- [138] Información Vigilancia en Salud Pública n.d. <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/Paginas/default.aspx> (accessed December 10, 2022).
- [139] Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional. vol. BOE-A-2015-2837. 2015.
- [140] Peters RPH, Dubbink JH, van der Eem L, Verweij SP, Bos MLA, Ouburg S, et al. Cross-sectional study of genital, rectal, and pharyngeal Chlamydia and gonorrhoea in women in rural South Africa. *Sex Transm Dis* 2014;41:564–9. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000175>.
- [141] Ross MW, Nyoni J, Ahaneku HO, Mbwambo J, McClelland RS, McCurdy SA. High HIV seroprevalence, rectal STIs and risky sexual behaviour in men who have sex with men in Dar es Salaam and Tanga, Tanzania. *BMJ Open* 2014;4:e006175. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006175>.
- [142] Yirenya-Tawiah D, Annang TN, Apea-Kubi KA, Lomo G, Mensah D, Akyeh L, et al. Chlamydia Trachomatis and Neisseria

- Gonorrhoeae prevalence among women of reproductive age living in urogenital schistosomiasis endemic area in Ghana. *BMC Research Notes* 2014;7:349. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-349>.
- [143] Golparian D, Hellmark B, Fredlund H, Unemo M. Emergence, spread and characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with in vitro decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in Sweden. *Sex Transm Infect* 2010;86:454–60. <https://doi.org/10.1136/sti.2010.045377>.
- [144] Huang C-T, Yen M-Y, Wong W-W, Li L-H, Lin K-Y, Liao M-H, et al. Characteristics and Dissemination of Mosaic Penicillin-Binding Protein 2-Harboring Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with Reduced Cephalosporin Susceptibility in Northern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4893–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00482-10>.
- [145] Kapil R, Press CG, Hwang ML, Brown L, Geisler WM. Investigating the Epidemiology of Repeat *Chlamydia trachomatis* Detection after Treatment by Using *C. trachomatis* OmpA Genotyping. *J Clin Microbiol* 2015;53:546–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.02483-14>.
- [146] Chan PA, Robinette A, Montgomery M, Almonte A, Cu-Uvin S, Lonks JR, et al. Extragenital Infections Caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: A Review of the Literature. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2016;2016:1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/5758387>.
- [147] Fifer H, Natarajan U, Jones L, Alexander S, Hughes G, Golparian D, et al. Failure of Dual Antimicrobial Therapy in Treatment of Gonorrhea. *N Engl J Med* 2016;374:2504–6. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1512757>.
- [148] Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1858–60. <https://doi.org/10.1093/jac/dks162>.
- [149] Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3538–45. <https://doi.org/10.1128/AAC.00325-11>.
- [150] Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom and Australia 2018:11.
- [151] La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos n.d. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed December 14, 2022).
- [152] European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP). European Centre for Disease Prevention and Control n.d. <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/euro-gasp> (accessed December 10, 2022).
- [153] Piñeiro L, Idigoras P, Arrastia M, Manzanal A, Ansa I, Cilla G. Increases in the Macrolide Resistance of *Mycoplasma genitalium* and the Emergence of the A2058T Mutation in the 23S rRNA Gene: Clonal Spread? *Antibiotics (Basel)* 2022;11:1492. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111492>.
- [154] Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2020;20:1302–14. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30154-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30154-7).
- [155] Fernández-Huerta M, Barberá MJ, Serra-Pladevall J, Esperalba J, Martínez-Gómez X, Centeno C, et al. *Mycoplasma genitalium* and antimicrobial resistance in Europe: a comprehensive review. *Int J STD AIDS* 2020;31:190–7. <https://doi.org/10.1177/0956462419890737>.
- [156] *Mycoplasma genitalium* antimicrobial resistance surveillance (MARS). GOVUK n.d. <https://www.gov.uk/government/publications/mycoplasma-genitalium-antimicrobial-resistance-surveillance-mars> (accessed December 10, 2022).
- [157] Abdelrahman YM, Belland RJ. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:949–59. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.002>.
- [158] Witkin SS, Minis E, Athanasiou A, Leizer J, Linhares IM. *Chlamydia trachomatis*: the

- Persistent Pathogen. *Clin Vaccine Immunol* 2017;24:e00203-17.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00203-17>.
- [159] Solomon AW, Burton MJ, Gower EW, Harding-Esch EM, Oldenburg CE, Taylor HR, et al. Trachoma. *Nat Rev Dis Primers* 2022;8:32.
<https://doi.org/10.1038/s41572-022-00359-5>.
- [160] Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:385–400.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.30>.
- [161] Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. *Science* 1998;282:754–9.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5389.754>.
- [162] Seth-Smith HM, Harris SR, Persson K, Marsh P, Barron A, Bignell A, et al. Co-evolution of genomes and plasmids within Chlamydia trachomatis and the emergence in Sweden of a new variant strain. *BMC Genomics* 2009;10:239.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-239>.
- [163] Joseph SJ, Didelot X, Gandhi K, Dean D, Read TD. Interplay of recombination and selection in the genomes of Chlamydia trachomatis. *Biol Direct* 2011;6:28.
<https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-28>.
- [164] Somboonna N, Wan R, Ojcius DM, Pettengill MA, Joseph SJ, Chang A, et al. Hypervirulent Chlamydia trachomatis Clinical Strain Is a Recombinant between Lymphogranuloma Venereum (L₂) and D Lineages. *MBio* 2011;2:e00045-11.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00045-11>.
- [165] Borges V, Isidro J, Correia C, Cordeiro D, Vieira L, Lodia Z, et al. Transcontinental Dissemination of the L2b/D-Da Recombinant *Chlamydia trachomatis* Lymphogranuloma venereum (LGV) Strain: Need of Broad Multi-Country Molecular Surveillance. *Clinical Infectious Diseases* 2021;73:e1004–7.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciab067>.
- [166] Seth-Smith HMB, Bénard A, Bruisten SM, Versteeg B, Herrmann B, Kok J, et al. Ongoing evolution of Chlamydia trachomatis lymphogranuloma venereum: exploring the genomic diversity of circulating strains. *Microbial Genomics* 2021;7.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000599>.
- [167] Rodríguez-Domínguez M, González-Alba JM, Puerta T, Martínez-García L, Menéndez B, Cantón R, et al. Spread of a new Chlamydia trachomatis variant from men who have sex with men to the heterosexual population after replacement and recombination in ompA and pmpH genes. *Clin Microbiol Infect* 2017;23:761–6.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.009>.
- [168] Piñeiro L, Isaksson J, Zapico M, Cilla G, Herrmann B. Chlamydia trachomatis genotypes A and B from urogenital specimens of patients in Spain: molecular characterization. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:910.e5-910.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.025>.
- [169] de Vries HJC, Pannekoek Y, Dean D, Bavoi PM, Borel N, Greub G, et al. Call for consensus in Chlamydia trachomatis nomenclature: moving from biovars, serovars and serotypes to genovariants and genotypes. *Clinical Microbiology and Infection* 2022;28:761–3.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.02.013>.
- [170] Smolarczyk K, Młynarczyk-Bonikowska B, Majewski S, Rudnicka E, Unemo M, Fiedor P. Lymphogranuloma venereum: an emerging problem in Poland. *Pdia* 2022;39:454–9.
<https://doi.org/10.5114/ada.2020.101466>.
- [171] Piñeiro L, Galán JC, Vall-Mayans M. Infecciones por Chlamydia trachomatis (incluye linfogranuloma venéreo) y Mycoplasma genitalium. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019;37:525–34.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.014>.
- [172] A Treatise on the Venereal Disease and Its Varieties n.d.:43.
- [173] Coutts WE. Lymphogranuloma venereum. *Bull World Health Organ* 1950;2:545–62.
- [174] Durand: Lymphogranulomatose inguinale subaiguë d'origi... - Google Académico n.d.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?&title=Lymphogranuloma%20inguinale%20subaigue%20d%E2%80%99origine%20genitale%20probable%20peut-%C3%AAtre%20venerienne&journal=Prov%20Med%20%28Paris%29&volume=24&pages=55-62&publication_year=1913&author=Durand%2CM&author=Nicolas%2CJ&author=Fabrave%2CM (accessed December 16, 2022).
- [175] Findlay GM. THE RELATIONSHIP OF CLIMATIC BUBO AND LYMPHOGRANULOMA INGUINALE. *The Lancet* 1932;220:11–3.

- [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)17896-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)17896-7).
- [176] Hart: Chancroid, donovanosis, and lymphogranuloma venereum - Google Académico n.d. https://scholar.google.com/scholar_lookup?&title=Chancroid%2C%20Donovanosis%2C%20Lymphogranuloma%20Venereum&publication_year=1979&author=Hart%2CG (accessed December 16, 2022).
- [177] SULKIN SE, FLETCHER PF, HUBER ET, REH EP. THE FREI TEST FOR LYMPHOGRANULOMA VENEREUM: EXPERIENCES WITH A NEW ANTIGEN (LYGRANUM) PREPARED FROM INFECTED YOLK SAC OF DEVELOPING CHICK EMBRYO. *Journal of the American Medical Association* 1941;116:2663–5. <https://doi.org/10.1001/jama.1941.02820240023007>.
- [178] Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect* 2002;78:90–2. <https://doi.org/10.1136/sti.78.2.90>.
- [179] O'Farrell N, Hoosen AA, Coetzee KD, van den Ende J. Genital ulcer disease in men in Durban, South Africa. *Sexually Transmitted Infections* 1991;67:327–30. <https://doi.org/10.1136/sti.67.4.327>.
- [180] Brathwaite AR, Figueroa JP, Ward E. A comparison of prevalence rates of genital ulcers among persons attending a sexually transmitted disease clinic in Jamaica. *West Indian Med J* 1997;46:67–71.
- [181] Eichmann A. [Sexually transmissible diseases following travel in tropical countries]. *Schweiz Med Wochenschr* 1993;123:1250–5.
- [182] Iagovdik NZ, Pankratov VG, Diuba VM. [Lymphogranuloma venereum in a student from Ethiopia]. *Vestn Dermatol Venerol* 1989;71–2.
- [183] Scieux C, Barnes R, Bianchi A, Casin I, Morel P, Perol Y. Lymphogranuloma venereum: 27 cases in Paris. *J Infect Dis* 1989;160:662–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/160.4.662>.
- [184] Bauwens JE, Lampe MF, Suchland RJ, Wong K, Stamm WE. Infection with *Chlamydia trachomatis* lymphogranuloma venereum serovar L1 in homosexual men with proctitis: molecular analysis of an unusual case cluster. *Clin Infect Dis* 1995;20:576–81. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.3.576>.
- [185] Panizza E, Nigro M, De Pasquale R, Furnari PM. [Epidemiologic considerations apropos of 6 cases of lymphogranuloma venereum recorded in Sicily in a 1-year period]. *G Ital Dermatol Venereol* 1987;11–4.
- [186] Epling S, Reich GA. Report on an outbreak of lymphogranuloma venereum in central Florida. *J Fla Med Assoc* 1988;75:29–30.
- [187] Nieuwenhuis R, Ossewaarde J, van der Meijden WI, Neumann H. Unusual presentation of early lymphogranuloma venereum in an HIV-1 infected patient: effective treatment with 1 g azithromycin. *Sex Transm Infect* 2003;79:453–5. <https://doi.org/10.1136/sti.79.6.453>.
- [188] Götz HM, Ossewaarde JM, Nieuwenhuis RF, van der Meijden WI, Dees J, Thio B, et al. [A cluster of lymphogranuloma venereum among homosexual men in Rotterdam with implications for other countries in Western Europe]. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2004;148:441–2.
- [189] Lymphogranuloma Venereum Among Men Who Have Sex with Men --- Netherlands, 2003--2004 n.d. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5342a2.htm> (accessed December 17, 2022).
- [190] Eurosurveillance | Preliminary report of an outbreak of lymphogranuloma venereum in homosexual men in the Netherlands, with implications for other countries in western Europe n.d. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esw.08.04.02367-en> (accessed December 17, 2022).
- [191] Savage EJ, van de Laar MJ, Gallay A, van der Sande M, Hamouda O, Sasse A, et al. Lymphogranuloma venereum in Europe, 2003-2008. *Euro Surveill* 2009;14:19428. <https://doi.org/10.2807/ese.14.48.19428-en>.
- [192] van de Laar MJW, Fenton KA, Ison C, ESSTI Network. Update on the European lymphogranuloma venereum epidemic among men who have sex with men. *Euro Surveill* 2005;10:E050602.1. <https://doi.org/10.2807/esw.10.22.02714-en>.
- [193] LGV infections: trends and epidemiology. GOVUK n.d. <https://www.gov.uk/government/publications/lgv-infections-in-the-uk-trends-and-epidemiology> (accessed December 17, 2022).
- [194] Herida M, de Barbeyrac B, Sednaoui P, Scieux C, Lemarchand N, Kreplak G, et al. Rectal lymphogranuloma venereum surveillance in France 2004-2005. *Euro Surveill* 2006;11:155–6.
- [195] Kivi M, Koedijk FDH, van der Sande M, van de Laar MJW. Evaluation prompting transition from enhanced to routine surveillance of lymphogranuloma

- venereum (LGV) in the Netherlands. *Euro Surveill* 2008;13:8087.
- [196] Dupin N. [Sexually transmitted infections in France in 2009]. *Rev Prat* 2010;60:520–5.
- [197] Cusini M, Boneschi V, Tanzi C, Girgenti V, De Vries H, Alessi E. Ano-rectal lymphogranuloma venereum: the first case in Italy. *G Ital Dermatol Venereol* 2008;143:83–5.
- [198] Castro R, Baptista T, Vale A, Nunes H, Prieto E, Mansinho K, et al. Anorectal lymphogranuloma venereum: the first two confirmed cases in Portugal. *Euro Surveill* 2008;13:19060. <https://doi.org/10.2807/ese.13.50.19060-en>.
- [199] Stary G, Meyer T, Bangert C, Kohrgruber N, Gmeinhardt B, Kirnbauer R, et al. New *Chlamydia trachomatis* L2 Strains Identified in a Recent Outbreak of Lymphogranuloma Venereum in Vienna, Austria. *Sexually Transmitted Diseases* 2008;35:377–82. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31815d6df8>.
- [200] Høie S, Knudsen LS, Gerstoft J. Lymphogranuloma venereum proctitis: a differential diagnose to inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2011;46:503–10. <https://doi.org/10.3109/00365521.2010.537681>.
- [201] Lymphogranuloma venereum - Annual Epidemiological Report for 2015. European Centre for Disease Prevention and Control 2017. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/lymphogranuloma-venereum-annual-epidemiological-report-2015> (accessed December 17, 2022).
- [202] Vanousova D, Zakoucka H, Jilich D, Rozsypal H, Stankova M, Zufanova S, et al. First detection of *Chlamydia trachomatis* LGV biovar in the Czech Republic, 2010–2011. *Euro Surveill* 2012;17:20055.
- [203] Bošnjak Z, Džijan S, Pavlinić D, Perić M, Ružman N, Križan IR, et al. Distribution of *Chlamydia trachomatis* serotypes in clinical urogenital samples from north-eastern Croatia. *Curr Microbiol* 2012;64:552–60. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0106-7>.
- [204] Korhonen S, Hiltunen-Back E, Puolakkainen M. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in rectal and pharyngeal specimens: identification of LGV genotypes in Finland. *Sex Transm Infect* 2012;88:465–9. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2011-050458>.
- [205] de Vries HJC. Lymphogranuloma venereum in the Western world, 15 years after its re-emergence: new perspectives and research priorities. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2019;32:43–50. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000519>.
- [206] de Vries HJC, Zingoni A, Kreuter A, Moi H, White JA, European Branch of the International Union against Sexually Transmitted Infections, et al. 2013 European guideline on the management of lymphogranuloma venereum. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29:1–6. <https://doi.org/10.1111/jdv.12461>.
- [207] European Centre for Disease Prevention and Control. HIV and STI prevention among men who have sex with men. Stockholm: ECDC; 2015.
- [208] Lymphogranuloma venereum - Annual Epidemiological Report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/lymphogranuloma-venereum-annual-epidemiological-report-2017> (accessed April 14, 2022).
- [209] STI laboratory diagnostics in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control 2013. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/sti-laboratory-diagnostics-europe> (accessed December 17, 2022).
- [210] Castro JG, Ponomareva O, Alcaide M, Rosa-Cunha I, Dilanchian P, Willis D. Increase in lymphogranuloma venereum cases in South Florida. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* 2012;11:220–2. <https://doi.org/10.1177/1545109712447198>.
- [211] Voux A de. Notes from the Field: Cluster of Lymphogranuloma Venereum Cases Among Men Who Have Sex with Men — Michigan, August 2015–April 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6534a6>.
- [212] New York City Health Code. Article 11: Reportable Diseases and Condition. <https://www.nyc.gov/site/doh/providers/reporting-and-services/notifiable-diseases-and-conditions-reporting-central.page>.
- [213] Pathela P, Jamison K, Kornblum J, Quinlan T, Halse TA, Schillinger JA. Lymphogranuloma Venereum: An Increasingly Common Anorectal Infection Among Men Who Have Sex With Men

- Attending New York City Sexual Health Clinics. *Sex Transm Dis* 2019;46:e14–7. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000921>.
- [214] Chi KH, de Voux A, Morris M, Katz SS, Pillay A, Danavall D, et al. Detection of Lymphogranuloma Venereum–Associated Chlamydia trachomatis L2 Serovars in Remnant Rectal Specimens Collected from 7 US Public Health Laboratories. *Sexual Trans Dis* 2022;49:e26–8. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001483>.
- [215] Kropp RY. Emergence of lymphogranuloma venereum in Canada. *Canadian Medical Association Journal* 2005;172:1674–6. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050621>.
- [216] Totten S, MacLean R, Payne E, Severini A. Chlamydia and lymphogranuloma venereum in Canada: 2003–2012 Summary report. *CCDR* 2015;41:20–5. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v41i02a01>.
- [217] Boutin C, Venne S, Fiset M, Fortin C, Murphy D, Severini A, et al. Lymphogranuloma venereum in Quebec: Re-emergence among men who have sex with men. *Canada Communicable Disease Report* 2018;44:55–61. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v44i02a04>.
- [218] Morton AN, Fairley CK, Zaia AM, Chen MY. Anorectal lymphogranuloma venereum in a Melbourne man. *Sex Health* 2006;3:189–90. <https://doi.org/10.1071/sh06029>.
- [219] Eisen DP. Locally acquired lymphogranuloma venereum in a bisexual man. *Medical Journal of Australia* 2005;183:218–9. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2005.tb07005.x>.
- [220] Stark D, van Hal S, Hillman R, Harkness J, Marriott D. Lymphogranuloma Venereum in Australia: Anorectal Chlamydia trachomatis Serovar L2b in Men Who Have Sex with Men. *J Clin Microbiol* 2007;45:1029–31. <https://doi.org/10.1128/JCM.02389-06>.
- [221] Kotevski DP, Lam M, Selvey C, Templeton DJ, Donovan LG, Sheppard V. Epidemiology of lymphogranuloma venereum in New South Wales, 2006–2015. *Commun Dis Intell* 2019;43. <https://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.54>.
- [222] NSW Sexually Transmissible Infections Strategy 2022–2026 - Sexual health n.d. <https://www.health.nsw.gov.au/sexualhealth/Pages/nsw-sti-strategy.aspx> (accessed December 17, 2022).
- [223] Mayans MV, Sanz B, Armengol P, Loureiro E. Outbreaks of infectious syphilis and other STIs in men who have sex with men in Barcelona, 2002–3. *Weekly Releases* (1997–2007) 2004;8:2578. <https://doi.org/10.2807/esw.08.44.02578-en>.
- [224] Vall Mayans M, Sanz Colomo B, Ossewaarde JM. First case of LGV confirmed in Barcelona. *Euro Surveill* 2005;10:E050203.2. <https://doi.org/10.2807/esw.10.05.02634-en>.
- [225] Mayans M, Caballero E, Olalla P, Armengol P, Codina M, Barbera-Gracia M, et al. Outbreak of lymphogranuloma venereum among men who have sex with men in Barcelona 2007/08—an opportunity to debate sexual health at the EuroGames 2008. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 2008;13. <https://doi.org/10.2807/ese.13.25.18908-en>.
- [226] Barrabeig-Fabregat I, Camps-Cura N, Carmona-Parcerisa G, Ciruela-Navas P, Sala-Farré MR, Orcau-Palau À. Manual de notificació per als declarants al sistema de notificació de malalties de declaració obligatòria (MDO). Scientia 2016.
- [227] Vargas-Leguas H, Olalla PG de, Arando M, Armengol P, Barberá MJ, Vall M, et al. Lymphogranuloma venereum: a hidden emerging problem, Barcelona, 2011. *Eurosurveillance* 2012;17:20057. <https://doi.org/10.2807/ese.17.02.20057-en>.
- [228] Rodríguez-Domínguez M, Puerta T, Menéndez B, González-Alba JM, Rodríguez C, Hellín T, et al. Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. *Clinical Microbiology and Infection* 2014;20:219–25. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12256>.
- [229] Adán Merino L, Gómez Senent S, Martín Alonso MA, Turrión JP, Martín Arranz E, Poza Cordón J, et al. [Lymphogranuloma venereum: an emergent disease]. *Gastroenterol Hepatol* 2010;33:416–7. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.12.004>.
- [230] Díaz A, Ruiz-Alguero M, Hernando V. Linfogranuloma venéreo en España, 2005–2015: revisión de la bibliografía. *Medicina Clínica* 2018;151:412–7. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.05.036>.

- [231] Cabello Úbeda A, Fernández Roblas R, García Delgado R, Martínez García L, Sterlin F, Fernández Guerrero ML, et al. Anorectal Lymphogranuloma Venereum in Madrid: A Persistent Emerging Problem in Men Who Have Sex With Men. *Sex Transm Dis* 2016;43:414–9. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000459>.
- [232] De Munain JL, Ezpeleta G, Imaz M, Del Mar Camara M, Esteban V, Santamaría JM, et al. Two Lymphogranuloma Venereum Cases in a Heterosexual Couple in Bilbao (Spain). *Sexually Transmitted Diseases* 2008;35:918–9. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31817e9228>.
- [233] Piñeiro L, Montes M, Gil-Setas A, Camino X, Echeverría MJ, Cilla G. [Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in an area of northern Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:462–4. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.012>.
- [234] Mejuto P, Boga JA, Junquera M, Torreblanca A, Leiva PS. Genotyping *Chlamydia trachomatis* strains among men who have sex with men from a Northern Spain region: a cohort study. *BMJ Open* 2013;3:e002330. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002330>.
- [235] Parra-Sánchez M, García-Rey S, Pueyo Rodríguez I, Viciano Fernández P, Torres Sánchez MJ, Palomares Folía JC. Clinical and epidemiological characterisation of lymphogranuloma venereum in southwest Spain, 2013–2015. *Sex Transm Infect* 2016;92:629–31. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2015-052453>.
- [236] Repiso-Jiménez JB, Millán-Cayetano JF, Salas-Márquez C, Correa-Ruiz A, Rivas-Ruiz F. Lymphogranuloma Venereum in a Public Health Service Hospital in Southern Spain: A Clinical and Epidemiologic Study. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)* 2020;111:743–51. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2020.02.006>.
- [237] Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Ponencia de Vigilancia Epidemiológica: 9 de abril de 2013. Comisión de salud Pública: 19 de junio de 2013. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud: 23 de julio de 2013. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Instituto de Salud Carlos III; 2015. <https://doi.org/10.4321/repisalud.5345>.
- [238] Unidad de Microbiología y Parasitología. Servicio de Análisis Clínicos Ctra. del Rosario, 145, 38010 Santa Cruz de Tenerife. Spain, Pino Calm B, Martínez-García L, Beltrán Tacoronte C, Alcoba Florez J. Underdiagnosis of lymphogranuloma venereum. *Rev Esp Quimioter* 2020;33:76–7. <https://doi.org/10.37201/req/061.2019>.
- [239] Ghanta SN, Saccente M. Chronic Lymphogranuloma Venereum Proctocolitis Masquerading as Inflammatory Bowel Disease. *J Investig Med High Impact Case Rep* 2022;10:23247096221107230. <https://doi.org/10.1177/23247096221107233>.
- [240] Goldenberger D, Dutly F, Gebhardt M. Analysis of 721 *Chlamydia trachomatis*-positive urogenital specimens from men and women using lymphogranuloma venereum L2-specific real-time PCR assay. *Euro Surveill* 2006;11:E061018.4. <https://doi.org/10.2807/esw.11.42.03064-en>.
- [241] Peuchant O, Baldit C, Le Roy C, Trombert-Paolantoni S, Clerc M, Bébéar C, et al. First case of *Chlamydia trachomatis* L2b proctitis in a woman. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:E21-23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03661.x>.
- [242] Verweij SP, Ouburg S, de Vries H, Morré SA, van Ginkel CJW, Bos H, et al. The first case record of a female patient with bubonic lymphogranuloma venereum (LGV), serovariant L2b. *Sex Transm Infect* 2012;88:346–7. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2011-050298>.
- [243] Desclaux A, Touati A, Neau D, Laurier-Nadalié C, Bébéar C, de Barbeyrac B, et al. Extra-rectal lymphogranuloma venereum in France: a clinical and molecular study. *Sex Transm Infect* 2018;94:3–8. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2017-053126>.
- [244] Dosekun O, Edmonds S, Stockwell S, French P, White JA. Lymphogranuloma venereum detected from the pharynx in four London men who have sex with men. *Int J STD AIDS* 2013;24:495–6. <https://doi.org/10.1177/0956462412472830>.
- [245] de Vrieze NHN, van Rooijen M, Speksnijder AGCL, de Vries HJC. Urethral lymphogranuloma venereum infections in men with anorectal lymphogranuloma venereum and their partners: the missing link in the current epidemic. *Sex Transm Dis* 2013;40:607–8. <https://doi.org/10.1097/01.olq.0000431359.26583.13>.

- [246] Rönn MM, Ward H. The association between Lymphogranuloma venereum and HIV among men who have sex with men: systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* 2011;11:70. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-70>.
- [247] Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries HJC, Francis SC, Mabey D, et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e235–79. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30310-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30310-9).
- [248] van Aar F, Kroone MM, de Vries HJ, Götz HM, van Benthem BH. Increasing trends of lymphogranuloma venereum among HIV-negative and asymptomatic men who have sex with men, the Netherlands, 2011 to 2017. *Eurosurveillance* 2020;25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.1900377>.
- [249] Spaargaren J, Schachter J, Moncada J, de Vries HJC, Fennema HSA, Peña AS, et al. Slow Epidemic of Lymphogranuloma Venereum L2b Strain. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1787–8. <https://doi.org/10.3201/eid1111.050821>.
- [250] de Vries HJC, Schim van der Loeff MF, Bruisten SM. High-resolution typing of *Chlamydia trachomatis*: epidemiological and clinical uses. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2015;28:61–71. <https://doi.org/10.1097/QCO.00000000000000129>.
- [251] Gomes JP, Nunes A, Florindo C, Ferreira MA, Santo I, Azevedo J, et al. Lymphogranuloma venereum in Portugal: unusual events and new variants during 2007. *Sex Transm Dis* 2009;36:88–91. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31818b1e27>.
- [252] Peuchant O, Touati A, Sperandio C, Hénin N, Laurier-Nadalié C, Bébéar C, et al. Changing Pattern of *Chlamydia trachomatis* Strains in Lymphogranuloma Venereum Outbreak, France, 2010–2015. *Emerg Infect Dis* 2016;22:1945–7. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160247>.
- [253] Lymphogranuloma venereum genovariants in men having sex with men in Italy | Sexually Transmitted Infections n.d. <https://sti.bmj.com/content/97/6/441> (accessed December 17, 2022).
- [254] Manning C, O'Neill C, Clarke IN, Rebec M, Cliff PR, Marsh P. High-resolution genotyping of Lymphogranuloma Venereum (LGV) strains of *Chlamydia trachomatis* in London using multi-locus VNTR analysis-ompA genotyping (MLVA-ompA). *PLoS ONE* 2021;16:e0254233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254233>.
- [255] Lee Y-J, Kim D, Lee K, Chun J-Y. Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. *Sci Rep* 2014;4:7439. <https://doi.org/10.1038/srep07439>.
- [256] Schaeffer A, Henrich B. Rapid Detection of *Chlamydia trachomatis* and Typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. *BMC Infect Dis* 2008;8:56. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-56>.
- [257] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 2016;33:1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [258] Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2008;25:1253–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.
- [259] Guindon S, Gascuel O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 2003;52:696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>.
- [260] Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 1999;16:37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
- [261] Cifras de Población (CP) a 1 de enero de 2022. Estadística de Migraciones (EM). Año 2021. Instituto Nacional de Estadística. Junio 2022.
- [262] Cifras de Población (CP) a 1 de julio de 2020. Estadística de Migraciones (EM). Primer semestre de 2020. Instituto Nacional de Estadística. Enero 2021.
- [263] Cifras de Población (CP) a 1 de enero de 2016. Estadística de Migraciones 2015. Instituto Nacional de Estadística. Junio 2016.
- [264] Cifras de Población (CP) a 1 de enero de 2019. Estadística de Migraciones (EM). Año 2018. Instituto Nacional de Estadística n.d.:11.
- [265] Infografía: Tinder supera los cuatro millones de usuarios de pago en el mundo. Statista Infografías n.d. <https://es.statista.com/grafico/16052/usuarios-de-pago-de-tinder/> (accessed April 17, 2022).
- [266] Peuchant O, Touati A, Sperandio C, Hénin N, Laurier-Nadalié C, Bébéar C, et al.

- Changing Pattern of Chlamydia trachomatis Strains in Lymphogranuloma Venereum Outbreak, France, 2010–2015. *Emerg Infect Dis* 2016;22:1945–7. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160247>.
- [267] Marangoni A, Foschi C, Tartari F, Gaspari V, Re MC. Lymphogranuloma venereum genovariants in men having sex with men in Italy. *Sex Transm Infect* 2021;97:441–5. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2020-054700>.
- [268] Cole MJ, Field N, Pitt R, Amato-Gauci AJ, Begovac J, French PD, et al. Substantial underdiagnosis of lymphogranuloma venereum in men who have sex with men in Europe: preliminary findings from a multicentre surveillance pilot. *Sex Transm Infect* 2020;96:137–42. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2019-053972>.
- [269] Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Estimación del Continuo de Atención del VIH en España, 2016. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología – Instituto de Salud Carlos III / Plan Nacional sobre el Sida – Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación; 2019.
- [270] Rivero A, Polo R, Molina JAP, Lozano F, Aldeguer JL. COMITÉ DE REDACCIÓN 2016.
- [271] Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 2020;395:470–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9).
- [272] Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* 2020;382:727–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
- [273] Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it n.d. [https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it) (accessed December 7, 2022).
- [274] Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5:536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- [275] Intervención del Director General de la OMS en la conferencia de prensa sobre el 2019-nCoV del 11 de febrero de 2020 n.d. [https://www.who.int/es/director-general/s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020](https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020) (accessed December 7, 2022).
- [276] Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020;395:514–23. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).
- [277] Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet* 2020;395:507–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).
- [278] Wang R, Zhang X, Irwin DM, Shen Y. Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. *J Infect* 2020;80:350–71. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.017>.
- [279] CDC Weekly C, The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) — China, 2020. *China CDC Weekly* 2020;2:113–22. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.032>.
- [280] Fisher D, Heymann D. Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Medicine* 2020;18:57. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01533-w>.
- [281] Shi Y, Wang G, Cai X-P, Deng J-W, Zheng L, Zhu H-H, et al. An overview of COVID-19. *J Zhejiang Univ Sci B* 2020;21:343–60. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000083>.
- [282] Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- [283] Eurosurveillance editorial team. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro Surveill* 2020;25:200131e. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.200131e>.
- [284] Lai C-C, Shih T-P, Ko W-C, Tang H-J, Hsueh P-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International*

- Journal of Antimicrobial Agents 2020;55:105924.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>.
- [285] Lescure F-X, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky P-H, Behillil S, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* 2020;20:697–706.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30200-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30200-0).
- [286] Bernard Stoecklin S, Rolland P, Silue Y, Mailles A, Campese C, Simondon A, et al. First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in France: surveillance, investigations and control measures, January 2020. *Euro Surveill* 2020;25:2000094.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000094>.
- [287] Spiteri G, Fielding J, Diercke M, Campese C, Enouf V, Gaymard A, et al. First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the WHO European Region, 24 January to 21 February 2020. *Euro Surveill* 2020;25:2000178.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000178>.
- [288] Rizzo C, Campagna I, Pandolfi E, Croci I, Russo L, Ciampini S, et al. Knowledge and Perception of COVID-19 Pandemic during the First Wave (Feb-May 2020): A Cross-Sectional Study among Italian Healthcare Workers. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:3767.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18073767>.
- [289] Indolfi C, Spaccarotella C. The Outbreak of COVID-19 in Italy: Fighting the Pandemic. *JACC Case Rep* 2020;2:1414–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jaccas.2020.03.012>.
- [290] Threat assessment brief: Outbreak of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation in Italy. European Centre for Disease Prevention and Control 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/outbreak-novel-coronavirus-disease-2019-covid-19-situation-italy> (accessed December 7, 2022).
- [291] Alocución de apertura del Director General de la OMS en la rueda de prensa sobre la COVID-19 celebrada el 11 de marzo de 2020 n.d.
<https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed December 7, 2022).
- [292] Características de los casos investigados por Covid-2019 en España. Centro Nacional de Epidemiología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Informe COVID-19 nº1. 11 febrero 2020.
- [293] Características de los casos investigados por Covid-2019 en España. Centro Nacional de Epidemiología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Informe COVID-19 nº3. 28 febrero 2020.
- [294] Coronavirus (COVID-19) - 14 de marzo 2020. Departamento de Seguridad Nacional.
<https://www.dsn.gob.es/es/actualidad/sala-prensa/coronavirus-covid-19-14-marzo-2020> (accessed December 15, 2022).
- [295] Alfonso Viguria U, Casamitjana N. Early Interventions and Impact of COVID-19 in Spain. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021;18:4026.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18084026>.
- [296] Monge S, Zamalloa PL, Moros MJS, Olaso OP, Miguel LGS, Varela C, et al. Lifting COVID-19 mitigation measures in Spain (May-June 2020). *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)* 2021:S0213-005X(21)00195-6.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.05.011>.
- [297] Working group for the surveillance and control of COVID-19 in Spain, Members of the Working group for the surveillance and control of COVID-19 in Spain. The first wave of the COVID-19 pandemic in Spain: characterisation of cases and risk factors for severe outcomes, as at 27 April 2020. *Euro Surveill* 2020;25:2001431.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2001431>.
- [298] Coronavirus (COVID-19) - 10 de mayo 2020 | DSN n.d.
<https://www.dsn.gob.es/es/actualidad/sala-prensa/coronavirus-covid-19-10-mayo-2020> (accessed December 15, 2022).
- [299] La Moncloa. 10/05/2020. Estado de situación del COVID-19 [Prensa/Actualidad/Sanidad] n.d.
https://www.lamoncloa.gob.es/serviciosdeprensa/notasprensa/sanidad14/Paginas/2020/10052020_datoscovid19.aspx (accessed December 7, 2022).
- [300] COVID-19 n.d.
<https://cneccovid.isciii.es/covid19/#ccaa> (accessed December 7, 2022).
- [301] Coronavirus (COVID-19) - 22 de febrero 2021 | DSN n.d.
<https://www.dsn.gob.es/es/actualidad/sala-prensa/coronavirus-covid-19-22->

- febrero-2021 (accessed December 7, 2022).
- [302] Henríquez J, Gonzalo-Almorox E, García-Goñi M, Paolucci F. The first months of the COVID-19 pandemic in Spain. *Health Policy and Technology* 2020;9:560–74. <https://doi.org/10.1016/j.hlpt.2020.08.013>.
- [303] Soriano V, Meiriño R, Corral O, Guallar MP. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibodies in Adults in Madrid, Spain. *Clin Infect Dis* 2021;72:1101–2. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa769>.
- [304] Diaz LF. Vigilancia de los excesos de mortalidad por todas las causas. *MoMo n.d.*:14.
- [305] ¿Cómo ha sido la mortalidad en cada CCAA en las distintas olas de covid19? | @diariofarma. *diariofarma* 2021. <https://diariofarma.com/2021/04/15/como-ha-sido-la-mortalidad-en-cada-ccaa-en-las-distintas-olas-de-covid19> (accessed December 7, 2022).
- [306] Han E, Tan MMJ, Turk E, Sridhar D, Leung GM, Shibuya K, et al. Lessons learnt from easing COVID-19 restrictions: an analysis of countries and regions in Asia Pacific and Europe. *The Lancet* 2020;396:1525–34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32007-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32007-9).
- [307] Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática. Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. vol. BOE-A-2020-3692. 2020.
- [308] La Moncloa. 28/04/2020. Plan de desescalada [Consejo de Ministros] n.d. <https://www.lamoncloa.gob.es/consejodeministros/Paginas/enlaces/280420-enlace-desescalada.aspx> (accessed December 7, 2022).
- [309] Ministerio de Sanidad. Actualización nº 90. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 29.04.2020 (datos consolidados a las 21:00 horas del 28.04.2020) SITUACIÓN EN ESPAÑA n.d.
- [310] Ministerio de Sanidad. Actualización nº 144. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 22.06.2020 (datos consolidados a las 14:00 horas del 22.06.2020) SITUACIÓN EN ESPAÑA n.d.
- [311] Haider N, Osman AY, Gadzekpo A, Akipede GO, Asogun D, Ansumana R, et al. Lockdown measures in response to COVID-19 in nine sub-Saharan African countries. *BMJ Global Health* 2020;5:e003319. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-003319>.
- [312] Haug N, Geyrhofer L, Londei A, Dervic E, Desvars-Larrive A, Loreto V, et al. Ranking the effectiveness of worldwide COVID-19 government interventions. *Nat Hum Behav* 2020;4:1303–12. <https://doi.org/10.1038/s41562-020-01009-0>.
- [313] Alfano V, Ercolano S. The Efficacy of Lockdown Against COVID-19: A Cross-Country Panel Analysis. *Appl Health Econ Health Policy* 2020;18:509–17. <https://doi.org/10.1007/s40258-020-00596-3>.
- [314] Lau H, Khosrawipour V, Kocbach P, Mikolajczyk A, Schubert J, Bania J, et al. The positive impact of lockdown in Wuhan on containing the COVID-19 outbreak in China. *Journal of Travel Medicine* 2020;27:taaa037. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa037>.
- [315] Gerli AG, Centanni S, Miozzo MR, Virchow JC, Sotgiu G, Canonica GW, et al. COVID-19 mortality rates in the European Union, Switzerland, and the UK: effect of timeliness, lockdown rigidity, and population density. *Minerva Med* 2020;111:308–14. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.20.06702-6>.
- [316] Violence against women and girls: the shadow pandemic. UN Women – Headquarters n.d. <https://www.unwomen.org/en/news/stories/2020/4/statement-ed-phumzile-violence-against-women-during-pandemic> (accessed December 7, 2022).
- [317] Ruiz-Pérez I, Pastor-Moreno G. Medidas de contención de la violencia de género durante la pandemia de COVID-19. *Gaceta Sanitaria* 2021;35:389–94. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2020.04.005>.
- [318] Mojahed A, Brym S, Hense H, Grafe B, Helfferich C, Lindert J, et al. Rapid Review on the Associations of Social and Geographical Isolation and Intimate Partner Violence: Implications for the Ongoing COVID-19 Pandemic. *Front Psychiatry* 2021;12:578150. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.578150>.
- [319] Sharma P, Sharma S, Singh N. COVID-19: Endangering women’s mental and reproductive health. *Indian J Public Health* 2020;64:S251–2. https://doi.org/10.4103/ijph.IJPH_498_20.

- [320] Rodríguez-Jimenez R, Fares-Otero NE, García-Fernández L. Gender-based violence during COVID-19 outbreak in Spain. *Psychol Med* 2020;1–2. <https://doi.org/10.1017/S0033291720005024>.
- [321] Sepúlveda-Loyola W, Rodríguez-Sánchez I, Pérez-Rodríguez P, Ganz F, Torralba R, Oliveira DV, et al. Impact of Social Isolation Due to COVID-19 on Health in Older People: Mental and Physical Effects and Recommendations. *J Nutr Health Aging* 2020;24:938–47. <https://doi.org/10.1007/s12603-020-1469-2>.
- [322] Lara B, Carnes A, Dakterzada F, Benitez I, Piñol-Ripoll G. Neuropsychiatric symptoms and quality of life in Spanish patients with Alzheimer's disease during the COVID-19 lockdown. *Eur J Neurol* 2020;27:1744–7. <https://doi.org/10.1111/ene.14339>.
- [323] Holt-Lunstad J, Smith TB, Baker M, Harris T, Stephenson D. Loneliness and social isolation as risk factors for mortality: a meta-analytic review. *Perspect Psychol Sci* 2015;10:227–37. <https://doi.org/10.1177/1745691614568352>.
- [324] Brooks SK, Webster RK, Smith LE, Woodland L, Wessely S, Greenberg N, et al. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *The Lancet* 2020;395:912–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30460-8).
- [325] Luo M, Guo L, Yu M, Jiang W, Wang H. The psychological and mental impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on medical staff and general public - A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res* 2020;291:113190. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113190>.
- [326] Panda PK, Gupta J, Chowdhury SR, Kumar R, Meena AK, Madaan P, et al. Psychological and Behavioral Impact of Lockdown and Quarantine Measures for COVID-19 Pandemic on Children, Adolescents and Caregivers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Trop Pediatr* 2021;67:fmaa122. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmaa122>.
- [327] Lai J, Ma S, Wang Y, Cai Z, Hu J, Wei N, et al. Factors Associated With Mental Health Outcomes Among Health Care Workers Exposed to Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw Open* 2020;3:e203976. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.3976>.
- [328] Serrano-Ripoll MJ, Meneses-Echavez JF, Ricci-Cabello I, Fraile-Navarro D, Fiol-deRoque MA, Pastor-Moreno G, et al. Impact of viral epidemic outbreaks on mental health of healthcare workers: a rapid systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 2020;277:347–57. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.08.034>.
- [329] Muller AE, Hafstad EV, Himmels JPW, Smedslund G, Flottorp S, Stensland SØ, et al. The mental health impact of the covid-19 pandemic on healthcare workers, and interventions to help them: A rapid systematic review. *Psychiatry Res* 2020;293:113441. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113441>.
- [330] Di Tella M, Romeo A, Benfante A, Castelli L. Mental health of healthcare workers during the COVID-19 pandemic in Italy. *J Eval Clin Pract* 2020;26:1583–7. <https://doi.org/10.1111/jep.13444>.
- [331] Solomon MD, McNulty EJ, Rana JS, Leong TK, Lee C, Sung S-H, et al. The Covid-19 Pandemic and the Incidence of Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2020;383:691–3. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2015630>.
- [332] De Filippo O, D'Ascenzo F, Angelini F, Bocchino PP, Conrotto F, Saglietto A, et al. Reduced Rate of Hospital Admissions for ACS during Covid-19 Outbreak in Northern Italy. *N Engl J Med* 2020;383:88–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2009166>.
- [333] Metzler B, Siostrzonek P, Binder RK, Bauer A, Reinstadler SJ. Decline of acute coronary syndrome admissions in Austria since the outbreak of COVID-19: the pandemic response causes cardiac collateral damage. *Eur Heart J* 2020;41:1852–3. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa314>.
- [334] Estudio del Impacto de COVID-19 en las personas con enfermedad crónica. Plataforma de pacientes 2020. <https://www.plataformadepacientes.org/estudio-del-impacto-de-covid-19-en-las-personas-con-enfermedad-cronica> (accessed December 12, 2022).
- [335] National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2017 Emergency Department Summary Tables 2017:37.
- [336] Heppner Z, Shreffler J, Polites A, Ross A, Thomas JJ, Huecker M. COVID-19 and emergency department volume: The patients return but have different characteristics. *Am J Emerg Med* 2021;45:385–8.

- <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.09.009>.
- [337] Garcia S, Albaghdadi MS, Meraj PM, Schmidt C, Garberich R, Jaffer FA, et al. Reduction in ST-Segment Elevation Cardiac Catheterization Laboratory Activations in the United States During COVID-19 Pandemic. *J Am Coll Cardiol* 2020;75:2871–2. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.04.011>.
- [338] Bugger H, Gollmer J, Pregartner G, Wünsch G, Berghold A, Zirlik A, et al. Complications and mortality of cardiovascular emergency admissions during COVID-19 associated restrictive measures. *PLoS One* 2020;15:e0239801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239801>.
- [339] Delgado-Miguel C, Garcia Urbán J, Del Monte Ferrer C, Muñoz-Serrano A, Miguel-Ferrero M, Martínez L. Impact of the COVID-19 pandemic on acute appendicitis in children. *J Healthc Qual Res* 2022;37:225–30. <https://doi.org/10.1016/j.jhqr.2021.12.005>.
- [340] Velayos M, Muñoz-Serrano AJ, Estefanía-Fernández K, Sarmiento Caldas MC, López-Gutiérrez JC. Influencia de la pandemia por coronavirus 2(sars-cov-2) en la apendicitis aguda. *Sars-cov-2 en la apendicitis aguda. An pediatr (2003 Ed impr)* 2020;118–22.
- [341] Nogueira RG, Qureshi MM, Abdalkader M, Martins SO, Yamagami H, Qiu Z, et al. Global Impact of COVID-19 on Stroke Care and IV Thrombolysis. *Neurology* 2021;96:e2824–38. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011885>.
- [342] Diegoli H, Magalhães PSC, Martins SCO, Moro CHC, França PHC, Safanelli J, et al. Decrease in Hospital Admissions for Transient Ischemic Attack, Mild, and Moderate Stroke During the COVID-19 Era. *Stroke* 2020;51:2315–21. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.030481>.
- [343] Notas de prensa: la Comunidad de Madrid pone en marcha un plan histórico que unirá la sanidad pública y privada bajo una única coordinación. Dirección General de Medios de Comunicación. Marzo 2020.
- [344] Suárez J, Mata E, Guerra A, Jiménez G, Montes M, Arias F, et al. Impact of the COVID-19 pandemic during Spain's state of emergency on the diagnosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2021;123:32–6. <https://doi.org/10.1002/jso.26263>.
- [345] Vives N, Binefa G, Vidal C, Milà N, Muñoz R, Guardiola V, et al. Short-term impact of the COVID-19 pandemic on a population-based screening program for colorectal cancer in Catalonia (Spain). *Prev Med* 2022;155:106929. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2021.106929>.
- [346] Picchio CA, Valencia J, Doran J, Swan T, Pastor M, Martró E, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on harm reduction services in Spain. *Harm Reduction Journal* 2020;17:87. <https://doi.org/10.1186/s12954-020-00432-w>.
- [347] Romero-Hernández B, Martínez-García L, Rodríguez-Dominguez M, Martínez-Sanz J, Vélez-Díaz-Pallarés M, Pérez Mies B, et al. The Negative Impact of COVID-19 in HCV, HIV, and HPV Surveillance Programs During the Different Pandemic Waves. *Front Public Health* 2022;10:880435. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.880435>.
- [348] Quiros-Roldan E, Izzo I, Carriero C, Degli Antoni M, Storti S, Tiecco G, et al. Decrease in new diagnosis of HIV/AIDS in the two years period 2019–2020: impact of COVID-19 pandemic. *J Public Health Res* 2021;11:2256. <https://doi.org/10.4081/jphr.2021.2256>.
- [349] Volume 33 | HIV Surveillance | Reports | Resource Library | HIV/AIDS | CDC 2022. <https://www.cdc.gov/hiv/library/reports/hiv-surveillance/vol-33/index.html> (accessed December 12, 2022).
- [350] European Centre for Disease Prevention and Control, World Health Organization. HIV/AIDS surveillance in Europe 2021 : 2020 data. LU: European Centre for Disease Prevention and Control; 2021.
- [351] Hepatitis A - Annual Epidemiological Report for 2020. European Centre for Disease Prevention and Control 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hepatitis-annual-epidemiological-report-2020> (accessed December 12, 2022).
- [352] Hepatitis B - Annual Epidemiological Report for 2020. European Centre for Disease Prevention and Control 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hepatitis-b-annual-epidemiological-report-2020> (accessed December 12, 2022).
- [353] Hepatitis C - Annual Epidemiological Report for 2020. European Centre for Disease Prevention and Control 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hepatitis-c-annual->

- epidemiological-report-2020 (accessed December 12, 2022).
- [354] 2020 Viral Hepatitis Surveillance Report | CDC 2022. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2020surveillance/index.htm> (accessed December 12, 2022).
- [355] Guaraldi G, Zona S, Menozzi M, Brothers TD, Carli F, Stentarelli C, et al. Late presentation increases risk and costs of non-infectious comorbidities in people with HIV: an Italian cost impact study. *AIDS Res Ther* 2017;14:8. <https://doi.org/10.1186/s12981-016-0129-4>.
- [356] Blach S, Kondili LA, Aghemo A, Cai Z, Dugan E, Estes C, et al. Impact of COVID-19 on global HCV elimination efforts. *J Hepatol* 2021;74:31–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.042>.
- [357] World Health Organization. Combating hepatitis B and C to reach elimination by 2030: advocacy brief. World Health Organization; 2016.
- [358] Sowah L, Chiou C. Impact of Coronavirus Disease 2019 Pandemic on Viral Hepatitis Elimination: What Is the Price? *AIDS Res Hum Retroviruses* 2021;37:585–8. <https://doi.org/10.1089/AID.2020.0301>.
- [359] Sun Y, Li H, Luo G, Meng X, Guo W, Fitzpatrick T, et al. Antiretroviral treatment interruption among people living with HIV during COVID-19 outbreak in China: a nationwide cross-sectional study. *J Int AIDS Soc* 2020;23:e25637. <https://doi.org/10.1002/jia2.25637>.
- [360] Lee D, Chow EPF, Aguirre I, Fairley CK, Ong JJ. Access to HIV Antiretroviral Therapy among People Living with HIV in Melbourne during the COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:12765. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312765>.
- [361] Pley CM, McNaughton AL, Matthews PC, Lourenço J. The global impact of the COVID-19 pandemic on the prevention, diagnosis and treatment of hepatitis B virus (HBV) infection. *BMJ Glob Health* 2021;6:e004275. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-004275>.
- [362] Pagaoa M, Grey J, Torrone E, Kreisel K, Stenger M, Weinstock H. Trends in Nationally Notifiable Sexually Transmitted Disease Case Reports During the US COVID-19 Pandemic, January to December 2020. *Sexually Transmitted Diseases* 2021;48:798. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001506>.
- [363] Li G, Tang D, Song B, Wang C, Qunshan S, Xu C, et al. Impact of the COVID-19 Pandemic on Partner Relationships and Sexual and Reproductive Health: Cross-Sectional, Online Survey Study. *J Med Internet Res* 2020;22:e20961. <https://doi.org/10.2196/20961>.
- [364] Coombe J, Kong FYS, Bittleston H, Williams H, Tomnay J, Vaisey A, et al. Love during lockdown: findings from an online survey examining the impact of COVID-19 on the sexual health of people living in Australia. *Sex Transm Infect* 2020. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2020-054688>.
- [365] Reyniers T, Rotsaert A, Thunissen E, Buffel V, Masquillier C, Van Landeghem E, et al. Reduced sexual contacts with non-steady partners and less PrEP use among MSM in Belgium during the first weeks of the COVID-19 lockdown: results of an online survey. *Sex Transm Infect* 2021;97:414–9. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2020-054756>.
- [366] Lehmler JJ, Garcia JR, Gesselman AN, Mark KP. Less Sex, but More Sexual Diversity: Changes in Sexual Behavior during the COVID-19 Coronavirus Pandemic. *Leisure Sciences* 2021;43:295–304. <https://doi.org/10.1080/01490400.2020.1774016>.
- [367] Chow EPF, Hocking JS, Ong JJ, Schmidt T, Buchanan A, Rodriguez E, et al. Changing the Use of HIV Pre-exposure Prophylaxis Among Men Who Have Sex With Men During the COVID-19 Pandemic in Melbourne, Australia. *Open Forum Infect Dis* 2020;7:ofaa275. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa275>.
- [368] Sanchez TH, Zlotorzynska M, Rai M, Baral SD. Characterizing the Impact of COVID-19 on Men Who Have Sex with Men Across the United States in April, 2020. *AIDS Behav* 2020;24:2024–32. <https://doi.org/10.1007/s10461-020-02894-2>.
- [369] Stephenson R, Chavanduka TMD, Rosso MT, Sullivan SP, Pitter RA, Hunter AS, et al. Sex in the Time of COVID-19: Results of an Online Survey of Gay, Bisexual and Other Men Who Have Sex with Men's Experience of Sex and HIV Prevention During the US COVID-19 Epidemic. *AIDS Behav* 2021;25:40–8. <https://doi.org/10.1007/s10461-020-03024-8>.

- [370] Howarth AR, Saunders J, Reid D, Kelly I, Wyal S, Weatherburn P, et al. 'Stay at home ...': exploring the impact of the COVID-19 public health response on sexual behaviour and health service use among men who have sex with men: findings from a large online survey in the UK. *Sex Transm Infect* 2022;98:346–52. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2021-055039>.
- [371] Ballester-Arnal R, Nebot-García JE, Ruiz-Palomino E, Giménez-García C, Gil-Llario MD. "INSIDE" Project on Sexual Health in Spain: Sexual Life During the Lockdown Caused by COVID-19. *Sex Res Social Policy* 2021;18:1023–41. <https://doi.org/10.1007/s13178-020-00506-1>.
- [372] Oh TH, Baeck JH, Lee SR, Park DS, Yu YD. The Prevalence of Sexually Transmitted Infections and Sociosexual Behaviors in the South Korean Military Before and During the COVID-19 Pandemic. *Mil Med* 2021;usab479. <https://doi.org/10.1093/milmed/usab479>.
- [373] Tu P, Li J, Jiang X, Pei K, Gu Y. Impact of the COVID-19 pandemic on sexual and reproductive health among women with induced abortion. *Sci Rep* 2021;11:16310. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95868-w>.
- [374] Sexual relationships during the lockdown: Adjusting sex counselling and therapy to the restriction of quarantine - ESSM n.d. <https://www.essm.org/adjusting-sex-therapy-to-the-restriction-of-quarantine/> (accessed April 7, 2021).
- [375] Ogunbodede OT, Zablotska-Manos I, Lewis DA. Potential and demonstrated impacts of the COVID-19 pandemic on sexually transmissible infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2021;34:56–61. <https://doi.org/10.1097/QCO.00000000000000699>.
- [376] Chow EPF, Hocking JS, Ong JJ, Phillips TR, Fairley CK. Sexually Transmitted Infection Diagnoses and Access to a Sexual Health Service Before and After the National Lockdown for COVID-19 in Melbourne, Australia. *Open Forum Infect Dis* 2021;8:ofaa536. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa536>.
- [377] Lai C-C, Chen S-Y, Yen M-Y, Lee P-I, Ko W-C, Hsueh P-R. The impact of the coronavirus disease 2019 epidemic on notifiable infectious diseases in Taiwan: A database analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2021;40:101997. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.101997>.
- [378] BASHH ISSUES GUIDANCE ON SEX, SOCIAL DISTANCING AND COVID-19 n.d. <https://www.bashh.org/news/news/bashh-issues-guidance-on-sex-social-distancing-and-covid-19/> (accessed December 8, 2022).
- [379] Notas de prensa: la Comunidad de Madrid pone en marcha un plan histórico que unirá la sanidad pública y privada bajo una única coordinación. Dirección General de Medios de Comunicación. Marzo 2020.
- [380] Simões D, Stengaard AR, Combs L, Raben D, Pharris A, Winter A, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on testing services for HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections in the WHO European Region, March to August 2020. *Euro Surveill* 2020;25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.47.2001943>.
- [381] Simões D, Stengaard AR, Combs L, Raben D, EuroTEST COVID-19 impact assessment consortium of partners. Impact of the COVID-19 pandemic on testing services for HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections in the WHO European Region, March to August 2020. *Euro Surveill* 2020;25:2001943. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.47.2001943>.
- [382] Tarin-Vicente EJ, Sendagorta Cudos E, Servera Negre G, Falces Romero I, Ballesteros Martín J, Martín-Gorgojo A, et al. Sexually Transmitted Infections During the First Wave of the COVID-19 Pandemic in Spain. *Actas Dermosifiliogr* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2021.11.024>.
- [383] Sentís A, Prats-Urbe A, López-Corbeto E, Montoro-Fernandez M, Nomah DK, de Olalla PG, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on Sexually Transmitted Infections surveillance data: incidence drop or artefact? *BMC Public Health* 2021;21:1637. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-11630-x>.
- [384] Overview n.d. <https://eurohealthobservatory.who.int/monitors/hsrm/overview> (accessed December 17, 2022).
- [385] White JA. Manifestations and management of lymphogranuloma venereum: Current Opinion in Infectious Diseases 2009;22:57–66. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328320a8ae>.

- [386] Stoner BP, Cohen SE. Lymphogranuloma Venereum 2015: Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clin Infect Dis* 2015;61:S865–73. <https://doi.org/10.1093/cid/civ756>.
- [387] Gupta S, Ajith C, Kanwar AJ, Sehgal VN, Kumar B, Mete U. Genital elephantiasis and sexually transmitted infections - revisited. *Int J STD AIDS* 2006;17:157–65; quiz 166. <https://doi.org/10.1258/095646206775809150>.
- [388] Buder S, Schöfer H, Meyer T, Bremer V, Kohl PK, Skaletz-Rorowski A, et al. Bacterial sexually transmitted infections. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019;17:287–315. <https://doi.org/10.1111/ddg.13804>.
- [389] Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2013;31:20–5. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70110-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70110-1).
- [390] Palomo AO. Emilia Cercenado Mansilla Rafael Cantón Moreno n.d.
- [391] Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis* 2011;24:62–9. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834204d5>.
- [392] Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1981;31:1161–76. <https://doi.org/10.1128/iai.31.3.1161-1176.1981>.
- [393] *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2318528/> (accessed December 17, 2022).
- [394] The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22986056/> (accessed December 17, 2022).
- [395] Schachter J. Chlamydial infections. *West J Med* 1990;153:523–34.
- [396] Grayston JT, Wang S. New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause. *J Infect Dis* 1975;132:87–105. <https://doi.org/10.1093/infdis/132.1.87>.
- [397] Brunelle BW, Sensabaugh GF. The ompA gene in *Chlamydia trachomatis* differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. *Infect Immun* 2006;74:578–85. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.578-585.2006>.
- [398] Caldwell HD, Schachter J. Antigenic Analysis of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia* spp. *Infect Immun* 1982;35:1024–31.
- [399] Barnes RC, Wang SP, Kuo CC, Stamm WE. Rapid immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies in a solid-phase enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1985;22:609–13.
- [400] Schachter J. Chlamydial Infections. *New England Journal of Medicine* 1978;298:540–9. <https://doi.org/10.1056/NEJM197803092981005>.
- [401] Dean D, Millman K. Molecular and mutation trends analyses of omp1 alleles for serovar E of *Chlamydia trachomatis*. Implications for the immunopathogenesis of disease. *J Clin Invest* 1997;99:475–83.
- [402] Dean D, Patton M, Stephens RS. Direct sequence evaluation of the major outer membrane protein gene variant regions of *Chlamydia trachomatis* subtypes D', I', and L2'. *Infect Immun* 1991;59:1579–82. <https://doi.org/10.1128/iai.59.4.1579-1582.1991>.
- [403] Morré SA, Ossewaarde JM, Lan J, van Doornum GJJ, Walboomers JMM, MacLaren DM, et al. Serotyping and Genotyping of Genital *Chlamydia trachomatis* Isolates Reveal Variants of Serovars Ba, G, and J as Confirmed by omp1 Nucleotide Sequence Analysis. *J Clin Microbiol* 1998;36:345–51.
- [404] Petrovay F, Balla E, Németh I, Gönczöl É. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from the endocervical specimens of high-risk women in Hungary. *J Med Microbiol* 2009;58:760–4. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.008607-0>.
- [405] Vaulet LG, Entrocassi C, Portu AI, Castro E, Bartolomeo SD, Ruettger A, et al. High Frequency of *Chlamydia trachomatis* Mixed Infections Detected by Microarray Assay in South American Samples. *PLOS ONE* 2016;11:e0153511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153511>.
- [406] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003;49:853–60. <https://doi.org/10.1373/49.6.853>.
- [407] Giffard PM, Andersson P, Wilson J, Buckley C, Lilliebridge R, Harris TM, et al. CtGEM typing: Discrimination of *Chlamydia trachomatis* ocular and urogenital strains

- and major evolutionary lineages by high resolution melting analysis of two amplified DNA fragments. *PLoS ONE* 2018;13:e0195454.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195454>.
- [408] Lan J, Walboomers JM, Roosendaal R, van Doornum GJ, MacLaren DM, Meijer CJ, et al. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:1060–5.
<https://doi.org/10.1128/jcm.31.5.1060-1065.1993>.
- [409] Quint KD, van Doorn L-J, Kleter B, de Koning MNC, van den Munckhof HAM, Morre SA, et al. A highly sensitive, multiplex broad-spectrum PCR-DNA-enzyme immunoassay and reverse hybridization assay for rapid detection and identification of *Chlamydia trachomatis* serovars. *J Mol Diagn* 2007;9:631–8.
<https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.070011>.
- [410] Li J-H, Yin Y-P, Zheng H-P, Zhong M-Y, Peng R-R, Wang B, et al. A high-resolution melting analysis for genotyping urogenital *Chlamydia trachomatis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010;68:366–74.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.013>.
- [411] Dean D, Bruno WJ, Wan R, Gomes JP, Devignot S, Mehari T, et al. Predicting Phenotype and Emerging Strains among *Chlamydia trachomatis* Infections. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1385–94.
<https://doi.org/10.3201/eid1509.090272>.
- [412] Gomes JP, Nunes A, Bruno WJ, Borrego MJ, Florindo C, Dean D. Polymorphisms in the Nine Polymorphic Membrane Proteins of *Chlamydia trachomatis* across All Serovars: Evidence for Serovar Da Recombination and Correlation with Tissue Tropism. *J Bacteriol* 2006;188:275–86.
<https://doi.org/10.1128/JB.188.1.275-286.2006>.
- [413] Gomes JP, Bruno WJ, Borrego MJ, Dean D. Recombination in the Genome of *Chlamydia trachomatis* Involving the Polymorphic Membrane Protein C Gene Relative to *ompA* and Evidence for Horizontal Gene Transfer. *J Bacteriol* 2004;186:4295–306.
<https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4295-4306.2004>.
- [414] Henderson IR, Lam AC. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol* 2001;9:573–8.
[https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02234-x](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02234-x).
- [415] Grimwood J, Stephens RS. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics* 1999;4:187–201.
<https://doi.org/10.1089/omi.1.1999.4.187>.
- [416] Stothard DR, Toth GA, Batteiger BE. Polymorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three disease-causing groups of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 2003;71:1200–8.
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1200-1208.2003>.
- [417] Chen C-Y, Chi K-H, Alexander S, Martin IMC, Liu H, Ison CA, et al. The molecular diagnosis of lymphogranuloma venereum: evaluation of a real-time multiplex polymerase chain reaction test using rectal and urethral specimens. *Sex Transm Dis* 2007;34:451–5.
<https://doi.org/10.1097/01.olq.0000245957.02939.ea>.
- [418] Stevens MP, Twin J, Fairley CK, Donovan B, Tan SE, Yu J, et al. Development and evaluation of an *ompA* quantitative real-time PCR assay for *Chlamydia trachomatis* serovar determination. *J Clin Microbiol* 2010;48:2060–5.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02308-09>.
- [419] Lan J, Ossewaarde JM, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *Chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:528–30.
- [420] Pedersen LN, Herrmann B, MÄller JK. Typing *Chlamydia trachomatis* : from egg yolk to nanotechnology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2009;55:120–30.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00526.x>.
- [421] Pannekoek Y, Morelli G, Kusecek B, Morré SA, Ossewaarde JM, Langerak AA, et al. Multi locus sequence typing of *Chlamydiales*: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*. *BMC Microbiol* 2008;8:42.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-42>.
- [422] Klint M, Fuxelius H-H, Goldkuhl RR, Skarin H, Rutemark C, Andersson SGE, et al. High-Resolution Genotyping of *Chlamydia trachomatis* Strains by Multilocus Sequence Analysis. *J Clin Microbiol*

- 2007;45:1410–4.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02301-06>.
- [423] Lindstedt B-A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005;26:2567–82.
<https://doi.org/10.1002/elps.200500096>.
- [424] Nadon CA, Trees E, Ng LK, Nielsen EM, Reimer A, Maxwell N, et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. *Eurosurveillance* 2013;18:undefined-undefined.
- [425] Pedersen LN, Pødenphant L, Møller JK. Highly discriminative genotyping of *Chlamydia trachomatis* using omp1 and a set of variable number tandem repeats. *Clinical Microbiology and Infection* 2008;14:644–52.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02011.x>.
- [426] Ikryannikova LN, Shkarupeta MM, Shitikov EA, Il'ina EN, Govorun VM. Comparative evaluation of new typing schemes for urogenital *Chlamydia trachomatis* isolates. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2010;59:188–96.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00678.x>.
- [427] Bom RJM, Christerson L, Schim van der Loeff MF, Coutinho RA, Herrmann B, Bruisten SM. Evaluation of High-Resolution Typing Methods for *Chlamydia trachomatis* in Samples from Heterosexual Couples. *J Clin Microbiol* 2011;49:2844–53. <https://doi.org/10.1128/JCM.00128-11>.
- [428] Tagini F, Greub G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:2007–20.
<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3024-6>.
- [429] Taylor-Brown A, Madden D, Polkinghorne A. Culture-independent approaches to chlamydial genomics. *Microbial Genomics* 2018;4.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000145>.
- [430] Christiansen MT, Brown AC, Kundu S, Tutill HJ, Williams R, Brown JR, et al. Whole-genome enrichment and sequencing of *Chlamydia trachomatis* directly from clinical samples. *BMC Infect Dis* 2014;14:591.
<https://doi.org/10.1186/s12879-014-0591-3>.
- [431] Bowden KE, Joseph SJ, Cartee JC, Ziklo N, Danavall D, Raphael BH, et al. Whole-Genome Enrichment and Sequencing of *Chlamydia trachomatis* Directly from Patient Clinical Vaginal and Rectal Swabs 2021;6:15.
- [432] Borges V, Cordeiro D, Salas AI, Lodhia Z, Correia C, Isidro J, et al. *Chlamydia trachomatis*: when the virulence-associated genome backbone imports a prevalence-associated major antigen signature. *Microb Genom* 2019;5:e000313.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000313>.
- [433] Christerson L, de Vries HJC, de Barbeyrac B, Gaydos CA, Henrich B, Hoffmann S, et al. Typing of Lymphogranuloma Venereum *Chlamydia trachomatis* Strains. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1777–9.
<https://doi.org/10.3201/eid1611.100379>.
- [434] Isaksson J, Carlsson O, Airell Å, Strömdahl S, Bratt G, Herrmann B. Lymphogranuloma venereum rates increased and *Chlamydia trachomatis* genotypes changed among men who have sex with men in Sweden 2004–2016. *Journal of Medical Microbiology* 2017;66:1684–7.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000597>.
- [435] Clarke IN. Evolution of *Chlamydia trachomatis*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1230:E11–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06194.x>.
- [436] Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HMB, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P, et al. Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 2012;44:413–9.
<https://doi.org/10.1038/ng.2214>.
- [437] Katoh K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 2002;30:3059–66.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
- [438] Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 1993;10:512–26.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- [439] Shimodaira H, Hasegawa M. Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Molecular Biology and Evolution* 1999;16:1114.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026201>.
- [440] Nunes A, Borrego MJ, Nunes B, Florindo C, Gomes JP. Evolutionary dynamics of ompA, the gene encoding the *Chlamydia*

- trachomatis key antigen. *J Bacteriol* 2009;191:7182–92.
<https://doi.org/10.1128/JB.00895-09>.
- [441] Qin X, Zheng H, Xue Y, Ren X, Yang B, Huang J, et al. Prevalence of Chlamydia trachomatis Genotypes in Men Who Have Sex with Men and Men Who Have Sex with Women Using Multilocus VNTR Analysis-ompA Typing in Guangzhou, China. *PLoS One* 2016;11:e0159658.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159658>.
- [442] Geisler WM, Whittington WLH, Suchland RJ, Stamm WE. Epidemiology of Anorectal Chlamydial and Gonococcal Infections Among Men Having Sex With Men in Seattle: Utilizing Serovar and Auxotype Strain Typing. *Sexually Transmitted Diseases* 2002;29:189–95.
- [443] Chow EPF, Tomnay J, Fehler G, Whiley D, Read TRH, Denham I, et al. Substantial increases in chlamydia and gonorrhea positivity unexplained by changes in individual-level sexual behaviors among men who have sex with men in an Australian sexual health service from 2007 to 2013. *Sex Transm Dis* 2015;42:81–7.
<https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000232>.
- [444] Herbenick D, Rosenberg M, Golzarri-Arroyo L, Fortenberry JD, Fu T-C. Changes in Penile-Vaginal Intercourse Frequency and Sexual Repertoire from 2009 to 2018: Findings from the National Survey of Sexual Health and Behavior. *Arch Sex Behav* 2022;51:1419–33.
<https://doi.org/10.1007/s10508-021-02125-2>.
- [445] Tao G, Gift TL. Healthcare provider awareness of the recent FDA approval on first diagnostic tests for extragenital testing for chlamydia and gonorrhea. *Preventive Medicine* 2022;159:107078.
<https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2022.107078>.
- [446] Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, et al. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021 2021;70.
- [447] Ratnayake A, Campbell MB, Jones A, Gomes G, Martin DH, Kissinger PJ. Anal and Oral Sex Behaviors Among Young Black Men Who Have Vaginal Sex: Evidence of the Need for Extragenital Testing for Chlamydia and Gonorrhea. *Sex Transm Dis* 2022;49:826–30.
<https://doi.org/10.1097/OLQ.00000000000001709>.
- [448] Assaf RD, Cunningham NJ, Adamson PC, Jann JT, Bolan RK. High proportions of rectal and pharyngeal chlamydia and gonorrhoea cases among cisgender men are missed using current CDC screening recommendations. *Sex Transm Infect* 2022;98:586–91.
<https://doi.org/10.1136/sextrans-2021-055361>.
- [449] World Health Organization. WHO Guidelines for the treatment of Chlamydia trachomatis. 2016. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246165/9789241549714-eng.pdf>.
- [450] Commissioner O of the. FDA clears first diagnostic tests for extragenital testing for chlamydia and gonorrhea. FDA 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-clears-first-diagnostic-tests-extragenital-testing-chlamydia-and-gonorrhea> (accessed December 18, 2022).
- [451] Chan PA, Robinette A, Montgomery M, Almonte A, Cu-Uvin S, Lonks JR, et al. Extragenital Infections Caused by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: A Review of the Literature. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2016;2016:5758387.
<https://doi.org/10.1155/2016/5758387>.
- [452] Chow EP, Fairley CK. The role of saliva in gonorrhoea and chlamydia transmission to extragenital sites among men who have sex with men: new insights into transmission. *J Int AIDS Soc* 2019;22 Suppl 6:e25354.
<https://doi.org/10.1002/jia2.25354>.
- [453] Dudareva-Vizule S, Haar K, Sailer A, Wisplinghoff H, Wisplinghoff F, Marcus U, et al. Prevalence of pharyngeal and rectal Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections among men who have sex with men in Germany. *Sex Transm Infect* 2014;90:46–51.
<https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-050929>.
- [454] Tongtoyai J, Todd CS, Chonwattana W, Pattanasin S, Chaikummao S, Varangrat A, et al. Prevalence and Correlates of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by Anatomic Site Among Urban Thai Men Who Have Sex With Men. *Sexually Transmitted Diseases* 2015;42:440–9.
<https://doi.org/10.1097/OLQ.00000000000000311>.
- [455] Cornelisse VJ, Sherman CJ, Hocking JS, Williams H, Zhang L, Chen MY, et al. Concordance of chlamydia infections of the rectum and urethra in same-sex male partnerships: a cross-sectional analysis. *BMC Infectious Diseases* 2017;17:22.

- <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2141-7>.
- [456] Rice CE, Maierhofer C, Fields KS, Ervin M, Lanza ST, Turner AN. Beyond Anal Sex: Sexual Practices of Men Who Have Sex With Men and Associations With HIV and Other Sexually Transmitted Infections. *The Journal of Sexual Medicine* 2016;13:374–82. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2016.01.001>.
- [457] Lau A, Kong FYS, Huston W, Chow EPF, Fairley CK, Hocking JS. Factors associated with anorectal *Chlamydia trachomatis* or *Neisseria gonorrhoeae* test positivity in women: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect* 2019;95:361–7. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2018-053950>.
- [458] Gratrix J, Singh AE, Bergman J, Egan C, Plitt SS, McGinnis J, et al. Evidence for increased *Chlamydia* case finding after the introduction of rectal screening among women attending 2 Canadian sexually transmitted infection clinics. *Clin Infect Dis* 2015;60:398–404. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu831>.
- [459] Visser M, Dvorakova M, Aar F van, Heijne JCM. Increased risk of subsequent chlamydia infection among women not tested at the anorectal anatomical location. *Sex Transm Infect* 2022;98:317–22. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2021-054991>.
- [460] Dukers-Muijers NHTM, Janssen KJH, Hoebe CIPA, Götz HM, Schim van der Loeff MF, de Vries HJC, et al. Spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* accounting for bacterial viability in vaginally or rectally infected women (FemCure). *Sex Transm Infect* 2020;96:541–8. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2019-054267>.
- [461] Barbee LA, Khosropour CM, Soge OO, Hughes JP, Haglund M, Yeung W, et al. The Natural History of Rectal Gonococcal and Chlamydial Infections: The ExGen Study. *Clin Infect Dis* 2022;74:1549–56. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab680>.
- [462] Tabesh M, Fairley CK, Hocking JS, Williamson DA, Zhang L, Xu X, et al. Comparison of the patterns of chlamydia and gonorrhoea at the oropharynx, anorectum and urethra among men who have sex with men. *Sex Transm Infect* 2022;98:11–6. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2020-054632>.
- [463] Ferrer L, González V, Martró E, Folch C, Saludes V, Muñoz R, et al. High HIV/STI prevalence among cisgender men and transgender women sex workers attending community-based centres in Barcelona, Spain: The Sweetie Project. *Int J STD AIDS* 2022;33:1045–53. <https://doi.org/10.1177/09564624221116536>.
- [464] Man OM, Ramos WE, Vavala G, Goldbeck C, Ocasio MA, Fournier J, et al. Optimizing Screening for Anorectal, Pharyngeal, and Urogenital *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections in At-Risk Adolescents and Young Adults in New Orleans, Louisiana and Los Angeles, California, United States. *Clin Infect Dis* 2021;73:e3201–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1838>.
- [465] Bui HTM, Adamson PC, Le GM, Klausner JD. Pharyngeal *Chlamydia trachomatis* in Men Who Have Sex With Men in a Human Immunodeficiency Virus (HIV) Pre-exposure Prophylaxis Program in Hanoi, Vietnam. *Clin Infect Dis* 2022;75:2045–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac618>.
- [466] Dolat L, Valdivia RH. A renewed tool kit to explore *Chlamydia* pathogenesis: from molecular genetics to new infection models. *F1000Res* 2019;8:935. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18832.1>.
- [467] van Rooijen MS, van der Loeff MFS, Morré SA, van Dam AP, Speksnijder AGCL, de Vries HJC. Spontaneous pharyngeal *Chlamydia trachomatis* RNA clearance. A cross-sectional study followed by a cohort study of untreated STI clinic patients in Amsterdam, The Netherlands. *Sex Transm Infect* 2015;91:157–64. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2014-051633>.
- [468] Khosropour CM, Soge OO, Golden MR, Hughes JP, Barbee LA. Incidence and Duration of Pharyngeal *Chlamydia* Among a Cohort of Men Who Have Sex With Men. *Clin Infect Dis* 2022;75:875–81. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1022>.
- [469] Wijers JNAP, Dukers-Muijers NHTM, van Liere GAFS, Dirks JAMC, Wolffs PFG, Hoebe CIPA. Men and Women Have an Equal Oropharyngeal and Anorectal *Chlamydia trachomatis* Bacterial Load: A Comparison of 3 Anatomic Sites. *J Infect Dis* 2021;223:1582–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz668>.
- [470] Templeton DJ, Jin F, Imrie J, Prestage GP, Donovan B, Cunningham PH, et al. Prevalence, incidence and risk factors for pharyngeal chlamydia in the community

- based Health in Men (HIM) cohort of homosexual men in Sydney, Australia. *Sex Transm Infect* 2008;84:361–3. <https://doi.org/10.1136/sti.2008.032037>.
- [471] Jones RB, Rabinovitch RA, Katz BP, Batteiger BE, Quinn TS, Terho P, et al. Chlamydia trachomatis in the pharynx and rectum of heterosexual patients at risk for genital infection. *Ann Intern Med* 1985;102:757–62. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-102-6-757>.
- [472] Peters RPH, Verweij SP, Nijsten N, Ouburg S, Mutsaers J, Jansen CL, et al. Evaluation of sexual history-based screening of anatomic sites for chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infection in men having sex with men in routine practice. *BMC Infect Dis* 2011;11:203. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-203>.
- [473] Kent CK, Chaw JK, Wong W, Liska S, Gibson S, Hubbard G, et al. Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal chlamydia and gonorrhea detected in 2 clinical settings among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. *Clin Infect Dis* 2005;41:67–74. <https://doi.org/10.1086/430704>.
- [474] Turner AN, Reese PC, Ervin M, Davis JA, Fields KS, Bazan JA. HIV, rectal chlamydia and rectal gonorrhoea in men who have sex with men attending an STD clinic in a midwestern US city. *Sex Transm Dis* 2013;40:10.1097/OLQ.0b013e31828fd163. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31828fd163>.
- [475] Dukers-Muijers NHTM, Evers YJ, Hoebe CJP, Wolffs PFG, de Vries HJC, Hoenderboom B, et al. Controversies and evidence on Chlamydia testing and treatment in asymptomatic women and men who have sex with men: a narrative review. *BMC Infect Dis* 2022;22:255. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07171-2>.
- [476] Malekinejad M, Barker EK, Merai R, Lyles CM, Bernstein KT, Sipe TA, et al. Risk of HIV Acquisition Among Men Who Have Sex With Men Infected With Bacterial Sexually Transmitted Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sex Transm Dis* 2021;48:e138–48. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001403>.
- [477] Bernstein KT, Marcus JL, Nieri G, Philip SS, Klausner JD. Rectal gonorrhoea and chlamydia reinfection is associated with increased risk of HIV seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;53:537–43. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181c3ef29>.
- [478] Annan NT, Sullivan AK, Nori A, Naydenova P, Alexander S, McKenna A, et al. Rectal chlamydia—a reservoir of undiagnosed infection in men who have sex with men. *Sex Transm Infect* 2009;85:176–9. <https://doi.org/10.1136/sti.2008.031773>.
- [479] Evers YJ, van Liere GAFS, Dukers-Muijers NHTM, van Bergen J, Kuizenga-Wessel S, Hoebe CJP. Routine universal testing versus selective or incidental testing for oropharyngeal Chlamydia trachomatis in women in the Netherlands: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2022;22:552–61. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00465-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00465-5).
- [480] van Liere GAFS, van Rooijen MS, Hoebe CJP, Heijman T, de Vries HJC, Dukers-Muijers NHTM. Prevalence of and Factors Associated with Rectal-Only Chlamydia and Gonorrhoea in Women and in Men Who Have Sex with Men. *PLoS One* 2015;10:e0140297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140297>.
- [481] Evers YJ, Dukers-Muijers NHTM, van Liere GAFS, van Bergen J, Kuizenga-Wessel S, Hoebe CJP. Pharyngeal *Chlamydia trachomatis* in Men Who Have Sex With Men (MSM) in The Netherlands: A Large Retrospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases* 2022;74:1480–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab685>.
- [482] Xu X, Chow EPF, Ong JJ, Hoebe CJP, Zou Z, Hocking JS, et al. Chlamydia trachomatis transmission between the oropharynx, urethra and anorectum in men who have sex with men: a mathematical model. *BMC Med* 2020;18:326. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01796-3>.
- [483] Passaro RC, Segura ER, Perez-Brumer A, Cabeza J, Montano SM, Lake JE, et al. Body Parts Matter: Social, Behavioral, and Biological Considerations for Urethral, Pharyngeal, and Rectal Gonorrhoea and Chlamydia Screening Among MSM in Lima, Peru. *Sex Transm Dis* 2018;45:607–14. <https://doi.org/10.1097/OLQ.00000000000000816>.
- [484] Spicknall IH, Mayer KH, Aral SO, Romero-Severson EO. Assessing Uncertainty in an Anatomical Site-Specific Gonorrhoea Transmission Model of Men Who Have Sex With Men. *Sex Transm Dis* 2019;46:321–8.

- <https://doi.org/10.1097/OLQ.00000000000000953>.
- [485] Saxon C, Hughes G, Ison C. Asymptomatic Lymphogranuloma Venereum in Men who Have Sex with Men, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2016;22:112–6. <https://doi.org/10.3201/eid2201.141867>.
- [486] Pallawela S, Bradshaw D, Hodson L, Rehill K, Wong F, Rockwood N, et al. Screening for asymptomatic lymphogranuloma venereum co-infection in men who have sex with men newly diagnosed with HIV, hepatitis C or syphilis. *Int J STD AIDS* 2016;27:625–7. <https://doi.org/10.1177/0956462415592802>.
- [487] Hughes Y, Chen MY, Fairley CK, Hocking JS, Williamson D, Ong JJ, et al. Universal lymphogranuloma venereum (LGV) testing of rectal chlamydia in men who have sex with men and detection of asymptomatic LGV. *Sex Transm Infect* 2022;98:582–5. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2021-055368>.
- [488] de Vries HJC, de Barbeyrac B, de Vrieze NHN, Viset JD, White JA, Vall-Mayans M, et al. 2019 European guideline on the management of lymphogranuloma venereum. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019. <https://doi.org/10.1111/jdv.15729>.
- [489] Simons R, Candfield S, French P, White JA. Observed Treatment Responses to Short-Course Doxycycline Therapy for Rectal Lymphogranuloma Venereum in Men Who Have Sex With Men. *Sex Transm Dis* 2018;45:406–8. <https://doi.org/10.1097/OLQ.00000000000000772>.
- [490] Gjurašin B, Lepej SŽ, Cole MJ, Pitt R, Begovac J. Chlamydia trachomatis in Cervical Lymph Node of Man with Lymphogranuloma Venereum, Croatia, 2014. *Emerg Infect Dis* 2018;24:806–8. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171872>.
- [491] Handsfield HH. Lymphogranuloma Venereum Treatment and Terminology. *Sex Transm Dis* 2018;45:409–11. <https://doi.org/10.1097/OLQ.00000000000000853>.
- [492] Albay DT, Mathisen GE. Head and neck manifestations of lymphogranuloma venereum. *Ear Nose Throat J* 2008;87:478–80.
- [493] de Vrieze NHN, Versteeg B, Bruisten SM, van Rooijen MS, van der Helm JJ, de Vries HJC. Low Prevalence of Urethral Lymphogranuloma Venereum Infections Among Men Who Have Sex With Men: A Prospective Observational Study, Sexually Transmitted Infection Clinic in Amsterdam, the Netherlands. *Sex Transm Dis* 2017;44:547–50. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000657>.
- [494] Touati A, Laurier-Nadalié C, Bébéar C, Peuchant O, de Barbeyrac B. Evaluation of four commercial real-time PCR assays for the detection of lymphogranuloma venereum in Chlamydia trachomatis-positive anorectal samples. *Clin Microbiol Infect* 2021;27:909.e1-909.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.040>.
- [495] Chen C-Y, Chi KH, Alexander S, Ison CA, Ballard RC. A real-time quadriplex PCR assay for the diagnosis of rectal lymphogranuloma venereum and non-lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis infections. *Sex Transm Infect* 2008;84:273–6. <https://doi.org/10.1136/sti.2007.029058>.
- [496] Otero-Guerra L, Fernández-Blázquez A, Vazquez F. Diagnóstico rápido de las infecciones de transmisión sexual. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2017;35:444–50. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.01.004>.
- [497] Dirks J a. MC, van Liere GAFS, Hoebe CIPA, Wolffs P, Dukers-Muijers NHTM. Genital and anal Chlamydia trachomatis bacterial load in concurrently infected women: a cross-sectional study. *Sex Transm Infect* 2019;95:317–21. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2018-053678>.
- [498] Vodstrcil LA, Mclver R, Huston WM, Tabrizi SN, Timms P, Hocking JS. The Epidemiology of Chlamydia trachomatis Organism Load During Genital Infection: A Systematic Review. *J Infect Dis* 2015;211:1628–45. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu670>.
- [499] Dirks JAMC, Wolffs PFG, Dukers-Muijers NHTM, Brink AATP, Speksnijder AGCL, Hoebe CIPA. Chlamydia trachomatis load in population-based screening and STI-clinics: implications for screening policy. *PLoS ONE* 2015;10:e0121433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121433>.
- [500] van Liere GAFS, Dirks JAMC, Hoebe CIPA, Wolffs PF, Dukers-Muijers NHTM. Anorectal Chlamydia trachomatis Load Is Similar in Men Who Have Sex with Men and Women Reporting Anal Sex. *PLoS One* 2015;10:e0134991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134991>.
- [501] Gupta K, Bakshi RK, Van Der Pol B, Daniel G, Brown L, Press CG, et al. Repeated

- Chlamydia trachomatis infections are associated with lower bacterial loads. *Epidemiol Infect* 2018;147:e18. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002704>.
- [502] Wijers JNAP, van Liere GAFS, Dukers-Muijers NHTM, Wolfs PFG, Hoebe CJP. Men and Women Repeatedly Infected With Chlamydia trachomatis Have a Lower Urogenital Bacterial Load. *Sexually Transmitted Diseases* 2020;47:e51. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001219>.
- [503] CDC. Mopox in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention 2022. <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/mpx-trends.html> (accessed December 18, 2022).
- [504] Tsoumanis A, Hens N, Kenyon CR. Is Screening for Chlamydia and Gonorrhoea in Men Who Have Sex With Men Associated With Reduction of the Prevalence of these Infections? A Systematic Review of Observational Studies. *Sex Transm Dis* 2018;45:615–22. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000824>.
- [505] Phillips S, Vodstrcil LA, Huston WM, Lawrence A, Timms P, Chen MY, et al. Detection of Chlamydia trachomatis mRNA using digital PCR as a more accurate marker of viable organism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37:2117–22. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3347-y>.
- [506] Crowell TA, Hardick J, Lombardi K, Parker Z, Kokogho A, Amusu S, et al. Asymptomatic Lymphogranuloma Venereum among Nigerian Men who have Sex with Men. *Sex Transm Infect* 2018;94:578–81. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2017-053414>.

Anexo III





The Negative Impact of COVID-19 in HCV, HIV, and HPV Surveillance Programs During the Different Pandemic Waves

Beatriz Romero-Hernández^{1,2,3}, Laura Martínez-García^{1,2,3},
Mario Rodríguez-Domínguez^{1,2,3}, Javier Martínez-Sanz^{2,4,5}, Manuel Vélez-Díaz-Pallarés⁶,
Belen Pérez Mies^{2,7}, A. Muriel^{2,3,8,9}, Francisco Gea^{10,11}, María Jesús Pérez-Eliás^{2,4,5} and
Juan Carlos Galán^{1,2,3*}

¹ Microbiology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ² Instituto Ramón y Cajal for Health Research (IRYCIS), Madrid, Spain, ³ CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain, ⁴ Department of Infectious Diseases, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ⁵ CIBER of Infectious Diseases (CIBERINFEC), Madrid, Spain, ⁶ Pharmacy Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ⁷ Pathology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ⁸ Clinical Biostatistics Unit, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ⁹ Universidad de Alcalá, Madrid, Spain, ¹⁰ Liver Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ¹¹ CIBER of Liver and Digestive Diseases (CIBEREHD), Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Kaiyuan Sun,
National Institutes of Health (NIH),
United States

Reviewed by:

Francesco Paolo Bianchi,
University of Bari Aldo Moro, Italy
Grace Nabakooza,
Medical Research Council, Uganda

*Correspondence:

Juan Carlos Galán
juancarlos.galan@salud.madrid.org

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases - Surveillance,
Prevention and Treatment,
a section of the journal
Frontiers in Public Health

Received: 21 February 2022

Accepted: 19 May 2022

Published: 22 July 2022

Citation:

Romero-Hernández B,
Martínez-García L,
Rodríguez-Domínguez M,
Martínez-Sanz J,
Vélez-Díaz-Pallarés M, Pérez Mies B,
Muriel A, Gea F, Pérez-Eliás MJ and
Galán JC (2022) The Negative Impact
of COVID-19 in HCV, HIV, and HPV
Surveillance Programs During the
Different Pandemic Waves.
Front. Public Health 10:880435.
doi: 10.3389/fpubh.2022.880435

Background: The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has been a worldwide stress test for health systems. 2 years have elapsed since the description of the first cases of pneumonia of unknown origin. This study quantifies the impact of COVID-19 in the screening program of chronic viral infections such as human papillomavirus (HPV), human immunodeficiency virus (HIV), and hepatitis C virus (HCV) along the six different pandemic waves in our population. Each wave had particular epidemiological, biological, or clinical patterns.

Methods: We analyzed the number of samples for screening of these viruses from March 2020 to February 2022, the new infections detected in the pandemic period compared to the previous year, the time elapsed between diagnosis and linking to treatment and follow-up of patients, and the percentage of late HIV diagnosis. Moreover, we used the origin of the samples as a marker for quantifying the restoration of activity in primary care.

Results: During the first pandemic year, the number of samples received was reduced by 26.7, 22.6, and 22.5% for molecular detection of HPV or serological HCV and HIV status respectively. The highest decrease was observed during the first wave with 70, 40, and 26.7% for HPV, HCV, and HIV. As expected, new diagnoses also decreased by 35.4, 58.2, and 40.5% for HPV, HCV, and HIV respectively during the first year of the pandemic. In the second year of the pandemic, the number of samples remained below pre-pandemic period levels for HCV (−3.6%) and HIV (−9.3%) but was slightly higher for HPV (8.0%). The new diagnoses in the second year of the pandemic were −16.1, −46.8, and −18.6% for HPV, HCV, and HIV respectively.

Conclusions: Undoubtedly, an important number of new HPV, HCV, and HIV infections were lost during the COVID-19 pandemic, and surveillance programs were disrupted as a consequence of collapse of the health system. It is a priority to reinforce these

surveillance programs as soon as possible in order to detect undiagnosed cases before the associated morbidity-mortality increases. New pandemic waves could increase the risk of reversing the achievements made over the last few decades.

Keywords: impact of COVID-19, chronic viral infections, epidemic waves, decrease in HCV/HIV detection, lost infections

INTRODUCTION

In March 2020, many countries implemented a strict lockdown to avoid the spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the collapse of their public health systems (1). The lockdown and near collapse of hospitals affected the health of many citizens (2). For instance, 22.8% of Spanish patients refused to attend their health centers for fear of contagion (3), but also the non-COVID activity in Spanish hospitals drastically decreased. For example, 31.8% of surgeries related to any type of cancer were canceled in Spain, resulting in 45,449 fewer surgeries than had been arranged (4).

The direct impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on infectious diseases has also been analyzed, especially as it relates to surveillance programs (5, 6). The number of new diagnoses has decreased, which will probably affect the quality of life of these undiagnosed individuals (7). An international estimation suggests that around 800,000 new hepatitis C viruses (HCV) were missed, and that as a result there will be 72,300 excess deaths in the coming years (8). Cervical cancer screening based on molecular detection of human papillomavirus (HPV) was suspended, in many countries, mainly between April and June 2020. This action could increase the incidence of cervical cancer and precancerous lesions in the future (9). These breaks in surveillance programs will lead to a dramatic delay in the World Health Organization (WHO) objectives for 2030 (10). All available studies, taken together, report the impact of COVID-19 over the first pandemic wave, limiting our understanding of the full scope of damage caused by the pandemic. In fact, access to primary care is not yet back to normal, and successive pandemic waves have altered many activities in the hospital setting. This work aims to analyze the impact of COVID-19, during 2 years, on surveillance programs for the early detection of new human immunodeficiency virus (HIV) diagnosis, viremic HCV status, and high-risk HPV (hrHPV) patients in a tertiary hospital and its corresponding health area.

METHODS

We carried out a 24 month observational retrospective study to determine the number of HIV, HCV, and HPV-positive cases recorded during the COVID-19 pandemic (from March 2020 to February 2022). The results were compared to cases observed during the pre-pandemic period (from March 2020 to February 2022) in Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, which has a reference laboratory for 20 primary care

centers and sees to more than 650,000 individuals. Since March 2020, six waves of the COVID-19 pandemic were observed in Spain: the first (March-June 2020), second (August-November 2020), third (December 2020-February 2021), fourth (April-June 2021), fifth (July-September 2021), and sixth (December-2021- February 2022) (11). During the period between March 2020 and February 2022, the Spanish government established several different social and health measures ranging from lockdown and a national state of alarm to a relaxation of such measures, which could have affected the diagnosis of non-COVID infectious diseases and surveillance programs differently. In accordance with the changing social and clinical measures, we have divided the pandemic into three phases. The first phase corresponds to the strict lockdown (corresponding with the highest mortality rate) and includes the first wave. The second phase includes the pre-vaccine period and the national state of alarm period until May 2021. The second and third waves occurred in this phase. The third phase is the period of vaccination of the population (including booster vaccinations prior to the sixth pandemic wave), the end of the national state of alarm and the progressive relaxation of social restrictions until their elimination (with the exception of masks in closed spaces). Unfortunately, three pandemic waves took place in this phase. These reasons are sufficient to assess the impact of pandemic waves in the surveillance programs for testing hrHPV, HCV, and HIV independently. We also analyzed the impact according to the origin of the samples in primary care or hospital settings. Blood and urine cultures were used as surrogate markers for relative quantifying of the negative impact of COVID-19 in the laboratory daily routine and to evaluate the re-establishment of regular activity at Ramón y Cajal University Hospital of in-hospital and out-of-hospital activities respectively.

The screening of cervical cancer based on the hrHPV detection is undertaken in sexually active women ranging between 25 and 65 years old, according to national guidelines. The detection of hrHPV is made in cervical liquid-based cytology. HIV and HCV tests were requested in serum samples from people with high-risk behaviors of expo-sure to these viruses in agreement with national screening programs^{1,2}. These analyses require serum samples. As quality markers, we measured the time elapsed between diagnosis and the linking of treatment and follow-up with a specialized physician in pre-pandemic and

¹<https://www.msbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/docs/GuiaRecomendacionesDiagnosticoPrecozVIH.pdf>

²https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/docs/GUIA_DE_CRIBADO_DE_LA_INFECION_POR_EL_VHC_2020.pdf (accessed July 2020).

pandemic periods. Moreover, we identified the percentage of late HIV diagnosis (<350 CD4/ μ L) in both periods.

For statistical analysis, the comparison between the number of tests requested in the different phases was made through a one-way ANOVA taking the year 2019 as a reference and adding Sidak correction for multiple comparisons. Non-parametric tests, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney tests were used for sensitivity analysis (12).

RESULTS

Overall, throughout the pandemic period studied (March 2020 to February 2022), the number of samples received by the Microbiology Department as the laboratory of reference for molecular detection of hrHPV or serological HCV and HIV status were 733 (−26.7%), 6,600 (−22.6%) and 6,919 (−22.5%) samples lower than 2019 respectively, during the 12 first months. These reductions were higher in phase I, 774 (−70.5%, fewer samples received), 4,814 (−40%) and 2,930 (−26.7%) for hrHPV, HCV and HIV respectively (Table 1). In phase II (corresponding to the second and third pandemic waves), the number of samples increased, although they were still lower than the pre-pandemic period for HCV and HIV (1,786 and 3,988, corresponding to −8.9 and −20.1% respectively). In the next 12 months (March 2021 to February 2022), the number of hrHPV samples was slightly higher (106 samples) corresponding to 3.9% more than in the pre-pandemic period. In HCV and HIV, the number of samples received remained lower than in the pre-pandemic period in 1,902 (−5.9%) and 3,429 (−11.0%) respectively. This second pandemic year corresponds to phase III (and three pandemic waves). For HCV, only in the sixth and last pandemic wave, was the number of samples slightly higher than in the pre-pandemic period (305 more samples received representing a 4% increase) whereas for HIV the “normal activity” was not recovered (Table 1). The surrogate markers used in this study showed that in-hospital activity (blood cultures) was recovered from the second phase, whereas the out-of-hospital activity in primary care (urine culture) did not recover until the third phase (Supplementary Figure 1). Although, the surrogate marker of primary care activity suggests a normal activity, when we compared the samples received according to the origin (Figure 1), we cannot conclude the restoration of “normal activity” for screening programs, because the number of samples from primary care is lower than the pre-pandemic period. The statistical analysis (Sidak correction for multiple comparison) indicates significant differences between phase I and the pre-pandemic period for all infections analyzed ($p < 0.0001$) for hrHPV and HCV and $p < 0.006$ for HIV. In the successive phases, we only found significant differences in phase II for HIV ($p < 0.03$).

As to the new diagnoses detected during the first year of the pandemic, we also observed an important reduction of 402 (−35.4%), 78 (−58.2%), and 29 (−42.0%) patients for hrHPV, HCV, and HIV respectively. These reductions were higher in phase I, reaching −70% for hrHPV and HCV and −42.1% for

HIV. In the second year of the pandemic (corresponding to phase III) 115 (−16.1%), 37 (−46.8%), and 8 (−18.6%) new diagnoses were lost for hrHPV, HCV, and HIV respectively (Figure 2). The statistical analysis (Sidak correction for multiple comparison) indicates significant differences between phase I and phase II compared to the pre-pandemic period for hrHPV ($p < 0.0001$) and HCV ($p < 0.03$), whereas no statistically significant differences were found in newly diagnosed cases of HIV among the different phases and the pre-pandemic period.

The most worrying findings were the delay in HIV diagnosis and the time elapsed between diagnosis and the linking to treatment. In 2019, the percentage of patients with <350 CD4/ μ L in the first analytical study post-HIV diagnosis was 36%. However, in 2021 this data reached 40%, and in the first months of 2022, around 66% cases were late HIV diagnoses (10/15 patients). As to the time elapsed between diagnosis and linking to treatment, this doubled from 24 to 48 days.

DISCUSSION

We have analyzed the impact of the COVID-19 pandemic on the diagnosis of chronic viral infectious diseases during a period of 24 months in a tertiary hospital in Spain, which was among the most seriously affected countries during the first pandemic wave between March-June 2020. Spain also had the highest percentage of vaccinated population from mid-June 2021 (13) and the booster dose was higher than the European average in February-22³. Between both periods (March 2020 to February 2022), up to six epidemic waves have been described, but obviously, the impact of the successive waves on health has been different. During the first three pandemic waves, corresponding to the first and second phases, (lockdown and pre-vaccination period) in the first year of the pandemic, the cumulative mortality at 14-days (CM) was always >100 cases/1,000,000 inhabitants. In the last three pandemic waves, corresponding to the third phase (vaccination including booster dose and progressive elimination of social measures) in the second year of the pandemic, CM at 14-days was <60 cases/1,000,000 inhabitants, even though the cumulative incidence (CI) was around 240/100,000 inhabitants in the sixth (and last) pandemic wave (11).

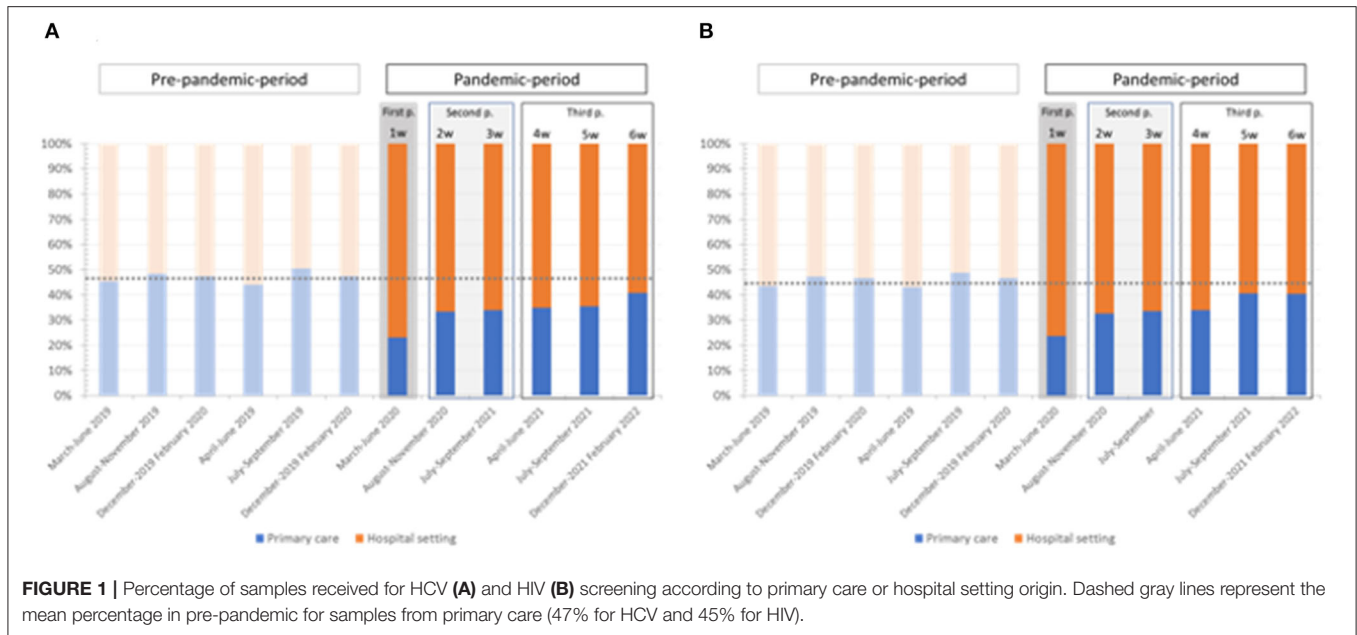
Our results show that the most drastic impact was during the first wave and corresponded to a strict lockdown period in which access to primary care centers was minimal, and the population's fear of COVID infection was widespread. This data suggests that the strict lockdown was a desperate solution with profound consequences both in the active screening programs for the viruses included in this study, and in the time elapsed between diagnosis and the linking of treatment and follow-up. In the first phase, the samples tested, and new diagnoses were reduced by around 70% for hrHPV. In the surveillances for HCV and HIV, the reduction of samples tested was lower than new infections detected (40% and 70% for HCV; 26.7% and 42.1% for HIV respectively). The observed decrease in HCV and HIV testing

³<https://ourworldindata.org/grapher/covid-vaccine-booster-doses-per-capita?time=2021-08-01.0.2022-02-21>

TABLE 1 | HPV (a), HCV (b) and HIV (c) determinations in pre-pandemic and pandemic period during the different pandemic waves.

	First pandemic year						Second pandemic year						
	First phase		Second phase				Third phase						
	First wave		Second wave		Third wave		Fourth wave		Fifth wave		Sixth wave		
	Pre-P	Pand	Pre-P	Pand	Pre-P	Pand	Pre-P	Pand	Pre-P	Pand	Pre-P	Pand	
(a) HPV													
Number of analyzed samples	1097	323	1000	885	650	806	840	982	660	632	650	708	
Difference of analyzed samples (%) in pandemic waves	-70.5%		-115 (-11.5%)				156 (24.0%)		142 (16.9%)		-28 (-4.2%)		58 (8.9%)
Difference of analyzed samples (%) in pandemic phases	-774 (-70.5%)		41 (2.5%)				172 (8.0%)						
Infected patients	544	165	489	388	101	179	165	195	198	130	351	274	
Difference of new patients (%) in pandemic waves	-70%		-20%		70%		20%		-35%		-22%		
Difference of new patients (%) in pandemic phases	-379 (-69.6%)		-23 (-3.9%)				-115 (-16.1%)						
(b) HCV													
Number of analyzed samples	12047	7233	12378	9415	7650	8827	9074	8836	8722	7733	7650	7955	
Difference of analyzed samples (%) in pandemic waves	-40%		-2963 (-23.9%)				1177 (15.3%)		-238 (-2.6%)		-989 (-11.3%)		305 (4.0%)
Difference of analyzed samples (%) in pandemic phases	-4814 (-40.0%)		-1786 (-8.9%)				-922 (-3.6%)						
Viremic patients	57	17	64	28	13	9	40	12	13	14	26	16	
Difference of viremic patients (%) in pandemic waves	-70%		-56%		-30%		-70%		7%		-38%		
Difference of viremic patients (%) in pandemic phases	-40 (-70%)		-38 (-49.3%)				-37 (-46.8%)						
(c) HIV													
Number of analyzed samples	10986	8056	11460	8830	8339	6981	8288	7877	8214	7001	8339	7652	
Difference of analyzed samples (%) in pandemic waves	-26.7%		-2630 (-22.9%)				1358 (-16.3%)		-411 (-4.9%)		-1213 (-14.8%)		-687 (-8.2%)
Difference of analyzed samples (%) in pandemic phases	-2930 (-26.7%)		-3988 (-20.1%)				-2311 (-9.3)						
New infected patients	19	11	31	20	19	9	16	9	16	14	11	12	
Difference of new patients (%) in pandemic waves	-42.1%		-35.5%		-52.6%		-43.7%		-12.5%		9.1%		
Difference of new patients (%) in pandemic phases	-8 (-42.1%)		-21 (-42.0%)				-8 (-18.6%)						
CI*/CM**	~20/~250		~40/~100		~60/~150		~20/~25		~50/~35		~240/~60		

Phases indicate the public health measures; whereas waves correspond to exponential increase of COVID-19 cases in our population (see main text). Pre-P and Pand, correspond to pre-pandemic and pandemic period. *(CI) Cumulative incidence, per 100,000 inhabitants. **(CM)cumulative mortality per 1,000,000 inhabitants in the different pandemic waves (see text footnote 2).



was lower than the number of requested HPV tests, because all patients who attended the Emergency Department (ED) for SARS-CoV-2 infection were also tested for HIV and HCV, which was not directly related to screening programs but rather to clinical decisions (14). This national recommendation did not increase the new number of diagnoses which was probably because the target population was not the most suitable for detecting new HIV and HCV, as the profile was older patients, the most susceptible group to hospital complications caused by COVID-19.

When the social restrictions and fear of contagion in the population decreased, the activity progressively recovered, and the number of samples analyzed increased during the second phase (second and third waves). It was not the same for the viruses analyzed in the successive waves. These differences could be attributed to the organization of our public health system. Gynecological activity among specialty centers began at the end of the first wave with pregnant women and those patients with altered cytology. In contrast, the infectious disease specialists were the last to return to their “normal activities” as they were responsible for managing COVID-19 patients. The “normal activity” for screening HPV, HCV and HIV was almost recovered by the third phase (fourth-sixth waves). These findings are related to the surrogate markers used in this study to quantify the primary care and hospital activities, but the number of samples for HCV and HIV screening from primary care was not completely recovered (the majority of new diagnoses are detected in primary care).

In our study, the number of infected patients was significantly lower than in the pre-pandemic year. There is an unknown number of infected people who could be lost for many years. In the following years, we should be able to measure the real impact of the COVID-19 pandemic. An estimation could be

inferred based on our data in a single center. In 2 years (March 2020 to February 2022), we could have lost around 517, 115 and 37 new diagnoses of hrHPV, HCV and HIV respectively. Several studies suggest that a decrease in the hrHPV, HCV, HIV detection after the pandemic could lead to higher cancer mortality (15, 16) and a lower life expectancy for AIDS-defining conditions (17) in the following years. The delay in the HIV diagnosis is associated with non-infectious comorbidities and multimorbidity and contributes to higher total care costs (7). The percentage of late HIV diagnoses did not change drastically between 2019 and 2021 (36% and 40%). These values are consistent with national data (18); however, in the first months of 2022 (data not shown), the percentage of late diagnoses reached a worrying 66% (10/15 new diagnoses). This finding confirms our worst predictions: the loss of the efforts of health professionals’ campaigns to reduce late HIV diagnoses over the last few years (19). A multidisciplinary group of American researchers suggested a rapid return to the pre-pandemic level, and that there would be minimal pandemic consequences related to HCV outcomes (20).

However, the simulations studies could be highly alarming and overrated. In many developed countries the new HIV diagnosis is declining due to pre-exposure prophylaxis (PrEP) strategy (21), the vaccine against HPV infection or the micro-elimination programs, reducing the pool of viremic HCV patients drastically. In fact, a reduction in new HIV and HCV diagnoses was described in Spain during the years prior to COVID-19. In Madrid, around 38 and 44% fewer new HIV and HCV diagnoses were detected in the previous 2 years (22)⁴. These results suggest that those simulations must be interpreted with caution.

⁴<https://www.comunidad.madrid/ser/penalty/z@vicios/salud/datos-medica/penalty/z@mentos-hepa/penalty/z@titis-c>

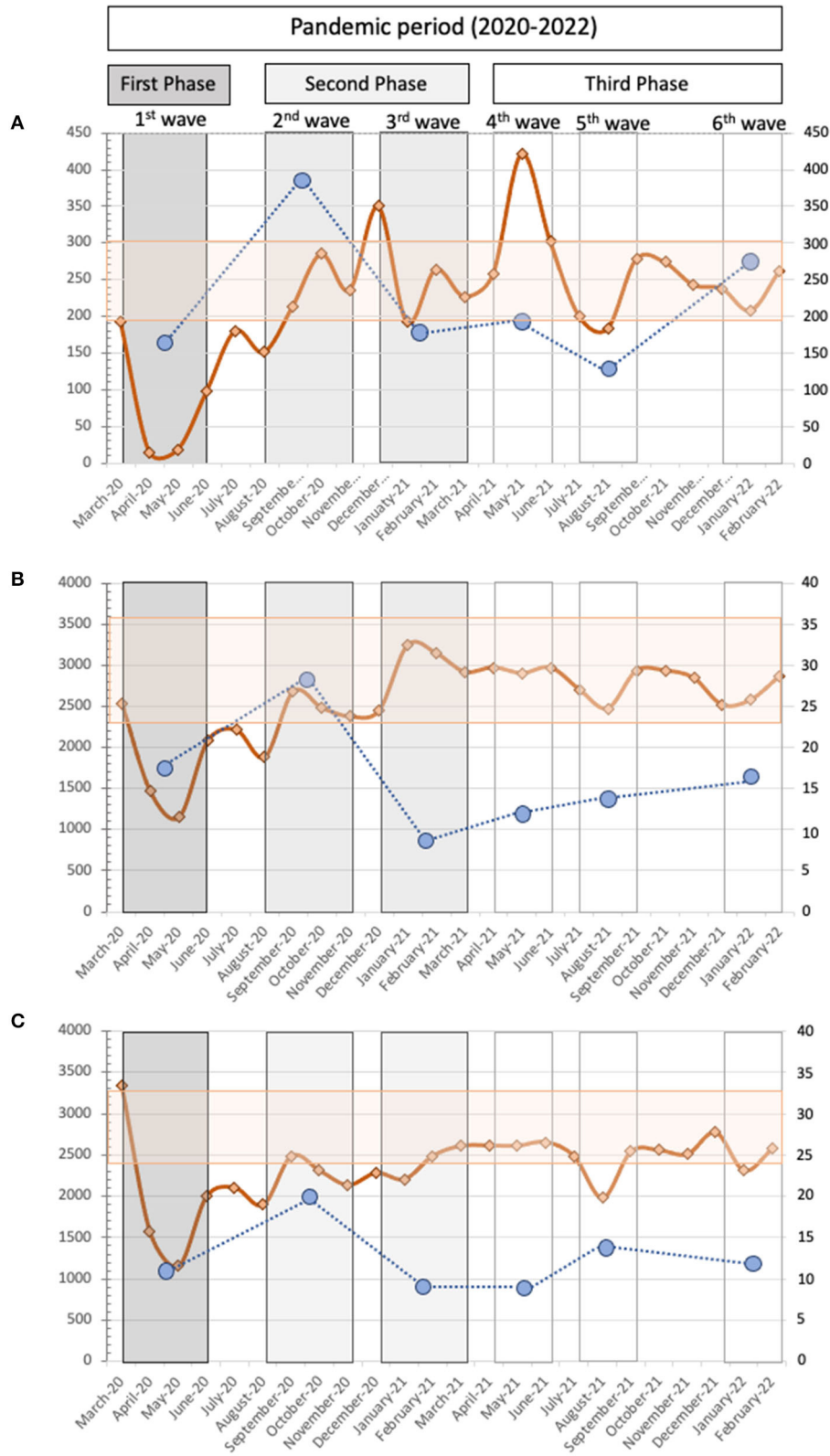


FIGURE 2 | The monthly distributions of samples analyzed along the pandemic period for **(A)** HPV, **(B)** HCV, and **(C)** HIV are represented by orange solid lines. The upper/lower limit of samples/months obtained in pre-pandemic period are represented as light orange horizontal stick. The right y-axis corresponds to number of samples analyzed. The left y-axis corresponds to new diagnoses. Blue circles correspond to hrHPV infected patients **(A)**, viremic HCV patients **(B)**, or positive serological status against HIV **(C)**, in no previously known patients, in each pandemic wave (I–VI).

Nevertheless, positive consequences have been reached during the COVID-19 pandemic. Among them, digital technologies offer new opportunities to improve people's health with telemedicine (including treatment or telepharmacy) (24, 25). In our hospital, we have seen that our Pharmacy Department successfully applied telepharmacy to outpatient care during the COVID-19 pandemic and has distributed 13,084 shipments of treatment to these chronic patients to avoid them having to go to the hospital. This has contributed to minimizing the impact of COVID-19 as has been described (23).

We also understand that as the decentralizing in SARS-CoV-2 detection helped to control the pandemic, the decentralization in HIV/HCV diagnoses and care and the incorporation of telemedicine in high-resource settings will probably be critical in healthcare systems in the future. Our health system will need time to identify these lost infections, and the active surveillance programs should be reinforced as soon as possible. The implementation of these measures could accelerate the identification of cases and facilitate the linking to our public health system. These new measures will be necessary for a long period and the COVID-19 pandemic may well drive these changes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

REFERENCES

- Brauner JM, Mindermann S, Sharma M, Johnston D, Salvatier J, Gavenciak T et al. Inferring the effectiveness of government interventions against COVID-19. *Science*. (2021) 371:eabd9338. doi: 10.1126/science.abd9338
- Kendzierska T, Zhu DT, Gershon AS, Edwards JD, Peixoto C, Robillard R, et al. The effects of the health system response to the COVID-19 pandemic on chronic disease management: a narrative review risk. *Manag Healthc Policy*. (2021) 14:575–84. doi: 10.2147/RMHP.S293471
- Galvez M, Rueda Y, Gomariz V. *Estudio del impacto de COVID-19 en las personas con enfermedad o trastorno crónico*. Ed. Plataforma de Organizaciones de Pacientes. Nephila Health Partnership. (2020). Available online at: https://www.plataformadepacientes.org/sites/default/files/informe_covid19_final_web_ok.pdf.
- COVID Surg Collaborative. Elective surgery cancellations due to the COVID-19 pandemic: global predictive modelling to inform surgical recovery plans. *Br J Surg*. (2020) 107:1440–49. doi: 10.1002/bjs.11746
- National Alliance for State and Territorial AIDS Directors (NASTAD): The COVID-19 Pandemic's Impact of HIV and Hepatitis Programs. (2020). Available online at: <https://www.nastad.org/sites/default/files/resources/docs/covid19-impact-hiv-hepatitis-programs.pdf>. (accessed October 2, 2020).
- Miller MJ, Xu L, Qin J, Hahn E, Ngo-Metzger Q, Mittman B, et al. Impact of COVID-19 on Cervical cancer screening rates among women aged 21–65 years in a large integrated health care system—southern California, January 1–September 30, 2019, and January 1–September 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. (2021) 70:109–13. doi: 10.15585/mmwr.mm7004a1
- Guaraldi G, Zona S, Menozzi M, Brothers TD, Carli F, Stentarelli C, et al. Late presentation increases risk and costs of non-infectious comorbidities in people with HIV: an Italian cost impact study. *AIDS Res Ther*. (2017) 14:8. doi: 10.1186/s12981-016-0129-4

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JCG designed and supervised the study. BR-H collected data and wrote the manuscript with support from JCG, LM-G, and MR-D. MA performed the statistical analysis. JM-S, MV-D-P, BP, FG, and MP-E discussed the results and provided critical feedback to contribute to the final manuscript.

FUNDING

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) co-financed by the European Development Regional Fund (A Way to Achieve Europe program (PI20/01397 and CB06/02/0053) and the Ramon y Cajal Institute for Health Research (IRYCIS) (COVID-19 Grant 2020/0154).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the persons directly involved in the programs to eliminate Hepatitis C, HIV prevention programs and Cervical Cancer screening.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2022.880435/full#supplementary-material>

- Blach S, Kondili LA, Aghemo A, Cai Z, Dugan E, Estes C, et al. Impact of COVID-19 on global HCV elimination efforts. *J Hepatol*. (2021) 74:31–6. doi: 10.1016/j.jhep.2020.07.042
- Castanon A, Rebolj M, Pesola F, and Sasieni P. Recovery strategies following COVID-19 disruption to cervical cancer screening and their impact on excess diagnoses. *Br J Cancer*. (2021) 9:21. doi: 10.1038/s41416-021-01275-3
- Combating hepatitis B and C to reach elimination by 2030. *World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland*. (2016). Available online at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206453/WHO_HIV_2016.04_eng.pdf;jsessionid=BD4927D267FF65CFF65C1C07FC CDDF30?sequence=1
- Situación de COVID-19 en España a 23 de febrero de (2022). *Equipo COVID-19. RENAVE*. Available online at: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/InformesCOVID-19.aspx>
- Ashby D. Practical statistics for medical research. Douglas G Altman, Chapman and Hall, London. *Statistic Med*. (1991) 10:1635–6. doi: 10.1002/sim.4780101015
- Ritchie H, Mathieu E, Rodés-Guirao L, Appel C, Giattino C, Otiz-Ospina E, et al. “Coronavirus Pandemic (COVID-19)”. *Published online at OurWorldInData.org*. Available online at: <https://ourworldindata.org/coronavirus> [Online Resource]
- Documento técnico Manejo clínico del COVID-19: atención hospitalaria. (2020). Available online at: https://www.msccs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Protocolo_manejo_clinico_ah_COVID-19.pdf
- Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A, US. Cancer screening recommendations: developments and the impact of COVID-19. *Med Sci (Basel)*. (2022) 10:16. doi: 10.3390/medsci10010016

16. Lazarus JV, Picchio C, Dillon JF, Rockstroh JK, Weis N, Buti M. Too many people with viral hepatitis are diagnosed late with dire consequences. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2019) 16:451–2. doi: 10.1038/s41575-019-0177-z
17. Quiros-Roldan E, Izzo I, Carriero C, Degli Antoni M, Storti S, Tiecco G, et al. Decrease in new diagnosis of HIV/AIDS in the 2 years period 2019-2020: impact of COVID-19 pandemic. *J Public Health Res.* (2021) 11:2256. doi: 10.4081/jphr.2021.2256
18. Rava M, Domínguez-Domínguez L, Bisbal O, López-Cortés LF, Busca C, Antela A, et al. Late presentation for HIV remains a major health issue in Spain: Results from a multicenter cohort study, 2004-2018. *PLoS One.* (2021) 16:e0249864. doi: 10.1371/journal.pone.0249864
19. Gómez-Ayerbe C, Martínez-Sanz J, Muriel A, Pérez Elías P, Moreno A, Barea R, et al. Impact of a structured HIV testing program in a hospital emergency department and a primary care center. *PLoS One.* (2019) 14:e0220375. doi: 10.1371/journal.pone.0220375
20. Barocas JA, Savinkina A, Lodi S. Projected long-term impact of the COVID-19 pandemic on hepatitis C outcomes in the United States: a modelling study. *Clin Infect Dis.* (2021) 9:ciab779. doi: 10.1093/cid/ciab779
21. Stover J, Glaubius R, Teng Y, Kelly S, Hallett TB, Revill P, et al. Modeling the epidemiological impact of the UNAIDS 2025 targets to end AIDS as a public health threat by 2030. *PLoS Med.* (2021) 18:e1003831. doi: 10.1371/journal.pmed.1003831
22. Unidad de Vigilancia de VIH, ITS y hepatitis. *Vigilancia Epidemiológica del VIH y sida en España 2019: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida.* Plan Nacional sobre el Sida - D.G. de Salud Pública / Centro Nacional de Epidemiología - ISCIII. Madrid. (2020).
23. Goodman-Casanova JM, Dura-Perez E, Guzman-Parra J, Cuesta-Vargas A, Mayoral-Cleries F. Telehealth home support during COVID-19 confinement for community-dwelling older adults with mild cognitive impairment or mild dementia: survey Study. *J Med Internet Res.* (2020) 22:e19434. doi: 10.2196/19434
24. El-Nahal WG, Shen NM, Keruly JC, Jones JL, Fojo AT, Lau B et al. Telemedicine and visit completion among people with HIV during the COVID-19 pandemic compared to pre-pandemic. *AIDS.* (2021) 27:21. doi: 10.1101/2021.12.19.21268052
25. Giacomelli A, Bonazzetti C, Conti F, Pezzati L, Oreni L, Micheli V et al. Brief Report: Impact of the COVID-19 Pandemic on virological suppression in people living with HIV attending a large Italian HIV clinic. *J Acquir Immune Defic Syndr.* (2021) 88:299–304. doi: 10.1097/QAI.00000000000002754

Conflict of Interest: BR-H has received funding to attend conferences from Gilead and obtained financed project from Roche. LM-G has obtained financed project from Roche. JM-S reports personal fees from ViiV Healthcare, Janssen Cilag, Gilead Sciences, and MSD and non-financial support from ViiV Healthcare, Janssen Cilag, and Gilead Sciences. MP-E has received funding to attend conferences, educational activities or advisory, as well as scholarships from the pharmaceutical companies Gilead, Janssen, Abbvie, MSD, and ViiV. JCG received personal fees as advisor from Gilead, Abbvie, and Roche, he obtained financed projects from MSD, Roche and Sistemas Genómicos.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Romero-Hernández, Martínez-García, Rodríguez-Domínguez, Martínez-Sanz, Vélez-Díaz-Pallarés, Pérez Mies, Muriel, Gea, Pérez-Eliás and Galán. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Bacteriology

Quantification of plasmid copy number as surrogate marker of virulence among different invasive and non-invasive genotypes of *Chlamydia trachomatis*

José María López-Pintor^{a,b}, Laura Martínez-García^{a,b,c}, Ainhize Maruri^{a,b}, Blanca Menéndez^d, Teresa Puerta^d, Concepción Rodríguez^{a,b}, José María González-Alba^{a,b}, Mario Rodríguez-Domínguez^{a,b,c}, Juan Carlos Galán^{a,b,c,*}

^a Microbiology Department, Ramón y Cajal Hospital, Madrid, Spain

^b Ramón y Cajal Institute for Health Research (IRYCIS), Madrid, Spain

^c Network Center for Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain

^d Sandoval Health Center, IdiSSC. Hospital Clínico S. Carlos, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2021

Revised in revised form 20 November 2021

Accepted 23 November 2021

Available online 28 November 2021

Keywords:

Virulence factors

Plasmid copy number

Chlamydia trachomatis

Lymphogranuloma venereum

ABSTRACT

The population dissemination of invasive genotypes of *C. trachomatis* and an increase of urogenital infections cases by non-invasive genotypes have been observed in many countries. In this epidemiological context, the descriptions of a high proportion of infections related to L-genotypes in asymptomatic patients, but also to infections caused by non-L genotypes in symptomatic patients have been unexpected finding. The plasmid copy number (PCN) has been proposed as a surrogate marker of virulence. We quantified the PCN in 233 samples and 179 samples carrying L-genotype and non-L genotypes respectively. A significant difference in the median of PCN was detected between symptomatic/asymptomatic patients ($P < 0.001$), independently of the genotype. Moreover, PCN could vary, in the same strain, among different anatomical sites suggesting that micro-environmental changes could affect virulence. These findings suggest that the quantification of PCN in clinical samples could improve the management of patients.

© 2021 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The World Health Organization reported more than 376 million new sexually transmitted infections (STI) around the world in 2019 (Rowley et al., 2019). Globally, these findings are similar to reports published in previous years (Newman et al., 2015). However, in many regions STIs have continuously increased during the last two decades (Crowell et al., 2018). Moreover, in many developed countries, a *C. trachomatis* infection is the most common notifiable condition (Chlamydia infection, 2019). The endemic situation in these countries has been more complex since 2003, when a lymphogranuloma venereum (LGV) outbreak, caused by a new invasive variant (L2b), was described in The Netherlands and quickly spread not only to many European countries, but also to USA and Australia (Spaargaren et al., 2005; Zhong, 2017; Zhong, 2018). Consequently, the clinical patterns of *C. trachomatis* infections are currently more diverse ranging from asymptomatic cases to proctitis with bleeding (Saxon et al., 2016). It was initially assumed that LGV was only related to symptomatic cases (Rodríguez-Domínguez et al., 2014),

and the description in 2016 of asymptomatic LGV cases was an unexpected finding (Saxon et al., 2016).

Classically, several genetic markers and virulence factors have been proposed to explain the broad spectrum of clinical symptoms in *C. trachomatis*; among them, two open reading frames (ORF) located in the cryptic plasmid, encoding proteins designated *plasmid gene proteins* (Pgp), such as Pgp3 (Yang et al., 2020) and Pgp4 (Song et al., 2013). Pgp3 has been associated with immunopathology related to *C. trachomatis* infections, and Pgp4 is a transcriptional regulator of *pgp3*. Among the eight genes (*pgp1-pgp8*) located in the cryptic plasmid, only *pgp3* and *pgp4* non-mutant strains exhibited attenuated infection characteristics in non-human and murine infection models (Yang et al., 2015). Moreover, *pgp4* is also the transcriptional regulator of other chromosomal genes, such as *glgA* encoding for glycogen synthesis (Zhong, 2017) which could act as an essential carbon source within a nutritionally limiting inflammatory environment. This could be an advantage for chlamydial survival in mucosal tissues (Song et al., 2013).

However, some studies have demonstrated that plasmid-free *C. trachomatis* was deficient in both spreading to the gastrointestinal tract and inducing inflammatory host response (Zhong, 2018; Zou et al., 2019). Patton et al. reported that a 50% infectious dose of a

* Corresponding author.

E-mail address: juancarlos.galan@salud.madrid.org (J.C. Galán).

plasmid-deficient LGV strain was 400 times greater than a plasmid-carrier strain (Patton et al., 2018). There are several studies about the plasmid role in virulence of *C. trachomatis*: Zhong et al. demonstrated that induction of hydrosalpinx is plasmid-dependent (Zhong, 2018), and Zhong et al. and Zou et al., (2019) proved that chlamydial plasmid promotes inflammation in the oviduct (Zhong, 2018; Zou et al., 2019). Furthermore, Yeow et al. suggested that plasmid could be a risk factor for reproductive system disorders (Yeow et al., 2016), and in other studies, plasmid has been related to avoiding apoptosis (Zou et al., 2019). For these reasons, some authors propose that the cryptic plasmid could itself be a virulence factor (Patton et al., 2018; Versteeg et al., 2018; Yeow et al., 2016; Zhong, 2017; Zhong, 2018; Zou et al., 2019), as there could be a relationship between plasmid copy number (PCN) and Pgp3-Pgp4 expression. In fact, strains carrying a high PCN have been related more to virulence (Yeow et al., 2016; Zhong, 2017; Zhong, 2018; Zou et al., 2019).

On the other hand, other authors have not found any relation between PCN (or expression levels) and virulence (Borges et al., 2010; Last et al., 2014). Nonetheless, it has been reported that it is possible that PCN could change depending on the microenvironment, local immunity system capacity, or growth phase of the microorganism (Borges et al., 2010). Furthermore, L-genotypes have been related to clinical symptoms, while non-L genotypes are more related to asymptomatic infected patients (Bébéar and de Barbeyrac, 2009). For this reason, we proposed quantifying the PCN of different genotypes directly from clinical samples from different anatomical locations. In addition, the virulence-related genes and upstream regions were also sequenced to find the presence of SNPs that could be related to different symptoms. The main objective of this work was to simultaneously analyze the PCN and sequencing of well-known virulence factors in patients with a wide-range of symptoms, in order to establish a prognostic marker of virulence.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The study was carried out on 412 clinical positive samples for *C. trachomatis* from symptomatic and asymptomatic patients attending three sexually transmitted infection (STI) centres in Madrid between July 2017 and November 2018. All patients were tested to detect microorganisms related to STI (*C. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HCV and HIV) following the clinical protocols implemented in these STI centers. Demographic and clinical data were recovered, including symptoms such as pain and secretion, and signs such as adenopathy, proctitis, rectal bleeding and rectal ulcers. The study was approved by the Ethical Committee from Ramon y Cajal Hospital.

2.2. Selected samples

According to the internal protocols in the STI centres the sampling by a specialist professional included pharyngeal, rectal urethral/cervical or urine samples. In rectal ulcers these samples were taken by a swab specifically directed at the ulcerated region. The clinical symptoms of the patient were not considered. The detection of *C. trachomatis* was performed in m2000 real-time system (Abbott Molecular, IL) in the respective STI centres. Those samples yielding positive amplification for *C. trachomatis* were sent to the coordinator laboratory for genotyping, and were conserved to -20°C. The samples were analyzed within 2-3 days of receipt in the coordinator laboratory and the total time was lower than 7 days between sampling to genotyping. For detection of L-genotypes related to LGV, a previously published real-time PCR based on a 36bp deletion in *pmpH* gene was used (Morré et al., 2005). In order to exclude the simultaneous presence of L and non-L genotypes, a second previously published real-time PCR was performed (Rodríguez-Domínguez et al., 2015). An

internal *ompA* fragment of 762 nt was sequenced (Quint et al., 2010). The sequence yielded only one profile and we assumed the presence of only one *C. trachomatis* type. We also tried to get a representation of all *C. trachomatis ompA*-genotypes. Finally, all samples were stored to -80°C until the PCN quantification experiments.

2.3. PCN quantification and virulence-related gene

DNA extraction was performed using Nuclisens EasyMag (Bio-Mérieux, Inc, Marcy l'Etoile, France). The process started from 200 µL of sample and finished by elution of the extracted DNA in 50 µL of buffer. A multiplex real-time PCR was designed to estimate PCN through detecting *pgp8* (pORF2), the most conserved gene among those plasmid genes, and *omcB*, a chromosomal, single-copy and specific gene from *C. trachomatis* (Pickett et al., 2005). Hence the ratio (R) of *plasmid:chromosomal* was calculated following the $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ equation previously described. In our model, $R = 2^{-(\Delta Ct_{pgp8} - \Delta Ct_{omcB})}$ was used to estimate the number of plasmid copies per bacterium (Pickett et al., 2005). *RNAseP* gene, a human marker, was used to standardize the assay. The analysis was performed in triplicate for each sample.

On the other hand, genes associated with virulence *pgp3*, *pgp4*, *glgA*, and the intergenic region between *pgp3* and *pgp4*, were sequenced in L and non-L strains from symptomatic and asymptomatic patients. Primers utilized to obtain the sequences of genes *pgp3*, *pgp4* and *glgA* are shown in Supplementary material Table S1.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by STATA (13.0 Version). Results for continuous variables were expressed as means or as medians, whilst data for categorical variables was expressed as percentages. Comparative analysis between both groups was estimated using Student's *t* test (normal distribution) or Mann-Whitney *U* test (non normal distribution) for continuous variables, and chi-square analysis for categorical variables. A *P*-value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Plasmid copy number regarding *C. trachomatis* genotype

Initially, the first approach was to discriminate between L and non-L *C. trachomatis* genotypes, based on 36bp deletion in the *pmpH* gene as the marker to distinguish between L and non-L genotypes (Morré et al., 2005). Then, PCN was estimated as described in material and methods. The quantification of chlamydial plasmid in those samples with demonstrated presence of L-genotype (233 samples) was significantly higher ($P < 0.001$) than in samples carrying non-L genotypes (179 samples) 13.00 [11.20] vs 9.85 [13.51] respectively (Fig. 1A).

In a second step, we analyzed the genotype distribution based on *pmpH* and *ompA* sequencing. The distribution of 179 clinical samples carrying non-invasive genotypes (*ompA*-genotypes) was: 35 allocated as genotype D, 58 as genotype E, 12 genotypes F, 9 G, 8 J, 4 K; the remaining samples could not be classified (53 samples). Furthermore, the distribution among L genotypes was 107 *ompA*-L2, 51 *ompA*-L2b and 28 *ompA*-L2bv1; the remaining 47 samples could not be classified. According to the evolutionary reconstruction proposal for urogenital *C. trachomatis* genotypes (Seth-Smith et al., 2013), we decided to group all these genotypes in two lineages. T1 corresponds to clinically prevalent urogenital serotypes (E and F genotypes), and T2 contains urogenital (D, G, I-K) closely related to ocular genotypes (A-C). Among T2 urogenital genotypes, we also analyzed D and G separately (the closest related and prevalent genotypes) as T2a and I-J-K (infrequently described) as T2b taking into account the local epidemiology. The strains allocated in genotypes E and F (T1 lineage) yielded higher

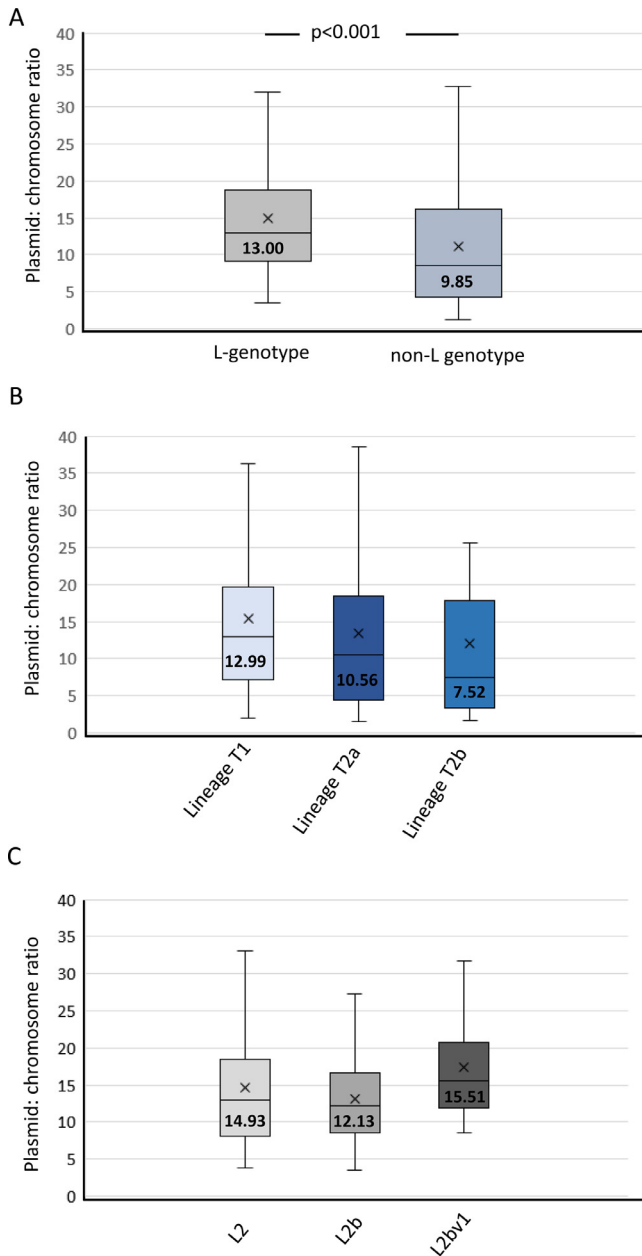


Fig. 1. (A) Median values of plasmid copy number among *C. trachomatis* strains previously identified as L ($n = 233$) and non-L ($n = 179$) genotypes based on *pmpH* gene. (B) PCN among different non-L genotypes. Median value of plasmid copy number among urogenital *C. trachomatis* strains belonging to non-L genotypes, according to evolutionary classification proposed by Harris et al (Seth-Smith et al., 2009). Lineage T1 (E+F; $n = 70$) and lineage T2 which was subdivided in T2a (D+G; $n = 44$) and T2b (I/J/K; $n = 12$). (C) PCN among different L2 variants described in our population 107 *ompA*-L2, 51 *ompA*-L2b and 28 *ompA*-L2bv1.

PCN than T2 (12.99 [13.21] vs 9.69 [12.54]; $P < 0.001$), and was higher in T2a than in T2b (10.56 vs 7.52) (Fig. 1B). No significant PCN differences among variants belonging to L-genotypes were found (Fig. 1C).

3.2. Plasmid copy number and disease severity

The first finding was that those patients carrying L-genotype were more frequently related to clinical symptoms than non-L ones ($P = 0.021$) (Fig. 2 and Table S2). However, 11% of patients with signs carrying non-L genotypes or 18% of asymptomatic patients carrying L genotypes were also found. In symptomatic patients, the PCN was higher 17.96 [12.13] than asymptomatic patients 11.16 [10.18], without clear relation to *ompA*-genotype ($P < 0.001$), whereas patients

who experimented symptoms presented a PCN of 13.48 [9.96] (Fig. 3 and Fig S1). Both non-L and L *C. trachomatis* genotypes reported higher PCN among symptomatic than asymptomatic patients (19.07 [10.71] vs 10.36 [5.35]; $p < 0.02$, in non-L genotypes and 16.86 [11.62] vs 11.31 [9.42]; $P < 0.001$, in L-genotypes). In both non-L and L genotypes, strains associated with symptoms presented PCN values ranging between patients with many signs and asymptomatic patients. These results suggest the close relationship between clinical symptoms and PCN.

When the correlation between PCN and severity was analyzed to *ompA*-genotype level, we found 1.5-fold between patients with symptoms and asymptomatic patients for L-genotypes (L2b and L2bv1) or non-L genotypes (T1 lineage, corresponding to E and F genotypes). Nonetheless, for L2 genotype and T2a lineage, this ratio was >2.5-fold, probably because in these groups there are subpopulations with spectrum of symptoms very different from that expected: 20% L2 genotypes were found in asymptomatic patients and 20% D and G genotypes were described in patients with severe symptoms.

3.3. Plasmid copy number regarding the anatomical site of infection and multiple-site infections by *C. trachomatis*

Overall, PCN differences were observed among *C. trachomatis* strain infecting different anatomical locations. Ninety-six urogenital *C. trachomatis* belonging to non-L genotypes (35 urethral, 54 cervical, and 9 urine) showed statistically higher PCN than 76 extra-genital samples distributed among 40 rectal and 36 pharyngeal samples (13.00 vs 7.95; $P < 0.001$). On the contrary, among *C. trachomatis* strains classified as L-genotype, 23 rectal ulcer strains had higher PCN than samples from other sources such as 183 rectal samples and 1 pharyngeal (we also included 3 urethral, 2 cervical, 3 urines): 20.75 vs 13.45 ($P < 0.01$). For another 23 samples anatomical location could not be determined due to lack of information.

Twenty-one patients had a simultaneous *C. trachomatis* infection in two locations. Thirteen patients had a *C. trachomatis* infection in a rectal ulcer and in the rectum, but only in 10 patients was the genotype of both strains the same: 3 L2, 4 L2b, 1 L2bv1 and 2 cases of a L2 variant not previously described (according to *ompA* sequence). In these 10 cases, strains present in rectal ulcer presented higher PCN than rectum ones (18.03 vs 13.95).

We also detected six simultaneous infections in pharynx and rectum, and in 2 patients the *ompA*-genotype of both strains was the same: 1 case of genotype G and 1 case of genotype D, and PCN was higher in pharyngeal strains (21.45 vs 7.2). The other four cases demonstrated the following combinations: 2 cases of rectum L2 with a pharyngeal D strain; a rectum L2 strain with a pharyngeal F strain; and a rectum L2b strain with a pharyngeal strain that could not be genotyped. Moreover, two other patients carrying E-genotypes *C. trachomatis* strains in urine and urethra yielded the same PCN (19.70 and 19.04 respectively), suggesting no differences as they had the same source. All of the patients affected by multiple-site infection showed symptomatology in, at least, one of the locations.

3.4. Sequences of virulence-related genes

A total of 78 sequences (21 from *pgp3*, 13 *pgp4*, 16 *glgA* and 28 *pgp3*-*pgp4* including intergenic region) from 39 L-genotype and 15 non-L from 28 symptomatic patients and 26 asymptomatic ones could be obtained (see supplementary material for access numbers, in Table S3). There were the following non-synonymous changes between L-genotypes and non-L ones: in *pgp3*, D90G, K109T, S138R and T212I; in *pgp4*, R5S; and in *glgA* only one mutation in N354D. However, the analysis of virulence-related genes (*pgp3*, *pgp4*, and *glgA*) and the intergenic region between *pgp3* and *pgp4* did not reveal differences among symptomatic and asymptomatic strains (see supplementary material Tables S4-S6 for alignments).

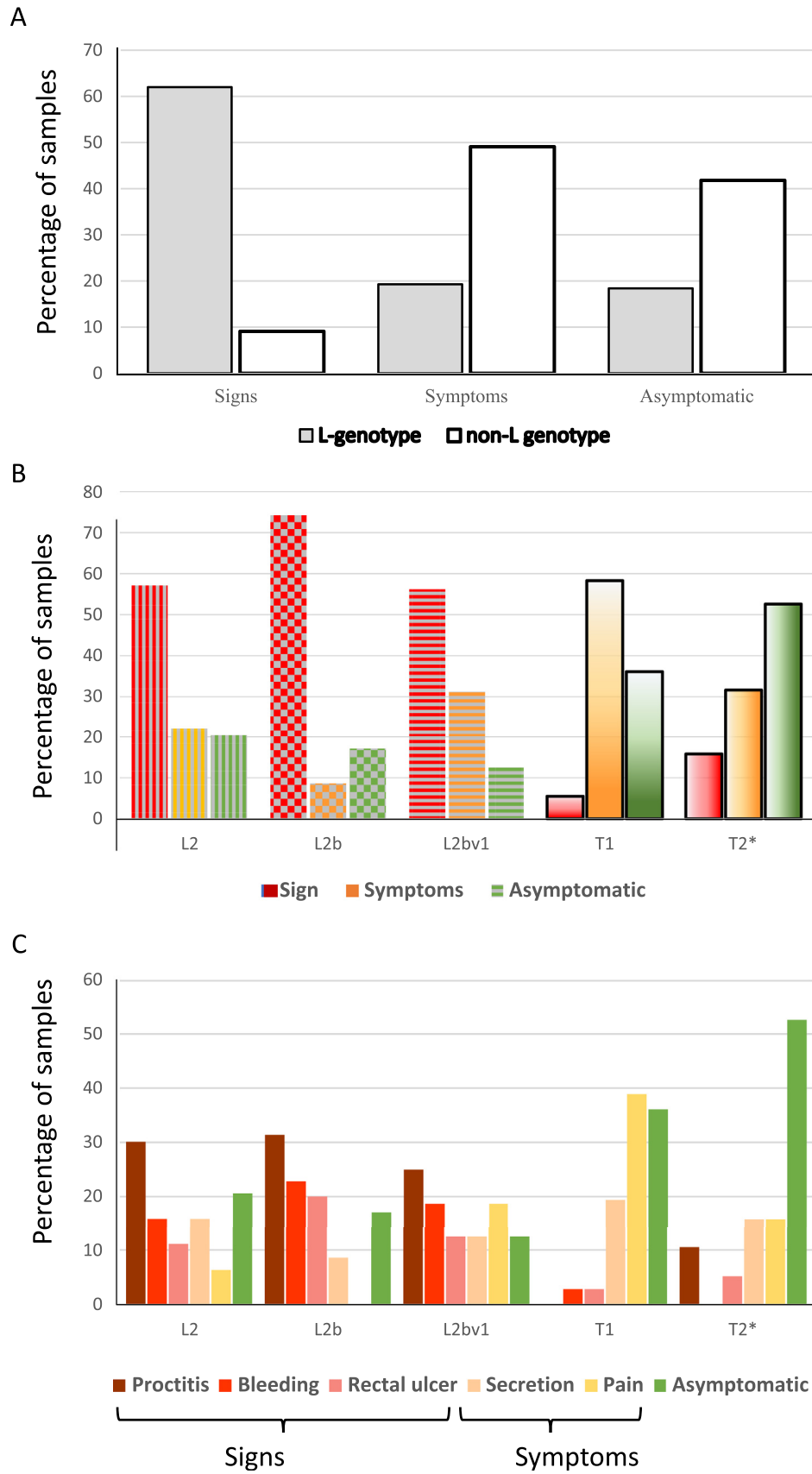


Fig. 2. Description of signs (adenopathy, proctitis, rectal bleeding and rectal ulcers) and symptoms (pain and secretion) among the patients infected with different *C. trachomatis* genotypes. (A) Distribution of the observed symptoms between the simplest classification (L and non-L genotypes). (B) Number of patients presenting with signs and symptoms among different L-variants and urogenital T1 and T2 lineages. (C) Main clinical findings with regard to genotype detected. *Only D+G genotypes were included. The number of samples included in each analyzed variable is described in supplementary material Table S2.

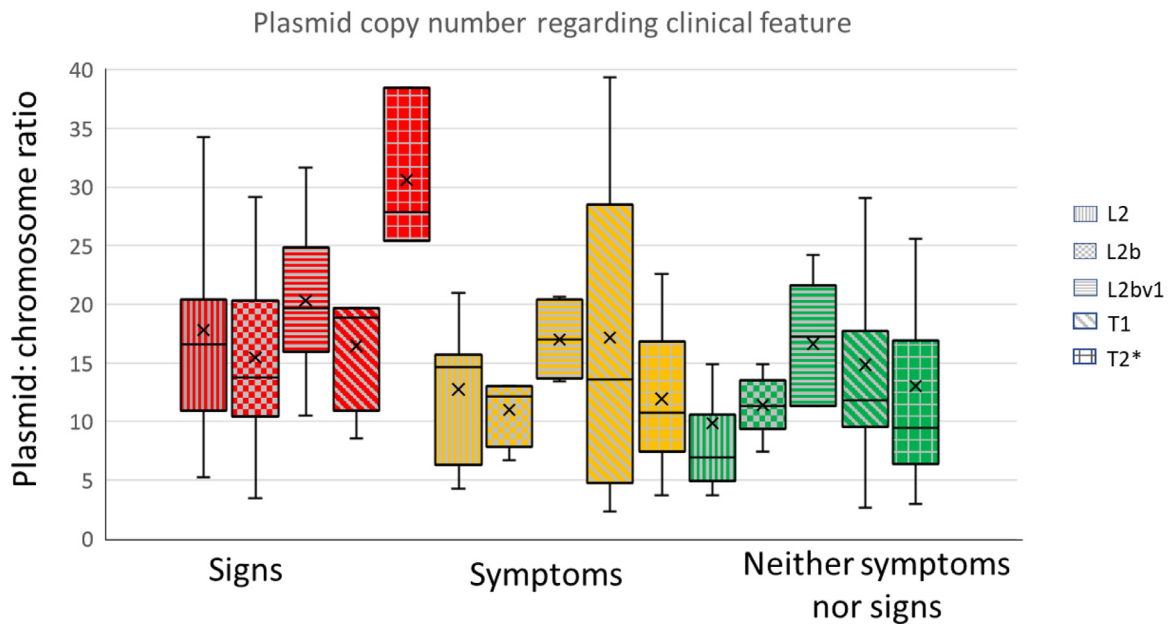


Fig. 3. Plasmid/chromosome ratio among the different *C. trachomatis* genotypes following the classification previously described (Seth-Smith et al., 2009), for three main clinical criteria, presence of signs (adenopathy, proctitis, rectal bleeding and rectal ulcers), symptomatic (pain and secretion), or asymptomatic patients. Neither in the overall population nor by genotype division did the PCN of patients that presented signs show significant differences with the PCN of strains associated with symptoms or those associated with asymptomatic patients. *Only D+G genotypes were included. See Table S2 for the absolute number of samples.

4. Discussion

Lymphogranuloma venereum disease (LGV) has been characterized by inflammation of inguinal or femoral lymph nodes and the genotypes commonly associated with this disease (L1-L3) are known as invasive-genotypes or LGV-genotypes in comparison to *C. trachomatis* genotypes in which inflammation is largely limited to the initial site of infection. In the current context of increased screening, the proportion of asymptomatic patients carrying LGV genotypes has increased to almost 50% (Saxon et al., 2016). Moreover, the description of urogenital *C. trachomatis* belonging to lineage T2 (according to Harris et al. proposal) (Harris et al., 2012) has been frequently detected in rectal infections, sometimes with clinical symptoms (such as bleeding or proctitis). Nowadays, the high proportion of asymptomatic L-genotypes, together with non-L genotypes mimicking the clinical manifestations associated with LGV may give rise to a complex epidemiological and clinical setting, questioning the tools to predict the real severity attributable to different genotypes.

Several virulence factors have been proposed to explain these differences; among them, the chlamydial plasmid, which could have a central role as virulence factor (Versteeg et al., 2018; Zhong, 2017; Zhong, 2018; Zou et al., 2019). Comparative analyses of *C. trachomatis* genomes show that all genotypes conserve a high synteny grade (high co-localization of genes on the chromosome) indicating that only subtle differences as well as transcriptional activity or regulation of chlamydial chromosomal/plasmidial gene expression (Carlson et al., 2008) may determine the disease severity (Thomson et al., 2008).

In a recent study, plasmid-deficient *C. trachomatis* strains were 530-fold less infective than those strains harbouring the plasmid (Ma et al., 2020). The virulence associated with chlamydial plasmid could be related to the production of *pgp3* gene-encoded protein (Zhang et al., 2019) and the transcriptional regulation encoded by *pgp4*. When the sequences of *pgp3*, *pgp4* and *glgA* were compared, there were several non-synonymous mutations able to differentiate between L and non-L genotypes; however, none of these differences were associated with clinical symptoms. This finding suggests that the key to the virulence of *C. trachomatis* could be in the

transcriptional level of these virulence genes rather than in genetic differences between them. There are recent reports proposing the quantification of chlamydial plasmid as an approach to infer bacterial pathogenicity (Yang et al., 2020). Accordingly, our results about the significant differences in PCN observed between L and non-L genotypes suggest that this marker could correlate with the invasiveness of the microorganism. In addition, in all the symptomatic cases, PCN of *C. trachomatis* was similar and independent of genotype. A similar conclusion could be drawn among asymptomatic patients. This suggests that to distinguish between L or non-L genotypes might not be sufficient, suggesting the convenience of introducing PCN for a more accurate clinical management of the infected patients in the current chlamydia epidemic.

As to the site of infection, multiple-site *C. trachomatis* infections were detected in 21 patients. Among them 13 were rectal samples and rectal ulcer, and in 10 patients the strain belonged to the same *pmpH* + *ompA*-genotype. In these ten strains, the PCN was higher in rectal ulcer than in rectum as the invasiveness could be lower (Ma et al., 2020), so PCN could be influenced by the microenvironment. Similar conclusions could be reached in the study from Seth-Smith et al (Seth-Smith et al., 2009), where they found higher copy numbers in *C. trachomatis* strains related to ocular infections. However, other studies did not find this correlation (Borges et al., 2010; Last et al., 2014). These discrepancies in PCN could be related to transport time and temperature influences in DNA degradation, impacting chromosomal DNA more than plasmid (Dirks J a et al., 2021), or stress conditions which could be different in different anatomical sites, such as oral and cervical (Fakhry et al., 2013) or the microenvironmental conditions observed in intestinal tract (Ma et al., 2020). Among the few previous publications, the plasmid/chromosome ratio was <10 (frequently around 4-6 copies), whereas in our study many clinical strains yielded a ratio >10. A possible explanation was that in our study the quantification took place directly in the clinical sample, whereas practically all previous studies were done in *C. trachomatis* isolates grown in cellular culture. Recently, a study about PCN in the clinical samples revealed values more similar to our results, with 66.8% of all samples with PCN/chromosome ratio >10 (Dirks J a et al., 2021).

In the future, new studies must be designed to define in long time the bacterial persistence and clearance. This is a limitation of our study, which was based on routine procedure in STI clinics in order to demonstrate the relation between PCN and clinical symptoms. Another limitation of our study was observed in the simultaneous infections in more than one anatomic site, as the complete genome sequencing should be obtained to confirm the relation between these strains with the same *pmpH* + *ompA*-genotype.

A specific design must be implemented to guarantee the follow up of these patients. Another limitation of our study was the presence of signs and symptoms in patients with simultaneous detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*.

In conclusion, the L-genotypes of *C. trachomatis* showed a higher PCN than the non-L genotypes; the few infections with signs and symptoms caused by non-L genotypes with clinical symptoms similar to L-genotypes infections were also associated with a higher PCN. Maybe this marker could also have an impact bacterial persistence (Yang et al., 2020) and consequently on the duration of treatment. This type of results reinforces the need to deepen the host- *C. trachomatis* interactions and the factors involved in the development of the disease.

Funding

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) co-financed by the European Development Regional Fund (A Way to Achieve Europe program (P116-01242, P120/01397 and CB06/02/0053).

Authors' contributions

José María López-Pintor: conceptualization, data curation, formal analysis, investigation and writing; Laura Martínez-García: conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, software and supervision; Ainhize Maruri: data curation, formal analysis and investigation; Blanca Menéndez: data curation and resources; Teresa Puerta: data curation and resources; Concepcion Rodríguez: data curation and investigation; José María González-Alba: conceptualization, formal analysis, methodology, software, supervision and validation; Mario Rodríguez-Domínguez: conceptualization, methodology, supervision and validation; Juan Carlos Galán: conceptualization, formal analysis, investigation, funding acquisition, methodology, project administration, resources, supervision, validation and writing.

Declaration of competing interest

The authors have no competing interests to declare.

Acknowledgments

We thank Instituto de Salud Carlos III (Spain) for the research support. We thank Clinical Sandoval staff, and also Mary Harper for corrections to the English. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the study for publication.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.diagmicrobio.2021.115610.

References

Bébéar C, de Barbeyrac B. Genital Chlamydia trachomatis infections. Clin Microbiol Infect 2009;15:4-10.

- Borges V, Ferreira R, Nunes A, Nogueira P, Borrego MJ, Gomes JP. Normalization strategies for real-time expression data in Chlamydia trachomatis. J Microbiol Methods 2010;82:256-64.
- Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, Wicke L, Virtaneva K, Sturdevant DE, et al. The Chlamydia trachomatis plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. Infect Immun 2008;76:2273-83.
- Chlamydia infection. Annual epidemiological report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control 2019 accessed 16 November 2021.
- Crowell TA, Hardick J, Lombardi K, Parker Z, Kokogho A, Amusu S, et al. Asymptomatic lymphogranuloma venereum among Nigerian men who have sex with men. Sex Transm Infect 2018;94:578-81.
- Dirks J a MC, Janssen K, Hoebe CJPA, Geelen THB, Lucchesi M, Dukers-Muijrsers NHTM, et al. Chlamydia trachomatis intra-bacterial and total plasmid copy number in clinical urogenital samples. Sci Rep 2021;11:259.
- Fakhry C, Marks MA, Gilman RH, Cabrera L, Yori P, Kosek M, et al. Comparison of the immune microenvironment of the oral cavity and cervix in healthy women. Cytokine 2013;64:597-604.
- Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HMB, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P, et al. Whole-genome analysis of diverse Chlamydia trachomatis strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. Nature Genet 2012;44:413-9.
- Last AR, Roberts CH, Cassama E, Nabicassa M, Molina-Gonzalez S, Burr SE, et al. Plasmid copy number and disease severity in naturally occurring ocular Chlamydia trachomatis infection. J Clin Microbiol 2014;52:324-7.
- Ma J, He C, Huo Z, Xu Y, Arulananandam B, Liu Q, et al. The cryptic plasmid improves Chlamydia fitness in different regions of the gastrointestinal tract. Infect Immun 2020;88: e00860-19.
- Morré SA, Spaargaren J, Fennema JSA, de Vries HJC, Coutinho RA, Peña AS. Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma venereum. Emerging Infect Dis 2005;11:1311-2.
- Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. PLoS ONE 2015;10: e0143304.
- Patton DL, Sweeney YC, Baldessari AE, Cles L, Kari L, Sturdevant GL, et al. The Chlamydia trachomatis Plasmid and CT135 virulence factors are not essential for genital tract infection or pathology in female pig-tailed macaques. Infect Immun 2018;86: e00121-18.
- Pickett MA, Everson JS, Pead PJ, Clarke IN. The plasmids of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. Microbiology (Reading) 2005;151:893-903.
- Quint KD, Bom RJM, Bruisten SM, van Doorn LJ, Nassir Hajipour N, Melchers WJG, et al. Comparison of three genotyping methods to identify Chlamydia trachomatis genotypes in positive men and women. Mol Cell Probes 2010;24:266-70.
- Rodríguez-Domínguez M, González-Alba JM, Puerta T, Menéndez B, Sánchez-Díaz AM, Canton R, et al. High prevalence of co-infections by invasive and non-invasive Chlamydia trachomatis genotypes during the Lymphogranuloma venereum outbreak in Spain. PLoS ONE 2015;10: e0126145.
- Rodríguez-Domínguez M, Puerta T, Menéndez B, González-Alba JM, Rodríguez C, Hellín T, et al. Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. Clin Microbiol Infect 2014;20:219-25.
- Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. Bull World Health Organ 2019;97:548-562P.
- Saxon C, Hughes G, Ison C. UK LGV Case-Finding Group. Asymptomatic lymphogranuloma venereum in men who have sex with men, United Kingdom. Emerging Infect Dis 2016;22:112-6.
- Seth-Smith HMB, Harris SR, Persson K, Marsh P, Barron A, Bignell A, et al. Co-evolution of genomes and plasmids within Chlamydia trachomatis and the emergence in Sweden of a new variant strain. BMC Genomics 2009;10:239.
- Seth-Smith HMB, Harris SR, Skilton RJ, Radebe FM, Golparian D, Shipitsyna E, et al. Whole-genome sequences of Chlamydia trachomatis directly from clinical samples without culture. Genome Res 2013;23:855-66.
- Song L, Carlson JH, Whitmire WM, Kari L, Virtaneva K, Sturdevant DE, et al. Chlamydia trachomatis Plasmid-Encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes. Infect Immun 2013;81:636-44.
- Spaargaren J, Schachter J, Moncada J, de Vries HJ, Fennema HS, Peña AS, et al. Slow epidemic of lymphogranuloma venereum L2b strain. Emerg Infect Dis 2005;11:1787-8.
- Thomson NR, Holden MTG, Carder C, Lennard N, Lockey SJ, Marsh P, et al. Chlamydia trachomatis: genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates. Genome Res 2008;18:161-71.
- Versteeg B, Bruisten SM, Pannekoek Y, Jolley KA, Maiden MCJ, van der Ende A, et al. Genomic analyses of the Chlamydia trachomatis core genome show an association between chromosomal genome, plasmid type and disease. BMC Genomics 2018;19:130.
- Yang C, Kari L, Lei L, Carlson JH, Ma L, Couch CE, et al. Chlamydia trachomatis plasmid gene protein 3 is essential for the establishment of persistent infection and associated immunopathology. mBio 2020;11: e01902-20.
- Yang C, Starr T, Song L, Carlson JH, Sturdevant GL, Beare PA, et al. Chlamydial lytic exit from host cells is plasmid regulated. mBio 2015;6: e01648-15.
- Yeow TC, Wong WF, Sabet NS, Sulaiman S, Shahhosseini F, Tan GMY, et al. Prevalence of plasmid-bearing and plasmid-free Chlamydia trachomatis infection among women who visited obstetrics and gynecology clinics in Malaysia. BMC Microbiol 2016;16:45.

- Zhang T, Huo Z, Ma J, He C, Zhong G. The plasmid-encoded pGP3 promotes Chlamydia evasion of acidic barriers in both stomach and vagina. *Infect Immun* 2019;87:e00844-18.
- Zhong G. Chlamydial plasmid-dependent pathogenicity. *Trends Microbiol* 2017;25:141-52.
- Zhong G. Chlamydia spreading from the genital tract to the gastrointestinal tract - A two-hit hypothesis. *Trends Microbiol* 2018;26:611-23.
- Zou Y, Lei W, Su S, Bu J, Zhu S, Huang Q, et al. Chlamydia trachomatis plasmid-encoded protein Pgp3 inhibits apoptosis via the PI3K-AKT-mediated MDM2-p53 axis. *Mol Cell Biochem* 2019;452:167-76.

Anorectal Lymphogranuloma Venereum in Madrid: A Persistent Emerging Problem in Men Who Have Sex With Men

Alfonso Cabello Úbeda, MD,* Ricardo Fernández Roblas, MD, PhD,† Rosa García Delgado, PhD,‡
 Laura Martínez García, MD,§ Fabiola Sterlin, MD,*
 Manuel L. Fernández Guerrero, MD, PhD,* and Miguel Górgolas, MD, PhD*

Background: Since 2003, outbreaks of lymphogranuloma venereum (LGV) with anorectal syndrome have been increasingly recognized in many Western countries. All of them have been classified as LGV serovar L2b, mainly occurring in human immunodeficiency virus (HIV)-infected men who have had sex with men (MSM). We describe a series of 26 diagnosed cases of LGV proctitis in downtown Madrid, Spain, in 2014, after implementing routine diagnostic procedures for this disease in symptomatic MSM.

Methods: We conducted an observational study of patients with symptomatic proctitis attending an outpatient infectious diseases clinic in Madrid, Spain during calendar year 2014. Clinical, epidemiological, laboratory, and therapeutic data were gathered and analyzed.

Results: Twenty-six patients were included in the analysis. All were MSM, and 24 of them were HIV-positive. All patients reported having acute proctitis symptoms including tenesmus (85%), pain (88%), constipation (62%), or anal discharge (96%). Proctoscopy showed mucopurulent exudate (25 patients [96%]), and rectal bleeding, with mucosal erythema and/or oedema in all cases. Rectal swabs were obtained from all patients, and LGV serovar L2 was confirmed in all of them. The cure rate was 100% after standard treatments with doxycycline 100 mg twice per day for 3 weeks. Simultaneous rectal infections with other sexually transmitted pathogens (gonorrhoea, herpes simplex virus, *Mycoplasma genitalium*) and systemic sexually transmitted diseases (STDs) (syphilis, acute HIV, and hepatitis C infections) were also documented in 12 patients (46%), but these co-infections did not appear to influence the clinical manifestations of LGV.

Conclusions: Anorectal LGV is a common cause of acute proctitis and proctocolitis among HIV-infected MSM who practice unprotected anal sex, and it is frequently associated with other rectal STDs. The implementation of routine screening and prompt diagnosis of these rectal infections should be mandatory in all clinical settings attended by HIV and STD patients.

Serovars A-C of *Chlamydia trachomatis* cause trachoma, which occurs mainly in developing countries; serovars D-K are

responsible for oculogenital infections, and serovars L1, L2, and L3 cause lymphogranuloma venereum (LGV).^{1,2} Infections of serovars A-K are usually confined to the mucosal epithelia of the eyes and the anogenital tract. In contrast, the L-serovars are more invasive and may induce genital ulcers and inguinal lymphadenopathies after passing the epithelial surface.²⁻⁴ Lymphogranuloma venereum serovar infection can present itself as an inguinal syndrome with painful inguinal lymphadenopathy or as an anorectal syndrome with acute proctitis. Severe LGV cases affecting the colon and rectum, and inducing excessive proliferation of intestinal and perirectal lymphatic tissues often mimic inflammatory bowel diseases, such as Crohn disease and ulcerative colitis.^{1-3,5}

Until recently, it was considered a rare disease in industrialized countries, whereas it was endemic in parts of Africa, Asia, South America, and Caribbean countries.⁶ Since 2003, outbreaks of LGV have been identified in many Western countries. First in the Netherlands,⁷ and subsequently in other parts of Europe, North America, and among the world's wealthiest countries.^{2,8,9} This led to the discovery of an ongoing unnoticed outbreak, that was described and also led to a rapid increase in case detections during the last decade.⁹ Most cases have been recognized as LGV serovar L2b, mainly in men who have sex with men (MSM).¹⁰ L2b serovar already circulated among MSM in San Francisco in 1981,⁹ suggesting that it has had a slow rising epidemic, unnoticed for more than 20 years among MSM in high-income countries.¹¹

Cluster reports of LGV have been documented in MSM with high prevalence of HIV infection, and in some cases related to "serosorting" (sexual networks in which some MSM may preferentially choose partners with similar HIV status as themselves).^{3,7,8,12,13} Human immunodeficiency virus infection and anal receptive intercourse, as well as potentially traumatic anal sexual practices, have been reported as important risk factors for rectal LGV.¹⁴

The first case of LGV in an MSM in Spain was reported in 2005 in Barcelona,¹² and subsequently additional cases were reported in Madrid¹⁵ and other cities.¹⁶ In recent years, we have seen a significant increase in anorectal LGV in our own clinic, mainly among HIV-positive MSM. We present herein the cases of anorectal LGV detected during the last year in a tertiary hospital in Madrid, where over 2500 HIV-positive patients were in attendance. Most of them were MSM within a coverage area of about 350,000 people in the central area of the city. Successful detection was achieved after implementing a specific screening program for anal dysplasia and reviewing clinic policies to assure maximum detection of MSM with anorectal symptoms.

MATERIALS AND METHODS

Retrospective and observational studies cases of proctitis were done in the outpatient department of the Division of Infectious Diseases, at Fundación Jiménez Díaz, in Madrid between January 2014 and January 2015.

From the *Division of Infectious Diseases, †Departments of Microbiology, ‡Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, QuironSalud, Universidad Autónoma de Madrid; and §Department of Microbiology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

Acknowledgements: We are grateful for the support to Departments of Microbiology and Immunology.

A.C. and M.G. conceived the study, participated in its design, data analysis and drafted the article. R.FR., L.M., F.S., and R.GD. participated in data collection, design and data analysis. M.L.F.G. participated in its design and drafted the article. All the authors contributed to the final version of the article.

Conflicts of Interest and Source of Funding: None declared.

Correspondence: Alfonso Cabello Úbeda, MD, Division of Infectious Diseases, Fundación Jiménez Díaz Avda, Reyes Católicos, 2 Madrid 28040, Spain. E-mail: alcubeda@yahoo.es or acabello@fjd.es.

Received for publication September 1, 2015, and accepted March 23, 2016. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000000459

Copyright © 2016 American Sexually Transmitted Diseases Association All rights reserved.

In 2012, we began an anal dysplasia screening program for MSM attending our clinic, which included systematic questioning of MSM about anorectal symptoms and routine anal inspection and anoscopy of men who had receptive anal sexual exposure or complained of anorectal symptoms. During the analytic period, January 1 to December 31, 2014, there were 321 clinic visits by MSM including in the sexually transmitted disease (STD) and anal dysplasia screening program. Two hundred sixty-seven cases were asymptomatic, despite the presence in some of them of *C. trachomatis*, gonorrhoea, or herpes simplex in rectal swabs. Fifty-four patients (17%) acknowledged 1 or more symptoms of proctitis or proctocolitis, including rectal pain, bleeding, tenesmus, constipation, or anal discharge. Of these symptomatic cases, 51 (94%) had rectal specimens collected and successfully tested for *C. trachomatis*. In these, 1 or more types of CT were identified in 31 men (57%), including 26 infections with CT L2. These 26 men comprise the patients analyzed in this report. No other LGV types of *C. trachomatis* were identified.

We defined proctitis as the presence of 1 or more signs or symptoms as defined in specific guidelines: rectal bleeding, pain, tenesmus, constipation, and anal discharge.^{17,18}

All patients were subjected to a proctoscopy (conventional anoscopy). *Chlamydia trachomatis* was detected by polymerase chain reaction on rectal swab specimens. The swabs used for samples collections were CE medical devices class IIa, DELTALAB. We used multiplex polymerase chain reaction (*C. trachomatis*/Neisseria/*Mycoplasma genitalium* Real-TM, Sacace Biotechnologies Srl, Como, Italy) to detect *C. trachomatis* infection by targeting a 89-bp region of the cryptic plasmid and a 162- to 165-bp region in the genome. The identification of serovar and serogroup was made by specific probes (RHA kit Ct Genotyping, Labo Bio.medical Products BV, Rijswijk<The Netherlands), performing this test takes 5 hours (because of the large number of samples received in our laboratory, the result could be delayed a few days). To perform all tests, the manufacturer's instructions were strictly followed.

Genotypic analysis of 3 randomly selected samples was performed: initially, a fragment of 430 bp in *pmpH* gene was amplified and sequenced, using primers pmpH-F 5'-AAACCG TGAGTATTCCGGA-3' and pmpH-R 5'-ATATGCCTCCTCA TTGTCTT-3'. In the second step, 858 bp of *ompA* gene, encoding major outer membrane protein, was sequenced using the previously published primers.¹⁹ Sequences obtained were aligned with reference sequences available in the National Centre for Biotechnology database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Three randomly samples were sent to a referral center for specific genotypic analysis. Because we obtained as result L2b serovar, described in most of the documented outbreaks over the last few years, more samples were not analyzed due to be an expensive test and not available in our institution.

Rectal swabs for *Neisseria gonorrhoeae* cultures on selective media, other selective media for facultative bacteria and polymerase chain reaction to detect herpes simplex virus (artus^R Herpes simplex virus 1/2 QS-RGQ; Qiagen, Hilden, Germany) were also performed. Likewise, we also carried out blood tests to detect other sexual transmitted diseases, such as HIV, syphilis, hepatitis B and hepatitis C serologic tests.

Clinical, epidemiological, laboratory, and therapeutic data were analyzed. Description of data was performed using percentages, means, and standard deviation, median, and interquartile range. Quantitative variables were analyzed by Kolmogorov-Smirnov testing to confirm normality of data. When no normality was found, logarithmic transformation was performed. Qualitative variables were analyzed by McNemar test for comparison of proportions over the time in a group. Statistical significance was

considered, one that reached a *P* value less than 0.05. Due to the size of the sample, Fisher exact test was used. The results were analyzed using the SPSS version 9.0 software package.

This was an observational retrospective study of routine clinical practice; therefore, informed consent was not obtained. We obtained the approval of the Ethics Committee of the Fundación Jiménez Díaz for reviewing clinical histories, and the patient records/information was anonymized and deidentified before analysis.

RESULTS

Twenty-six patients were included in the analysis. All of them were MSM. Twenty-three (88%) were white; the other 3 were of Native American origin. Eighteen patients (69%) were from Spain, 4 were from elsewhere in Europe and 4 were from the Americas or Caribbean. All of them lived in Madrid for several years, and none reported having travelled abroad on nearby dates of the clinical episodes. The median age was 36 years (range, 25–58 years).

All but 4 (85%) patients had a positive history of STDs. These included HIV infection (19 patients [73%]), syphilis (8 patients [31%]), genital warts (6 patients [23%]), gonorrhoea (3 patients [12%]), hepatitis C virus infection (2 patients [8%] with chronic known infection without chronic liver damage), and hepatitis B virus infection (1 patient [4%]). Most of them (22 patients, 85%) had not had a regular partner, and all reported having had unprotected anal intercourse, both receptive and insertive, and having used sex toys with many different casual partners.

The mean age of patients with previous known HIV infection was 38 years (range, 25–45 years), a median follow-up of 4 years, and only 3 of them were classified as CDC stage C. Thirteen of them were on effective highly active antiretroviral therapy with undetectable viral load and 6 were without antiretroviral therapy, having a mean CD4 cell count above 350 cells/ μ L in all cases.

The main clinical signs and symptoms of patients are shown in Table 1. The median duration of symptoms was six weeks (range, 1–16 weeks). Most of them reported acute proctitis symptoms like tenesmus (85%), pain (88%), constipation (62%), or anal discharge (96%). Proctoscopy was performed in all patients showing mucopurulent exudate (25 patients [96%]) and rectal bleeding with mucosal erythema or oedema (22 patients [85%]) (Fig. 1). Colonoscopy or rectosigmoidoscopy was performed on 14 patients (54%), revealing ulcers in all but one (93%) (Fig. 2). A magnetic resonance image was performed on 1 patient (due to a suspected fistula by the surgeon), the results were a disclosing circumferential wall thickening of the sigma and rectum and small nodules in the mesorectal area (Fig. 3).

Rectal swabs for anal diagnoses were obtained in all patients. All 26 samples were confirmed to be LGV positive, all of them serovar L2. Genotypic analysis of a small random sample (3 p) was performed: In the 3 analyzed samples, the sequenced fragments of *pmpH* gene were identical to L2b variant, which carry only 1 change (L159P) with respect to L2 variant. On the other hand, the sequencing of *ompA* gene confirmed the first result. All analyzed samples in this study carried the N162S change, which is present in L2b variant, but absent in L2 variant. As we have described in Materials and Methods, no further samples were tested, because L2b is the most common serovar reported in previous studies.

Concurrent anorectal (gonorrhoea, herpes simplex virus and *M. genitalium*) and systemic (syphilis, HIV, hepatitis B, and hepatitis C) infections with other sexually transmitted pathogens were documented in 12 patients (46%): gonorrhoea (7 cases), syphilis (6 cases), herpes simplex virus type 2 infection (2 cases),

TABLE 1. Signs, Symptoms, and Main Characteristics of Patients

Characteristic	Patients (n = 26)	LGV Alone (n = 17)	LGV + Others Anorectal STDs (n = 9)
HIV status	All		
Positive (receiving Highly active antiretroviral therapy)/new diagnosis	24(13)/5 (92%)	15(8)/2	9(5)/3
Negative	2 (8%)	2	0
Symptoms	All		
Tenesmus	22 (85%)	14 (82%)	8 (89%)
Pain	23 (88%)	15 (88%)	8 (89%)
Constipation	16 (62%)	10 (59%)	6 (67%)
Anal discharge	25 (96%)	16 (94%)	9 (100%)
Fever	4 (15%)	1 (6%)	3 (33%)
Rectal bleeding	22 (85%)	15 (88%)	7 (78%)
Proctoscopy findings	All		
Mucopurulent exudate	25 (96%)	16 (94%)	9 (100%)
Erythema	26 (100%)	17 (100%)	9 (100%)
Erosions/bleeding	13 (50%)	9 (53%)	4 (44%)
Colonoscopy findings	14 p (54%)	(n = 8)	(n = 6)
Ulcers/erosions			
< 5 cm	5 (19%)	3 (38%)	2 (33%)
≥ 5 cm	8(31%)	5 (63%)	3 (50%)
Pancolitis	1 (4%)	0	1 (17%)
Complications	14 p (54%)	(n = 8)	(n = 6)
Late complications			
Haemorrhoids	6 (23%)	4 (50%)	2 (33%)
Anal fissure	5 (19%)	4 (50%)	1 (17%)
Anal fistula	2 (8%)	0	2 (33%)
Anal stricture	1 (4%)	0	1 (17%)
Other complications			
Acute pancolitis	1 (4%)	0	1 (17%)
Other concurrent STDs	12 p (46%)		
Gonorrhoea	7 (27%)	0	7 (78%)
Syphilis	6 (23%)	3 (18%)	3 (33%)
Acute HIV	5 (19%)	2 (12%)	3 (33%)
Herpes simplex virus –2 (per pcr)	2 (8%)	0	2 (22%)
Acute HCV	2 (8%)	1 (6%)	1 (11%)
<i>M. genitalium</i>	1 (4%)	0	1 (11%)

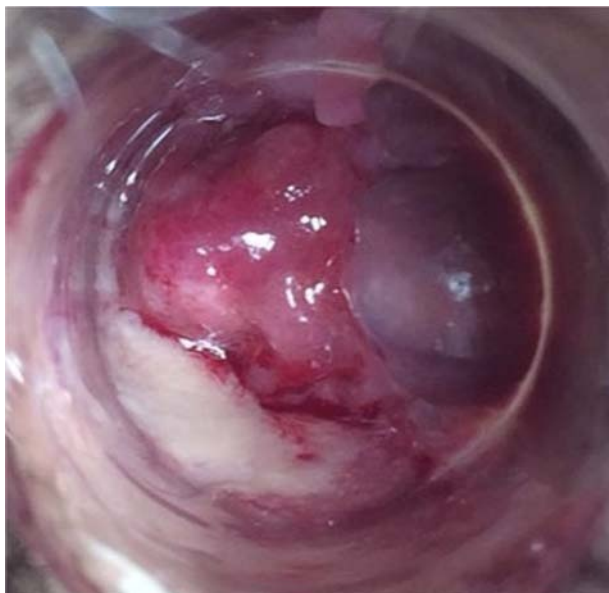


Figure 1. Rectal proctoscopy of a patient with LGV showing severe erythema of the rectal mucosa with erosions, bleeding, and purulent exudates.



Figure 2. Rectoscopic image of a patient with LGV showing mucosal erythema and purulent discharge.

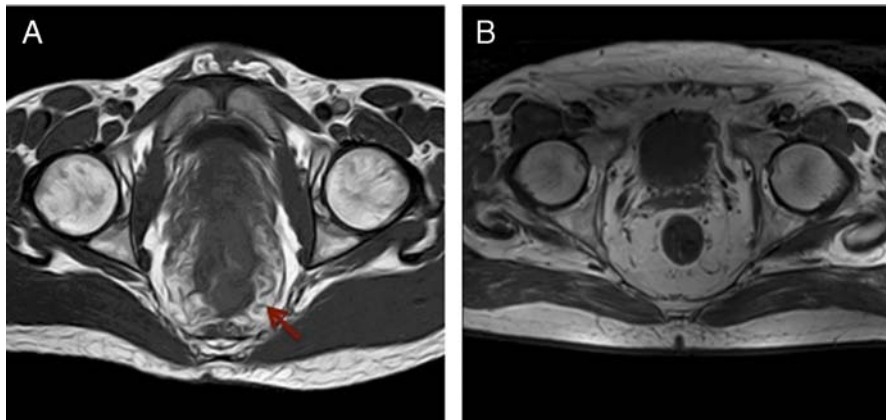


Figure 3. A, MRI of a case of several rectal gonorrhoea and LGV showing mucosal enlargement and infiltration (white arrow). B, MRI of a patient without lesions. MRI indicates magnetic resonance image.

acute hepatitis C infection (2 cases), and *M. genitalium* (1 case). In these patients, we saw more complications and the presence of fever; we did not find statistical differences between these and other aspects. The main clinical signs and symptoms of both groups are shown in Table 1. Three patients knew their new HIV-infected status at that time; they had 405 cel/ μ L, 780 cel/ μ L and 855 cel/ μ L CD4 count, with 107.00 cop/mL, 34000 cop/mL and undetectable viral load for VIH-1, respectively. Of 5 patients with unknown HIV infection, 3 of them found out their status at the same time of the LGV diagnosis (with precious negative serologic test), and 2 more were confirmed in the following 4 months. None of them had symptoms of primary infection. The ratio of HIV-infected overall was 24 of 26 patients (92%). All cases of syphilis were asymptomatic. Positive serologic tests (all presented rapid plasma reagin \geq 1/16) were detected either in the first or the second visit, having previous negative or unknown results. All of them had more than 1 ulcer in proctoscopy or colonoscopy findings. The syphilis, and acute HIV or HCV cases have been considered as systemic concomitant STDs and not like causes of proctitis or proctocolitis.

All patients received doxycycline 100 mg twice daily for 3 weeks, and follow-up was performed in 3 months. All patients improved after treatment; however, 13 patients (50%) developed late complications such as hemorrhoids (6 patients [23%]), anal fissure (5 patients [19%]), fistula (2 patients [8%]), or anal stricture (1 patient [4%]).

One patient developed acute pancolitis (Fig. 4). He was a well-controlled HIV-infected MSM who received empiric treatment for pancolitis without an STD etiology suspected infection. He was

initially treated with ceftriaxone and metronidazole, with barely improvement and further worsening. After *C. trachomatis* serovar LGV detection, doxycycline was started with clinical improvement and resolution. He had anal co-infection by *Neisseria gonorrhoeae*.

DISCUSSION

Cases of LGV were first described in the Netherlands in 2003, and nowadays, it remains as a common disease in many high-income countries.^{14,15,20} Our data, as other authors have previously shown, indicate that severe acute proctitis is more common than the inguinal lymphadenopathic syndrome, at least in MSM who practice unprotected anal intercourse.²¹ Human immunodeficiency virus coinfection had a high association in our series of cases, as reported by previous authors.⁶ Some sexual behaviors, such as fisting or the insertion of sexual toys, seem to promote mucosal injury and perhaps facilitate *C. trachomatis* infection as well as HIV²² or acute hepatitis C²³ infection. Some authors have suggested that HIV infection might alter the local capacity of the mucosa to control LGV infection and, therefore, facilitating its establishment in the rectal mucosa.¹² As we have commented above, some sexual behaviors seem to facilitate anal *C. trachomatis* infection; it is possible that transmission might occur through fingers, hands, sex toys, enema equipment, and other fomites. In the same period, we have seen MSM patients (4 patients) with classic LGV cases with purulent inguinal lymphadenopathy. In these cases, *C. trachomatis* was detected in the purulent drainage; however, genotypic analysis was not studied. We considered them as LGV infections and were treated as such. Probably, the transmission

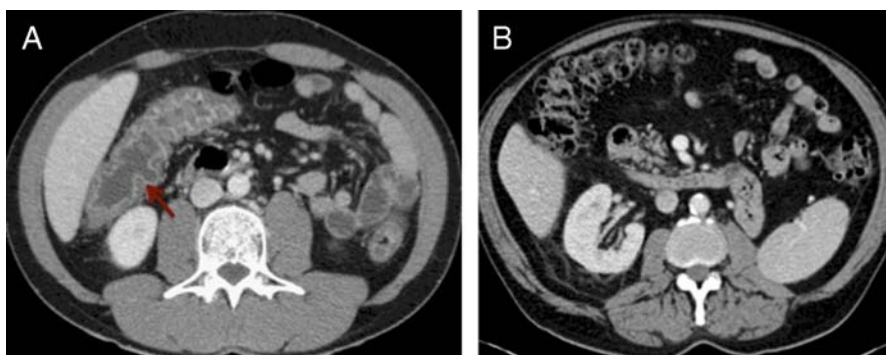


Figure 4. A, CT scan of a patient with LGV pancolitis and rectal gonorrhoea, showing extensive colonic mucosal inflammation (white arrow). B, CT scan of a patient without lesions.

route is more common but not only from rectum to rectum; nevertheless, this fact continues without a clear response.

We analyzed 3 randomly selected samples and found the LGV L2b, the same serovar described in the last decade.¹⁰ Some studies have compared this variety with previous isolated cases in the 80th and 90th decades, suggesting it had gone unnoticed for more than 20 years among MSM in our countries. Even so, a new strain has recently been described in Sweden as well as a 2 serovars coexistence in Madrid.^{15,24}

Diagnostic delay is also common, as seen in all of the cases that we report herein. Although asymptomatic LGV infection has been described,²⁵ much of the patients present acute and severe anorectal symptoms.^{8,21} It is probable that patient's embarrassment may delay consultation and also there is a lack of awareness of this entity by a great number of professionals. When the infection is not promptly diagnosed and treated, it tends to progress relentlessly, inducing severe local damage on rectal and sigmoidal mucosa.²⁶ The endoscopic lesions may mimic those present in bowel inflammatory diseases. Furthermore, in the biopsy, the intestinal histopathology is nonspecific and might be similar to different entities, such as Crohn disease²⁷ or ulcerative colitis, misleading doctor decisions and treatment and delaying a correct diagnosis.

The main symptoms described by our patients were tenesmus, pain, and anal discharge of blood and pus, as previously described by other authors as the principal suspicious signs for this disease. However, many patients might just have complained as having diarrhoea, misleading again their physicians. This underlines the importance of a proper interrogation of symptoms. Once the disease is suspected, proctoscopy and/or rectoscopy is recommended.⁵

According to the main clinical guidelines,^{17,18,28} empirical treatments with doxycycline and ceftriaxone were given, and all patients improved. Because laboratory results confirming the LGV serovar are not routinely available within a week for most health centers, we propose that patients with severe proctitis should receive presumptive treatment with doxycycline for 21 days; and appropriated samples should be taken to confirm the LGV diagnosis.²⁹

Concomitant STD infections, such as acute hepatitis C²³ and others, are usually present in HIV-positive MSM. The optimism produced by the advances in the fight against HIV, the trivialisation of the risk, distorting the idea of risky behavior, are among the determining factors of attitude that make it impossible to adopt effective preventive behavior and make it easier to acquire new and other infections.³⁰ It is therefore mandatory to screen and monitor other STDs (another anal sexually transmitted infections as gonococcal proctitis, HIV infection, syphilis, and hepatitis B or C infection) at the time of consultation and during follow-up. The mucosal damage induced by the infection (Figs. 1-3) probably facilitates the transmission of other STDs among these patients.

Recent partners should also be studied and treated to control outbreaks.⁸ However, the frequent casual sexual partners of patients often have made it difficult to control epidemiological outbreaks. Therefore, it should be recommended to screen all MSM who report having receptive anal sex in the previous 3 to 6 months for anorectal *C. trachomatis* infection, as indicated by other authors, especially if anorectal symptoms are present; but not only in this case because most *C. trachomatis* infections (non-LGV) are asymptomatic.

Finally, it is important to note that anorectal LGV might present itself as a severe proctitis disease with important local and systemic symptoms, mimicking inflammatory bowel disease.

The main limitation of our study is that we were not able to evaluate the impact of other concurrent STDs, common in this group of patients, in the lesions observed in the colonic mucosa. As 25 % of *C. trachomatis* serovar LGV infections could be asymptomatic, it is possible that concomitant anorectal STDs (as

gonorrhoea, Herpes simplex virus, and mycoplasma) might have some influence in the clinical manifestations.

In conclusion, acute LGV proctitis is a disease with significant morbidity, which usually occurs in HIV-positive MSM. Today, we have a steady increase of cases in major western cities, we also experience a better awareness of the disease and prompt diagnosis in HIV and STD clinics, but the continuous practice of unprotected sex and risky sexual behaviors might maintain the endemicity of this infection. In addition, the intense local damage that *C. trachomatis* caused on the rectal mucosa facilitates the acquisition of other STDs, such as syphilis and C hepatitis. We believe that it is necessary to increase patient's information about this disease and to facilitate recommendations for emphasizing adequate protection in sexual behaviors. The current use of HIV pre-exposure prophylaxis and the false sense of security in engaging in unprotected sex might be an obstacle and facilitate LGV epidemics.

REFERENCES

- Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect* 2002; 78:90–92.
- Stark D, van Hal S, Hillman R, et al. Lymphogranuloma venereum in Australia: anorectal *Chlamydia trachomatis* serovar L2b in men who have sex with men. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1029–1031.
- Van der Bij AK, Spaargaren J, Morré SA, et al. Diagnostic and clinical implications of anorectal lymphogranuloma venereum in men who have sex with men: a retrospective case-control study. *Clin Infect Dis* 2006; 42:186–194.
- De Vries HJ, Smelov V, Middelburg JG. Delayed microbial cure of lymphogranuloma venereum proctitis with doxycycline treatment. *Clin Infect Dis*. 2009;48:e53–e56.
- López-Vicente J, Rodríguez-Alcalde D, Hernández-Villalba L, et al. Proctitis as the clinical presentation of lymphogranuloma venereum, a re-emerging disease in developed countries. *Rev Esp Enferm Dig* 2014; 106:59–62.
- Heras E, Llibre JM, Martró E, et al. Lymphogranuloma venereum proctocolitis in men with HIV-1 infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29:124–126.
- Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, Götz HM, et al. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of *Chlamydia trachomatis* serovar I2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men. *Clin Infect Dis* 2004; 39:996–1003.
- Ward H, Martin I, Macdonald N, et al. Lymphogranuloma venereum in the United Kingdom. *Clin Infect Dis* 2007; 44:26–32.
- Spaargaren J, Schachter J, Moncada J, et al. Slow epidemic of lymphogranuloma venereum L2b strain. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1787–1788.
- Morré S, Spaargaren J. Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma venereum. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1311–1312.
- De Vries HJ, Schim van der Loeff MF, Bruisten SM. High-resolution typing of *Chlamydia trachomatis*: epidemiological and clinical uses. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28:61–71.
- Martin-Iguacel R, Llibre JM, Nielsen H, et al. Lymphogranuloma venereum proctocolitis: a silent endemic disease in men who have sex with men in industrialised countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:917–925.
- Stolte IG, Dukers NH, Geskus RB, et al. Homosexual men change to risky sex when perceiving less threat of HIV/AIDS since availability of highly active antiretroviral therapy: a longitudinal study. *AIDS* 2004; 18:303–309.
- Macdonald N, Sullivan A, French P, et al. Risk factors for rectal lymphogranuloma venereum in gay men: results of a multicentre case-control study in the U.K. *Sex Transm Infect* 2014; 90:262–268.
- Rodríguez-Domínguez M, Puerta T, Menéndez B, et al. Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:219–225.
- Mejuto P, Boga JA, Junquera M, et al. Genotyping *Chlamydia trachomatis* strains among men who have sex with men from a Northern Spain region: a cohort study. *BMJ Open* 2013; 3:e002330.

17. de Vries HJ, Zingoni A, White JA, et al. 2013 European Guideline on the management of proctitis, proctocolitis and enteritis caused by sexually transmissible pathogens. *Int J STD AIDS* 2014; 25: 465–474.
18. De Vries HJ, Zingoni A, Kreuter A, et al. 2013 European guideline on the management of lymphogranuloma venereum. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29:1–6.
19. Jurstrand M, Falk L, Fredlund H, et al. Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3915–3919.
20. Spaargaren J, Fennema HS, Morr  SA. New lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* variant, Amsterdam. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1090–1092.
21. White JA. Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22:57–66.
22. Elford J. Changing patterns of sexual behaviour in the era of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19:26–32.
23. Montoya-Ferrer A, Fierer DS, Alvarez-Alvarez B, et al. Acute hepatitis C outbreak among HIV-infected men, Madrid, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1560–1562.
24. Unemo M, Clarke IN. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24:62–69.
25. De Vrieze NH, van Rooijen M, Speksnijder AG, et al. Urethral lymphogranuloma venereum infections in men with anorectal lymphogranuloma venereum and their partners: the missing link in the current epidemic? *Sex Transm Dis* 2013; 40:607–608.
26. Heiligenberg M, Lutter R, Pajkrt D, et al. Effect of HIV and chlamydia infection on rectal inflammation and cytokine concentrations in men who have sex with men. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20:1517–1523.
27. Pallawela SN, Sullivan AK, Macdonald N, et al. Clinical predictors of rectal lymphogranuloma venereum infection: results from a multicentre case–control study in the U.K. *Sex Transm Infect* 2014; 90:269–274.
28. Workowski KA. Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis* 2015; 61: S759–S762.
29. Mohrmann G, Noah C. Ongoing epidemic of lymphogranuloma venereum in HIV-positive men who have sex with men : how symptoms should guide treatment. In: HIV Drug Therapy Glasgow Congress 2014. Journal of the International AIDS Society. 2014, 17 (Suppl 3):19657. Abstract P125.
30. Fernández de Mosteyr n S, del Val Acebr n M, Fernández de Mosteyr n T, et al. Practices and perception of risk in human immunodeficiency virus infected males who have sex with other males. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:219–224.