

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Epidemiología, caracterización molecular y estudio de resistencia a antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en un centro de infecciones de transmisión sexual de la Comunidad de Madrid.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

MARÍA DOLORES GUERRERO TORRES

DIRECTORES

RAQUEL ABAD TORREBLANCA

JULIO ALBERTO VÁZQUEZ MORENO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Epidemiología, caracterización molecular y estudio de resistencia a antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en un centro de infecciones de transmisión sexual de la Comunidad de Madrid.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

MARÍA DOLORES GUERRERO TORRES

DIRECTORES

RAQUEL ABAD TORREBLANCA

JULIO ALBERTO VÁZQUEZ MORENO

Madrid, 2020



CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

Dña. **Raquel Abad Torreblanca**, Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid y Científica titular de la Unidad de *Neisseria*, *Listeria* y *Bordetella* del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III),

y

D. **Julio A. Vázquez Moreno**, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, Profesor de investigación y responsable de la Unidad de *Neisseria*, *Listeria* y *Bordetella* del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Epidemiología, caracterización molecular y estudio de resistencia a antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en un centro de infecciones de transmisión sexual de la Comunidad de Madrid” realizada por **María Dolores Guerrero Torres** para optar al Grado de Doctora en Microbiología y Parasitología, ha sido desarrollada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su lectura y defensa frente al Tribunal correspondiente.

Madrid, 24 de Febrero del 2020

Dra. Raquel Abad Torreblanca

Dr. Julio A. Vázquez Moreno

AGRADECIMIENTOS

Querido Mateo,

Cariño, cuando leas estas líneas ya habrás dejado de ser un bebé y aunque ahora mamá no se puede imaginar que crezcas tanto como para leer esta tesis, cuando llegue el día, quiere que sepas que con mucho esfuerzo y la ayuda de muchas personas, esta tesis que hoy tienes entre tus manos ha podido ver la luz.

Espero que a lo largo de tu vida tengas la suerte de encontrarte con personas que te ayuden a conseguir las metas que te propongas. Cuando te rodees de gente que te haga el camino más fácil, es importante que les hagas saber lo agradecido que les estás. Para dar ejemplo, mamá va a expresar su gratitud a todas las personas que directa o indirectamente, han contribuido a la realización de esta tesis:

En primer lugar, al Dr. Julio A. Vázquez que me abrió las puertas de su laboratorio y puso todos los medios que estaban a su alcance para poder realizar este trabajo. También, le estoy muy agradecida por ponerme en contacto con la Dra. Raquel Abad, motor que ha impulsado cada uno de los pasos del proceso y sin la que nada de esto hubiera sido posible. Raquel, algún día me gustaría llegar a ser una pequeña parte de lo gran profesional que eres. Muchas gracias por la dedicación y porque a pesar de la distancia, los e-mails hacían que estuviéramos un poco más cerca.

A Blanca Menéndez y a Jorge del Romero, que además de brindarme la oportunidad de tener mi primer trabajo como microbióloga, me abrieron las puertas del C.S. Sandoval, haciéndome sentir siempre como en casa. Para mí ha sido un orgullo haber formado parte del centro. Me habéis enseñado mucho y sin vosotros nada de esto hubiera tenido lugar.

A todo el personal del CNM y de C.S. Sandoval por haber sido siempre tan generosos con vuestro tiempo todas las veces que os he necesitado.

Al personal del Servicio de Microbiología del H.U. La Princesa, donde me formé como especialista y que durante 4 años han sido mi familia en Madrid. Aunque cada persona ha marcado de algún modo mi paso por la residencia, quiero hacer una mención especial al Dr. Diego Domingo y a la Dra. Teresa Alarcón, que tanto me enseñaron y continúan haciéndolo. Y, por supuesto, no puedo olvidarme de las residentes y del Dr. Buenaventura Buendía, que son las que realmente hicieron de estos 4 años una etapa inolvidable.

A mis compañeras de trabajo del CLILAB, que me acogieron tan bien y que hacen que cada día me guste más mi trabajo.

Al Dr. Gonzalo Cuesta, el mejor profesor que jamás he tenido y que allá por primero de carrera, me enseñó a amar la microbiología. Aunque nunca puedas leer esto, Mateo tiene que saber el poder que tiene la educación y que un buen docente, puede marcar el resto de tu carrera profesional. Gracias Gon.

A mis amigas, María y Sandra, porque aunque pasen los años, siempre encontramos huecos para tomar cafés.

A mis suegros, mis cuñadas y toda mi familia política. Tengo mucha suerte de poder contar con vosotros.

A mis sobrinos, Daniela y Álvaro, la tía os quiere muchísimo y vuestra llegada ha sido de las cosas más bonitas de la Tierra.

A mi hermano Toni, que gracias a su cariño constante hace que desaparezcan los kilómetros que nos separan.

A mi madre, por no rendirse nunca, por enseñarme que con esfuerzo y perseverancia se puede lograr cualquier cosa. Gracias por ser tan generosa y querernos tanto. Espero algún día ser tan buena madre como tú.

Mateo, hijo mío, para que mamá escribiera esta tesis, papá te cuidó mucho durante tus primeros meses de vida y sin su ayuda y dedicación absoluta, nunca hubiera podido acabar su redacción. Aunque no ponga el nombre de papá en la portada, esta tesis también es suya.

Carlos, para que con nuestras tácticas y estrategias, sigamos construyendo puentes indestructibles. Te quiero mucho.

Y por último, Mateo, tu sonrisa ha sido el mejor impulso para finalizar esta tesis. Mamá hará todo lo posible para que a pesar de las dificultades que conlleva la vida adulta, permanezca esa alegría en tu rostro.

¡Te quiero mucho cariño!

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIX
ABREVIATURAS.....	XXIII
1. RESUMEN.....	3
2. SUMMARY.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	15
3.1 Generalidades.....	15
3.2 Descripción de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	16
3.2.1 Características microbiológicas.....	16
3.2.2 Factores de virulencia.....	17
3.2.3 Patogenia y respuesta inmune.....	23
3.2.3.1 Adhesión, colonización e invasión.....	23
3.2.3.2 Inflamación.....	25
3.2.3.3 Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria.....	25
3.2.3.3.1 Resistencia al efecto bactericida del suero.....	26
3.2.3.3.2 Variación de los antígenos de superficie.....	26
3.2.3.3.3 Inmunidad adaptativa.....	27
3.3 Manifestaciones clínicas.....	28
3.3.1 Infecciones urogenitales.....	28
3.3.2 Infecciones extragenitales.....	30
3.3.3 Infección en el embarazo.....	33
3.3.4 Infección en la infancia.....	33
3.4 Diagnóstico.....	34
3.4.1 Recogida, transporte y almacenamiento de la muestra.....	34
3.4.2 Microscopía.....	37
3.4.3 Cultivo e identificación.....	38
3.4.3.1 Cultivo de <i>N. gonorrhoeae</i>	38
3.4.3.2 Identificación presuntiva.....	39

3.4.3.3	Pruebas de identificación confirmatorias	40
3.4.3.3.1	Pruebas bioquímicas.....	40
3.4.3.3.2	Ensayos inmunológicos.....	42
3.4.3.3.3	MALDI-TOF (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>)	43
3.4.4	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos	43
3.4.5	Otros métodos diagnósticos	46
3.5	Métodos de tipado.....	46
3.5.1	Métodos de tipado fenotípico	47
3.5.1.1	Auxotipificación	47
3.5.1.2	Determinación de la serovariedad.....	47
3.5.1.3	Combinación Auxotipo/Serovar.....	48
3.5.2	Métodos de tipado molecular	49
3.5.2.1	Métodos basados en los patrones de bandas de ADN en el gel de electroforesis	49
3.5.2.1.1	Análisis del contenido plasmídico	49
3.5.2.1.2	Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	49
3.5.2.1.3	Ribotipado	50
3.5.2.1.4	Tipado de los genes <i>opa</i>	50
3.5.2.2	Métodos basados en el análisis de secuencias de ADN	51
3.5.2.2.1	Tipificación del gen <i>porB</i>	51
3.5.2.2.2	<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	52
3.5.2.2.3	<i>Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing</i> (NG-MAST).....	52
3.5.2.2.4	<i>Neisseria gonorrhoeae sequence typing for antimicrobial resistance</i> (NG-STAR) ..	53
3.5.2.2.5	Secuenciación del genoma completo (SGC)	54
3.6	Sensibilidad antimicrobiana y tratamiento	56
3.6.1	Estudio de la sensibilidad antimicrobiana	56
3.6.2	Historia del tratamiento y evolución de las resistencias	58
3.6.3	Mecanismos de resistencia.....	64
3.6.4	Regímenes de tratamiento actual	73
3.6.5	Perspectivas futuras de tratamiento	77
3.7	Epidemiología	80
3.8	Factores de riesgo	82
4.	OBJETIVOS	87
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
5.1	Diseño del estudio	91
5.2	Selección de cepas	91

5.3	Características sociodemográficas, clínicas y conductuales de los pacientes	92
5.4	Procesamiento inicial de las muestras	93
5.5	Identificación de <i>N. gonorrhoeae</i>	94
5.6	Estudio de sensibilidad antibiótica	96
5.7	Detección de la resistencia plasmídica a la penicilina	97
5.8	Cepa control	98
5.9	Tipificación	98
5.9.1	Serotipado	98
5.9.2	NG-MAST	99
5.9.2.1	Extracción del ADN	99
5.9.2.2	Amplificación de los fragmentos de los genes <i>porB</i> y <i>tbpB</i>	99
5.9.2.3	Secuenciación	102
5.9.2.4	Análisis de las secuencias y determinación del secuenciotipo (ST)	102
5.9.2.5	Determinación de los genogrupos	102
5.10	Secuenciación del genoma completo (SGC)	103
5.10.1	Extracción de ADN	103
5.10.2	Determinación de la cantidad y calidad del ADN extraído	105
5.10.3	Purificación del ADN	106
5.10.4	Preparación de las librerías de secuenciación	108
5.10.4.1	Tagmentación	108
5.10.4.2	Amplificación de las librerías	109
5.10.4.3	Purificación y comprobación de los amplicones de las librerías	110
5.10.4.4	Normalización y combinación de las librerías para la secuenciación	111
5.10.5	Secuenciación	111
5.10.6	Ensamblado de las secuencias	112
5.11	Análisis bioinformático	112
5.12	Análisis estadístico	113
6.	RESULTADOS	117
6.1	Características sociodemográficas de los pacientes	117
6.2	Características conductuales de los pacientes	119
6.3	Características clínicas de los pacientes	124
6.4	Sensibilidad antimicrobiana	133
6.4.1	Penicilina	134

6.4.2	Cefalosporinas	136
6.4.3	Azitromicina.....	138
6.4.4	Ciprofloxacino.....	139
6.4.5	Tetraciclina	141
6.4.6	Espectinomicina.....	143
6.4.7	Gentamicina.....	144
6.5	Factores de riesgo para la infección por <i>N. gonorrhoeae</i> resistente a antimicrobianos y con sensibilidad intermedia en población HSH	145
6.6	Serotipia y caracterización molecular	154
6.7	Secuenciación del genoma completo (SGC).....	158
6.7.1	Análisis filogenómico y caracterización molecular	159
6.7.2	Análisis de los determinantes genéticos asociados con la resistencia antimicrobiana	163
6.7.2.1	Betalactámicos.....	163
6.7.2.2	Azitromicina.....	170
6.7.2.3	Ciprofloxacino	173
6.7.2.4	Tetraciclina.....	176
6.7.2.5	Espectinomicina	179
6.7.2.6	Sulfonamidas	180
7.	DISCUSIÓN	185
7.1	Características sociodemográficas de los pacientes	185
7.2	Características conductuales de los pacientes.....	187
7.3	Características clínicas de los pacientes	191
7.4	Sensibilidad antimicrobiana y determinantes moleculares de resistencia	193
7.4.1	Penicilina.....	194
7.4.2	Cefalosporinas	196
7.4.3	Azitromicina.....	197
7.4.4	Ciprofloxacino	199
7.4.5	Tetraciclina	200
7.4.6	Espectinomicina.....	200
7.4.7	Gentamicina.....	201
7.5	Factores de riesgo para la infección por <i>N. gonorrhoeae</i> resistente a antimicrobianos y con sensibilidad intermedia en población HSH	202
7.6	Caracterización de los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	203
7.6.1	Serotipia.....	203

7.6.2	NG-MAST	204
7.6.3	Secuenciación del genoma completo	205
7.7	Limitaciones del estudio	209
8.	CONCLUSIONES.....	213
9.	BIBLIOGRAFÍA	219
ANEXO I: EVALUACIÓN DE LA TESIS POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS		235
ANEXO II: CUESTIONARIO SOCIODEMOGRÁFICO Y DE EVALUACIÓN DE RIESGO PARA LAS ITS		236
ANEXO III: ARTÍCULO CIENTÍFICO DERIVADO DE LA TESIS		237
ANEXO IV: CARTA CIENTÍFICA NO INCLUIDA EN LA TESIS		248
ANEXO V: TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS		249

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tinción de Gram de uretritis gonocócica donde se puede observar diplococos Gram negativos intraleucocitarios.	37
Figura 2. Aspecto de las colonias de <i>N. gonorrhoeae</i> en agar Thayer-Martin.	39
Figura 3. Prueba de la catalasa y la oxidasa utilizadas en la identificación presuntiva de <i>N. gonorrhoeae</i>	39
Figura 4. Prueba de identificación API NH que muestra un perfil de identificación de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	41
Figura 5. Diagnóstico de <i>N. gonorrhoeae</i> serotipo II/III (PorB1B) mediante coaglutinación Phadebact Monoclonal GC.	42
Figura 6. Determinación de la sensibilidad de <i>N. gonorrhoeae</i> por el método epsilómetro.	57
Figura 7. Historia del tratamiento antimicrobiano y la evolución de la aparición de resistencias en <i>N. gonorrhoeae</i>	59
Figura 8. Principales dianas y mecanismos de resistencia a azitromicina, ciprofloxacino, espectinomomicina y ESCs (72).	70
Figura 9. Incidencia de la infección gonocócica entre 2009 y 2015 en España.	80
Figura 10. Incidencia de la gonorrea en 2016 por comunidades autónomas.	81
Figura 11. Distribución por países de los casos de gonorrea por cada 100000 habitantes en Europa, 2017.	82
Figura 12. Detección de betalactamasas plasmídicas mediante la solución de nitrocefina.	97
Figura 13. Revelado de la PCR del gen <i>tbpB</i> por electroforesis en gel de agarosa.	101
Figura 14. Pasos realizados en la purificación del ADN con AMPure XP.	106
Figura 15. Proceso de tagmentación del ADN.	108
Figura 16. Incorporación de los adaptadores que identificarán la muestra en el proceso de secuenciación.	109
Figura 17. Electroforesis de alta sensibilidad de una librería de amplicones.	111
Figura 18. Distribución de la edad de los pacientes.	118
Figura 19. Distribución de los pacientes incluidos en el estudio según el lugar de origen.	118
Figura 20. Orientación sexual de los pacientes.	120
Figura 21. Consumo de drogas recreacionales.	120
Figura 22. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes heterosexuales.	122
Figura 23. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes bisexuales.	123
Figura 24. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes homosexuales masculinos.	123

Figura 25. Distribución de los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> según la localización anatómica de la muestra.....	125
Figura 26. Distribución de los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> en función del género.....	126
Figura 27. Distribución de los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> en función de la orientación sexual.....	126
Figura 28. Distribución de la sintomatología de la infección gonocócica según la localización de la infección.....	127
Figura 29. Disbacteriosis en las mujeres con cervicitis gonocócica.....	132
Figura 30. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a penicilina.....	134
Figura 31. Distribución de la CMI de penicilina de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> ...	135
Figura 32. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a penicilina en función de la localización de la infección.....	135
Figura 33. Porcentaje de sensibilidad y resistencia a ceftriaxona y cefixima según EUCAST y CLSI.....	136
Figura 34. Distribución de la CMI de ceftriaxona de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	136
Figura 35. Distribución de la CMI de cefixima de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	137
Figura 36. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a cefixima en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST.....	137
Figura 37. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a la azitromicina.....	138
Figura 38. Distribución de la CMI de azitromicina de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	138
Figura 39. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a la azitromicina en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST.....	139
Figura 40. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a ciprofloxacino según EUCAST y CLSI.....	139
Figura 41. Distribución de la CMI de ciprofloxacino de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	140
Figura 42. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a ciprofloxacino en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST y del CLSI.....	141
Figura 43. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a tetraciclina según EUCAST y CLSI.....	142
Figura 44. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a tetraciclina en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST y del CLSI.....	142
Figura 45. Distribución de la CMI de tetraciclina de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	143

Figura 46. Porcentaje de sensibilidad y sensibilidad intermedia a espectinomicina según EUCAST y CLSI.	143
Figura 47. Distribución de la CMI de espectinomicina de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	144
Figura 48. Distribución de la CMI de gentamicina de los 104 aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	144
Figura 49. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a gentamicina en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación de Brown <i>et al.</i> (82).....	145
Figura 50. Dendrograma Neighbor-Joining de los diferentes STs encontrados entre los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> incluidos en el estudio.	156
Figura 51. Árbol filogenómico basado en los datos de la SGC de los 103 aislamientos de gonococo incluidos en el estudio, y su comparación con los diferentes métodos de tipado: wgMLST, wgNG-MAST, wgNG-STAR y genogrupos	159
Figura 52. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a betalactámicos.....	165
Figura 53. Distribución de los determinantes de resistencia a betalactámicos en función de la CMI a penicilina.	167
Figura 54. Distribución de los determinantes de resistencia a betalactámicos en función de la CMI a ceftriaxona.	168
Figura 55. Distribución de los determinantes de resistencia a betalactámicos en función de la CMI a cefixima.	169
Figura 56. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a azitromicina.	171
Figura 57. Distribución de los determinantes de resistencia a macrólidos en función la CMI a azitromicina.....	172
Figura 58. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a ciprofloxacino.	174
Figura 59. Distribución de los determinantes de resistencia a fluoroquinolonas en función de la CMI a ciprofloxacino.....	175
Figura 60. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a tetraciclinas.....	177
Figura 61. Distribución de los determinantes de resistencia a tetraciclinas en función la CMI a tetraciclina.....	178
Figura 62. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a espectinomicina.....	179

Figura 63. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a sulfonamidas..... 180

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas de diferentes especies de <i>Neisseria</i> y otros microorganismos Gram negativos, oxidasa positiva.....	41
Tabla 2. TAANs aprobadas por la FDA para la detección de <i>N. gonorrhoeae</i> (Julio 2019).	45
Tabla 3. Mecanismos de resistencia en <i>N. gonorrhoeae</i>	66
Tabla 4. Recomendaciones de tratamiento de infección gonocócica no complicada en uretra, cérvix o recto.....	74
Tabla 5. Recomendaciones de tratamiento de la infección gonocócica en faringe.....	75
Tabla 6 Recomendación de tratamiento de la infección gonocócica resistente a ESCs o en fallos de tratamiento.	75
Tabla 7. Recomendación de tratamiento de otras infecciones gonocócicas en el adulto.....	76
Tabla 8. Recomendación de tratamiento de la infección gonocócica en niños.....	77
Tabla 9. Puntos de corte EUCAST y CLSI 2016.....	97
Tabla 10. Componentes utilizados para la amplificación mediante PCR de los genes <i>porB</i> y <i>tbpB</i>	100
Tabla 11. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de los genes <i>porB</i> y <i>tbpB</i>	100
Tabla 12. Condiciones de PCR para la amplificación de las librerías de secuenciación.	110
Tabla 13. Características sociodemográficas de los pacientes incluidos en el estudio.	117
Tabla 14. Características conductuales de los pacientes incluidos en el estudio.	119
Tabla 15. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes heterosexuales.	121
Tabla 16. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes bisexuales.	122
Tabla 17. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes homosexuales masculinos.....	124
Tabla 18. Sintomatología de los pacientes con gonorrea	128
Tabla 19. Tratamiento recibido por los pacientes con infección gonocócica.	129
Tabla 20. Infección concomitante de <i>N. gonorrhoeae</i> en más de una localización anatómica.	129
Tabla 21. Características principales de los pacientes con gonorrea en varias localizaciones anatómicas.	130
Tabla 22. Descripción de las ITS concomitantes a la infección por <i>N. gonorrhoeae</i>	131
Tabla 23. Antecedentes de ITS en los 12 meses previos.....	132
Tabla 24. Sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	133

Tabla 25. Distribución de cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> con resistencia a los distintos antimicrobianos.	134
Tabla 26. Factores de riesgo asociados con la resistencia a penicilina en población HSH.	149
Tabla 27. Factores de riesgo asociados con la resistencia al ciprofloxacino y con la resistencia y la sensibilidad intermedia a la azitromicina en población HSH.	151
Tabla 28. Factores de riesgo asociados con la resistencia y sensibilidad intermedia a tetraciclina en población HSH.	153
Tabla 29. Características clínicas y epidemiológicas de los secuenciotipos y genogrupos más prevalentes en la población de estudio.	157
Tabla 30. Distribución del número de loci presentes entre las de cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> incluidas en el estudio.	158
Tabla 31. Tipado MLST, NG-MAST y NG-STAR obtenido in silico de la SGC de las cepas de gonococo.	161
Tabla 32. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con resistencia a betalactámicos en la población de estudio.	166
Tabla 33. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con la resistencia a azitromicina en la población de estudio.	172
Tabla 34. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con la resistencia a fluoroquinolonas en la población de estudio.	175
Tabla 35. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con resistencia a tetraciclinas en la población de estudio.	178
Tabla 36. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con resistencia a sulfonamidas en la población de estudio.	181

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A	Azitromicina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aOR	Odds ratio ajustado.
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
AHU	Arginina, hipoxantina, uracilo
ATM	<i>Amplicon Tagment Mix</i>
BASHH	<i>British Association for Sexual Health and HIV</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</i>
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
C	Cérvix
CAI	Coito anal insertivo
CAR	Coito anal receptivo
C4bp	Proteína de unión a C4b
CD	Clúster de diferenciación
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEACAM	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario
CFX	Cefixima
cg	Genoma <i>core</i>
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CR	Receptor del complemento
CTA	Agar cisteína tripticasa
CTX	Ceftriaxona
D	Desconocido
DHPS	Dihidropteroato sintetasa
E	Espectinomicina
ECDC	<i>European Centre for disease Prevention and Control</i>

EF-G	Factor de elongación G.
EPI	Enfermedad pélvica inflamatoria
ESC	Cefalosporinas de amplio espectro
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Euro-GASP	<i>European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme</i>
F	Faringe
FDA	<i>Food and drug administration</i>
G	Genogrupo
GGT	γ -glutamil aminopeptidasa
GHB	Ácido γ -hidroxibutírico
GISP	<i>Gonococcal Isolate Surveillance Project</i>
HA	Hongos alucinógenos
HSH, MSM	Hombres que tienen sexo con hombres, <i>men who had sex with men</i>
HTX	Heterosexual
I	Intermedio
IC	Intervalo de confianza
IFD	Inmunofluorescencia directa
Ig	Inmunoglobulina
IGD	Infección gonocócica diseminada
IL	Interleucina
im	Intramuscular
IQR	Rango intercuartílico
ITS, STI	Infección de transmisión sexual, <i>sexually transmitted infections</i>
iv	Intravenoso
LAMP1	Proteína de membrana asociada al lisosoma 1
LGV	Linfogranuloma venéreo
LOS	Lipooligosacárido
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico
M	Mosaico
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MD	Monodosis
MDR	<i>Multidrug-resistance</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>

n	Número
NA	No aplica
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NG-MAST	<i>Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing</i>
NG-STAR	<i>Neisseria gonorrhoeae sequence typing for antimicrobial resistance</i>
NLR	Receptor de tipo NOD
NM	No mosaico
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
NS	No secuenciado
NT	<i>Neutralize Tagment Buffer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONPG	O-nitrofenil- β -galactosidasa
Opa	Proteína asociada a la opacidad
OR	Odds ratio
P	Penicilina
PABA	Ácido paraaminobenzoico
pb	Par de bases
PBP	Proteínas fijadoras de penicilina
PBS	Tampón fosfato salino, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	<i>Preformed Enzyme Test</i>
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PIP	Prolina iminopeptidasa
PMN	Polimorfonucleares
PPNG	<i>N. gonorrhoeae</i> productora de penicilinas
PrEP	Profilaxis pre-exposición
QRDR	Regiones determinantes de resistencia a quinolonas
R	Resistente
Rc	Recto
RCUT	<i>Rapid carbohydrate utilization test</i>
RENAVE	Red nacional de vigilancia epidemiológica
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RND	<i>Resistance-nodulation-cell division</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno

Rmp	Proteína modificable por reducción
RSB	<i>Resuspection Buffer</i>
S	Sensible
SD	Sensibilidad disminuida
SDA	Amplificación por desplazamiento de cadena
SGC	Secuenciación del genoma completo
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
ST	Secuenciotipo
T	Tetraciclimna
TAAN	Técnicas de detección de ácidos nucleicos
Tbp	Proteínas de unión a transferrina
TD	<i>Tagment DNA Buffer</i>
TLR	Receptor de tipo Toll
TMA	Amplificación mediada por transcripción
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
U	Uretra
UDI	Usuarios de drogas inyectadas
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
vo	Vía oral
wg	<i>Whole genome</i>
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
WT	<i>Wild type</i>
XDR	<i>Extensively drug-resistance</i> , extremadamente resistente

RESUMEN

1. RESUMEN

Epidemiología, caracterización molecular y estudio de resistencia a antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en un centro de infecciones de transmisión sexual de la Comunidad de Madrid.

Introducción

La infección gonocócica es la segunda infección de transmisión sexual (ITS) de etiología bacteriana más prevalente a nivel mundial. Actualmente, constituye un importante problema de salud pública, no sólo por su elevada incidencia sino porque además, *N. gonorrhoeae* ha desarrollado resistencia a todos los antibióticos de primera línea disponibles, lo que ha llevado a la aparición y dispersión de cepas multirresistentes a nivel mundial. Asimismo, la ausencia de nuevos antibióticos activos frente a este microorganismo, hace necesario el estudio y la vigilancia continuada de resistencias a los antibióticos previamente utilizados.

El objetivo principal de este estudio es obtener un conocimiento detallado de las características de la infección gonocócica en un centro especializado en infecciones de transmisión sexual en Madrid, mediante el análisis epidemiológico, de dinámica poblacional y del perfil de sensibilidad antibiótica de las cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas durante los meses de julio a octubre de 2016.

Material y Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo incluyendo 104 cepas de *N. gonorrhoeae*, aisladas en el Centro Sanitario Sandoval (42 aislados de exudados uretrales, 35 de exudados rectales, 19 de exudados faríngeos y 8 de exudados cervicales), que fueron tipadas molecularmente utilizando el esquema de NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing), y en las que se determinó la sensibilidad a penicilina, ceftriaxona, cefixima, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina, espectinomicina y gentamicina mediante E-test.

Mediante la secuenciación del genoma completo, utilizando la plataforma de secuenciación MiSeq (Illumina), se analizó la epidemiología molecular en la población de estudio. A partir de los ensamblados *de novo* generados, y su anotación con las plataformas *Bacterial Isolate Genome Sequence* (BIGSdb) y *Pathogenwatch*, las cepas fueron caracterizadas a nivel de genoma *core*, NG-MAST, MLST (*Multilocus sequence typing*) y NG-STAR (*Neisseria gonorrhoeae sequence typing for antimicrobial resistance*). Además, se llevó a cabo la identificación y caracterización de los diferentes mecanismos moleculares implicados en la resistencia antimicrobiana.

Asimismo, se analizaron las características sociodemográficas, clínicas y conductuales de los pacientes y se estudiaron posibles factores de riesgo asociados con la gonorrea resistente a los antimicrobianos.

Resultados

Se analizaron 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de 94 pacientes de los que un 89.4% eran hombres, con una edad mediana de 30.5 años, siendo el grupo de edad comprendido entre los 18 y los 28 años el más afectado, con un 41.5% de los casos. Asimismo, el 59.6% eran de origen español. El 78.7% de los pacientes eran hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y en general, mantenían prácticas sexuales poco seguras. Además, el 64.9% eran consumidores de drogas recreacionales.

En relación a las características clínicas, aunque del total de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae* el 40.4% de los gonococos se aislaron de exudados uretrales, a nivel global, aproximadamente la mitad de las muestras procedían de localizaciones extragenitales y cursaban mayoritariamente de manera asintomática. El 20% de los pacientes presentó una infección gonocócica concomitante en más de una localización anatómica, siendo la combinación de las muestras de recto y faringe, las más frecuentes. El 34% de los pacientes estaban coinfectados con el VIH y el 24.2% presentaba otras ITS concurrentes a la gonorrea, predominando la infección bacteriana por *Chlamydia trachomatis*. Asimismo, un tercio de los

sujetos tuvieron alguna ITS en el año previo al diagnóstico de la infección gonocócica, principalmente gonorrea, sífilis y clamidia.

En nuestra población de estudio, las tasas de resistencia más elevadas se detectaron en ciprofloxacino (42.3% EUCAST, 40.4% CLSI) y penicilina (15.4% EUCAST y CLSI); se encontraron tasas de resistencia inferiores al 6% en cefixima (2.9% EUCAST, 0% CLSI), azitromicina (1.9% EUCAST) y tetraciclina (5.8% EUCAST, 2.9% CLSI) y no se detectaron resistencias ni a ceftriaxona ni a espectinomicina. En el caso de la gentamicina la CMI₅₀ y CMI₉₀ fue de 3 mg/L y de 4 mg/L, respectivamente. Además, no se detectaron cepas multirresistentes ni encontramos diferencias entre la sensibilidad de las cepas aisladas de zonas genitales y las extragenitales.

Los principales mecanismos moleculares implicados en la resistencia a penicilina y tetraciclina fueron los plásmidos *bla*_{TEM} y *tetM*, respectivamente. En el caso de la cefixima, sólo la presencia del alelo *penA* en mosaico tipo X fue el responsable de su resistencia y para el ciprofloxacino, fueron las mutaciones en *gyrA* (posiciones aminoacídicas 91 y 95) y *parC*. No se encontraron mutaciones asociadas con incrementos de CMIs a azitromicina, ceftriaxona y espectinomicina.

En nuestro estudio, las infecciones por *N. gonorrhoeae* ocurrieron principalmente en HSH. En este grupo, los pacientes con edades comprendidas entre los 29 y los 39 años, así como aquellos con VIH, se asociaron estadísticamente con un mayor riesgo de tener una infección con cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino. Igualmente, el diagnóstico previo de una ITS se asoció con aislamientos que no eran sensibles a tetraciclina.

La caracterización molecular de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* mostró una elevada diversidad genética, obteniéndose 48 secuenciotipos (STs) y 9 genogrupos mediante el tipado NG-MAST, 27 STs con MLST y 30 STs mediante NG-STAR.

Conclusiones

En este estudio se describen las principales características sociodemográficas, conductuales y clínicas de los pacientes con infección gonocócica en un centro de ITS de Madrid, permitiendo establecer un perfil de paciente que posee conductas de mayor riesgo, al que se deben dirigir de manera preferente programas específicos de control y prevención de la infección.

En nuestra población, la gonorrea extragenital fue más frecuente que la infección genital, lo que confirma que para romper la cadena de transmisión es importante incorporar la toma de muestras faríngeas y rectales en los pacientes con sospecha de ITS.

Los niveles de resistencia antimicrobiana observados en nuestra población de estudio son más bajos que los reportados en otros lugares de España, no detectándose resistencia a ceftriaxona, por lo que este antibiótico continúa siendo una buena opción de tratamiento empírico, pudiéndose evitar la terapia dual con azitromicina con el fin de prevenir la aparición de resistencias en otras ITS bacterianas.

El análisis del genoma *core* en *N. gonorrhoeae* nos permitió establecer relaciones filogenómicas aportando un mejor análisis de la epidemiología molecular. El esquema MLST posee menor capacidad de discriminación, mientras que el NG-STAR y el NG-MAST reflejan mejor la diversidad de los clones de gonococo. Los clones NG-MAST más prevalentes fueron el ST5441, asociado con la sensibilidad a todos los antimicrobianos testados y el ST2318, asociado con infecciones extragenitales. Por otro lado, destaca la escasa presencia del genogrupo G1407, asociado mundialmente con resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y que está ampliamente distribuido en España.

SUMMARY

2. SUMMARY

Epidemiology, molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in a sexually transmitted infection clinic in Madrid Community.

Introduction

Gonococcal infection is the second most prevalent sexually transmitted bacterial infection worldwide. Nowadays, this has become a major public health problem, not only for its high incidence but because *N. gonorrhoeae* has developed resistance against all the available first-line treatments, which has led the emergence and spread of multidrug-resistant strains in the world. Moreover, the absence of new active drugs against this microorganism leads to the study and continuous observation of the previously used antibiotics and the resistance that was created.

The aim of this study is to know the characteristics and the specific details of the gonococcal infection in a sexually transmitted infections (STI) reference clinic in Madrid by analysing the epidemiology, the population dynamics and the antimicrobial susceptibility profile of the of *N. gonorrhoeae* strains that were isolated between the months of July and October of the year 2016.

Material and Methods

In this retrospective study, 104 strains of *N. gonorrhoeae* were obtained from patients attending the STI outpatient clinic Centro Sanitario Sandoval (42 urethral specimens, 35 rectal specimens, 19 pharynx specimens and 8 cervical specimens). They were molecularly typed using NG-MAST scheme (*Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing) and antimicrobial susceptibilities of penicillin, ceftriaxone, cefixime, azithromycin, ciprofloxacin, tetracycline, spectinomycin and gentamicin were determined by E-test.

The molecular epidemiology of the study population was analysed by the whole genome sequencing (WGS) using MiSeq platform (Illumina). The WGS data were assembled *de novo* and annotated with Bacterial Isolate Genome Sequence (BIGSdb) and Pathogenwatch genomics platform. The *N. gonorrhoeae* strains were characterized at the genome core level, NG-MAST, MLST (Multilocus sequence typing) and NG-STAR (*Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance). Furthermore, the different antimicrobial resistance molecular mechanisms were identified and characterized.

Also, socio-demographic, clinical and behavioural characteristics of the patients were analysed and potential gonococcal antimicrobial resistance – risk factors were studied.

Results

In this study, 104 *N. gonorrhoeae* strains isolated from 94 patients were analysed. The 89.4% of patients were men and the median age was 30.5 years, being the 18 and 28 year old group the most affected one with 41.5% of the cases. In addition, 56.6% of the patients were Spanish. The 78.7% of the patients were men which had sex with men (MSM) and most of them used to have unsafe sexual intercourse. It turned out that 64.9% of the patients used recreational drugs as well.

Moving to the clinical characteristics, although the 40.4% out of the 104 *N. gonorrhoeae* strains were isolated from urethral samples, approximately half of the specimens proceeded from extragenital sites and the majority of them did not develop any symptom. The 20% of the patients presented with gonococcal infections in more than one body site with rectal and pharyngeal infections being the most frequent combination. The 34% of the patients were HIV coinfecting. Other different HIV and gonorrhoea STIs were also presented in 24.2% of the total patients, mainly *Chlamydia trachomatis* infection. Moreover, one third of the subjects had other STI in the previous year, highlighting gonorrhoea, syphilis and chlamydia.

Among our study population, the highest resistance rates were detected in ciprofloxacin (42.3% EUCAST, 40.4% CLSI) and penicillin (15.4% EUCAST and CLSI). Inferior resistance rates below 6% were recorded in cefixime (2.9% EUCAST and 0% CLSI), azithromycin (1.9% EUCAST) and tetracycline (5.8% EUCAST, 2.9% CLSI). No resistance were detected in ceftriaxone and spectinomycin. For gentamicin, the CMI₅₀ and CMI₉₀ were 3 mg/L and 4 mg/L, respectively. Also, there were no multidrug-resistant strains detected and no differences in antimicrobial resistance were found between genital and extragenital gonococci.

The main molecular mechanisms implied in the penicillin and tetracycline resistance were *bla*_{TEM} and *tetM* plasmids, respectively. The molecular determinant of cefixime resistance was the *penA* mosaic X allele and for the ciprofloxacin, the mutations in *gyrA* (amino acids positions 91 and 95) and *parC*. Mutations associated with increased MICs values to azithromycin, ceftriaxone and spectinomycin were not found.

In our study, *N. gonorrhoeae* infections were mainly found in MSM. In this group, there was a significant association between age (29-39 year old MSM) and HIV-positive, and carriage of a ciprofloxacin resistant gonococcal strain. We also found a significant association between with having had an STI in the previous year and being carriers of decreased susceptible isolates to tetracycline in MSM.

The molecular characterization of the *N. gonorrhoeae* isolates showed a high genetic diversity, obtaining 48 sequence types (STs) and 9 genogroups by using the NG-MAST, 27 with MLST and 30 STs using the NG-STAR.

Conclusions

The present study describes the main socio-demographic, behavioural and clinical characteristics of the patients diagnosed with gonorrhoea attending the STI clinic in Madrid. This analysis leads to establish a high risk patient profile so they can participate in specific control and prevention programs of the infection.

In our population, the extragenital gonorrhoea was more frequent than genital infection, which confirms the importance of introducing the collection of pharynx and rectal samples in order to stop the transmission chain in patients under suspicion of STI.

The antimicrobial resistance levels observed among our population of study are lower than the ones reported in other parts of Spain. Due to not finding resistance to ceftriaxone, this antibiotic is still considered a good option for empirical treatment, avoiding as well, the dual therapy with azithromycin in order to prevent the emergence of increased resistance to azithromycin in other bacterial STIs.

The genome core analysis in *N. gonorrhoeae* helped us to establish phylogenomic relationships and to improve the molecular epidemiology analysis. The MLST scheme has a minor discrimination capacity; meanwhile NG-STAR and NG-MAST are better in reflecting the genetic diversity of clones. In our study, the widely disseminated multi-drug resistant genogroup, G1407, was quite rare, while more susceptible clones such as ST5441, associated with susceptibility to all antimicrobials tested, and ST2318, associated with extragenital locations, were the most prevalent.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades

Neisseria gonorrhoeae es el agente etiológico de la infección gonocócica y actualmente, es la segunda infección de transmisión sexual (ITS) de etiología bacteriana más prevalente a nivel mundial (1).

Esta infección se remonta al siglo II cuando el médico y filósofo Galeno de Pérgamo, interpretó erróneamente que la secreción purulenta de la uretra que tenía lugar durante la infección era semen. De hecho, el término gonorrea proviene del griego *γονόρροια* que significa flujo seminal. Sin embargo, existen todavía referencias más antiguas de uretritis venérea en escritos chinos, en el Antiguo Testamento (Leviticus 15:1-3) y en otros textos de la antigüedad (2).

En 1378 se acuñó el término “*the clap*” para hacer referencia a esta infección, que probablemente está relacionado con el nombre del distrito parisino Les Clapiers, donde se alojaban las personas que ejercían la prostitución (3).

El microorganismo fue descrito en 1879 por Neisser mientras llevaba a cabo la observación microscópica de exudados purulentos de pacientes con uretritis y *ophthalmia neonatorum*. Inicialmente, le dio el nombre de “micrococo” por tratarse de un organismo microscópico con forma redondeada (4–6) aunque posteriormente, fue Ehrlich quien introdujo el término de gonococo.

Unos años más tarde, en 1882, Leistikow y Löffler lograron cultivar la bacteria por primera vez (2). Sin embargo, tuvieron que pasar 3 años más hasta que Bumm, tras inocular a personas sanas con cultivos puros de gonococo, demostrara la relación etiológica de la infección. Ese mismo año, Trevisan le dio el nombre definitivo de *Neisseria gonorrhoeae* en honor a Neisser (6).

A lo largo de la historia se han probado muchos tratamientos, pero realmente no se dispuso de uno eficaz hasta la introducción de las sulfamidas en la década de 1930 y de la penicilina en 1943. Desde entonces, el tratamiento ha cambiado de manera espectacular debido a la aparición de resistencias antimicrobianas (2) lo que ha llevado a que actualmente, la infección gonocócica siga siendo un importante problema de salud pública, no sólo por su elevada incidencia, sino además porque ya han aparecido resistencias y fracasos al tratamiento empírico de primera línea con las cefalosporinas de amplio espectro (ESC) (7–11). Por esta razón, la gonorrea intratable podría ser una realidad cercana y es muy importante llevar a cabo programas de vigilancia antimicrobiana con el fin de detectar y prevenir la aparición y propagación de resistencias antimicrobianas (12,13).

3.2 Descripción de *Neisseria gonorrhoeae*

3.2.1 Características microbiológicas

El género *Neisseria* pertenece al filo *Proteobacteria*, clase *Beta Proteobacteria*, orden *Neisseriales*, familia *Neisseriaceae*. Hasta ahora se han reconocido más de 30 especies dentro del género, aunque realmente sólo 2 especies se consideran patógenas para el ser humano: *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*.

Neisseria gonorrhoeae es un coco Gram negativo con un tamaño que oscila entre 0.6 y 1.9 µm de diámetro y que adquiere una morfología en forma de granos de café. Esto es debido a que durante el proceso de fisión binaria en la reproducción asexual la división no es completa, ya que los tabiques o septos de cada una de las células que se originan no se separan totalmente, quedando de esta manera los lados contiguos aplanados, lo que le proporciona esta apariencia tan característica.

Algunas particularidades de este microorganismo es que son aerobios o anaerobios facultativos y no presentan cápsula, ni esporas, ni flagelos. Sin embargo, poseen pili de tipo IV en su superficie celular.

En cuanto a las características bioquímicas, son bacterias quimiorganotrofas, por lo que no fermentan azúcares sino que los metabolizan por oxidación. *N. gonorrhoeae* posee muchas similitudes con otras especies de *Neisseria*, ya que todas son oxidasa y catalasa positivas. Sin embargo, se diferencia por su capacidad para crecer en medios selectivos y usar únicamente la glucosa pero no la maltosa, ni la sacarosa o la lactosa en su metabolismo.

Los gonococos son muy sensibles a las condiciones ambientales y no toleran la desecación, las temperaturas extremas ni las condiciones alcalinas o ácidas. Asimismo, todas las cepas poseen requerimientos nutricionales muy estrictos, como requisitos de varias vitaminas, aminoácidos, hierro y otros factores.

Las condiciones óptimas para su crecimiento son a una temperatura de 35-37°C y una concentración de CO₂ del 5%. Las colonias aparecen a las 24-48 horas pero en la mayoría de los medios, su viabilidad se pierde tras 48 horas debido a la autólisis. Como ya se ha comentado anteriormente, las cepas son aerobias en las condiciones de cultivo habituales, aunque el microorganismo puede crecer de forma anaerobia cuando se le suministra nitrito como aceptor de electrones (2,14,15).

3.2.2 Factores de virulencia

Al igual que el resto de bacterias Gram negativas, *N. gonorrhoeae* posee una envoltura celular formada por tres capas diferentes: la membrana citoplasmática interna, la pared celular de peptidoglucano y la membrana externa que contiene lipooligosacárido, fosfolípidos y diversas proteínas. Algunos de estos componentes de la envoltura celular son considerados factores de

virulencia, ya que se les atribuye un cierto papel patogénico debido a su relación con la adherencia, la invasión celular y la citotoxicidad o porque suponen una vía de evasión frente a los mecanismos de defensa, tanto a nivel sistémico como de las mucosas (2).

Pili o fimbrias de tipo IV

Los pili o fimbrias de tipo IV son estructuras proteicas que desempeñan un papel primordial en la unión a las células epiteliales de la mucosa humana. Los pili se adhieren a las células epiteliales de las mucosas, pudiendo colonizar las zonas que presentan epitelio columnar o de transición, como la uretra, el cérvix, el recto, la orofaringe y la conjuntiva. Asimismo, también pueden unirse al epitelio vaginal de mujeres posmenopáusicas y de niñas prepúberes, ya que a partir de la pubertad este epitelio se transforma en escamoso estratificado, no siendo susceptible a la infección por gonococo.

Además de la adhesión a las células del huésped, los pili confieren resistencia a la fagocitosis, participan en la motilidad bacteriana, la formación de biopelículas y la transformación genética, permitiendo la transferencia horizontal de ácido desoxirribonucleico (ADN) entre gonococos.

Los pili son filamentos flexibles formados principalmente por subunidades repetidas de pilina o proteína PilE que son altamente variables y están implicadas en el reconocimiento del receptor. Las subunidades de pilina atraviesan la membrana externa del gonococo a través de la proteína PilQ. Otras proteínas que contribuyen a su correcto funcionamiento son PilC, que participa en la biogénesis del pilus y en la adherencia de la célula huésped, PilT y PilB, encargadas de despolimerizar y repolimerizar las hebras de los pili, condicionando los movimientos espasmódicos de la bacteria.

La pilina contiene regiones de considerable similitud antigénica entre cepas y otras regiones que presentan una elevada variabilidad antigénica, lo que permite a las bacterias evitar el reconocimiento por parte de las células del sistema inmunitario. Asimismo, una sola cepa de *N.*

gonorrhoeae es capaz de producir pili con diferentes composiciones antigénicas, dificultando el uso de vacunas basadas en estos elementos.

En *N. gonorrhoeae* se produce variación de fase entre el estado “con pili” y “sin pili” con bastante frecuencia. Asimismo, la presencia de fimbrias y su diferente nivel de expresión, da lugar a colonias que tienen más capacidad para unirse a las células del huésped, por tanto, son más virulentas que las colonias de gonococo que carecen de ellas. En el gonococo, después de 20-24 horas en cultivo se produce una variación de fase, dando lugar a colonias sin fimbrias (2,16).

Los receptores de los pili son los clúster de diferenciación 46 (CD46) y los receptores del complemento 3 (CR3), aunque es probable que haya más ligandos implicados (17–19).

Porina

La porina, antes denominada proteína I, es la proteína más abundante de la membrana externa constituyendo aproximadamente el 60% de su contenido proteico.

La porina es el producto del gen *porB* cuya función principal es la formación de canales aniónicos que permiten el intercambio de iones y nutrientes (16).

Las cepas de *N. gonorrhoeae* contienen un solo gen en una de las dos formas alélicas, *porB1A* y *porB1B*. La presencia de cada una de ellas se ha asociado a diferentes fenotipos: mientras que PorB1A tiende a estar relacionada con aspectos más complicados de la enfermedad, PorB1B causa infecciones mucosas localizadas (16,20).

Los gonococos que expresan PorB1A se asocian con una mayor resistencia a la acción bactericida del suero humano y, por consiguiente, con una mayor propensión a producir bacteriemia. Esta resistencia puede estar relacionada con la capacidad de unión a componentes reguladores del sistema del complemento (la proteína de unión a C4b (C4bp) y factor H). Por otro lado, parece que PorB1A favorece la translocación de las células epiteliales, lo que contribuye también a explicar la propensión a la diseminación.

La porina, durante el transcurso de la infección no suele sufrir variación antigénica, por lo que constituye la base para los sistemas de serotipificación y tipificación molecular. Asimismo, es una de las principales dianas para el desarrollo de vacunas (2,16,20,21).

Proteína relacionada con la opacidad (Opa)

Las proteínas Opa, antiguamente denominadas proteína II, son proteínas integrales de la membrana externa que contribuyen a la adherencia intergonocócica y proporcionan el aspecto opaco a las colonias de *N. gonorrhoeae*.

Las proteínas Opa pertenecen a una familia multigénica que contiene 11 alelos *opa*. Al igual que en el caso de los pili, presentan variación antigénica y de fase. La variación antigénica es debida a que cada alelo posee 2 regiones hipervariables que hacen que la secuencia de aminoácidos de estas proteínas varíe en cierto grado. Por otro lado, la variación de fase se produce debido al cambio en el número de repeticiones de una secuencia pentamérica (-CTCTT-) que altera el marco de lectura traduccional. Por tanto, una cepa de *N. gonorrhoeae* puede o bien no expresar ninguna variante o hasta 11, aunque generalmente no suelen expresar más de 3 al mismo tiempo.

Tras el contacto inicial de los pili, las proteínas Opa median la adherencia con la célula huésped. Se han identificado dos clases de receptores Opa en las células humanas: los OpaHS que reconocen proteoglicanos de heparán sulfato y los OpaCEA, que reconocen la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM) o CD66. Algunas proteínas Opa pueden unirse a receptores CEACAM de los linfocitos B y T, lo que da lugar a una regulación a la baja de las respuestas inmunitarias que podría ayudar a explicar la falta de respuesta inmunitaria a la infección natural (2,16,22).

Lipooligosacárido (LOS)

El lipooligosacárido de *N. gonorrhoeae* se localiza en la membrana externa y a diferencia del resto de bacterias Gram negativas, está formado por un lípido A y un núcleo de oligosacárido central, pero carece de las cadenas laterales de antígeno O.

El LOS es una potente endotoxina y provoca efectos citotóxicos locales como pérdida ciliar y muerte celular en el modelo de explante de la trompa de Falopio.

La composición de oligosacáridos del LOS es altamente variable, tanto en longitud como en contenido de azúcares, por tanto, el LOS también presenta variación antigénica lo que le permite imitar a los glicoesfingolípidos del huésped, promoviendo así la entrada de bacterias. Además, su sialización enmascara los epítomos tanto del LOS como de la porina, lo que contribuye a la resistencia de *N. gonorrhoeae* frente a los anticuerpos bactericidas.

Por todo ello, el LOS gonocócico contribuye a la patogenicidad al facilitar la translocación bacteriana a través de las mucosas y al proporcionar resistencia al efecto bactericida del suero humano (16).

Proteína modificable por reducción (Rmp)

La proteína modificable por reducción, también conocida como proteína III, es una proteína antigénicamente conservada que se encuentra ubicada en la membrana externa del gonococo. La Rmp estimula anticuerpos bloqueadores que reducen la actividad bactericida del suero humano, impidiendo el efecto lítico de éstos sobre la bacteria y favoreciendo la infección después de la exposición sexual a una pareja infectada (2,23,24).

Proteasas de la inmunoglobulina A1 (IgA1)

Las proteasas IgA1 están presentes en *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* pero no en otras especies de *Neisseria* no patógenas (2). Protegen a la bacteria frente la acción de los anticuerpos IgA1 presentes en las mucosas (2,16,25). Asimismo, la proteasa IgA1 también escinde a la

proteína de membrana asociada al lisosoma 1 (LAMP1) lo que conduce a la modificación de los lisosomas y la subsiguiente supervivencia bacteriana (16).

Proteínas de unión a transferrina (Tbp)

El hierro es un nutriente esencial y vital para la supervivencia de *N. gonorrhoeae*. Los patógenos gastan una energía considerable en la eliminación del hierro del entorno del huésped. No obstante, esta tarea de captación de hierro se vuelve más difícil durante una infección, ya que el huésped responde a la inflamación limitando su biodisponibilidad (16).

Se han identificado diversas proteínas de la membrana externa del gonococo que son necesarias para captar el hierro de la transferrina y de la lactoferrina. Sin embargo, únicamente se ha demostrado que las Tbp son necesarias para iniciar la infección uretral en hombres y que las cepas mutantes de *N. gonorrhoeae* que no expresan Tbp, no pudieron provocar los signos y los síntomas de uretritis en personas voluntarias.

Las proteínas que permiten al gonococo utilizar la transferrina humana como fuente de hierro son las TbpA y TbpB. Estas proteínas se expresan de forma ubicua por todas las cepas y están relativamente bien conservadas (26).

Asimismo y como se verá más adelante, se utiliza una región hipervariable dentro del gen *tbpB* junto con un fragmento del gen *porB*, como sistema de tipificación molecular más extendido en la actualidad, el *Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing* (NG-MAST) (21).

Peptidoglucano

N. gonorrhoeae posee transglucosilasas líticas que producen y liberan fragmentos de peptidoglucano sumamente inflamatorios. Estos fragmentos son tóxicos en el sistema del explante de la trompa de Falopio y provocan el consumo del complemento *in vitro*. Por otro lado, se han detectado fragmentos de peptidoglucano en el líquido sinovial aparentemente estéril, de pacientes con síndrome de artritis gonocócica.

Cápsula polisacárida

Los gonococos no producen una verdadera cápsula polisacárida sino que producen un polifosfato de superficie que puede desempeñar funciones similares a las de la cápsula, como crear una superficie celular hidrófila y de carga negativa (2,14,27).

3.2.3 Patogenia y respuesta inmune

N. gonorrhoeae coloniza las mucosas después del contacto sexual con una persona infectada. Se trata de un microorganismo cuyo único huésped es el ser humano y siempre es considerado patógeno, incluso aunque los síntomas de la enfermedad estén ausentes. Debido a que no puede sobrevivir fuera de su huésped, el gonococo posee la mayor parte de sus genes dedicados a la colonización y a la supervivencia, permitiéndole vivir como microorganismo intracelular y extracelular dentro del huésped humano.

La infección gonocócica consta de diversas etapas: la adhesión a las células del huésped, la endocitosis, la transcitosis y la liberación de las bacterias al espacio subepitelial, donde puede producir una extensión local de la infección o bien causar una infección diseminada. Asimismo, *N. gonorrhoeae* ha desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune y no crear memoria inmunológica, permitiendo la reinfección de un mismo individuo al cabo del tiempo.

3.2.3.1 Adhesión, colonización e invasión

Después de la transmisión, *N. gonorrhoeae* se divide hasta alcanzar una densidad celular necesaria que le permita llevar a cabo la reorganización de su citoesqueleto y la adhesión a la superficie de las células epiteliales columnares no ciliadas mediante los pili, las proteínas Opa, el LOS y la porina (16).

Tal y como se ha comentado anteriormente, la adhesión puede ocurrir en las mucosas del tracto urogenital, del recto, de la orofaringe y de la conjuntiva. Los diferentes orígenes embrionarios de las células que recubren cada localización, conducen a ligeras diferencias en las moléculas de superficie que actúan como receptores y a los mecanismos por los cuales sobrevive *N. gonorrhoeae*. Además, esto hace que las manifestaciones clínicas sean diferentes, ya que por ejemplo, en el tracto urogenital femenino normalmente las infecciones son asintomáticas y en el masculino son sintomáticas (22).

Los pili de tipo IV son las primeras estructuras que participan en la adhesión. En los hombres se unen a CD46 y en el caso de las mujeres también a CR3 (2). Una vez unidos, las estructuras del pilus se retraen permitiendo acercar la bacteria a la superficie celular. Posteriormente, mediante la unión de las proteínas Opa a los receptores CEACAM y a los proteoglicanos de heparán sulfato, se promueve un contacto más estrecho que induce el reordenamiento de la actina dentro del huésped, lo que produce la endocitosis bacteriana.

La expresión coordinada de los pili y las proteínas Opa varía considerablemente, pues los microorganismos aislados de la uretra masculina expresan ambos elementos. Sin embargo, en las mujeres la expresión de Opa varía según la etapa del ciclo menstrual y si la mujer está tomando anticonceptivos orales o no. Durante la fase folicular, las bacterias aisladas del cuello uterino expresan Opa mientras que durante la menstruación tienden a no expresarla. Las bacterias aisladas de las trompas de Falopio mayoritariamente no expresan estas proteínas. Esto puede ser debido al cambio que se produce en la composición de las secreciones que hace que haya más enzimas proteolíticas, siendo Opa muy sensible a ellas.

Tras la endocitosis, se produce el transporte de la bacteria dentro del fagosoma hasta llegar a la zona basal de la célula produciéndose finalmente, la exocitosis de la bacteria en el tejido subepitelial y con ello, la liberación de fragmentos del peptidoglucano y de LOS, dando lugar al daño celular (16).

3.2.3.2 Inflamación

El principal síntoma de la infección gonocócica no complicada es el reclutamiento masivo de neutrófilos en el lugar de la infección que conduce a la descarga purulenta.

Tras la unión de los microorganismos a la mucosa, se liberan citoquinas proinflamatorias como interleucinas (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), así como la quimiocina IL-8, lo que lleva a un reclutamiento de los neutrófilos al sitio de la infección.

Durante la colonización, los gonococos liberan LOS y fragmentos de peptidoglucano que son detectados en las células inmunes por los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos), respectivamente. Esto contribuye a la secreción de citoquinas proinflamatorias adicionales (16,22).

A pesar de que el reclutamiento activo de polimorfonucleares (PMN) puede aclarar una parte de las bacterias, *N. gonorrhoeae* puede sobrevivir dentro de los fagosomas a los mecanismos de defensa tanto oxidativos como no oxidativos. Los microorganismos combaten el estrés oxidativo mediante la expresión de diferentes enzimas como la catalasa, la citocromo C peroxidasa y la superóxido dismutasa que descomponen las especies reactivas de oxígeno (ROS) (16,28). Asimismo, la porina inhibe la fusión con los lisosomas (29) y la proteasa IgA1 escinde a LAMP-1, modificando los lisosomas y permitiendo la supervivencia bacteriana (16).

3.2.3.3 Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria

N. gonorrhoeae posee una serie de mecanismos complejos que le permiten evadir la respuesta inmunitaria del huésped favoreciendo que las infecciones persistan y, por tanto, aumentando el riesgo de contagio a otras personas.

3.2.3.3.1 Resistencia al efecto bactericida del suero

La activación de la vía alternativa y clásica del complemento se produce por la presencia de microorganismos. Respecto a la primera, se origina como consecuencia del daño tisular no específico o unión al microorganismo, mientras que en relación a la segunda, se produce a través del depósito de anticuerpos IgG e IgM sobre la bacteria, que conduce a su eliminación por parte del sistema inmunitario. La activación de ambas vías converge con la escisión y activación de la proteína C3, la cual es crucial para mantener una cascada que finaliza con la formación de poros en la superficie bacteriana causando lisis y muerte celular (22).

N. gonorrhoeae ha desarrollado una serie de mecanismos para limitar el establecimiento del complemento en su superficie y, por tanto, permitir la supervivencia bacteriana. Por un lado, la porina se une a C4bp y al factor H, que son represores de la vía clásica y alternativa, respectivamente. Asimismo, la sialización del LOS aumenta el depósito de factor H en la porina, lo que explica el aumento de la resistencia a la acción bactericida del suero humano (28).

3.2.3.3.2 Variación de los antígenos de superficie

N. gonorrhoeae puede modular la expresión de sus componentes superficiales ya sea por variación de fase o por variación antigénica. En general, la variación de fase se produce como consecuencia del cambio en el marco de lectura que hace que un gen se exprese o no, mientras que la variación antigénica conduce a cambios en la composición química de algún componente estructural. Por lo tanto, la variación coordinada de los antígenos de superficie, permite al gonococo desarrollar estrategias adaptativas que dificultan el reconocimiento por los anticuerpos del huésped.

Normalmente cuando el microorganismo reside en el exterior celular contiene pili en su superficie. Estos pili presentan variación antigénica que junto a la diversidad en la composición

del LOS y su sialización, impiden la muerte por los anticuerpos del suero facilitando el crecimiento extracelular.

Por el contrario, la internalización en las células del huésped requiere la retracción de los pili que hace que las células carezcan de estos elementos. Cuando esto se combina con la variación de fase en la expresión de Opa y un LOS no sializado, el gonococo puede traslocarse a través del epitelio de la mucosa en una etapa inicial de la infección y, en última instancia, residir dentro de varios tipos celulares (16).

3.2.3.3 Inmunidad adaptativa

Los individuos que han tenido previamente una infección gonocócica pueden volver a sufrirla, ya que la gonorrea no provoca una respuesta inmune protectora ni genera memoria inmunológica.

Además de la variación de los antígenos de la superficie gonocócica y la evasión del sistema de complemento, *N. gonorrhoeae* modula la respuesta inmune adaptativa del huésped. Por un lado, la unión de las proteínas Opa con el receptor CEACAM-1 suprime la activación de las células T e inhibe la producción de anticuerpos específicos por parte de los linfocitos B y, por otro lado, la internalización en las células dendríticas está mediada por el LOS y, debido a que las moléculas del LOS varían en composición, *N. gonorrhoeae* tiene una oportunidad adicional de evadir el sistema inmune.

Por otra parte, como se ha comentado previamente, la proteasa IgA1 promueve la colonización de la bacteria, ya que escinde a la IgA en 2 cadenas haciendo que pierda su actividad (16,22).

3.3 Manifestaciones clínicas

La gonorrea es una infección que se transmite principalmente mediante relaciones sexuales o por contacto perinatal de madre a hijo. Afecta a las superficies mucosas de la uretra, el cérvix, la faringe, el recto y la conjuntiva. Los signos y síntomas varían en función de la localización anatómica de la infección y si existe coinfección con otros patógenos.

3.3.1 Infecciones urogenitales

Infección en hombres

La uretritis aguda es la manifestación clínica más frecuente de la infección gonocócica en hombres. Tras la exposición, el periodo de incubación suele comprender de 2 a 5 días, aunque este intervalo puede ser más largo pudiendo variar generalmente entre 1 y 10 días. A pesar de que puede ser una infección asintomática en el 10% de los casos, después del periodo de incubación la mayoría de los hombres desarrollan secreción uretral y disuria. Inicialmente, la secreción uretral puede ser escasa y mucoide pero en 1 o 2 días es claramente purulenta. En comparación con la uretritis no gonocócica, el período de incubación de la gonorrea es más corto, la disuria suele ser más prominente y la descarga habitualmente es más profusa y purulenta (2,25,30).

Los síntomas de la uretritis gonocócica dependen en gran medida del tipo de serotipo de gonococo. Los hombres que cursan sin sintomatología suelen estar infectados por cepas del serotipo PorB1a. Probablemente, la disminución de la prevalencia de estas cepas ha hecho que actualmente, sobre todo haya uretritis sintomáticas (2).

Antes de la era de los antibióticos, la mayoría de los casos de uretritis gonocócica no tratada se resolvían espontáneamente tras aproximadamente unas 8 semanas. En la actualidad, las complicaciones por la diseminación ascendente de la infección son poco frecuentes, aunque

dentro de éstas las más comunes son la epididimitis y la prostatitis. Otras complicaciones locales más inusuales incluyen el edema del pene debido a linfangitis dorsal o tromboflebitis, el absceso periuretral, la estenosis uretral, la vesiculitis seminal, las infecciones de las glándulas de Cowper y de Tyson y la balanitis en varones no circuncidados (2,25,30).

Infección en mujeres

La cervicitis es la manifestación clínica más frecuente en mujeres. La infección afecta al epitelio columnar del endocérnix aunque también puede llegar a áreas más periféricas del cuello uterino donde el epitelio columnar confluye con el epitelio escamoso. La mucosa vaginal está recubierta por un epitelio escamoso estratificado y generalmente no está infectada por *N. gonorrhoeae*, salvo en el caso de mujeres con deficiencia de estrógenos como por ejemplo las niñas prepúberes y las mujeres posmenopáusicas. En la gran mayoría de los casos y debido a su proximidad anatómica, hay infección uretral concomitante.

A pesar de que el período de incubación de la gonorrea está menos definido en las mujeres que en los hombres, los síntomas generalmente se desarrollan dentro de los 10 días de la infección y suelen ser más agudos e intensos que los de la cervicitis por clamidia. Las principales manifestaciones clínicas incluyen leucorrea, disuria, metrorragias y menorragias. En la exploración física se puede observar una secreción cervical mucopurulenta y/o un cérnix edematoso y friable que sangra fácilmente al realizar un frotis.

En las mujeres, aproximadamente en el 50% de los casos, la infección es asintomática o con una sintomatología muy leve que demora la búsqueda de asistencia sanitaria y facilita la diseminación de la enfermedad. Algunas de las complicaciones que pueden ocurrir en el transcurso de la enfermedad son la afectación de las glándulas de Skene y Bartolino que pueden llegar a causar abscesos, pero sin duda, la complicación más grave es la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI).

La EPI se produce por una infección ascendente y se manifiesta por combinaciones de endometritis, salpingitis, absceso tubo-ovárico, peritonitis pélvica y perihepatitis. La EPI puede cursar con náuseas, fiebre, leucocitosis, elevación de la proteína C reactiva, sangrado cervical, dispareunia y dolor hipogástrico. La cicatrización de las trompas de Falopio puede originar más secuelas, como embarazos ectópicos e infertilidad (2,25,30).

3.3.2 Infecciones extragenitales

Infección anorrectal

La principal vía de adquisición de la gonorrea rectal, tanto en mujeres como en hombres, es el coito anal receptivo sin protección, sin embargo, en algunas mujeres con cervicitis gonocócica, la contaminación perineal con las secreciones vaginales puede ser la responsable de la infección (2,25,30,31).

Como la mayor parte de las infecciones anorrectales son asintomáticas y no se recogen cultivos de manera rutinaria en esta localización, se desconoce la prevalencia real de esta infección. A pesar de que estas cifras podrían estar infravaloradas, en una revisión sobre infecciones extragenitales (31) los autores recopilan datos de prevalencia del 0.6 al 35.8% en mujeres y del 0.2 al 24% en hombres que tienen sexo con hombres (HSH). En hombres heterosexuales se desconoce la prevalencia, aunque esta cifra podría ser anecdótica debido al tipo de prácticas sexuales en este colectivo.

La infección gonocócica rectal suele ser asintomática en el 90% de los casos y en el resto cursa con proctitis aguda que se manifiesta por dolor, molestia o prurito anorrectal, tenesmo, secreción purulenta o sangrado rectal. Asimismo, la anoscopia puede revelar edema, eritema y/o friabilidad en la mucosa con un exudado mucopurulento (2,25,30,31).

Infección orofaríngea

Esta infección gonocócica se adquiere por contacto orogenital y generalmente coexiste con una infección genital. Al igual que en el caso de la gonorrea rectal, los datos de prevalencia están infradiagnosticados, ya que más del 90% de las infecciones son asintomáticas (31).

La gonorrea faríngea, si muestra sintomatología, suele ser leve y en ocasiones se produce faringitis sintomática con linfadenitis cervical. La mayoría de los casos se resuelven espontáneamente (2,25,30).

El diagnóstico suele realizarse de forma casual durante la realización de un cribado o en el estudio de contactos (30). A pesar de que la mayoría de las infecciones son asintomáticas y que la transmisibilidad es baja, la gonorrea faríngea juega un papel fundamental en la adquisición de genes de resistencia, ya que es uno de los reservorios donde se producen más transferencia horizontal de genes con otras especies comensales de *Neisseria* (3).

Infección ocular en el adulto

Esta infección se caracteriza principalmente por una conjuntivitis purulenta que se produce por contacto directo del ojo con secreciones genitales contaminadas. La conjuntivitis gonocócica suele ser dolorosa, con fotofobia y exudado purulento abundante que si no se trata rápidamente, puede complicarse con queratitis y panoftalmitis que pueden causar ceguera (2,25,30).

Infección gonocócica diseminada (IGD)

La IGD es una complicación rara que aparece por la diseminación hematógena de *N. gonorrhoeae* a partir de una infección primaria de las mucosas. El gonococo gracias al amplio arsenal de estrategias para evadir la respuesta inmune, persiste durante más tiempo de manera asintomática, lo que le proporciona la oportunidad de poder diseminarse. Normalmente se

produce dentro de las primeras 2 o 3 semanas después de adquirir la infección y se estima que puede aparecer hasta en aproximadamente el 3% de los casos (2,32,33).

La IGD ocurre principalmente en mujeres y en ellas se relaciona más con la menstruación, el tercer trimestre del embarazo y la faringe como foco primario de la infección (2,25,30,32). Asimismo, los déficits de complemento son otro factor de riesgo que predispone la diseminación hematológica de la infección (2,25,33).

Las propiedades de *N. gonorrhoeae* asociadas a la IGD incluyen la resistencia a la acción bactericida del suero humano y la infección asintomática. Estas cepas son a menudo del serotipo PorB1A, presentan sensibilidad a la penicilina y tienen requisitos nutricionales especiales de crecimiento como el auxotipo AHU⁻ (arginina, hipoxantina, uracilo) que hacen que el organismo sea más fastidioso y más difícil de aislar (2,25).

Los pacientes con IGD pueden presentar síntomas inespecíficos como escalofríos, fiebre, malestar y mialgia, sin embargo, la tríada específica que caracteriza la IGD son las lesiones cutáneas, la tenosinovitis y la enfermedad articular que consiste en poliartritis migratoria y artritis séptica.

Las lesiones cutáneas, presentes en el 60% de los casos, se limitan generalmente a las articulaciones e incluyen pápulas y pústulas, a menudo con un componente hemorrágico. Otras manifestaciones cutáneas menos frecuentes son abscesos, celulitis, petequias, máculas purpúricas, fascitis necrotizante y vasculitis (33).

La clínica articular empieza con una tenosinovitis que afecta de manera asimétrica a las muñecas, los tobillos y los dedos de las manos y de los pies. La artritis es la manifestación más frecuente y generalmente, sobreviene en una o dos articulaciones, con mayor frecuencia en la rodilla, el tobillo, el codo o la muñeca (30).

Si bien existen otras complicaciones más severas de la IGD, éstas son muy poco frecuentes. Entre ellas destacan la endocarditis, la perihepatitis o síndrome de Fitz-Hugh-Curtis, la osteomielitis y la meningitis (30,32).

3.3.3 Infección en el embarazo

La gonorrea durante el embarazo puede tener graves consecuencias tanto para la madre como para el bebé. Por ello, la detección y el tratamiento precoz de la infección son extremadamente importantes. Asimismo, la detección temprana de la infección también nos ayuda a identificar una población de riesgo de contraer otras ITS, lo que nos permite realizar una vigilancia más profunda durante el embarazo y realizar programas de prevención (25). Algunos estudios recientes realizados en Japón y Kenia arrojan datos de prevalencia de infección gonocócica del 1-2% en mujeres embarazadas (34,35).

La gonorrea durante el embarazo se asocia con aborto espontáneo, parto prematuro, rotura temprana de las membranas fetales, corioamnionitis, funisitis y mortalidad infantil perinatal. Las manifestaciones clínicas son las mismas que en la mujer que no está embarazada, a excepción de la EPI y la perihepatitis que son infrecuentes después del primer trimestre (2,25).

3.3.4 Infección en la infancia

La infección gonocócica en la infancia se puede dividir por sus características clínicas, morales y legales en la infección en el periodo neonatal y la infección en niños y niñas.

La infección neonatal se produce por la exposición a las secreciones cervicales infectadas durante el parto. Se inicia de forma aguda a los 2-5 días de nacer. La manifestación clínica más

común de la gonorrea neonatal es la *ophthalmia neonatorum* y con menor frecuencia la sepsis con artritis séptica, meningitis y neumonía.

La *ophthalmia neonatorum* es la conjuntivitis del recién nacido y clínicamente se manifiesta igual que en el adulto. Esta infección se puede prevenir con la administración al recién nacido de un colirio de nitrato de plata al 1%, de una pomada oftálmica de eritromicina al 0,5% o bien con tetraciclina al 1%. La profilaxis se administra en ambos ojos tanto si se trata de un parto vaginal como de una cesárea.

Después del periodo neonatal, cualquier ITS plantea la posibilidad de abuso sexual. Aunque en algunos casos la infección genital en niñas podría ser adquirida de forma accidental en entornos con poca higiene, la infección por *N. gonorrhoeae* en niños prepúberes se considera una evidencia de abusos sexuales.

Las manifestaciones clínicas varían en función de la localización anatómica. En las niñas, la vulvovaginitis gonocócica es la manifestación más común y raramente se complica con una EPI y en los niños, la uretritis se manifiesta igual que en el adulto. Tanto las infecciones anorrectales como las faríngeas suelen ser asintomáticas (2,25,30).

3.4 Diagnóstico

3.4.1 Recogida, transporte y almacenamiento de la muestra

En el diagnóstico microbiológico de la infección gonocócica son especialmente importantes la toma de la muestra, su transporte y posterior procesamiento, sobre todo en el caso del cultivo, ya que *N. gonorrhoeae* es muy sensible a las condiciones ambientales. La realización correcta de estos procesos, así como la mínima demora entre la recogida y el procesamiento de la muestra, aumenta la viabilidad del microorganismo y, por tanto, el rendimiento diagnóstico.

La localización anatómica en la recogida de la muestra depende de la clínica del paciente, las prácticas sexuales y el método diagnóstico que se vaya a utilizar. En general, en las mujeres la mejor muestra para el cultivo es el exudado endocervical seguido de las muestras vaginales y uretrales. Sin embargo, para el diagnóstico mediante técnicas de detección de ácidos nucleicos (TAANs), la mejor muestra es el frotis vaginal o endocervical. En el caso de los varones heterosexuales, la muestra idónea tanto para el cultivo como para la microscopía es el frotis uretral y para las TAANs, la orina. En HSH y en hombres y mujeres con signos clínicos y/o prácticas sexuales anales y orales, se deben añadir muestras faríngeas y rectales. Por otro lado, habrá que tener en cuenta las muestras de sangre y líquido articular ante la sospecha de infección diseminada (36).

La recogida de la muestra se debe realizar antes de instaurar el tratamiento antibiótico y debe evitarse el uso de antisépticos, analgésicos y lubricantes, ya que inhiben el crecimiento del gonococo. Además, *N. gonorrhoeae* es muy sensible a determinadas sustancias como el arginato cálcico, los ácidos grasos presentes en torundas de algodón o compuestos sulfurados presentes en las torundas de celulosa. Por ello, actualmente, en la obtención de la muestra se recomienda utilizar hisopos de plástico o alambre flexible con punta flocada de rayón o dacrón.

Tras realizar la toma de la muestra, la situación óptima es el procesamiento inmediato, sin embargo, si esto no es posible es aconsejable utilizar medios de transporte, preferiblemente líquidos, tipo Stuart o Amies con carbón activado que prolongan la viabilidad del microorganismo hasta un máximo de 48 horas. No obstante, se recomienda inocular los cultivos antes de las 6 horas, ya que pasado ese tiempo la viabilidad de *N. gonorrhoeae* disminuye notablemente (36,37). Por otro lado, durante mucho tiempo se ha pensado que la supervivencia del gonococo era superior a temperatura ambiente en comparación con la refrigeración. En estudios recientes, se ha demostrado que la conservación y supervivencia de *N. gonorrhoeae* es superior si los escobillones con medio de transporte se mantienen refrigerados (4 °C) (37).

Además de lo comentado anteriormente, para la realización de una correcta toma de muestras el personal debe aplicar diferentes procedimientos en función de las distintas localizaciones anatómicas. A continuación se detalla el procedimiento para la toma de las muestras más frecuentes:

- Uretra: en hombres se puede recoger la secreción directamente con una torunda. Si la descarga no es evidente, se inserta de 2 a 3 cm un escobillón fino y se gira suavemente durante 5-10 segundos. En las mujeres, se masajea la uretra contra la sínfisis del pubis y se procede igual que para los hombres. Es importante que las muestras se obtengan al menos 1 hora después de que el paciente haya orinado.
- Endocérvix: antes de obtener la muestra, se debe utilizar una esponja o torunda para eliminar las secreciones exocervicales. Posteriormente, se debe insertar un hisopo de 2 a 3 cm en el canal endocervical que se rotará contra la pared del mismo entre 10-30 segundos.
- Vagina: se debe tomar sólo para TAANs y en el caso de niñas prepúberes o mujeres que se hayan sometido a una histerectomía, también para cultivo. La muestra se realiza del fórnix posterior y puede ser recogida por la propia paciente.
- Orina: se debe recoger sólo para TAANs. Es importante que al menos haya pasado como mínimo una hora desde la última vez que el paciente orinó y no se ha de limpiar la zona genital. Se debe recoger de 10 a 20 mL del primer chorro en un recipiente estéril.
- Recto: se insertará la torunda pasando el esfínter anal y girándola de lado a lado durante 10-30 segundos. Si se contamina con heces, se debe descartar la muestra y proceder a la repetición de la toma con otro escobillón. En pacientes sintomáticos, se recomienda realizar la muestra utilizando proctoscopio.
- Faringe: se frota la región de la faringe posterior por encima del borde inferior del paladar blando y las criptas amigdalinas.

Para el diagnóstico mediante TAANs se deben seguir las recomendaciones del fabricante en la obtención, transporte y almacenamiento de las muestras (36,37).

3.4.2 Microscopía

La microscopía se considera una técnica rápida, económica y sencilla. En el examen microscópico se utiliza la tinción de Gram o de azul de metileno a 1000 aumentos. En hombres sintomáticos, la presencia de ≥ 2 PMNs por campo y diplococos Gram negativos intracelulares permite realizar un diagnóstico de uretritis gonocócica con una buena sensibilidad ($\geq 95\%$) y especificidad (figura 1). Sin embargo, en hombres asintomáticos, en exudados endocervicales, rectales y faríngeos, la sensibilidad de la tinción de Gram es baja, por lo que no es una herramienta útil para descartar la infección.

La microscopía está desaconsejada en muestras extragenitales donde puede haber confusión con flora saprófita, principalmente en el caso de las muestras faríngeas. (30,36–40).

A pesar de que la tinción más utilizada en los laboratorios es la tinción de Gram, la tinción con azul de metileno tiene la ventaja de que la morfología se observa mejor y además, es una tinción más rápida; sin embargo, posee la desventaja de no apreciarse las características tintoriales (36,37).

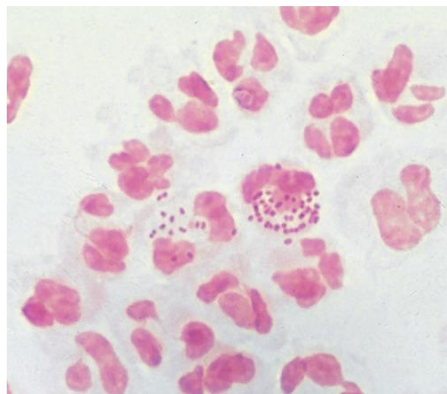


Figura 1. Tinción de Gram de uretritis gonocócica donde se puede observar diplococos Gram negativos intraleucocitarios.

3.4.3 Cultivo e identificación

3.4.3.1 Cultivo de *N. gonorrhoeae*

Durante mucho tiempo el cultivo ha sido considerado como el *gold standard*, permitiéndonos realizar el diagnóstico definitivo mediante el aislamiento y la identificación del microorganismo. Además, permite realizar estudios de sensibilidad antibiótica, esenciales para detectar y monitorizar las resistencias antimicrobianas. Otra ventaja que presenta el diagnóstico mediante cultivo es que, en caso de ser necesario, proporciona la posibilidad de hacer estudios de tipificación bacteriana y es la técnica recomendada ante infecciones persistentes o sospecha de fracaso terapéutico. No obstante, es una técnica relativamente lenta y como se ha comentado anteriormente, para optimizar el diagnóstico, se debe realizar una correcta metodología desde la recogida de la muestra hasta el cultivo, ya que *N. gonorrhoeae* es muy sensible a las condiciones ambientales.

Las cepas de gonococo tienen necesidades nutricionales muy estrictas. Por esta razón, es necesario utilizar medios de cultivo enriquecidos como el agar chocolate que, gracias a que contiene suplementos de varias vitaminas, aminoácidos, hierro y otros factores, permite su crecimiento. No obstante, en este tipo de medios pueden crecer también otros microorganismos presentes en la muestra, por lo que es necesario utilizar otros medios que además de estar enriquecidos, sean lo suficientemente selectivos para impedir el crecimiento de los microorganismos saprófitos. Por ello, se recomienda el uso de medios selectivos como el agar Thayer-Martin, Martin-Lewis o el medio New York City que permiten el aislamiento de *N. gonorrhoeae*, ya que poseen antimicrobianos como la vancomicina, la colistina, el trimetoprim y la nistatina, que inhiben las bacterias Gram positivas, Gram negativas (incluyendo casi todas las neisserias saprofitas) y levaduras.

Las placas se deben incubar durante 24-72 horas a una temperatura de 35-37°C y con un atmósfera al 5% de CO₂. Si el cultivo es positivo se observarán colonias de color grisáceo (figura 2) a las que se les harán las pruebas de identificación.



Figura 2. Aspecto de las colonias de *N. gonorrhoeae* en agar Thayer-Martin.

3.4.3.2 Identificación presuntiva

La identificación presuntiva se realiza observando la morfología de la colonia (color grisáceo), la tinción de Gram (diplococos Gram negativos) y las pruebas de la oxidasa y la catalasa positivas (figura 3) (36–38,40).

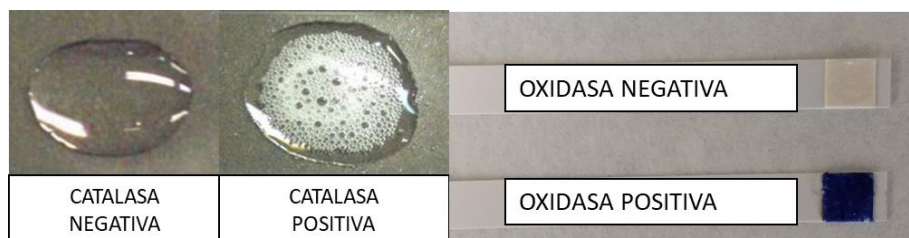


Figura 3. Prueba de la catalasa y la oxidasa utilizadas en la identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae*.

3.4.3.3 Pruebas de identificación confirmatorias

La identificación definitiva requiere, además de las pruebas de la identificación presuntiva, la realización de una o más técnicas que demuestren los patrones de utilización de carbohidratos, los perfiles enzimáticos o las características inmunológicas de los microorganismos.

3.4.3.3.1 Pruebas bioquímicas

Tradicionalmente, en los laboratorios se ha utilizado como método de identificación confirmatoria, la capacidad de *N. gonorrhoeae* para producir ácido a partir de la utilización de glucosa, pero no de otros carbohidratos (tabla 1). Para ello, se inocula la bacteria en varios medios de cultivo semisólidos como el agar cisteína tripticasa (CTA), que están suplementados cada uno de ellos con un azúcar distinto y con rojo fenol como indicador de pH. A las 24 horas, si la bacteria metaboliza ese azúcar, la producción de ácido en contacto con el indicador de pH ocasionará un cambio de color en el medio de cultivo (36). Basado en el mismo principio, con la prueba rápida de utilización de carbohidratos (*rapid carbohydrate utilization test*, RCUT), en 4 horas se obtiene el resultado. En la RCUT se usan medios líquidos inoculados con una elevada densidad de crecimiento, por tanto, la acidificación del medio y posterior viraje del cultivo depende de enzimas preformadas y no del crecimiento (36,41,42).

Del mismo modo que las RCUT, se han desarrollado pruebas rápidas de detección de enzimas que hidrolizan sustratos cromogénicos. Se comercializan las pruebas Gonocheck-II (E-Y Laboratories) y *Neisseria Preformed Enzyme Test* (PET; Key Scientific) que detectan la actividad de las enzimas γ -glutamil aminopeptidasa, β -galactosidasa y prolina aminopeptidasa (tabla 1). Sin embargo, no se recomienda su uso de manera exclusiva, ya que pueden dar falsos positivos con otras especies de *Neisseria* y falsos negativos, porque no todas las cepas de *N. gonorrhoeae* tienen la prolina aminopeptidasa positiva (36,43). Actualmente, existen kits rápidos comerciales

que aúnan la utilización de carbohidratos y la detección de enzimas preformadas, proporcionando una identificación más fiable (figura 4). Algunos ejemplos de estos kits son API-NH (bioMérieux), Vitek 2 NH (bioMérieux), MicroScan NH (Beckman Coulter) o Rapid NH (Remel). En estos kits, cada pocillo tiene asociada una puntuación, de manera que se obtiene un perfil numérico que, al compararlo con una base de datos, nos proporciona la identificación del microorganismo.



Figura 4. Prueba de identificación API NH que muestra un perfil de identificación de *Neisseria gonorrhoeae*.

Especies	Características bioquímicas								
	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Fructosa	ONPG ^a	GGT ^b	PIP ^c	
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-	-	-	+ (-)	
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-	-	-	+ (-)	- (+)	
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	-	+/-	-	-	-	+	
<i>N. cinerea</i>	- (+)	-	-	-	-	-	-	+	
<i>N. subflava</i> ^d	+	+	-	+/-	+/-	-	-	+	
<i>N. sicca</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	
<i>N. mucosa</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	
<i>N. flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>M. catarrhalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	- (+)	
<i>K. denitrificans</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	

Tabla 1. Características bioquímicas de diferentes especies de *Neisseria* y otros microorganismos Gram negativos, oxidasa positiva.

^aONPG, o-nitrofenil-β-galactosidasa; ^bGGT, γ-glutamil aminopeptidasa; ^cPIP, prolina iminopeptidasa; ^d incluye los biovars subflava, flava, y perflava, los cuales difieren en su actividad frente a la sacarosa y fructosa; +, positivo; -, negativo; +/-, no es un resultado consistente para la especie; + (-), la mayoría de las cepas son positivas; - (+), la mayoría son negativas (36).

3.4.3.3.2 Ensayos inmunológicos

Los métodos inmunológicos utilizados para la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae* son la inmunofluorescencia directa (IFD) y la coaglutinación.

Hasta hace pocos años, se comercializaba un test de IFD MicroTrak *N. gonorrhoeae* (Trinity Biotech), que utilizaba anticuerpos monoclonales frente a la proteína de membrana PorB. Este test presentaba el inconveniente de necesitar un microscopio de fluorescencia, limitando el acceso a laboratorios pequeños con menos recursos y además, la sensibilidad y especificidad de la técnica era menor que con los métodos de coaglutinación.

Los principales ensayos de coaglutinación son el GonoGen II (BioConnections), que es una prueba colorimétrica que utiliza anticuerpos monoclonales frente a la proteína PorB adsorbidos en partículas de metal; y el Phadebact Monoclonal GC (MKL Diagnostics), que usa células estafilocócicas recubiertas de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas PorB1A y PorB1B. El Phadebact es la técnica de diagnóstico inmunológico más usada, ya que además de diagnosticar, permite serotipar (figura 5) (36,42–44).

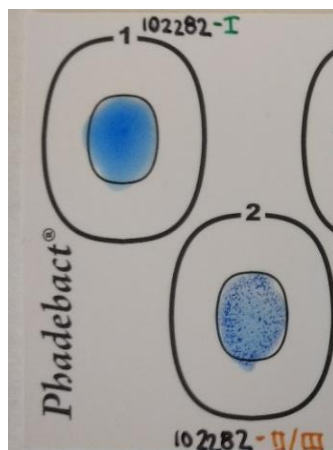


Figura 5. Diagnóstico de *N. gonorrhoeae* serotipo II/III (PorB1B) mediante coaglutinación Phadebact Monoclonal GC.

3.4.3.3 MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*)

Actualmente, otro de los métodos que se utiliza en la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae* es el MALDI-TOF. Esta técnica basada en la espectrometría de masas permite en un tiempo muy reducido y con una metodología sencilla, identificar los microorganismos basándose en el perfil proteico de la bacteria.

De forma muy esquemática, el espectrómetro de masas genera, analiza y detecta iones en fase gaseosa de una muestra. Al formarse los iones, éstos son dirigidos hacia el analizador de masas (TOF), que los separa en función del ratio masa-carga. Posteriormente, los iones serán detectados formando el espectro de masas. Los espectros son comparados con una base de datos y de esta comparación, el *software* obtendrá la identificación del microorganismo con una puntuación que nos indicará la fiabilidad de dicha identificación.

La tecnología MALDI-TOF no está al alcance de todos los laboratorios por el elevado coste del equipo, sin embargo, la identificación por muestra es muy asequible (36,45–48).

La sensibilidad de la técnica y el valor predictivo positivo están por encima del 99% y en los últimos años, a parte del uso del MALDI-TOF como herramienta diagnóstica, se están estudiando otras aplicaciones como el tipado de cepas de gonococo y la detección de resistencias antimicrobianas (47).

3.4.4 Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

Las TAANs se pueden utilizar para la identificación definitiva del microorganismo a partir del cultivo o lo más frecuente, para la realización del diagnóstico directamente a partir de la muestra. Actualmente, son las técnicas recomendadas para la detección de las infecciones

urogenitales tanto en mujeres como en hombres, sintomáticos y asintomáticos, ya que se ha demostrado que son coste-eficaces y poseen una sensibilidad superior al 96% (40).

La ventaja de estas técnicas es que son más sensibles que el cultivo, dado que detectan microorganismos no viables haciéndolas menos dependientes de las condiciones de recogida, transporte y procesamiento de las muestras. Además, se pueden realizar en una gama más amplia de tipos de muestras, lo que ha permitido su uso en muestras menos invasivas como la primera micción de orina en los hombres y el frotis vaginal en las mujeres. Este hecho es importante, ya que facilita la auto-toma de la muestra por parte del paciente y es el procedimiento utilizado en muchos casos en el cribado de ITS. No obstante, la sensibilidad de las TAANs en orina de mujeres, puede ser un 10% inferior que en los exudados vaginales y por tanto, no son la muestra óptima para esta prueba.

En muestras extragenitales, las TAANs son más sensibles que el cultivo y son la prueba de elección para detectar infecciones faríngeas y rectales. Sin embargo, la especificidad es menor, pudiendo dar falsos positivos sobre todo en muestras faríngeas debido a la presencia de otras especies de *Neisseria* (36,37,40,49). En mayo de 2019, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó por primera vez el uso de dos pruebas comerciales, Aptima Combo 2 Assay (Hologic) y Xpert CT/NG (Cepheid) para la detección de *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en muestras extragenitales (50), sin embargo, el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) en 2014, ya recomendó el uso de esta tecnología siempre que se utilizara otra TAAN con una diana diferente para la confirmación de los resultados positivos (49). Principalmente, se aconseja el uso de estas técnicas ante la sospecha de la infección gonocócica extragenital en HSH, aunque también se recomienda en pacientes heterosexuales debido a la transmisión por sexo oral, práctica cada vez más extendida (36,37,40,49).

Los tiempos de respuesta con las TAANs son menores que con el cultivo y aunque presentan el inconveniente de ser técnicas con precios más elevados, permiten la automatización y la

detección simultánea de otros microorganismos, principalmente *C. trachomatis*. Actualmente, están irrumpiendo en el mercado kits de diagnóstico sindrómico que detectan la mayoría de los patógenos causantes de ITS, como por ejemplo Allplex STI (Seegene), Viasure STD *Real Time PCR Detection kit* (CerTest) o STD *Direct Flow Chip* (Master Diagnóstica), entre otros. Sin embargo, estas técnicas todavía no están validadas por la FDA. Asimismo, aunque han salido algunas plataformas que permiten la detección de genes de resistencias, todavía no están del todo optimizadas por lo que actualmente, el cultivo no puede ser sustituido por las TAANs para la detección de resistencias antimicrobianas (51).

Las principales TAANs incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación mediada por transcripción (TMA) y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA). En la siguiente tabla se pueden observar las diferentes TAANs aprobadas por la FDA (36,49,52).

Ensayo	Fabricante	Diana	Tecnología
Abbott RealTime CT/NG	Abbott	Genes Opa	PCR a tiempo real
APTIMA Combo 2 Assay	Hologic	16S ARNr	TMA
BD MAX CT/GC/TV	Becton-Dickinson	No especificada	PCR a tiempo real
Cobas Amplicor	Roche	M·Ngo PII (citosina DNA metiltransferasa)	PCR
COBAS 4800 CT/NG	Roche	Repetición Directa Región 9 (DR9)	PCR a tiempo real
Probetec ET	Becton-Dickinson	PivNg (Homólogo de la proteína invertida Pilina)	SDA
Probetec GC Qx	Becton-Dickinson	Pilina (Región diferente que en Probetec-ET)	SDA
Xpert CT/NG Assay	Cepheid	2 secuencias cromosómicas no especificadas.	PCR a tiempo real

Tabla 2. TAANs aprobadas por la FDA para la detección de *N. gonorrhoeae* (Julio 2019).

PCR, reacción en cadena de la polimerasa; TMA, amplificación mediada por transcripción; SDA, amplificación por desplazamiento de cadena.

3.4.5 Otros métodos diagnósticos

Existen otros métodos diagnósticos para la detección de *N. gonorrhoeae* a partir de muestra directa, como las técnicas de hibridación de los ácidos nucleicos (PACE 2, Hologic; Hybrid Capture II), las técnicas basadas en la transformación genética (Gonostat, Sierra Diagnostics) y el enzimoimmunoanálisis que, por su rendimiento y coste, no lo hace competitivo en comparación con otros métodos disponibles. Asimismo, debido a la capacidad del gonococo para evadir la respuesta inmune, en este momento, ni las técnicas de IFD ni la serología tienen utilidad diagnóstica.

Actualmente, el CDC sólo recomienda la microscopía, el cultivo y las TAANs como métodos diagnósticos (49), por lo que el futuro de estas técnicas es incierto y posiblemente acabarán desapareciendo del mercado.

3.5 Métodos de tipado

Existe una larga trayectoria en el tipado de aislamientos de *N. gonorrhoeae*, tanto para fines epidemiológicos como para el estudio de la transmisión de cepas resistentes a antibióticos.

Dado que la elección del método de tipado puede ser diferente en función del propósito que se quiera conseguir, es crucial elegir el método o los métodos más efectivos para responder a las preguntas específicas que nos planteamos. Algunas de estas preguntas podrían ser el estudio de la filogenia y la genética de poblaciones bacterianas, la identificación de cepas específicas que se propagan a nivel mundial en determinadas poblaciones y/o en grupos *core*, en los test de cura para la confirmación de fallos de tratamiento o simplemente, como herramienta para resolver problemas médico-legales como el abuso sexual.

Si al tipado de las cepas le sumamos los datos de sensibilidad antimicrobiana, nos permitirá comprender mejor la transmisión de cepas específicas resistentes a los antibióticos y en última instancia, dicha información se puede aplicar para diseñar diferentes programas e intervenciones preventivas de salud pública.

La tipificación del gonococo se puede dividir en dos grandes grupos, los métodos fenotípicos y los moleculares. Actualmente, se utilizan de manera exclusiva los métodos moleculares, ya que estas técnicas son más objetivas, reproducibles y con una mejor capacidad de discriminación.

3.5.1 Métodos de tipado fenotípico

3.5.1.1 Auxotipificación

La determinación del auxotipo es una técnica que se describió por primera vez en 1973 y que se basa en los distintos requerimientos nutricionales en aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas de la bacteria. Este método está prácticamente en desuso, puesto que tiene una capacidad de discriminación baja, consume mucho tiempo y se trata de una técnica laboriosa que requiere un alto nivel de experiencia técnica.

3.5.1.2 Determinación de la serovariedad

Esta técnica está basada en las variaciones antigénicas de la proteína PorB. Como se ha comentado anteriormente con las técnicas diagnósticas de serotipado basadas en la coaglutinación, podemos clasificar las cepas de gonococos en función de si poseen la proteína PorB1A o la PorB1B. Sin embargo, con la determinación de la serovariedad, podemos ir un paso más adelante clasificando estas proteínas en función de sus variedades antigénicas.

Los serovares se determinan del mismo modo que el serotipo, con técnicas de coagulación, que nos permiten detectar interacciones entre antígenos gonocócicos y paneles de anticuerpos monoclonales específicos. Es una técnica rápida, que no requiere un equipamiento sofisticado y que además, es fácil de realizar. Por otro lado, posee una capacidad discriminatoria más alta que con el auxotipado.

No obstante, aunque la determinación de la serovariedad puede ser importante para una mejor comprensión de la respuesta inmune del huésped y, en última instancia, para el desarrollo de vacunas, entre sus desventajas se incluyen: una menor capacidad discriminatoria respecto a los métodos genotípicos, la subjetividad en la interpretación de los resultados que puede conducir a problemas de reproducibilidad, la baja especificidad de algunos anticuerpos monoclonales, la prevalencia de cepas no tipables y la aparición de nuevos serovares por la evolución continua del gen *porB*. Sin embargo, en algunas regiones donde la caracterización molecular no es posible, esta técnica sigue siendo una herramienta valiosa como marcador primario, ya que de manera rápida permite diferenciar los aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

3.5.1.3 Combinación Auxotipo/Serovar

Durante los años 80 y 90, se utilizaron como método de tipificación la combinación de las técnicas de auxotipado y la determinación de la serovariedad. Esta combinación proporciona mayor poder de discriminación que con la utilización de cada método por separado. Es importante señalar que con la llegada de los métodos moleculares, estas técnicas están cayendo en desuso debido a la mayor capacidad de discriminación entre cepas y al menor requerimiento de mano de obra de los métodos moleculares.

3.5.2 Métodos de tipado molecular

Estos métodos se pueden dividir en dos grupos: los métodos basados en el análisis de los patrones de bandas en el gel electroforesis y los basados en el análisis de secuencias de ADN.

3.5.2.1 Métodos basados en los patrones de bandas de ADN en el gel de electroforesis

3.5.2.1.1 Análisis del contenido plasmídico

Los plásmidos de *N. gonorrhoeae* se clasifican en función del peso molecular, el fenotipo o de las secuencias de ADN. Se han estudiado los plásmidos crípticos, los conjugativos y los que contienen determinantes de resistencia. Estos últimos, son los que pertenecen a la familia de los plásmidos productores de betalactamasas y el plásmido conjugativo con el determinante de resistencia a tetraciclinas, *tetM*.

El análisis del contenido plasmídico no se recomienda como método de tipado, puesto que posee una capacidad discriminatoria baja y puede haber problemas de reproducibilidad, ya que los plásmidos pueden adquirirse o perderse con los subcultivos.

3.5.2.1.2 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La PFGE es una técnica que consiste en la digestión de todo el genoma bacteriano mediante endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte, como *SpeI* o *BglIII*, seguido de la separación de dichos fragmentos de ADN en un gel de agarosa sometido a electroforesis de campo pulsado. El tipado se realiza mediante la comparación del patrón de bandas resultante.

Esta técnica es muy reproducible y permite el tipado de todos los aislamientos de gonococo. En cambio, la principal desventaja es su elevada laboriosidad y el coste, ya que necesita varios días para su realización y requiere de un alto nivel de experiencia técnica e interpretativa.

La PFGE es particularmente útil, dado que permite una buena discriminación entre aislamientos de gonococo pudiendo diferenciar aislados no distinguibles con otros métodos de tipado como la auxotipificación, la determinación del serovar, la combinación auxotipo/serovar, la secuenciación completa del gen *porB* y el NG-MAST. Por ello, esta técnica se utiliza principalmente para identificar a las poblaciones bacterianas en una región particular, en estudios de brotes de cepas resistentes a antibióticos y en evaluaciones forenses.

3.5.2.1.3 Ribotipado

El ribotipado es una variante del análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), basada en el análisis de los genes del ARN ribosomal. La técnica consiste en la digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción, la separación de los fragmentos mediante electroforesis y su posterior identificación mediante hibridación con sondas específicas del ARN ribosomal. Este método, produce patrones de hibridación específicos y reproducibles, simplificando la interpretación de los resultados en comparación con el análisis PFGE, ya que se reducen el número de bandas a interpretar. Sin embargo, el ribotipado no se utiliza en *N. gonorrhoeae*, ya que su capacidad discriminatoria es baja. Además, el método es laborioso y no es práctico para su uso fuera de los laboratorios de referencia.

3.5.2.1.4 Tipado de los genes *opa*

Este método se basa en la amplificación por PCR de los 11 genes *opa*, su posterior digestión con las endonucleasas de restricción TaqI y HhaI, seguido de la separación de estos fragmentos

mediante electroforesis y por último, la visualización de los patrones de bandas resultantes. Esta técnica de tipado tiene una elevada capacidad de discriminación entre cepas pero, por otro lado, comparte las mismas desventajas que el tipado por PFGE.

Debido al elevado poder de discriminación, el tipado de los genes *opa* se utiliza principalmente en aquellas situaciones en las que se quiera realizar un análisis epidemiológico fino, que diferencie con mucho detalle las cepas de gonococo (53).

3.5.2.2 Métodos basados en el análisis de secuencias de ADN

Actualmente, el análisis de las secuencias de ADN es el método de elección para clasificar las cepas de *N. gonorrhoeae*, debido a que proporciona una información exacta y reproducible, con un elevado poder de discriminación y, asimismo, los datos de las secuencias pueden almacenarse o compartirse electrónicamente, lo que permite realizar comparaciones entre laboratorios (54).

3.5.2.2.1 Tipificación del gen *porB*

Se basa en el análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos de la totalidad del gen *porB* o de un fragmento extenso que comprende la mayoría de los segmentos polimórficos del gen. Los inconvenientes de esta técnica de tipado son que no existe una estandarización internacional y además, no hay una base de datos que permita realizar comparaciones entre cepas, como en el caso del NG-MAST, por lo que actualmente no es un método de tipado muy utilizado.

3.5.2.2.2 *Multilocus sequence typing (MLST)*

El MLST se basa en la secuenciación de fragmentos de genes conservados que evolucionan de manera lenta, los cuales son evolutivamente neutrales y se distribuyen por todo el genoma. El MLST se utiliza para el estudio de poblaciones de muchas especies bacterianas. El fundamento de la técnica es el mismo, lo único que varían son los genes *housekeeping* analizados en cada una de las especies bacterianas. En el caso de *N. gonorrhoeae*, se analizan secuencias de 7 genes (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm*) a los que se les asigna un número de alelo y de la combinación de alelos en los 7 loci, se define un perfil alélico o secuenciotipo. Existe una base de datos pública en la que se pueden caracterizar y depositar las secuencias de los aislamientos de gonococo que se estén analizando (<https://pubmlst.org/neisseria/>).

El MLST es adecuado para estudios epidemiológicos a largo plazo y de biología de poblaciones, sin embargo, debido a que se analizan genes altamente conservados, la capacidad de discriminación no es del todo óptima en la detección de redes o *clusters* de transmisión (53).

3.5.2.2.3 *Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing (NG-MAST)*.

El NG-MAST, al contrario de lo que sucede con el MLST, consiste en la secuenciación de un fragmento interno hipervariable de 2 genes altamente polimórficos, *porB* (490 pares de bases, pb) y *tbpB* (390 pb). Estos genes, tal y como se ha comentado anteriormente, codifican para la porina y para la subunidad β de la proteína fijadora de transferrina, respectivamente. Ambos genes, al codificar proteínas que se encuentran en la superficie bacteriana, sufren una elevada variabilidad genética que se acumula rápidamente por estar expuestos a la selección derivada de la respuesta inmunológica del huésped.

La asignación de los secuenciotipos se basa, al igual que en MLST, en la combinación de números de alelos para cada gen. Esta asignación se realiza a través de en una base de datos pública (<http://www.ng-mast.net/>).

El tipado mediante NG-MAST es útil para identificar la variabilidad en las poblaciones gonocócicas, identificar redes de transmisión e investigar fallos de tratamiento. Asimismo, el NG-MAST también sirve para predecir fenotipos específicos de resistencia antimicrobiana (21,53).

Como se ha mencionado previamente, las secuencias de los genes que se utilizan para la tipificación del NG-MAST poseen una elevada variabilidad y, por consiguiente, en una determinada población pueden coexistir cepas con secuenciotipos diferentes, pero que están genéticamente muy relacionadas. Por esta razón, los aislamientos de *N. gonorrhoeae* que comparten uno de los alelos de NG-MAST y que muestran una similitud de al menos un 99% en el otro alelo (diferencia de ≤ 5 pb para *porB* y ≤ 4 pb para *tbpB*) se clasifican dentro de un mismo genogrupo, lo que permite mejorar los análisis epidemiológicos (55).

3.5.2.2.4 *Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance (NG-STAR)

El tipado mediante el NG-STAR sigue la misma metodología que el MLST o el NG-MAST pero, en este caso, para la obtención del secuenciotipo, se utilizan las secuencias de 7 genes (*penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC*, y 23S ARNr) asociados con la resistencia a betalactámicos, macrólidos y quinolonas.

Este nuevo método de tipado surgido en 2017, se encuentra disponible on-line de manera pública (<https://ngstar.canada.ca/>) aunque todavía no tiene un uso muy extendido. El NG-STAR

integra la información sobre genes de resistencias y permite la monitorización de la diseminación global de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antimicrobianos (56).

3.5.2.2.5 Secuenciación del genoma completo (SGC)

La secuenciación del genoma completo, WGS por sus siglas en inglés (*whole genome sequencing*), ofrece la información más completa de una cepa bacteriana. La SGC está enmarcada dentro de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS), también conocidas como secuenciación masiva. Éstas tienen la capacidad de producir millones de reacciones de secuenciación en paralelo, sin la necesidad de electroforesis o clonación bacteriana y, por tanto, ofrecen una alternativa con un elevado rendimiento y bajo coste en comparación con los métodos tradicionales de secuenciación tipo Sanger.

En pocos años han surgido diversas plataformas de secuenciación masiva que tienen diferentes fundamentos. En 2005 se lanzó la plataforma 454 (Roche) que utilizaba la técnica de pirosecuenciación, siendo ésta la primera NGS en comercializarse. Un año más tarde, surgió la plataforma de secuenciación Solexa/Illumina basada en la amplificación en puente y la incorporación de nucleótidos fluorescentes. En 2007 irrumpió la plataforma SOLiD (Life Technologies), la cual realiza la secuenciación por ligación de octámeros de secuencia conocida marcados con fluorescencia. Tres años más tarde, se incorporó al mercado Ion Torrent (Life Technologies), que se basa en la detección de protones durante la polimerización de los nucleótidos. Todas estas técnicas de NGS se clasifican dentro de las técnicas de secuenciación de segunda generación y producen un promedio de lecturas de 300 nucleótidos.

Las técnicas de secuenciación masiva de segunda generación siguen un proceso laborioso en el que de manera esquemática, previo a la secuenciación, se lleva a cabo la preparación de las librerías con los genomas. Para ello, se realiza la fragmentación del ADN, la adición de

adaptadores en los extremos de las secuencias (que funcionan como códigos de barras para distinguir el ADN de los diferentes aislamientos secuenciados), la amplificación clonal de las secuencias, la normalización de las librerías y por último, la secuenciación. Tras ésta, se procede al análisis bioinformático de las secuencias mediante la limpieza, el ensamblaje y la anotación de los genomas.

En cambio, las técnicas de tercera generación, evitan el paso de amplificación previo a la secuenciación y por tanto, se realiza la secuenciación sobre una única molécula de ADN, produciendo lecturas más largas (>20000 nucleótidos). Sin embargo, estos secuenciadores aún no se utilizan en el laboratorio de microbiología clínica debido a su falta de accesibilidad y a la menor calidad de las secuencias. Entre las NGS de tercera generación destacan RSII o Sequel (Pacific Biosciences), MinION (Oxford Nanopore) y HeliScope (Helicos BioScience) (57–60).

Mediante la SGC se pueden realizar análisis filogenéticos mucho más exactos que con el resto de métodos de tipado comentados anteriormente. Esto se debe a que las comparaciones se realizan utilizando el genoma *core*, es decir, para establecer las relaciones se usan los genes que tienen en común y están presentes en todos los aislamientos de una especie. La principal ventaja es que las representaciones son más precisas, ya que se evitan las dificultades al alinear e interpretar la evolución de regiones genómicas complejas y diversas (57). Asimismo, con los datos obtenidos de los genomas completos (*whole genome, wg*) se puede obtener *in silico* el wgNG-MAST, el wgMLST y el wgNG-STAR. Estudios recientes que compararon la SGC junto con MLST y/o NG-MAST, ponen de manifiesto que existen discordancias entre los resultados obtenidos, ya que hay aislados a los que se les asignó un mismo secuenciotipo y sin embargo, se distribuyeron entre diferentes clados filogenéticos con la SGC (61).

Por otro lado, al disponer de la secuencia del genoma completo, esta técnica permite la identificación y caracterización de genes de resistencia así como también, facilita la identificación de nuevas mutaciones que confieran resistencia a algún antibiótico. Del mismo

modo, la SGC se puede utilizar para identificar brotes, estudiar factores de virulencia, identificar objetivos para vacunas, entre otras aplicaciones (62).

3.6 Sensibilidad antimicrobiana y tratamiento

3.6.1 Estudio de la sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana se puede determinar mediante métodos fenotípicos que están basados en la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo, o bien con métodos genotípicos, que se fundamentan en la detección de los genes y las mutaciones implicadas en la resistencia antimicrobiana. A pesar de que los métodos genotípicos poseen una buena correlación con los fenotípicos, en la práctica clínica para *N. gonorrhoeae* se usan de manera exclusiva los métodos basados en el cultivo (51,63).

Los métodos para determinar la sensibilidad antimicrobiana se deben realizar partiendo de un cultivo puro de *N. gonorrhoeae* de unas 20-24 horas y sembrado en un medio no selectivo, como el agar chocolate. Posteriormente, el medio de cultivo de elección para la realización del antibiograma es el agar GC suplementado con el 1% de IsoVitalex, que se incuba durante 20-24 horas, a una temperatura de 35-37°C y con un atmósfera al 5% de CO₂.

El método de referencia para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) es la dilución en agar. En este método se cultivan las bacterias en el medio de cultivo comentado anteriormente, al cual se le incorpora una concentración definida del antibiótico a testar (36). La dilución en agar es un método que no es ideal para realizarlo de manera rutinaria, ya que es laborioso y poco rentable si se estudian pocas cepas, por lo que se reserva principalmente para los laboratorios de referencia. Por ende, el método cuantitativo que se usa con más frecuencia

para la determinación de la sensibilidad es el epsilómetro (Etest), ya que se obtienen resultados comparables a la dilución en agar y es más sencillo de realizar (3).

El Etest consiste en una tira de papel no poroso que posee un gradiente definido del antimicrobiano y que al ponerlo en contacto con la superficie del medio y tras la incubación, el antibiótico difunde al medio y se puede observar una zona elipsoidal simétrica. La CMI vendrá definida por el valor obtenido en la intersección de la elipse con la tira (figura 6).

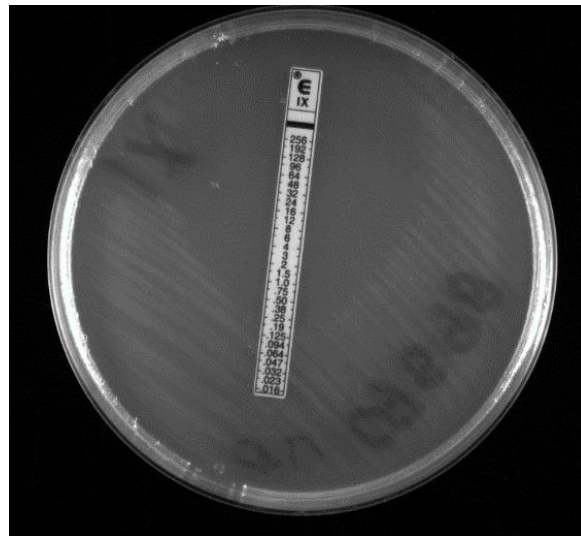


Figura 6. Determinación de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* por el método epsilómetro.

Además de la determinación cuantitativa de la sensibilidad, se puede obtener una determinación cualitativa mediante el ensayo de difusión en disco. En este ensayo se deposita en la superficie del medio de cultivo, previamente inoculado con el microorganismo, discos de papel secante impregnados en concentraciones conocidas de antibióticos. El antibiótico difunde radialmente al medio y tras la incubación, los discos aparecen rodeados de un halo de inhibición que midiéndolo y comparándolo con los criterios de interpretación, permite clasificar a las bacterias en las categorías: sensible, intermedio o resistente (36). Los métodos de difusión en disco sólo se recomiendan cuando no se puede realizar la determinación de la CMI por ninguno de los métodos anteriores y cualquier valor de resistencia inusual o emergente, debe confirmarse con otro método (3).

Existen dos sociedades científicas que establecen los criterios de interpretación del antibiograma, permitiendo clasificar a los microorganismos en 3 categorías de respuesta clínica al tratamiento: sensible (S), intermedio (I) o resistente (R). Estas sociedades son la *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* y *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* (64,65). Clásicamente, un microorganismo era definido como sensible por un nivel de actividad antimicrobiana asociada con una alta probabilidad de éxito terapéutico; como intermedio, si el efecto terapéutico era incierto; y resistente, si existía una alta probabilidad de fracaso terapéutico. Sin embargo, en 2019, el EUCAST redefinió estas categorías haciendo énfasis en la relación entre la categoría clínica y el nivel de exposición al fármaco, que sobre todo afecta a la definición de la categoría intermedia. De esta manera, las nuevas categorías se redefinen como:

- Sensible, régimen de dosificación estándar: cuando hay una alta probabilidad de éxito terapéutico usando un régimen de dosificación estándar del agente antimicrobiano.
- Sensible cuando se incrementa la exposición (antes categoría intermedia): cuando hay una alta probabilidad de éxito terapéutico porque la exposición al agente está incrementada, por ajuste del régimen de dosificación o por su concentración en el lugar de la infección.
- Resistente: cuando existe una alta probabilidad de fracaso terapéutico incluso cuando hay un incremento de la exposición (66).

3.6.2 Historia del tratamiento y evolución de las resistencias

Antes de que los antimicrobianos llegaran a nuestras vidas, la infección gonocócica se combatía fundamentalmente mediante hábitos de vida saludables como una buena alimentación, un descanso adecuado, evitando el uso del alcohol y teniendo abstinencia sexual. A estos hábitos

también se le sumaban otros como el tratamiento sistémico con diferentes tipos de bálsamos, hipertermia, irrigaciones uretrales y compuestos químicos como el arsénico, el antimonio, el bismuto, el oro, la plata y el mercurio (3).

Tras la llegada de los primeros antibióticos durante la primera mitad del siglo XX, *N. gonorrhoeae* ha ido adquiriendo determinantes de resistencia a cada antimicrobiano que se usaba para combatir la infección. En la figura 7 (3) se puede apreciar la manera en la que se ha ido modificando el tratamiento de elección, en función de la adquisición de resistencias.

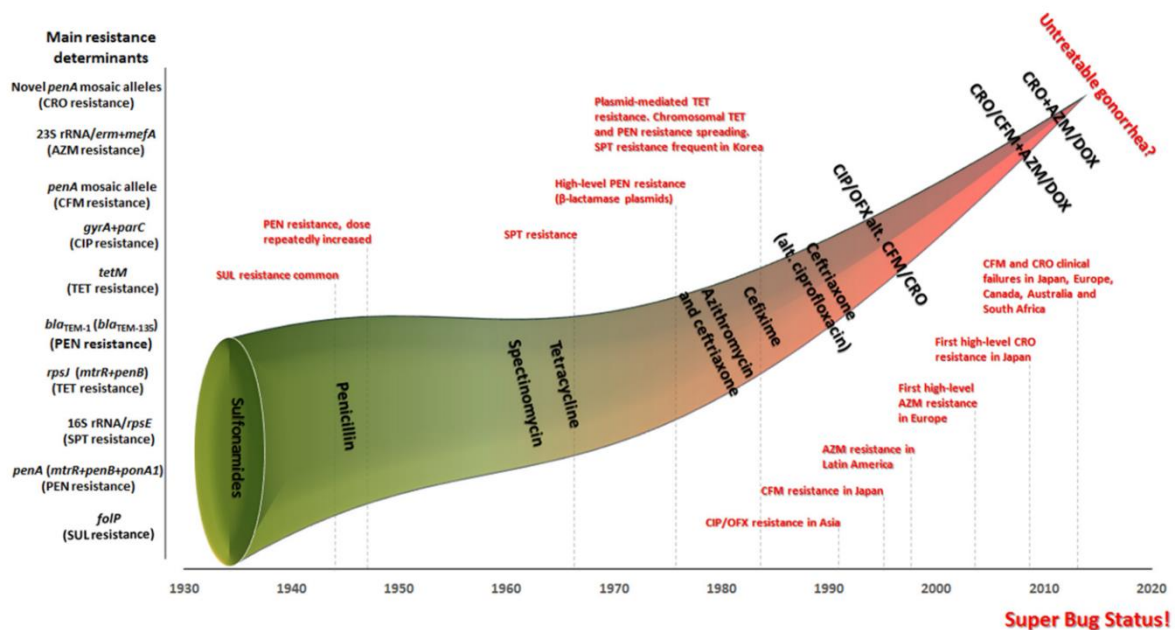


Figura 7. Historia del tratamiento antimicrobiano y la evolución de la aparición de resistencias en *N. gonorrhoeae*.

Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron los primeros antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la gonorrea. Inicialmente curaron del 80 al 90% de los casos, sin embargo, a finales de los años 40, más del 90% de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* mostraban resistencia *in vitro*. No obstante, el sulfametoxazol, en combinación con el trimetoprim, se siguió utilizando en países con pocos recursos durante décadas.

Penicilinas

A pesar de que la penicilina se descubrió en 1928 por Alexander Fleming, no fue hasta 1943 cuando se documentó como tratamiento eficaz de la uretritis gonocócica. La penicilina marcó un antes y un después tanto en el tratamiento de la gonorrea, como de otras enfermedades infecciosas y, tanto es así, que rápidamente sustituyó a las sulfonamidas como tratamiento de primera línea.

En los primeros años de implantación, la penicilina curaba más del 90% de las infecciones a dosis bajas (45 mg). Sin embargo, con el paso de los años, la acumulación de resistencias cromosómicas hizo aumentar sus CMI, incrementándose de este modo las dosis para obtener mayores tasas de curación. A partir de 1946, cuando se notificaron cuatro casos de resistencia a altas dosis (entre 0.6 y 1.6 millones de unidades) y durante las dos décadas siguientes, fue aumentando la proporción de cepas resistentes a penicilina. En 1976, se describieron dos tipos de betalactamasas plasmídicas que conferían resistencia de alto nivel a la penicilina pero, a pesar de esta situación, se siguió utilizando la penicilina como tratamiento de primera línea hasta que una década después, se abandonara como consecuencia de la aparición de resistencias mediadas por mecanismos cromosómicos. A día de hoy, es frecuente aislar cepas de gonococo con resistencia a penicilina mediada tanto por mecanismos cromosómicos como plasmídicos.

Espectinomicina

La estructura molecular de la espectinomicina se basa en el anillo aminociclitol que actúa sobre la subunidad 30S ribosomal, y está estrechamente relacionada con los aminoglicósidos. Este compuesto fue sintetizado y comercializado a principios de los años 60 como tratamiento específico de la gonorrea y se utilizó principalmente en los casos de resistencia de alto nivel a la penicilina. En la década de los años 80, se dejó de utilizar como tratamiento empírico de primera línea, ya que desde que en 1967 se publicara en Holanda la primera cepa de gonococo resistente a espectinomicina, se fueron sucediendo los casos de aislamientos resistentes en todo el mundo.

Asimismo, este fármaco no alcanza concentraciones óptimas en faringe, teniendo una eficacia en torno al 80%, por lo cual no estaría recomendado su uso en esta localización. No obstante, actualmente este compuesto no está disponible en España ni en otros países, por lo que las tasas de resistencia a espectinomicina permanecen bajas.

Tetraciclinas

Este grupo de antibióticos se introdujeron sobre todo en el tratamiento de la gonorrea en pacientes alérgicos a la penicilina. Como en el caso de la penicilina, las CMIs de las tetraciclinas se incrementaron como consecuencia de la acumulación de mutaciones cromosómicas, sin embargo, no fue hasta mediados de los años 80 cuando se detectaron a nivel internacional cepas con alto nivel de resistencia debido a la aparición de cepas de *N. gonorrhoeae* con el determinante *tetM* en el plásmido conjugativo. Este hecho fue el desencadenante de la eliminación de las tetraciclinas como tratamiento de la infección gonocócica en las guías clínicas de Estados Unidos y de otros países.

Quinolonas

En la segunda mitad de los años 80 las fluoroquinolonas, sobre todo el ciprofloxacino, se utilizaron ampliamente para el tratamiento de la infección gonocócica. En un primer momento se utilizaban dosis bajas de 250 mg, pero en 1990 ya se habían comunicado fallos terapéuticos. Posteriormente, la dosis se duplicó aunque rápidamente se detectaron cepas resistentes. A finales de los años 90, algunos países del Pacífico Occidental de Asia fueron los primeros en dejar de recomendar las fluoroquinolonas como tratamiento de primera línea. Las cepas de gonococo resistentes a ciprofloxacino no tardaron en diseminarse a nivel mundial y, en 2007, las guías clínicas del CDC dejaron de recomendar el ciprofloxacino como tratamiento de primera línea. En la actualidad, existe una elevada prevalencia de cepas de gonococo resistentes a fluoroquinolonas en todo el mundo.

Macrólidos

En 1980 se desarrolló la azitromicina pero, hasta esa fecha, ningún macrólido había mostrado eficacia en el tratamiento de la gonorrea. No obstante, a finales de la década de los 90, se notificaron cepas con sensibilidad disminuida y resistencia a la azitromicina en América Latina, donde este antibiótico se había usado con frecuencia en el tratamiento de otras ITS bacterianas. Posteriormente y de manera alarmante, se identificaron casos de gonococo con elevado nivel de resistencia (CMI \geq 256 mg/L) en Escocia, Inglaterra, Argentina, Italia, EEUU y Suecia (3).

La azitromicina en monoterapia no está recomendada en el tratamiento de *N. gonorrhoeae*. Sin embargo, se utiliza como parte del tratamiento en la terapia dual, junto con la ceftriaxona (38,40,67).

Cefalosporinas

Las cefalosporinas de amplio espectro, recomendadas en el tratamiento de la gonorrea, son la ceftriaxona intramuscular y la cefixima oral. En algunos países, cuando no se disponía de la cefixima, se utilizaron otras cefalosporinas orales como por ejemplo cefuroxima, cefditoreno, cefpodoxima y ceftibuteno.

Las primeras cepas de gonococo resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, surgieron en Japón a finales de los años 90 y de allí se propagaron por todo el mundo. Entre las causas de la aparición de la resistencia a las ESCs se sitúa el hecho de que en Japón, la ceftriaxona no se aprobó para tratar esta infección hasta finales de la década de 1990 y, en consecuencia, se utilizaron muchas cefalosporinas orales en dosis subóptimas, como por ejemplo cefixima de 300 mg en lugar de 400 mg, que podrían haber dado lugar a concentraciones subinhibitorias y, por tanto, haber seleccionado la resistencia a las cefalosporinas (68). Esto fue un caldo de cultivo para que las CMIs de cefixima y ceftriaxona fueran aumentando progresivamente, hasta ser resistentes y comenzaran a notificarse en muchos países fallos en el tratamiento con cefixima (3).

En el año 2010, la comunidad científica internacional se puso en alerta ante los primeros aislamientos de cepas extremadamente resistentes que poseían resistencias de alto nivel a todas las ESCs. La primera cepa se aisló de la faringe de una trabajadora del sexo en Kyoto. A esta cepa, que se le conoce como H041, mostraba una CMI a cefixima y ceftriaxona de 8 y 2 mg/L, respectivamente (8). La segunda cepa conocida como F89, se aisló de un exudado uretral en un paciente HSH de Francia. La F89 tenía una CMI a cefixima de 4 mg/L y a ceftriaxona de 2 mg/L (9). En mayo de 2011, se produjeron los primeros casos en España y más concretamente en Cataluña, donde se aislaron las cepas de una pareja HSH. El aislamiento uretral de un paciente y el rectal del otro, tenían una CMI a ceftriaxona de 1.5 mg/L (10).

Para mitigar la propagación de cepas resistentes y debido a que el uso de dos antimicrobianos con distintas dianas ralentiza la aparición de resistencias, las guías clínicas recomendaron como tratamiento de elección la terapia dual con ceftriaxona 250-500 mg por vía intramuscular junto con una dosis única de azitromicina 1-2 g por vía oral (38,40,67). Sin embargo, actualmente ya se han descrito casos de fracaso a la terapia dual (11,69,70).

En el año 2009, impulsado por la aparición de resistencias a las ESCs en *N. gonorrhoeae*, se definieron los términos de multirresistencia (*multidrug-resistance N. gonorrhoeae*, MDR-NG) y de cepas extremadamente resistentes (*extensively drug-resistance N. gonorrhoeae*, XDR-NG).

Para ello, se clasificaron los antibióticos en 3 categorías:

- Categoría I: antibióticos que se recomiendan generalmente en el tratamiento de la gonorrea. Se incluyen las ESC, tanto inyectables como orales, y la espectinomicina.
- Categoría II: antibióticos que se usan con menos frecuencia o se proponen para un uso más extenso. Estas son las penicilinas, las fluoroquinolonas, la azitromicina, los aminoglicósidos y los carbapenémicos.

- Categoría III: antibióticos que se han reemplazado o considerados como inadecuados. Ejemplo de ellos son el cloranfenicol, el tianfenicol, las tetraciclinas, la rifampicina, el trimetoprim sulfametoxazol y la eritromicina.

Las cepas MDR-NG son los aislamientos que son resistentes a un antibiótico de la categoría I y dos o más de la categoría II. En cambio, las XDR-NG son resistentes a dos o más antibióticos de la categoría I y tres o más de la categoría II (71).

La aparición de los gonococos XDR podría iniciar una nueva era en la cual la gonorrea no se pudiera tratar con los antibióticos disponibles, por lo que se han puesto en marcha programas de vigilancia antimicrobiana en muchos países, para estudiar la epidemiología de *N. gonorrhoeae* y poder detectar la aparición y diseminación de resistencias (3).

3.6.3 Mecanismos de resistencia

Como se ha mencionado anteriormente, *N. gonorrhoeae* posee una capacidad extraordinaria para adquirir o desarrollar resistencia a todos los antimicrobianos utilizados en su tratamiento. Esto lo consigue a través de cuatro mecanismos principales:

- Destrucción o modificación enzimática del antimicrobiano.
- Modificación de la diana terapéutica, que conduce a una disminución de la afinidad por el antimicrobiano.
- Disminución de la entrada del antimicrobiano al interior de la bacteria.
- Aumento del flujo de salida del antibiótico al exterior del microorganismo.

Mientras que la resistencia a determinados antimicrobianos está directamente relacionada con determinantes de resistencia concretos, otros requieren de un efecto acumulativo de varios mecanismos para lograr una resistencia clínicamente relevante (3,51).

La mayoría de los determinantes genéticos que confieren resistencia se sitúan a nivel cromosómico y sólo poseen un origen plasmídico los genes *bla*_{TEM} y *tetM*, los cuales confieren un alto nivel de resistencia a la penicilina y la tetraciclina, respectivamente. Por otro lado, *N. gonorrhoeae* ha demostrado tener una gran capacidad de transferencia horizontal de material genético, hecho que es muy relevante, ya que se sabe que la infección gonocócica faríngea, que en la mayoría de las ocasiones es asintomática, puede actuar como reservorio de resistencias debido a la adquisición de genes de resistencia procedentes de otras especies saprófitas de *Neisseria* de la orofaringe. Además, esta adquisición de genes no afecta al *fitness* biológico del microorganismo, por lo que las cepas multirresistentes persisten incluso en ausencia de presión antibiótica (3,30). En la tabla 3 (3,72), se resumen todos los mecanismos de resistencia en *N. gonorrhoeae*.

Resistencia a sulfonamidas

Esta familia de antibióticos de efecto bacteriostático, son análogos estructurales del ácido paraaminobenzoico (PABA), que utilizan las bacterias en la síntesis del ácido fólico. Las sulfonamidas compiten con el PABA en su unión a la dihidropteroato sintetasa (DHPS) (73). La resistencia a las sulfonamidas está mediada por dos mecanismos, la hiperproducción de PABA que diluye el efecto del antimicrobiano, o por mutaciones en el gen *folP* que codifica la DHPS. La alteración de esta enzima hace que disminuya de manera significativa su afinidad por las sulfonamidas (3).

Antibióticos	Mecanismos de resistencia
Sulfonamidas	Hiperproducción de PABA.
	Mutaciones en <i>folP</i> : acumulación de mutaciones puntuales o mutaciones en mosaico.
Penicilinas	Penicilinas plasmídica tipo TEM-1 o TEM-135.
	Mutaciones en <i>penA</i> : acumulación de mutaciones puntuales o mutaciones en mosaico.
	Polimorfismo de nucleótido único (SNP) en <i>penA</i> : alelo <i>penA1</i> (L421P).
	Mutaciones en <i>mtrR</i> : promotor (-35A) y en región codificante (A39T, G45D y codón de parada prematuro).
	SNPs en <i>porB/penB</i> : G120K, G120D y A121D.
	Mutaciones en <i>pilQ</i> , <i>penC</i> .
	“Factor X”: determinante de resistencia no transformable desconocido.
Tetraciclinas	Plásmido TetM.
	SNP en <i>rpsJ</i> (V57M).
	Mutaciones en <i>mtrR</i> : promotor (-35A) y en región codificante (A39T, G45D y codón de parada prematuro).
	SNPs en <i>porB/penB</i> : G120K, G120D y A121D.
Espectinomicina	SNP en 16S ARNr (C1192U).
	Mutaciones en <i>rpsE</i> : T24P, delección de V25 y K26E.
Quinolonas	SNPs en <i>gyrA</i> : S91F, D95N y D95G.
	SNPs en <i>parC</i> : D86N, S87I/N/R, S88P y E91A/K/G.
Azitromicina	SNPs en 23S ARNr (1-4 alelos): C2611Ty A2059G.
	Metilasas <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> y <i>ermF</i> .
	Mutaciones en <i>mtrR</i> : promotor (-35A) y en región codificante (A39T, G45D y codón de parada prematuro).
	Bomba de expulsión MacAB y la codificada por <i>mef</i> .
	Mutaciones en <i>rplD</i> y <i>rplV</i> que codifican las proteínas ribosomales L4 y L22, respectivamente.
Cefalosporinas	Mutaciones en <i>penA</i> : acumulación de mutaciones puntuales (A501V/T, G542S, P551L/S) o mutaciones en mosaico (A311V, I312M, V316T/P, T483S, A501V, N512Y, G545S).
	Mutaciones en <i>mtrR</i> : promotor (-35A) y en región codificante (A39T, G45D y codón de parada prematuro).
	SNPs en <i>porB/penB</i> : G120K, G120D y A121D.
	“Factor X”: determinante de resistencia no transformable desconocido.

Tabla 3. Mecanismos de resistencia en *N. gonorrhoeae*.

Resistencia a penicilinas

Los antibióticos betalactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas, bloquean la actividad transpeptidasa a través de la unión del anillo betalactámico con las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), de manera que disminuye la síntesis de peptidoglucano y la bacteria muere por efecto osmótico o digerida por enzimas autolíticas. Tiene, por tanto, efecto bactericida (3,73). La resistencia a las penicilinas puede ser plasmídica o cromosómica.

Parece ser que el origen de la resistencia plasmídica a penicilina en *N. gonorrhoeae*, proviene de la conjugación con *Haemophilus parainfluenzae* (3,74). Estos plásmidos que contienen el gen *bla*_{TEM1}, codifican la producción de una betalactamasa de tipo TEM-1 que hidroliza el anillo betalactámico y confiere una resistencia de alto nivel a este antibiótico. A día de hoy, no se han descrito betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en gonococo, sin embargo, sí que se ha encontrado el gen *bla*_{TEM-135}, que difiere en un solo nucleótido (SNP, polimorfismo de nucleótido único) de *bla*_{TEM-1} y que, si acumulara un SNP adicional, podría dar como resultado una BLEE que hidrolizaría también las ESCs (3).

La resistencia cromosómica está mediada por tres mecanismos: modificación de la diana, disminución de la entrada y aumento del flujo de salida del antimicrobiano.

Entre las mutaciones que producen alteración en la diana, se encuentran las mutaciones en el gen *penA*, que codifica la PBP2. Estas mutaciones fueron adquiridas por transformación con secuencias *penA* procedentes de otras especies comensales de *Neisseria*, las cuales poseen entre 5 a 9 mutaciones, lo que se traduce en la modificación de la tasa de acilación de esta proteína, produciendo una disminución entre 6 a 8 veces en la sensibilidad a la penicilina. Asimismo, en las últimas décadas se han descrito mutaciones en mosaico en el gen *penA* que contienen entre 60-70 cambios de aminoácidos y que confieren resistencia, tanto a las penicilinas como a las cefalosporinas.

Aunque la alteración de la enzima PBP2 es el principal mecanismo de resistencia cromosómica, las cepas de gonococos que tienen un elevado nivel de resistencia a penicilina también poseen una mutación de cambio de sentido en el gen *ponA*, que codifica la proteína PBP1 con el cambio aminoacídico Leu421Pro, reduciendo la acilación de la penicilina.

Otros mecanismos cromosómicos que aumentan las CMI, son el incremento de la expulsión activa del antibiótico. En la penicilina, esto se produce por mutaciones en el gen represor *mtrR* que da lugar a una sobreexpresión de la bomba de expulsión MtrCDE. La proteína MtrCDE pertenece a la familia de bombas RND (*resistance-nodulation-cell division*) y además de a la penicilina, también afecta a las cefalosporinas, las tetraciclinas y los macrólidos.

Por otro lado, la disminución de la permeabilidad del antibiótico también contribuye a la resistencia. En *N. gonorrhoeae*, mutaciones en el gen *porB*, también conocido como *penB*, disminuye la entrada del antibiótico a la célula a través de la porina PorB1b. Del mismo modo, las mutaciones en *pilQ*, que codifica para la secretina PilQ que participa en la formación de los pili, podrían estar asociadas al aumento de CMI.

Finalmente, parece ser que existe al menos un determinante, no transformable, de resistencia a la penicilina que aún se desconoce, el "Factor X", que puede aumentar las CMI entre 3 a 6 veces (3).

Resistencia a tetraciclinas

Las tetraciclinas realizan el efecto antimicrobiano mediante el bloqueo de la síntesis proteica, uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma e impidiendo la interacción de éste con el ARN de transferencia (ARNt) (3,73). Al igual que en el caso de las penicilinas, la resistencia puede ser cromosómica o estar mediada por elementos plasmídicos.

La resistencia plasmídica es debida al determinante *tetM*, que se describió por primera vez en el género *Streptococcus*. La proteína TetM, que posee una gran similitud con el factor de

elongación G (EF-G), se une a los ribosomas causando la liberación del antibiótico y permitiendo de esta manera que continúe la síntesis proteica. La proteína TetM confiere resistencia de alto nivel a las tetraciclinas (CMI \geq 16 mg/L).

La resistencia cromosómica es debida a la mutación V57M en el gen *rpsJ*, que provoca que la estructura de la proteína ribosomal S10 esté alterada y que disminuya su afinidad por las tetraciclinas. Además, otros factores que aumentan la resistencia a este antibiótico, al igual que en el caso de la penicilina, son las mutaciones en los genes *mtrR* y *porB* que aumentan la salida y disminuyen su entrada, respectivamente.

Resistencia a espectinomicina

La espectinomicina es un antibiótico bacteriostático que ejerce su actividad al unirse a la subunidad ribosomal 30S, más concretamente al 16S ARNr, inhibiendo la elongación peptídica, ya que bloquea al EF-G que cataliza la translocación del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P (3).

La resistencia de alto nivel (CMI > 1024 mg/L) está causada principalmente por la mutación C1192U en el 16S ARNr y por una supresión de Val25 y una alteración de K26E en la proteína ribosomal S5, codificada por el gen *rpsE*. Por otro lado, la alteración T24P en este gen confiere resistencia de bajo nivel a la espectinomicina (figura 8). Las distintas mutaciones en *rpsE* desestabilizan la unión del antibiótico al 16S ARNr (3,51,72).

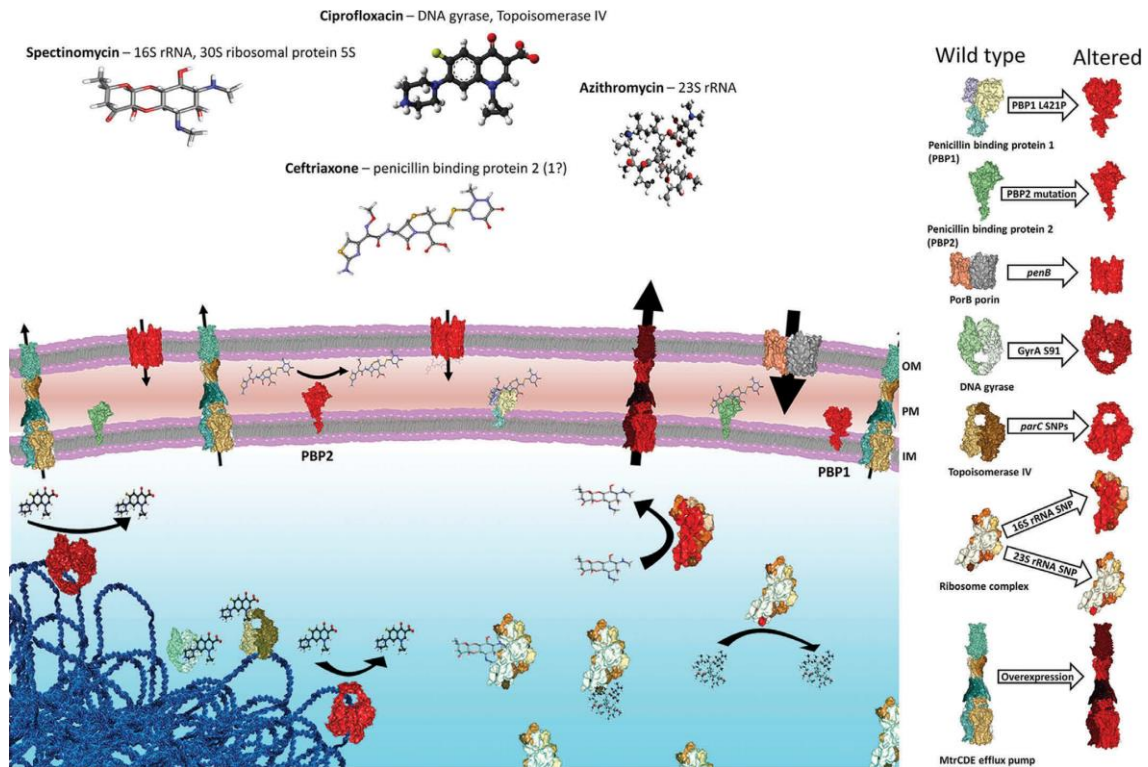


Figura 8. Principales dianas y mecanismos de resistencia a azitromicina, ciprofloxacino, espectinomycin y ESCs (72).

Resistencia a quinolonas

Esta familia de antibióticos con efecto bactericida actúa inhibiendo la ADN girasa y la topoisomerasa IV, enzimas esenciales en la replicación del ADN. Ambas enzimas son proteínas heterotetraméricas formadas por dos subunidades de GyrA y dos de GyrB, en el caso de la ADN girasa, y por dos subunidades de ParC y ParE, en la topoisomerasa IV.

La resistencia a las quinolonas se produce como consecuencia de mutaciones de efecto acumulativo que alteran el reconocimiento del antibiótico con las enzimas. Las principales mutaciones se encuentran en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA*. La mutación no sinónima GyrA S91F, causa niveles de resistencia de bajos a intermedios y si se produce una mutación adicional en el codón 95, aumenta aún más la CMI. Para que se produzca resistencia de alto nivel, se requieren mutaciones concomitantes en el gen *parC* (figura 8). Las mutaciones en los genes *gyrB* y *parE*, no parecen tener relevancia en la resistencia a las fluoroquinolonas (3,51).

Resistencia a azitromicina

Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos que actúan sobre la subunidad ribosomal 50S, liberando polipéptidos incompletos de manera que se inhibe la síntesis de proteínas. Esta familia de antibióticos interactúa con el 23S ARNr, por lo que se evita la translocación del peptidil-ARNt, bloqueando el canal de salida del péptido en la subunidad 50S.

Los mecanismos asociados a la resistencia de la azitromicina se producen como resultado de la alteración de la diana ribosomal, bien por metilación del 23S ARNr o por mutaciones específicas tanto en el 23S ARNr como en los genes *rpID* y *rpIV* que codifican las proteínas ribosomales L4 y L22, respectivamente. Asimismo, la resistencia se ve influida por un aumento del flujo de la salida del antibiótico debido a la sobreexpresión de bombas de expulsión (figura 8).

Las mutaciones específicas C2611T y A2059G en el ARNr 23S causan resistencia de bajo y alto nivel, respectivamente. No obstante, como *N. gonorrhoeae* tiene cuatro alelos, la CMI de azitromicina depende del número de alelos que posee esta mutación.

Las ARNr metilasas están codificadas por los genes *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC* y *ermF*) que se encuentran en transposones conjugativos. En ausencia de otros mecanismos de resistencia, confieren resistencia de alto nivel a eritromicina (CMI 4-16 mg/L) y de bajo nivel a azitromicina (CMI 1-4 mg/L).

La CMI a la azitromicina puede aumentar por la sobreexpresión de las bombas de expulsión MtrCDE, las MacAB (que pertenecen a la familia de las bombas ABC, ATP-binding cassette), y las codificadas por el gen *mef*, que se encuentra en un transposón conjugativo (3,72,75).

Resistencia a cefalosporinas

Al igual que en el caso de la resistencia cromosómica a la penicilina, el principal mecanismo de resistencia de *N. gonorrhoeae* a las cefalosporinas son alteraciones específicas en el gen *penA* que codifica PBP2. En concreto, el más implicado en la resistencia a las ESCs es el gen *penA* en

mosaico, que posee entre 60 y 70 cambios aminoacídicos (figura 8). Este mosaicismo se cree que surgió por transformación y posterior recombinación de genes *penA* procedentes de otras especies de *Neisseria* de la orofaringe como *N. perflava*, *N. sicca*, *N. polysaccharea*, *N. cinerea* y/o *N. flavescens*. La adquisición del gen *penA* en mosaico produce un mayor incremento de CMI a cefixima que a ceftriaxona.

En aislamientos de gonococo con sensibilidad disminuida y resistencia a cefixima, las alteraciones G545S, I312M y V316T parecen estar implicadas en el aumento de CMI, sin embargo, estas tres mutaciones necesitan de otras compensatorias para restablecer la actividad transpeptidasa. Asimismo, se han descrito otras mutaciones como A501V, N512Y, G542S y P551S/L, que también están asociadas con aumentos de CMIs a las ESCs.

A diferencia del alelo X en mosaico, relacionado con la mayoría de casos de resistencias y fracasos de tratamiento con cefixima en Japón, la cepa XDR H041 contenía 12 cambios aminoacídicos, aunque sólo 3 de ellos (A311V, V316P y T483S) eran los responsables del aumento significativo de las CMIs de cefixima y ceftriaxona, produciendo una disminución en su tasa de acilación. Por otro lado, las cepas XDR aisladas en Francia y en Cataluña presentaban el alelo XXXIV en mosaico, el cual contenía un cambio adicional (A501P) que provocaba cambios en la estructura secundaria de la proteína, que impedía la unión de las cefalosporinas a la PBP2.

Además de las mutaciones en la PBP2, las producidas en *mtrR* y *porB* provocan un aumento del flujo de salida y una disminución de la entrada de las ESCs, respectivamente. Sin embargo, en estos casos está más afectada la CMI de ceftriaxona que la de cefixima.

Al contrario que para la penicilina, parece que las mutaciones en *ponA* (L421P) y en *pilQ* (E666K) no afectan a las CMIs de las cefalosporinas, aunque no se puede descartar del todo su posible contribución. Por último, parece ser que podría existir un "Factor X" no transformable que como para la penicilina, podría aumentar las CMIs a las cefalosporinas (3,72).

3.6.4 Regímenes de tratamiento actual

El tratamiento tiene como objetivo eliminar la infección, evitar las complicaciones y reducir la transmisión a las parejas sexuales y al recién nacido en mujeres embarazadas. Posee, por tanto, un beneficio clínico y de salud pública, lo que justifica instaurar un tratamiento empírico ante una sospecha de gonorrea. Además, es importante y recomendable realizar el tratamiento *in situ* para garantizar la adherencia (30). Las actuales recomendaciones de tratamiento de las principales guías clínicas se resumen en las tablas 4-8 (30,38,40,76–79).

Una vez suministrado el tratamiento, se recomienda realizar un control microbiológico para asegurar la curación y romper la cadena de transmisión. El test de cura se recomienda en cualquier localización, aunque es prioritario realizarlo ante una infección faríngea, persistencia de síntomas, tratamiento de segunda línea, cuando se sospeche una mala adherencia al tratamiento, en reinfecciones y en casos de probable adquisición en áreas de alta resistencia como el Sudeste Asiático. El test de cura se puede realizar 3 semanas post-tratamiento mediante TAANs o pasados al menos 3 días por cultivo bacteriano. No obstante, en caso de fracaso terapéutico se debe realizar siempre cultivo y antibiograma (30).

Por otro lado, deben estudiarse las parejas sexuales del paciente de los 2-3 meses previos al inicio de los síntomas, o en el caso de los pacientes asintomáticos, se debe tener en cuenta la fecha de la toma de la muestra. Aunque si la última pareja fue hace más de 3 meses, también deberá ser evaluada. La excepción se produce en los pacientes con uretritis sintomáticas, en las que el estudio de contactos se puede limitar a los 15 días previos al inicio de los síntomas, pero si la última pareja sexual fue anterior a este periodo, también ha de incluirse.

El tratamiento del contacto deberá ser el mismo que el del paciente y además, habrá que recordar tanto al paciente como al contacto, mantener abstinencia sexual hasta 7 días después de recibirlo. Para evitar tratamientos innecesarios, si las relaciones sexuales se han producido pasadas 2 semanas, se podrán tratar únicamente en función de los resultados de las pruebas

diagnósticas. Sin embargo, si el contacto sexual fue antes de las 2 semanas, se puede ofrecer a los contactos sexuales asintomáticos tratamiento epidemiológico, es decir, tratamiento antes de obtener el resultado del laboratorio, ya que en ese período la negatividad de las TAANs puede no descartar la infección. Si estos casos no recibieran tratamiento epidemiológico deberían volver a ser estudiados pasado este período ventana (30,38,40,76). A parte del cribado de la gonorrea, se les realizará el despistaje de otras ITS como la clamidia, la sífilis, el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y las hepatitis víricas y se actualizarán en caso necesario, las vacunas frente al Virus de la hepatitis A (VHA), el Virus de la hepatitis B (VHB) y el Virus del papiloma humano (VPH) en población de riesgo (30).

Guías clínicas	Tratamiento infección gonocócica no complicada en uretra, cérvix o recto	
	De elección	Alternativo
Europea 2012	Ceftriaxona 500mg im MD + Azitromicina 2g vo MD	<ul style="list-style-type: none"> • Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD ^a. • Ceftriaxona 500mg im MD ^b. • Espectinomomicina 2g im MD + Azitromicina 2g vo MD ^c. • Ciprofloxacino 500mg vo MD u Ofloxacino 400mg vo MD ^d. • Azitromicina 2g vo MD ^e.
CDC 2015	Ceftriaxona 250mg im MD + Azitromicina 1g vo MD	<ul style="list-style-type: none"> • Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 1g vo MD ^a. • Doxiciclina 100mg/12h vo (7 días)+ Ceftriaxona/Cefixima ^f. • Gemifloxacino 320mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD ^c. • Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD ^c. • Espectinomomicina 2g im MD + Azitromicina 2g vo MD ^c.
WHO 2016	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250mg im MD + Azitromicina 1g vo MD. • Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 1g vo MD. 	<p><u>Monoterapia (dependiendo de las resistencias locales).</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250mg im MD. • Cefixima 400mg vo MD. • Espectinomomicina 2g im MD.
GESIDA 2017	Ceftriaxona 500mg im MD + Azitromicina 1g vo MD (2g en proctitis)	<ul style="list-style-type: none"> • Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD ^a. • Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD ^g. • Gemifloxacino 320mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD.
BASHH 2019	<p><u>Si se conoce el antibiograma:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ciprofloxacino 500mg vo MD ^d <p><u>Si se desconoce el antibiograma:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g im MD 	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g im MD + Azitromicina 2g vo MD ^h. • Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD ^h. • Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD ^{h,c}. • Azitromicina 2g vo MD ^e. • Espectinomomicina 2g im MD + Azitromicina 2g vo MD ^{h,c}.

Tabla 4. Recomendaciones de tratamiento de infección gonocócica no complicada en uretra, cérvix o recto. BASHH, *British Association for Sexual Health and HIV*; im, intramuscular; vo, vía oral; MD, monodosis. ^a En caso de rechazo de tratamiento im o no disponibilidad de ceftriaxona. ^b En caso de embarazo/lactancia o no disponibilidad de azitromicina. ^c En alergia o resistencia a cefalosporinas. ^d Si *N. gonorrhoeae* es sensible a fluoroquinolonas. ^e Si *N. gonorrhoeae* es sensible a macrólidos o en alergia a cefalosporinas. ^f En alergia a azitromicina. ^g En alergia a penicilinas. ^h En fallos de tratamiento.

Guías clínicas	Tratamiento infección gonocócica de faringe.	
	De elección	Alternativo
Europea 2012	Ceftriaxona 500mg im MD + Azitromicina 2g vo MD	<ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 500mg im MD ^a. Ciprofloxacino 500mg vo MD u Ofloxacino 400mg vo MD o Azitromicina 2g vo MD ^b.
CDC 2015	Ceftriaxona 250mg im MD + Azitromicina 1g vo MD	
WHO 2016	<ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 250mg im MD + Azitromicina 1g vo MD. Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 1g vo MD. 	<u>Monoterapia (dependiendo de las resistencias locales).</u> <ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 250mg im MD.
GESIDA 2017		
BASHH 2019	<u>Si se conoce el antibiograma:</u> <ul style="list-style-type: none"> Ciprofloxacino 500mg vo MD ^c <u>Si se desconoce el antibiograma:</u> <ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 1g im MD 	<ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 1g im MD + Azitromicina 2g vo MD ^d. Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD ^d. Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD ^d. Azitromicina 2g vo MD ^e.

Tabla 5. Recomendaciones de tratamiento de la infección gonocócica en faringe. im, intramuscular; vo, vía oral; MD, monodosis. ^a Si no hay disponibilidad de azitromicina. ^b En alergia a cefalosporinas. ^c Si *N. gonorrhoeae* es sensible a fluoroquinolonas. ^d En fallos de tratamiento. ^e Si *N. gonorrhoeae* es sensible a macrólidos o en alergia a cefalosporinas.

Guías clínicas	Tratamiento infección gonocócica resistente a ESCs o en fallos de tratamiento.
Europea 2012	<ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 1g im MD + Azitromicina 2g vo MD. Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD. Espectinomomicina 2g im MD + Azitromicina 2g vo MD (excepto en infecciones faríngeas).
CDC 2015	<ul style="list-style-type: none"> Gemifloxacino 320mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD. Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD. Espectinomomicina 2g im MD + Azitromicina 2g vo MD (excepto en infecciones faríngeas).
WHO 2016	<ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 500mg im MD + Azitromicina 2g vo MD. Cefixima 800mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD. Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD. Espectinomomicina 2g im MD + Azitromicina 2g vo MD (excepto en infecciones faríngeas).
GESIDA 2017	<ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 1g im MD + Azitromicina 2g vo MD. Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD.
BASHH 2019	<ul style="list-style-type: none"> Ceftriaxona 1g im MD + Azitromicina 2g vo MD. Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 2g vo MD. Gentamicina 240mg im MD + Azitromicina 2g vo MD. Espectinomomicina 2g im MD + Azitromicina 2g vo MD (excepto en infecciones faríngeas).

Tabla 6 Recomendación de tratamiento de la infección gonocócica resistente a ESCs o en fallos de tratamiento. im, intramuscular; vo, vía oral; MD, monodosis

Guías clínicas	Tratamiento otras infecciones gonocócicas en adultos	
Conjuntivitis		
Europea 2012	<u>De elección</u> Ceftriaxona 500mg/24h im 3 días.	<u>Alternativo</u> • Espectinomocina 2g/24h im 3 días. • Azitromicina 2g vo MD + Doxiciclina 100mg/12h 7 días + Ciprofloxacino 250mg/24h 3 días.
CDC 2015	Ceftriaxona 1g im MD + Azitromicina 1g vo MD.	
WHO 2016 GESIDA 2017		
BASHH 2019	Ceftriaxona 1g im MD.	
Orquiepididimitis		
Europea 2012	<u>De elección</u> • Ceftriaxona 500mg im MD + Doxiciclina 100mg/12h vo 10-14 días.	<u>Alternativo</u> • Ciprofloxacino 500mg vo MD + Doxiciclina 100mg/12h vo 10-14 días.
CDC 2015 WHO 2016 GESIDA 2017		
BASHH 2019	Ceftriaxona 1g im MD + régimen local recomendado para el tratamiento.	
EPI		
Europea 2012	Ceftriaxona 500mg im MD + Doxiciclina 100mg/12h vo 14 días + Metronidazol 400mg/12h vo 14 días.	
CDC 2015 WHO 2016 GESIDA 2017		
BASHH 2019	Ceftriaxona 1g im MD + régimen local recomendado para el tratamiento.	
IGD		
Europea 2012	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g/24h iv o im 7 días. • Espectinomocina 2g/12h im 7 días. (Pasarse a oral tras 1-2 días de mejoría: cefixima 400mg/12 vo o, si sensibles, ciprofloxacino 500mg/12h u Ofloxacino 400mg/12h).	
CDC 2015	Artritis y síndrome artritis-dermatitis	
	<u>De elección</u> • Ceftriaxona 1g/24h iv o im 7 días + Azitromicina 1g vo MD. (Pasarse a oral tras 1-2 días de mejoría hasta un total de 7 días).	<u>Alternativo</u> • Cefotaxima/Ceftizoxima 1g/8h iv MD 7 días + Azitromicina 1g vo MD. (Pasarse a oral tras 1-2 días de mejoría hasta un total de 7 días).
	Meningitis y endocarditis Ceftriaxona 1-2g/12-24h iv (10-14 días en meningitis y 4 semanas en endocarditis) + Azitromicina 1g vo MD.	
WHO 2016 GESIDA 2017		
BASHH 2019	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g/24h iv o im 7 días. • Cefotaxima 1g/8h iv 7 días. • Ciprofloxacino 500mg/12h si sensible a ciprofloxacino 7 días. • Espectinomocina 2g/12h im 7 días. (Pasarse a oral tras 1-2 días de mejoría: cefixima 400mg/12 vo o, si sensibles, ciprofloxacino 500mg/12h u Ofloxacino 400mg/12h).	

Tabla 7. Recomendación de tratamiento de otras infecciones gonocócicas en el adulto.
im, intramuscular; iv, intravenoso; vo, vía oral; MD, monodosis

Guías clínicas	Tratamiento infección gonocócica en niños	
<i>Ophthalmia neonatorum</i>		
Europea 2012 CDC 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 25-50mg/kg iv o im MD (máx. dosis 125 mg). 	
WHO 2016	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 50 mg/kg im MD (máx. dosis 150mg). • Kanamicina 25mg/kg im MD (máx. dosis 75mg). • Espectinomicina 25mg/kg im MD (máx. dosis 75mg). 	
GESIDA 2017		
BASHH 2010	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 25-50mg/kg iv o im MD (máx. dosis 125 mg). • Cefotaxima 100mg/kg IM MD (máx. dosis 1g). 	
Vulvovaginitis, cervicitis, uretritis, proctitis y faringitis		
Europea 2012 WHO 2016		
CDC 2015 GESIDA 2017	<u>Peso ≤45 kg</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 25-50mg/kg iv o im MD (máx. dosis 125 mg). 	<u>Peso >45 kg</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250mg iv MD + Azitromicina 1g vo MD. • Cefixima 400mg vo MD + Azitromicina 1g vo MD.
BASHH 2010	<u>Peso ≤45 kg (≤12 años)</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 125mg/kg im MD. • Espectinomicina 40mg/kg im MD (máx. dosis 2g), excepto en faringe. 	<u>Peso >45 kg (>12 años)</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250mg iv MD. • Cefixima 400mg vo MD. • Espectinomicina 2g im MD, excepto en faringe.
Bacteriemia y artritis		
Europea 2012 WHO 2016 BASHH 2010		
CDC 2015 GESIDA 2017	<u>Peso ≤45 kg</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 50mg/kg/24h iv o im (máx. dosis 1g) 7 días. 	<u>Peso >45 kg</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g/24h iv o im 7 días.
IGD y abscesos en cuero cabelludo del recién nacido		
Europea 2012 WHO 2016 GESIDA 2017 BASHH 2010		
CDC 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 25-50mg/kg/24h iv o im 7 días (10-14 si meningitis). • Cefotaxima 25mg/kg/24h iv o im 7 días (10-14 si meningitis). 	

Tabla 8. Recomendación de tratamiento de la infección gonocócica en niños. im, intramuscular; iv, intravenoso; vo, vía oral; MD, monodosis

3.6.5 Perspectivas futuras de tratamiento

En 2017, debido a la aparición de resistencias y a los casos de fracaso al tratamiento de primera línea, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó a *N. gonorrhoeae* entre los patógenos con un nivel de prioridad alta para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos (13). Hasta que no se produzca la introducción de nuevos antimicrobianos, las estrategias de

tratamiento deberán basarse en la combinación de múltiples fármacos, volver a utilizar antibióticos previamente usados para tratar la infección y frente a los que haya disminuido el nivel de resistencia o antimicrobianos existentes que no se hayan utilizado con el microorganismo (80,81).

Las guías clínicas de tratamiento de la gonorrea recomiendan como tratamientos alternativos o en casos de resistencia a cefalosporinas, las combinaciones de antibióticos como la gentamicina o el gemifloxacino en combinación con azitromicina (38,40,76,77).

Aunque actualmente no existen puntos de corte para la gentamicina, este antibiótico, junto con la doxiciclina, se han usado ampliamente desde 1993 en el tratamiento sindrómico de la uretritis en Malawi, sin reportar un aumento en el número de fracasos terapéuticos (82). En el ensayo clínico G-TOG en el que se evaluó la combinación de la gentamicina 240 mg im MD junto con la azitromicina 1 g vo MD, se demostró una no inferioridad terapéutica respecto al tratamiento estándar de ceftriaxona y azitromicina (83). Además, se ha visto que en los pacientes a los que se les suministraron estos fármacos, se ha logrado la cura microbiológica en el 100% de los casos (95% IC: 98.5–100%). Por otro lado, las combinaciones de gemifloxacino con azitromicina, han mostrado resultados muy similares de ratios de curación (99.5%, 95% IC: 97.6–100%) (84).

El ertapenem es un carbapenem que tiene actividad *in vitro* contra cepas de gonococo (85,86) y que ya ha sido utilizado para tratar casos de XDR en Reino Unido (70). Asimismo, la fosfomicina también podría ser una buena candidata, ya que muestra una buena distribución de CMI_s (87) y ha demostrado una no inferioridad terapéutica en uretritis no complicadas, en comparación al tratamiento dual de primera línea (88). Dentro de las fluoroquinolonas de cuarta generación, sitafloxacino y sobre todo delafloxacino, muestran buena actividad *in vitro* (80), habiéndose evaluado éste último en un ensayo clínico en fase III con buenos resultados (89).

Recientemente, se ha publicado el resultado de un ensayo clínico con solitromicina en el que los resultados no han sido favorables (90) y actualmente, la zoliflodacina y la gepotidacina se están

evaluando en ensayos clínicos (80). Además, hay otras moléculas que muestran buena actividad frente a *N. gonorrhoeae in vitro* y que podrían ser buenas candidatas para el futuro: eravaciclina (TP-434), dalbavancina, los nuevos carbapenémicos SM-295291 y SM-369926, en otras (3,80).

Debido a la elevada incidencia de la gonorrea y al aumento de cepas con resistencias a múltiples antibióticos, existe una urgencia cada vez mayor de desarrollar una vacuna contra este patógeno. Sin embargo, dado que esta bacteria posee una elevada variabilidad antigénica y de fase, hasta la fecha el desarrollo de una vacuna gonocócica no ha tenido éxito. Sólo cuatro vacunas han progresado a ensayos clínicos (de células completas, parcialmente autolisadas, basadas en los pili y basadas en la porina), aunque ninguna proporcionó protección (91,92).

Sin embargo, se ha abierto una posible vía de investigación al realizarse un estudio retrospectivo en Nueva Zelanda, en el que se vio que la inoculación con la vacuna compuesta por vesículas de membrana externa (MeNZB) frente a *Neisseria meningitidis* del serogrupo B, parece estar asociada con una probabilidad significativamente menor de contraer gonorrea en comparación con los no vacunados. Aunque la vacuna MeNZB ya no está disponible, estas vesículas de membrana externa forman parte también de la composición de la vacuna 4CMenB frente a *N. meningitidis* del serogrupo B, distribuida en varios países bajo el nombre comercial Bexsero. Dichos hallazgos, proporcionan evidencia experimental de que estas vacunas podrían ofrecer una moderada protección cruzada por un mecanismo desconocido de protección inmunológica en las mucosas, lo que abre nuevas vías de investigación y desarrollo de vacunas contra *N. gonorrhoeae* (92–94).

3.7 Epidemiología

La incidencia global de la gonorrea y de otras ITS es difícil de cuantificar debido a que no todos los países tienen sistemas de notificación de casos. Pese a esto, la OMS estimó que en 2016 el número de nuevos casos de gonorrea era de 86.9 millones en población adulta (1).

En España, la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) articula la vigilancia integrando la notificación y la investigación epidemiológica de las enfermedades de declaración obligatoria. En 2016, se notificaron un total de 6456 casos de infección gonocócica, lo que supone una incidencia de 13.89 casos por 100000 habitantes, superior a la de años previos (figura 9).

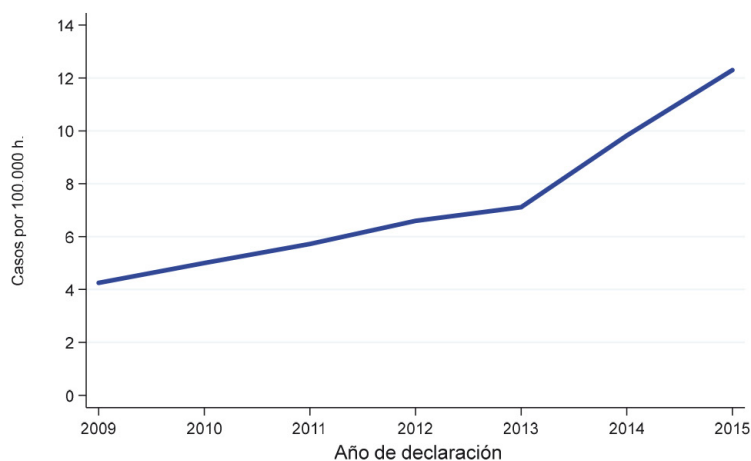


Figura 9. Incidencia de la infección gonocócica entre 2009 y 2015 en España.

Las tasas más elevadas se registraron en Cataluña (28.97), Asturias (28.14), Madrid (23.58) y Baleares (15.82). Las más bajas se notificaron en Murcia (2.04), Castilla La Mancha (2.54), Melilla (3.55) y Castilla y León (3.56) (figura 10). Los datos aportados por la notificación individualizada muestran una mayor afectación de las personas entre 25 y 34 años y de los hombres (83.7%) (95).

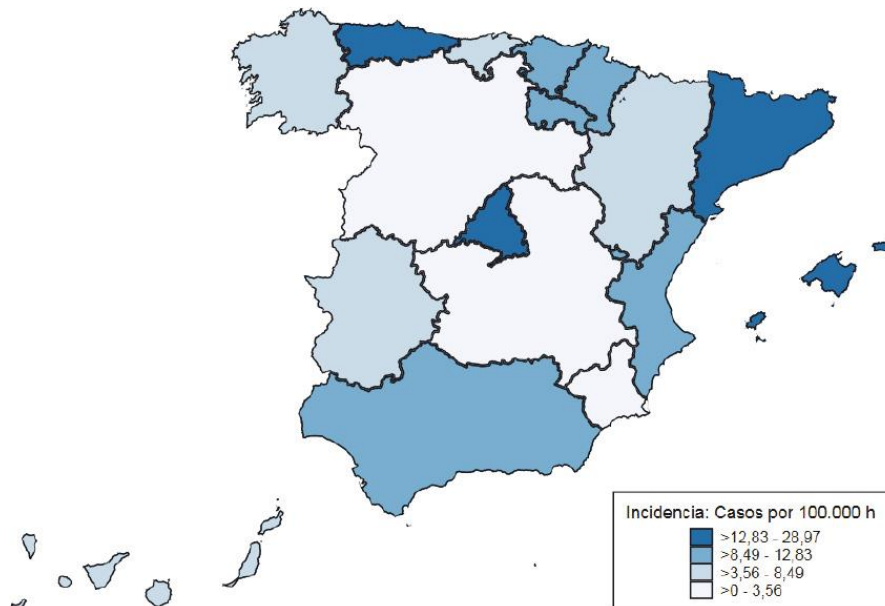


Figura 10. Incidencia de la gonorrea en 2016 por comunidades autónomas.

En Europa, según los datos del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), en 2017 28 países notificaron un total de 89239 casos (tasa de 22.2 por 100000 habitantes), aumentando el número de casos en un 17% respecto al año previo. Las tasas más elevadas corresponden al Reino Unido (75 por 100000), que reportó el 55% de los casos, seguido de Irlanda (47), Dinamarca (33), Islandia (29), Noruega (27) y Suecia (25) (figura 11). La infección gonocócica fue más frecuente en hombres que en mujeres, con una proporción 3.2:1 y el 47% de los casos fueron en HSH (96).

Sólo en Estados Unidos, durante 2017 se registraron un total de 170.6 casos por 100000 habitantes, lo que supone una cifra de 555608 casos anuales y un incremento del 18.6% respecto a 2016 (97).

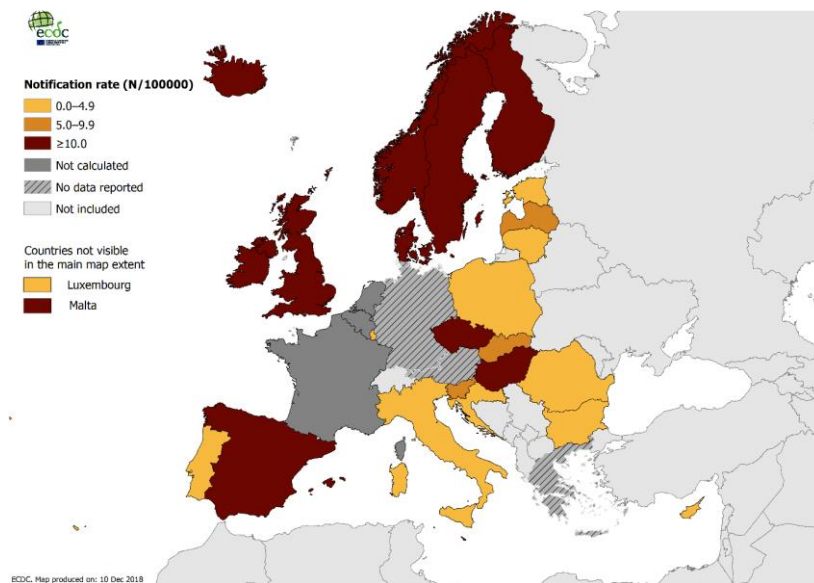


Figura 11. Distribución por países de los casos de gonorrea por cada 100000 habitantes en Europa, 2017.

3.8 Factores de riesgo

La gonorrea al igual que el resto de ITS, se transmite y mantiene por los grupos *core*, que incluyen a personas con infecciones de repetición, con un alto número de parejas sexuales, que ejercen la prostitución y que además, se concentran geográficamente. En definitiva, estos grupos en gran medida y de manera desproporcionada, son los responsables de mantener la transmisión en la población (98,99). Las principales características sociales y conductuales de los pacientes con gonorrea son:

- Género masculino.
- HSH.
- Edad comprendida entre los 20 y los 35 años (96,97,100,101).
- Ejercer la prostitución (98,102).
- Uso de drogas recreacionales (103,104).
- Tener relaciones sexuales desprotegidas (100,101,105).
- Múltiples parejas sexuales (101).

- Coinfecciones con otras ITS (101,105).
- Antecedentes de gonorrea y de otras ITS (101,105,106).

Es importante detectar los grupos *core* dentro de la población y definir los factores de riesgo o las características que comparten estas personas, con el fin de poder detectar redes de transmisión y así realizar programas de prevención. Al mismo tiempo, también es importante estudiar la asociación con la resistencia antibiótica para poder actualizar las guías locales de tratamiento antibiótico.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es obtener un conocimiento detallado de las características de la infección gonocócica en un centro especializado en infecciones de transmisión sexual en Madrid, mediante el análisis epidemiológico, de dinámica poblacional y del perfil de sensibilidad antibiótica de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas durante los meses de julio a octubre de 2016. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Describir las características sociodemográficas, conductuales y clínicas de los pacientes con infección gonocócica en la población de estudio.
2. Determinar el perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* a los distintos antibióticos recomendados en su tratamiento o que podrían ser una opción en el futuro: penicilina, cefixima, ceftriaxona, azitromicina, ciprofloxacino, tetraciclina, espectinomicina y gentamicina; comparándose la categorización de los aislados en función de la interpretación de los puntos de corte utilizados y recomendados por EUCAST y CLSI.
3. Detectar y analizar potenciales factores de riesgo asociados con la gonorrea resistente a antimicrobianos.
4. Caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la resistencia antimicrobiana mediante la secuenciación del genoma completo, SGC.
5. Estudiar la dinámica poblacional mediante las técnicas de tipado molecular NG-MAST y las basadas en la información de la SGC: wgMLST, wgNG-MAST y wgNG-STAR.
6. Comparar las distintas herramientas de tipificación molecular.

**MATERIAL
Y
MÉTODOS**

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio retrospectivo realizado durante julio a octubre de 2016 en el que por un lado, la recogida de las muestras y los datos clínicos de los pacientes se realizaron en un centro especializado en ITS y por otro lado, la parte experimental, basada en la epidemiología molecular y la sensibilidad antimicrobiana, así como el análisis de los resultados, se llevó a cabo en el Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III.

Este estudio se realizó respetando los principios y las normas éticas básicas que tienen su origen en la actual revisión de la Declaración de Helsinki aprobada por la Asamblea Médica Mundial (107). Asimismo, fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario La Princesa (Madrid) en su reunión del día 10 de Noviembre de 2016, con número de registro 2923* (Anexo I).

5.2 Selección de cepas

Durante el periodo de 4 meses comprendido entre julio y octubre de 2016, se diagnosticaron mediante PCR positiva un total de 360 muestras con infección gonocócica. De éstas, 211 muestras tuvieron el cultivo positivo. En el estudio, se realizó una selección aleatoria en una proporción aproximada 1:1, de 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de 94 pacientes atendidos en el Centro Sanitario Sandoval, en Madrid.

El Centro Sanitario Sandoval es una clínica ambulatoria, monográfica y de referencia en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las ITS. Este centro da cobertura a más de 30000 pacientes al año y posee unas características asistenciales peculiares que proporcionan una gran accesibilidad, ya que funciona sin cita previa y ofrece un servicio gratuito y anónimo. Estas

características han facilitado el acceso a poblaciones vulnerables o grupos *core* y han permitido que esta clínica se consolide como un centro centinela para la vigilancia epidemiológica de las ITS no sólo en la Comunidad de Madrid, sino en toda España.

5.3 Características sociodemográficas, clínicas y conductuales de los pacientes

Se incluyeron los datos sobre las características sociodemográficas, clínicas y conductuales de los pacientes de los que se obtuvieron los aislamientos de *N. gonorrhoeae* seleccionados para el estudio. El tratamiento de dichos datos se realizó de forma codificada.

La recogida de los datos se llevó a cabo mediante la revisión de las historias clínicas y en el caso de estar disponibles, mediante el cuestionario sociodemográfico y de evaluación de riesgo para las ITS (Anexo II). Éste se realiza con el fin de establecer las pruebas analíticas y microbiológicas pertinentes y realizar consejo preventivo. En ningún momento se entrevistó a los pacientes ni existió compensación económica.

Las variables incluidas en el estudio se describen a continuación:

Variables sociodemográficas:

- Edad.
- Género: masculino o femenino.
- País de origen.
- Nivel de estudios: primarios, secundarios, superiores o desconocidos.

Variables conductuales:

- Orientación sexual: HSH, heterosexuales y bisexuales.
- Trabajadores del sexo: sí o no.
- Usuarios de drogas inyectadas (UDI): sí o no.

- Uso de drogas recreacionales: sí o no. En caso afirmativo, el tipo de tóxico utilizado.
- Número de parejas sexuales en el último año: ≤5, 6-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, >50 y desconocido.
- Prácticas sexuales protegidas o desprotegidas.

Variables clínicas:

- Fecha de la toma de la muestra.
- Localización de la infección: uretra, cérvix, faringe o recto.
- Sintomatología: sí o no. En caso afirmativo, el tipo de síntomas.
- Tratamiento.
- Test de cura: sí o no. En caso afirmativo, fecha del control y resultado del mismo.
- Seroestatus del VIH: positivo o negativo.
- Coinfección con otras ITS: sí o no. En caso afirmativo, el tipo de infección concomitante.
- ITS en el último año: sí o no. En caso afirmativo, el tipo de infección sufrida.

5.4 Procesamiento inicial de las muestras

Las muestras fueron recogidas por el personal de enfermería del centro. En la propia consulta con el paciente todavía presente, se realizó una extensión en un portaobjetos, la siembra y la recogida de muestras para PCR.

Las muestras se recogieron con torundas de rayón o dacrón y se inocularon inmediatamente en placas de agar Thayer-Martin (bioMérieux). Posteriormente, se incubaron durante 48-72 horas a una temperatura de 35-37°C y con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, revisándolas diariamente.

A todos los pacientes se les recogieron muestras para PCR de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* utilizando las torundas suministradas por el kit y posteriormente, se hizo la PCR RealTime CT/NG (Abbott).

Asimismo, sólo para las muestras genitales, se realizó una extensión en un portaobjetos para la realización de la tinción de Gram. En el laboratorio, tras realizar la tinción, se observaron las muestras al microscopio con aceite de inmersión a 1000 aumentos. En exudados uretrales, la presencia de PMNs y diplococos Gram negativos intraleucocitarios, nos proporcionó un diagnóstico de uretritis gonocócica. En el caso de los exudados endocervicales, hubo que esperar al cultivo o a la PCR para obtener el diagnóstico.

5.5 Identificación de *N. gonorrhoeae*

Ante la presencia de colonias que por tamaño, forma y aspecto eran compatibles con *N. gonorrhoeae*, se realizó la identificación presuntiva mediante la prueba de la oxidasa positiva (Oxoid) y con la observación al microscopio de diplococos Gram negativos realizada a partir del cultivo. A continuación, se detalla la metodología de estas pruebas:

- Detección de la citocromo oxidasa: se extienden 1-2 colonias sobre una tira reactiva impregnada con N,N,N',N-tetrametil-p-diclorofenilendiamina y tras unos segundos, si el microorganismo posee la enzima citocromo oxidasa, se observa un color azul en la zona inoculada (figura 3).
- Tinción de Gram:
 - 1) En un portaobjetos, se resuspenden 1-2 colonias en solución salina o agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente.
 - 2) Se fija la preparación a la llama con un mechero.

- 3) Se cubre el frotis con cristal violeta durante 1 minuto y se lava con agua.
- 4) Se agrega como mordiente el lugol durante 1 minuto y se lava con agua.
- 5) Se decolora la muestra añadiendo alcohol acetona durante 15-30 segundos y se vuelve a lavar con agua.
- 6) Se agrega safranina como tinción de contraste y se incuba durante 1 minuto.
Posteriormente, lavar con agua y dejar secar.

Finalmente, la identificación definitiva se llevó a cabo por medio de la batería de pruebas bioquímicas API NH (bioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante, y tras presentar positiva la acidificación de la glucosa y de la prolina aminopeptidasa (perfiles 1000 y 1001), confirmaron la identificación de la bacteria. Seguidamente, se detalla la técnica:

- API NH: es una galería de 10 pocillos y 13 pruebas, que contienen sustratos deshidratados que aportan información sobre la utilización de carbohidratos y detección enzimática de la bacteria. Los pocillos de la galería, se inoculan partiendo de una suspensión bacteriana de 4 McFarland. Alguno de ellos, se cubren además con aceite de parafina. Tras la incubación de la galería durante 2 horas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmósfera aerobia y el revelado de alguna de las cúpulas, se procede a la lectura de los resultados observando el cambio de color de los pocillos y obteniéndose un perfil numérico que se compara con una bases de datos.

Todas las cepas identificadas como *N. gonorrhoeae*, fueron almacenadas en el cepario del laboratorio a -80°C en el caldo nutritivo triptona-soja suplementado al 10% con glicerol y posteriormente, los viales se transportaron en hielo seco al Centro Nacional de Microbiología. Una vez llegadas al CNM, se realizó un pase a agar chocolate para comprobar su viabilidad y volvieron a congelarse nuevamente.

5.6 Estudio de sensibilidad antibiótica

El estudio fenotípico de sensibilidad antibiótica de los aislamientos de gonococo, se realizó por difusión en placa mediante Etest (bioMérieux), utilizando el medio GC suplementado con IsoVitalex al 1%. Se testaron los siguientes antibióticos: penicilina, ceftriaxona, cefixima, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina, espectinomicina y gentamicina.

Para la realización del antibiograma, a partir de un cultivo fresco de aproximadamente 24 horas en agar chocolate se realizó, con ayuda de un nefelómetro, una suspensión bacteriana en solución salina con una turbidez equivalente a 0.5 McFarland. Posteriormente, con una torunda, se inocularon las placas GC extendiendo la suspensión en 3 direcciones, rotando la placa unos 60-90 grados cada vez que se cambiaba de dirección. Por último, con unas pinzas estériles, se pusieron las tiras de Etest sobre la superficie del medio y las placas se incubaron durante 18-24 horas a una temperatura de 35-37°C y con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura y a la interpretación de las CMIs, que se realizó siguiendo los criterios del EUCAST y del CLSI del año 2016 (tabla 9) (64,65). La azitromicina sólo se interpretó con el EUCAST, ya que el CLSI no tiene establecidos los puntos de corte para este antibiótico. Por otro lado, en el caso de la gentamicina, como ninguno de los dos comités recoge los criterios para este antibiótico, se usaron los rangos establecidos por Brown *et al.* basados en los ratios de curación y la comparación de CMIs: sensible, CMI ≤ 4mg/L y resistente, CMI ≥ 32mg/L (82).

Antibiótico	EUCAST 2016		CLSI 2016		
	CMI (mg/L)		CMI (mg/L)		
	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
Penicilina^a	≤0.06	>1	≤0.06	0.12-1	≥2
Ceftriaxona	≤0.125	>0.125	≤0.25	NA	NA
Cefixima	≤0.125	>0.125	≤0.25	NA	NA
Ciprofloxacino	≤0.03	>0.06	≤0.06	0.12-0.5	≥1
Azitromicina	≤0.25	>0.5	NA	NA	NA
Tetraciclina	≤0.5	>1	≤0.25	0.5-1	≥2
Espectinomicina	≤64	>64	≤32	64	≥128

Tabla 9. Puntos de corte EUCAST y CLSI 2016.

^a Siempre se ha de realizar el ensayo de la betalactamasa, si es positiva, se informará penicilina resistente; CMI, concentración mínima inhibitoria; NA, no aplica.

5.7 Detección de la resistencia plasmídica a la penicilina

La detección de betalactamasas plasmídicas se llevó a cabo mediante la solución de nitrocefina (Oxoid), que está basada en la hidrólisis de una cefalosporina cromogénica. Para ello, tras agregar 1 gota del reactivo al medio de cultivo y esperar 30 minutos, si la bacteria posee betalactamasas, hidrolizará el compuesto y se producirá un cambio de color amarillo a rojo (figura 12). Si transcurrido el tiempo de incubación no se produce ningún viraje de color, entonces la cepa no será productora de betalactamasas.

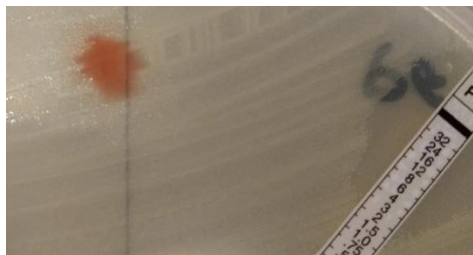


Figura 12. Detección de betalactamasas plasmídicas mediante la solución de nitrocefina.

5.8 Cepa control

Como control interno de calidad para los medios de cultivo y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se utilizó la cepa ATCC 49226.

5.9 Tipificación

5.9.1 Serotipado

La serotipia se realizó por el método de coaglutinación Phadebact Monoclonal GC (MKL Diagnostics), que además de serotipar, permite confirmar la identificación de las cepas de gonococo. Básicamente, esta técnica consiste en la coaglutinación de los aislamientos en función de la proteína I o porina y de esta manera, los clasifica como serogrupo WI (proteína IA) o WII/III (proteína IB).

Previamente a la coaglutinación, se hizo una suspensión de colonias de un cultivo de no más de 24 horas en 0.5 mL de tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS). Posteriormente, se introdujo en un baño de ebullición durante 5 minutos con el fin de evitar problemas de autoaglutinabilidad y, a continuación, se agitó en un vórtex durante 20-30 segundos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El kit comercial presenta los antisueros en dos viales, uno con anticuerpos monoclonales frente a la proteína IA y otro frente a la proteína IB. Además, proporciona unas tarjetas provistas de pocillos para realizar la coaglutinación. De esta manera, se añadió una gota de cada uno de los dos viales en dos pocillos separados y se mezclaron con una gota de la suspensión de gonococo. Tras esto, se realizó durante 1 minuto una suave rotación con la tarjeta y por último, se observó los anticuerpos monoclonales con los que coaglutinaban las cepas.

5.9.2 NG-MAST

Para llevar a cabo la técnica de tipado molecular NG-MAST, se siguió el protocolo descrito por Martin *et al.* (21) en el que se analizan las secuencias nucleotídicas de 2 regiones hipervariables de los genes *porB* y *tbpB*.

5.9.2.1 Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó mediante choque térmico y, para ello, se partió de un cultivo de *N. gonorrhoeae* en agar GC suplementado con IsoVitalax al 1% de unas 20-24 horas. A continuación, se detalla la metodología empleada:

- 1) En un eppendorf, se hizo una suspensión a partir de un asa colmada del cultivo en 500 μ L de agua Milli-Q.
- 2) Se calentó durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo.
- 3) Se congeló 2 minutos a -20°C .
- 4) Se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
- 5) Se recogió el sobrenadante y se conservó a -20°C hasta su uso.

5.9.2.2 Amplificación de los fragmentos de los genes *porB* y *tbpB*

Se realizó la amplificación de un fragmento de 737 pb del gen *porB* y de 589 pb del gen *tbpB* mediante PCRs individuales, utilizando el kit comercial illustra PuReTaq Ready-To-Go (GE Healthcare). Este kit contiene microesferas premezcladas individuales con dATP, dCTP, dGTP, dTTP, aproximadamente 2.5 unidades de PuReTaq polimerasa y tampón de reacción que deben reconstituirse en un volumen final de 25 μ L. Los reactivos utilizados en cada reacción de PCR se detallan en la tabla 10.

Reactivo	Cantidad
illustra PuReTaq Ready-To-Go	1 unidad
Primer forward (50 µM)	0.5 µL
Primer reverse (50 µM)	0.5 µL
Agua	19 µL
ADN (20 ng/µL)	5 µL
Volumen final	25 µL

Tabla 10. Componentes utilizados para la amplificación mediante PCR de los genes *porB* y *tbpB*.

Las secuencias de los cebadores o *primers* utilizadas fueron (21):

- *Primer forward porB*: 5'-CAAGAAGACCTCGGCAA-3'.
- *Primer reverse porB*: 5'-CCGACAACCACTTGGT-3'.
- *Primer forward tbpB*: 5'-CGTTGTCGGCAGCGCGAAAAC-3'.
- *Primer reverse tbpB*: 5'-TTCATCGGTGCGCTCGCCTTG-3'.

Las condiciones de cada una de las PCRs se resumen en la siguiente tabla:

Pasos	<i>porB</i>			<i>tbpB</i>		
	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Número ciclos
Desnaturalización inicial	95	4 min	1	95	4 min	1
Desnaturalización	95	30 seg		95	30 seg	
Hibridación	58	30 seg	25	62	30 seg	25
Extensión	72	1 min		72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1	72	10 min	1

Tabla 11. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de los genes *porB* y *tbpB*.

Los productos de amplificación obtenidos se sometieron a una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1%, utilizándose como marcador de peso molecular el marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), que posee un rango de fragmentos de 80–10000 pb. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta, confirmándose la correcta amplificación de los fragmentos de 737 y 589 pb (figura 13).

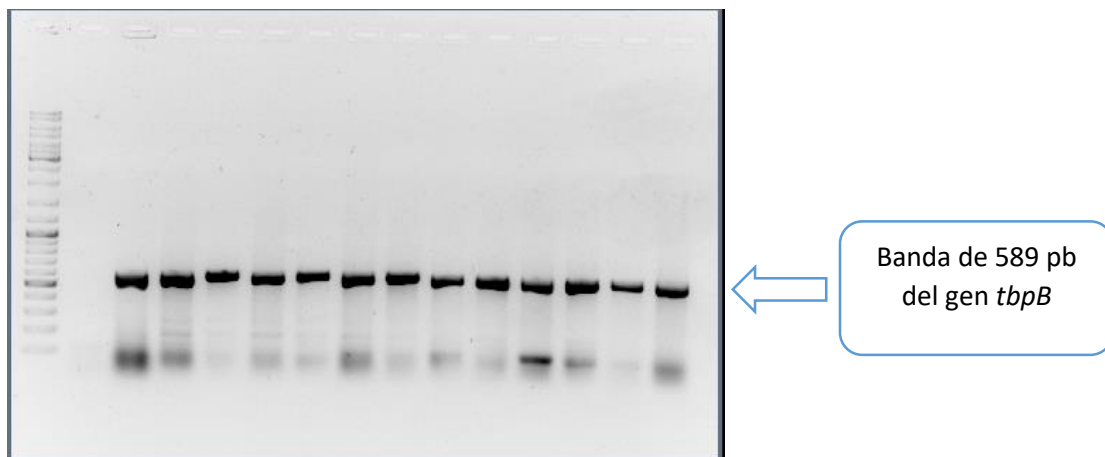


Figura 13. Revelado de la PCR del gen *tbpB* por electroforesis en gel de agarosa.

La purificación de los productos de la reacción de PCR se llevó a cabo mediante la digestión enzimática con el reactivo ExoSAP-IT (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este proceso se mezclaron 5 μ L del producto de la PCR con 2 μ L del reactivo ExoSAP y en un termociclador, en primer lugar, se incubó 15 minutos a 37°C, para degradar el exceso de *primers* y de nucleótidos y, posteriormente, otros 15 minutos pero a una temperatura de 80°C, para inactivar el reactivo ExoSAP-IT. A continuación, las muestras se diluyeron con 25-35 μ L de agua destilada para obtener una concentración de ADN aproximada de 10-20 ng/ μ L.

5.9.2.3 Secuenciación

Los fragmentos internos de *porB* y *tbpB* amplificados y purificados se secuenciaron utilizando 1 µL de los productos de PCR purificados, los mismos *primers* que los empleados en las reacciones de amplificación iniciales, pero una concentración de 0.5 µM y agua destilada hasta un volumen final de 10 µL. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del CNM (ISCH), utilizando el kit BigDye versión 3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems) en un secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

5.9.2.4 Análisis de las secuencias y determinación del secuenciotipo (ST)

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa informático DNASTar (DNASTAR®Lasergene™). Para definir cada uno de los alelos, se utiliza un fragmento interno de 490 pb desde la secuencia conservada -TTGAA- del gen *porB* y de 390 pb desde la secuencia -CGTCTGAA- del gen *tbpB*. Las secuencias resultantes fueron introducidas en la base de datos del NG-MAST disponible en internet (<http://www.ng-mast.net/>), donde se indica a que alelo corresponde cada una de ellas y se asignan nuevos alelos a las nuevas variantes no descritas previamente.

Mediante la combinación de ambos alelos (*porB* y *tbpB*) se obtuvo el ST correspondiente para cada uno de los aislados analizados.

5.9.2.5 Determinación de los genogrupos

Los genogrupos engloban STs estrechamente relacionados, es decir, STs que tienen en común uno de los dos alelos y muestran una similitud $\geq 99\%$ con el otro alelo (diferencia de ≤ 5 pb para *porB* y ≤ 4 pb para *tbpB*) (55). Para definir los genogrupos presentes en la muestra de estudio se

concatenaron las secuencias obtenidas de ambos genes y se determinó el porcentaje de similitud usando el test de máxima verosimilitud mediante el *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versión X (108). Asimismo, mediante este programa también se infirió el árbol filogenético con el método de Neighbor-Joining utilizando 1000 réplicas de bootstrap.

Los genogrupos obtenidos fueron nombrados con la letra G seguida del ST predominante dentro de cada grupo, o, en su defecto, del ST más antiguo (55).

5.10 Secuenciación del genoma completo (SGC)

La secuenciación del genoma completo de los aislamientos de *N. gonorrhoeae*, se realizó en la totalidad de las muestras a excepción de una de ellas debido a una pérdida de viabilidad bacteriana. En total se analizaron 103 cepas.

5.10.1 Extracción de ADN

Antes de la realización de las librerías de secuenciación, se realizó la extracción del ADN bacteriano mediante el kit comercial QIAamp® DNA Mini (Qiagen) que se basa en el uso de columnas donde se retienen las moléculas de ADN, utilizando la siguiente metodología:

- 1) En un eppendorf de 2 mL, se resuspendió un asa de siembra de un cultivo bacteriano de 20-24 horas en 180 µL de la solución ATL. A continuación, se homogenizó todo mediante vórtex.
- 2) Para lisar las bacterias, se añadieron 20 µL de proteinasa K, se mezcló todo con el vórtex y se incubó en un baño de agua a 56°C durante 4 horas. Ocasionalmente, durante la incubación se agitaron las muestras.

- 3) Se adicionaron 4 μL de RNasa A, se mezcló con el vórtex y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Pasado este tiempo y con el fin de inactivar la proteinasa K y la RNasa A, se agregaron 200 μL de la solución AL, se mezclaron vigorosamente con el vórtex durante 15 segundos y se incubaron 10 minutos a 70°C.
- 5) A continuación, se añadieron 200 μL de etanol absoluto, se mezcló de nuevo con el vórtex unos 15 segundos y se centrifugó brevemente para eliminar las gotas de la tapa.
- 6) La mezcla del paso anterior se transfirió a una columna QIAamp Mini Spin colocada dentro de un eppendorf nuevo y se centrifugó a 8000 rpm durante 1min. Se desechó el eppendorf con el filtrado y se transfirió la columna a un nuevo eppendorf.
- 7) Se adicionaron a la columna 500 μl del tampón de lavado AW1 y se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm. De nuevo, se transfirió la columna a un tubo nuevo y se descartó el eppendorf con el filtrado.
- 8) El procedimiento del lavado se repitió, pero esta vez con 500 μL del tampón de lavado AW2, seguido de 3 minutos de centrifugación a 14000 rpm. A continuación, se descartó el filtrado y se puso la columna en un nuevo eppendorf.
- 9) Para eliminar todo el etanol, se procedió a una centrifugación adicional de 1 minuto a 14000 rpm, colocando la columna en un nuevo eppendorf de 1.5 mL.
- 10) Para la elución del ADN, se añadieron 75 μL de tampón AE y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm.
- 11) Finalmente, el eluido con el ADN extraído se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.10.2 Determinación de la cantidad y calidad del ADN extraído.

Tras el proceso anterior, se comprobó que el ADN había sido extraído en calidad y cantidad suficiente. Con respecto a la calidad del ADN extraído, se llevaron a cabo análisis de pureza e integridad del ADN y para ello, se determinaron los ratios de absorbancia a 260/280 nm y a 260/230 nm mediante espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific). Ratios por encima de 1.8 y 1.8-2.2, respectivamente, son considerados buenos indicadores de la pureza del ADN.

El NanoDrop ND 1000 es un espectrómetro de amplio espectro (220-750 nm) que, gracias al empleo de un sistema de retención que aprovecha la tensión superficial, forma un puente de líquido entre los pedestales que sujetan la muestra. El pedestal superior es el extremo de una fibra óptica que está conectada a una fuente de emisión de xenón. Ambos pedestales definen un estrecho paso óptico, cuya longitud varía automáticamente con la concentración y la pureza de la muestra, permitiendo hacer mediciones en un rango muy amplio de concentraciones sin hacer diluciones. Asimismo, tiene un *software* asociado al equipo que incorpora una serie de aplicaciones específicas para realizar distintos tipos de mediciones.

Para medir la pureza de una muestra se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se levantó el pedestal superior del equipo.
- 2) Se depositó 1 μ L de la muestra en el pedestal inferior.
- 3) Se cerró el pedestal superior y se inició la medida espectral de los ratios 260/280 nm y a 260/230 nm, empleando el software asociado al equipo.

Por otro lado, la integridad del ADN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa.

La cuantificación del ADN se realizó con el kit QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega). Este sistema determina la concentración con un colorante fluorescente que se une al ADN de doble hélice y que posteriormente, se cuantifica en un fluorímetro. Para asegurar buenos resultados de la SGC se requiere una cantidad mínima de 325 ng de ADN de doble hélice y una concentración mínima de 5ng/μL.

Para determinar la concentración de ADN, se mezclaron 199 μL del reactivo suministrado con el kit con 1 μL de la muestra y tras una incubación de 5 minutos, se leyó con un fluorímetro.

5.10.3 Purificación del ADN

La purificación del ADN se llevó a cabo utilizando el kit AMPure XP (Beckman Coulter), mediante de los siguientes pasos (figura 14):

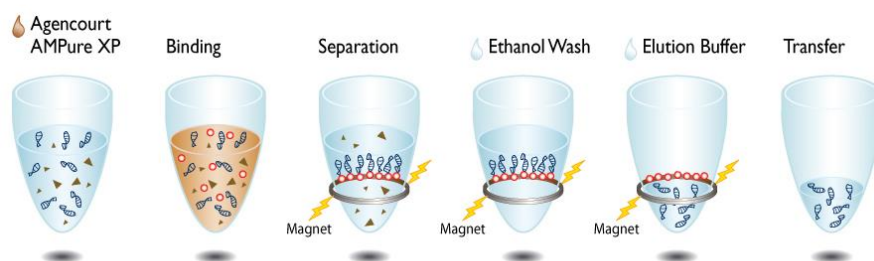


Figura 14. Pasos realizados en la purificación del ADN con AMPure XP.

- 1) En una placa de 96 pocillos se añadió 1 μg de ADN de cada muestra, por lo que para saber el volumen que había que poner en cada pocillo y obtener esta cantidad, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen a añadir } (\mu\text{L}) = \frac{1000 \text{ (ng)}}{\text{Concentración de QuantiFluor (ng}/\mu\text{L)}}}$$

- 2) Posteriormente, se añadió agua destilada hasta llegar a un volumen de 40 μL , se agregó a cada pocillo 40 μL de las bolitas magnéticas AMPure XP y se homogenizó 10 veces con una pipeta. Para lograr que se unieran al ADN, la mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3) A continuación, se colocó la placa de 96 pocillos sobre un imán durante 2 minutos, de manera que las bolas magnéticas junto con el ADN, se logran separar del resto de componentes de la muestra.
- 4) Sin quitar la placa del imán, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol al 80%. Esto se hizo añadiendo 200 μL del etanol, incubando 30 segundos y retirando el sobrenadante.
- 5) Seguidamente, se dejó secar el precipitado durante 10 minutos y se retiró la placa del imán.
- 6) Se resuspendió el precipitado en 25 μL de agua destilada y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Por último, para retirar las bolas magnéticas se volvió a poner la placa de 96 pocillos sobre el imán y tras una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente, se recogió el sobrenadante en tubos eppendorfs de 1.5 mL.

Después de realizar la purificación de las muestras, se volvió a cuantificar el ADN mediante el QuantiFluor ajustándose a una concentración de 0.2 ng/ μL en un volumen final de 400 μL .

5.10.4 Preparación de las librerías de secuenciación

La preparación de las librerías se realizó utilizando el kit comercial Nextera XT DNA LibraryPrep (Illumina). Para ello, se llevaron a cabo diferentes procesos, entre los cuales están la tagmentación, la amplificación de las librerías y la purificación de las mismas.

5.10.4.1 Tagmentación

La tagmentación consiste en la fragmentación enzimática, basada en transposasas, del ADN en fragmentos de aproximadamente 300 pb y su etiquetado mediante la ligación de secuencias adaptadoras en los extremos, tal y como se puede observar en la figura 15.

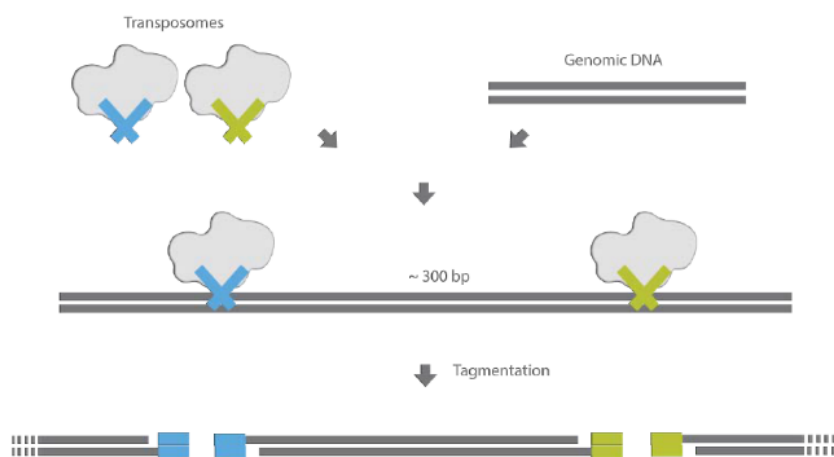


Figura 15. Proceso de tagmentación del ADN.

Para realizar la reacción de tagmentación se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1) En una placa de 96 pocillos para PCR, se añadieron 10 μL de la solución *Tagment DNA buffer* (TD) y 5 μL del ADN a una concentración de 0.2 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Posteriormente, se homogenizó con una pipeta.
- 2) A continuación, se agregaron 5 μL de la solución *Amplicon Tagment Mix* (ATM) a cada pocillo y se mezcló con la pipeta.

- 3) Para eliminar gotas de los reactivos sobre las paredes de los pocillos, se centrifugó a 280 g durante 1 minuto.
- 4) Seguidamente, se procedió a la tagmentación y para ello, en un termociclador se programó un ciclo de 55°C durante 5 minutos y otro de mantenimiento a 10°C.
- 5) Para neutralizar la reacción, se añadió a cada pocillo 5 µL de la solución *Neutralize Tagment Buffer* (NT) y se homogenizó con ayuda de una pipeta.
- 6) Por último, se centrifugó nuevamente a 280 g durante 1 minuto y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

5.10.4.2 Amplificación de las librerías

En este paso se amplifican los fragmentos de ADN y además, se les añaden unos adaptadores que identificarán a cada muestra dentro del pool de amplicones en la SGC (figura 16). A continuación se detalla el proceso de amplificación de las librerías:

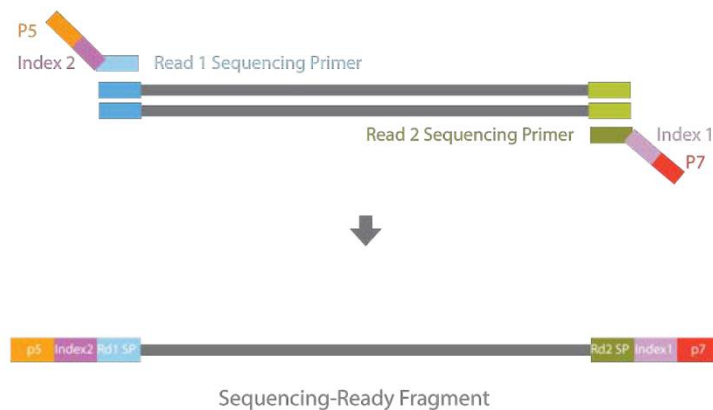


Figura 16. Incorporación de los adaptadores que identificarán la muestra en el proceso de secuenciación.

- 1) A partir del paso anterior, se añadieron 5 μL de cada uno de los dos adaptadores.
- 2) A esta mezcla, se le añadió 15 μL de la Master Mix incluida en el kit.
- 3) Tras homogeneizarlo todo, se centrifugó a 280 g durante 1 minuto.
- 4) Finalmente, se llevó a cabo la reacción de PCR, cuyas condiciones se detallan en la tabla 12.

Pasos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial 1	72	3 min	1
Desnaturalización inicial 2	95	30 seg	1
Desnaturalización	95	10 seg	
Hibridación	55	30 seg	12
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	5 min	1

Tabla 12. Condiciones de PCR para la amplificación de las librerías de secuenciación.

5.10.4.3 Purificación y comprobación de los amplicones de las librerías

La purificación del pool de amplicones se realizó con el kit AMPure XP. Se siguió la misma metodología detallada en el apartado 3.10.3, con algunas modificaciones:

- Se utilizaron 50 μL del producto de la PCR y 25 μL del reactivo AMPure XP.
- Se resuspendió el producto purificado con 52.5 μL de la solución *Resuspension Buffer* (RSB).

Una vez realizada la purificación, se determinó la concentración del ADN con el kit QuantiFluor ONE dsDNA System y posteriormente, se analizó la distribución del tamaño y la concentración de 1 μL de los amplicones purificados. Para ello, se realizó una electroforesis en chips de ADN de alta sensibilidad con el equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent), como se observa en la figura 17.

Se pueden secuenciar varias librerías con tamaños promedio de fragmentos tan pequeños como 250 pb o tan grandes como 1500 pb.

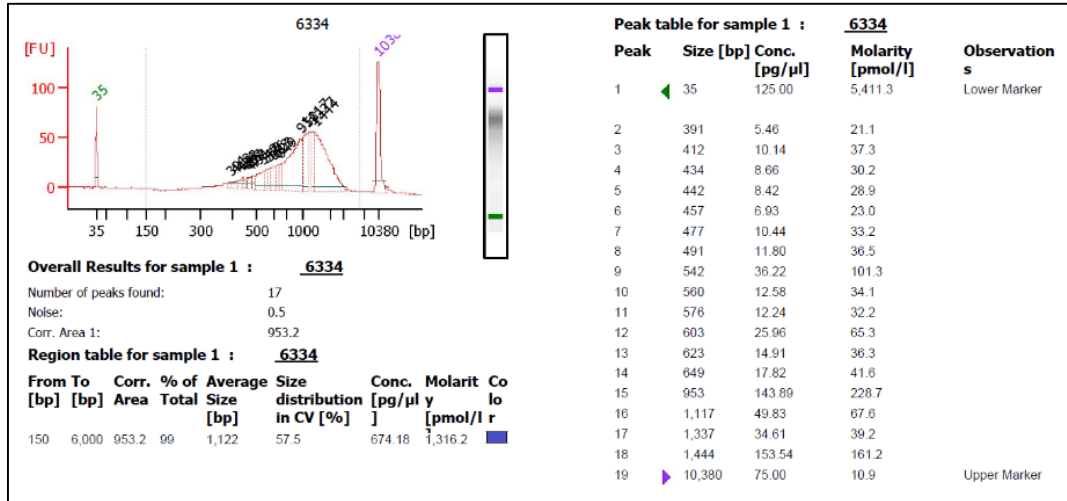


Figura 17. Electroforesis de alta sensibilidad de una librería de amplicones.

5.10.4.4 Normalización y combinación de las librerías para la secuenciación

Previo a la secuenciación, en la Unidad de Genómica del CNM (ISCIII) se realizó la normalización de las librerías, mediante dilución, añadiéndose la misma cantidad de cada una de ellas en un único tubo.

5.10.5 Secuenciación

La secuenciación de las librerías se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del CNM mediante la plataforma Miseq (Illumina), generando lecturas *paired-ends* de 300 pb.

5.10.6 Ensamblado de las secuencias

El ensamblado de las secuencias se realizó en la Unidad de Bioinformática del CNM.

En primer lugar, se realizó un control de calidad con la herramienta fastqc disponible en <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Seguidamente, se llevó a cabo el filtrado de las secuencias usando trimmomatic (109). Para ello, se eliminaron aquellos nucleótidos en los extremo 3' cuya calidad phred fue menor a 10 o a una media de 15, mirando en una ventana de 4 nucleótidos y además, se eliminaron las secuencias que tenían menos de 70 bases.

A continuación, se realizó el ensamblado *de novo* con SPades v 3.8 (110) y también, un control de calidad del ensamblado utilizando QUAST (111) y el genoma de referencia *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090, NC_002946.2.

5.11 Análisis bioinformático

La anotación de los genes de resistencia de los genomas completos se realizó mediante *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide* (BLASTn), con el fin de identificar variaciones alélicas y estudiar la presencia o ausencia de determinantes de resistencia. Las bases de datos utilizadas fueron las plataformas disponibles en Internet Pathogenwatch (<https://pathogen.watch/>) y *Bacterial Isolate Genome Sequence database* (BIGSdb) (<https://pubmlst.org/neisseria/>) (112). Se analizaron los siguientes genes asociados con resistencia:

- Betalactámicos: *penA*, *penB*, *pilQ*, *ponA*, *mtrR* y *bla_{TEM}* (penicilina).
- Azitromicina: 23S ARNr, *mtrR* y su promotor, *rplD*, *rplV*, *mef(A/B)*, el promotor de la bomba de eflujo MacAB y *erm(A/B/C/F)*.
- Ciprofloxacino: *gyrA* y *parC*.

- Tetraciclina: *penB*, *mtrR*, *rpsJ* y *tetM*.
- Espectinomicina: 16S ARNr y *rpsE*.
- Sulfonamidas: *folP*.

Asimismo, a través de la plataforma BIGSdb, también se llevó a cabo la caracterización *in silico* de los aislamientos mediante wgNG-MAST, wgMLST y wgNG-STAR.

Asimismo, mediante la herramienta de comparación de genomas del BIGSds, se determinó el genoma *core* de los aislamientos y para la representación gráfica del árbol filogenético se usó la herramienta iTOL (<https://itol.embl.de/>) (113), utilizando la cepa de *N. gonorrhoeae* FA 1090 como genoma de referencia.

5.12 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics v 23.0.

Para evaluar el grado de asociación entre las variables categóricas y los grupos de comparación, se utilizó el estadístico Chi-cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher, en el caso de que más del 20% de las frecuencias esperadas fueran menores de 5. Asimismo, se recurrió al test de McNemar, para comparar los criterios de interpretación del EUCAST y del CLSI para cada antimicrobiano estudiado.

Por otro lado, el estudio de la relación entre las variables cuantitativas se realizó mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

Para estudiar los factores asociados con la resistencia antimicrobiana y/o la sensibilidad disminuida (SD), en primer lugar se realizaron análisis univariantes mediante regresión logística para analizar la influencia individual de las siguientes variables:

- Grupo de edad.

- Origen.
- Nivel de estudios.
- UDI.
- Usuarios de drogas recreacionales.
- Número de parejas sexuales en el último año.
- Localización anatómica de la infección.
- Número de localizaciones con gonorrea.
- Sintomatología.
- Seroestatus al VIH.
- Coinfecciones con otras ITS.
- ITS diagnosticadas en el último año.

Posteriormente, se realizó el análisis multivariante incluyendo todos los determinantes asociados en el análisis univariable con una $p < 0.1$. Se calcularon las odds ratios (OR) y las odds ratios ajustadas (aOR) junto con sus intervalos de confianza (IC) al 95%.

El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Características sociodemográficas de los pacientes

Durante el periodo de Julio a Octubre de 2016, se obtuvieron un total de 211 aislamientos de *N. gonorrhoeae*. Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron al azar un total de 104 aislamientos procedentes de 94 pacientes. Las principales características sociodemográficas de los pacientes se resumen en la tabla 13.

Características sociodemográficas (n=94)		
Género, n (%)	Masculino	84 (89.4)
	Femenino	10 (10.6)
Edad mediana, años (IQR)		30.5 (24-40)
Grupo de edad, n (%)	18-28	39 (41.5)
	29-39	31 (33.0)
	40-51	24 (25.5)
Origen, n (%)	España	56 (59.6)
	Latinoamérica	23 (24.5)
	Europa	8 (8.5)
	Asia	5 (5.3)
	América	2 (2.1)
Nivel de estudios, n (%)	Primarios	3 (3.2)
	Secundarios	14 (14.9)
	Superiores	35 (37.2)
	Desconocido	42 (44.7)

Tabla 13. Características sociodemográficas de los pacientes incluidos en el estudio. n, número; IQR, rango intercuartílico.

Tal y como se observa en la tabla 13, el 89.4% de los pacientes eran hombres y el 10.6% mujeres.

El rango de edad de los pacientes incluidos en el estudio fue de 18 a 51 años, con una edad mediana de 30.5 años (IQR=24-40). El grupo de edad comprendido entre los 18 y los 28 años fue el más afectado, representando el 41.5% de los sujetos. Si se estratifican los datos en función del género, los hombres tuvieron una edad mediana de 31 años (IQR=24-39.75) frente a los 26.5

años de edad mediana de las mujeres (IQR= 21.75-43.75). En la figura 18 se representa la distribución de las edades de los pacientes.

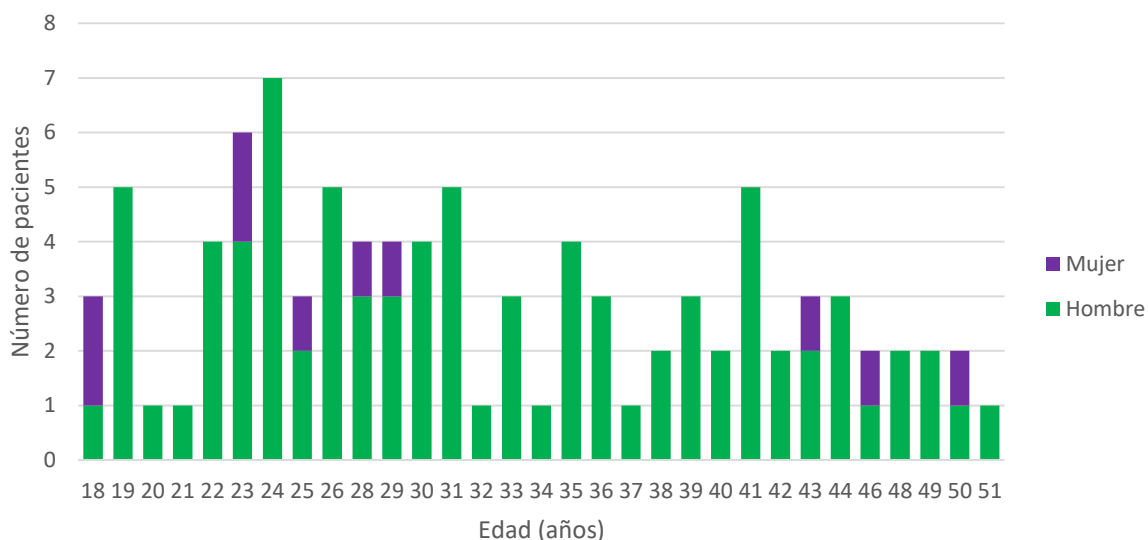


Figura 18. Distribución de la edad de los pacientes.

Según la procedencia de los pacientes, el 59.6% eran de origen español y el 40.4% eran extranjeros. Entre éstos, 24.5% procedían de Latinoamérica, siendo Perú y Venezuela los países predominantes con 5 casos cada uno. El 8.5% de los casos eran del resto de Europa (5.3% de Europa Occidental y 3.2% de Europa del Este). Entre los pacientes, no estuvieron representados el continente africano ni el oceánico (figura 19).

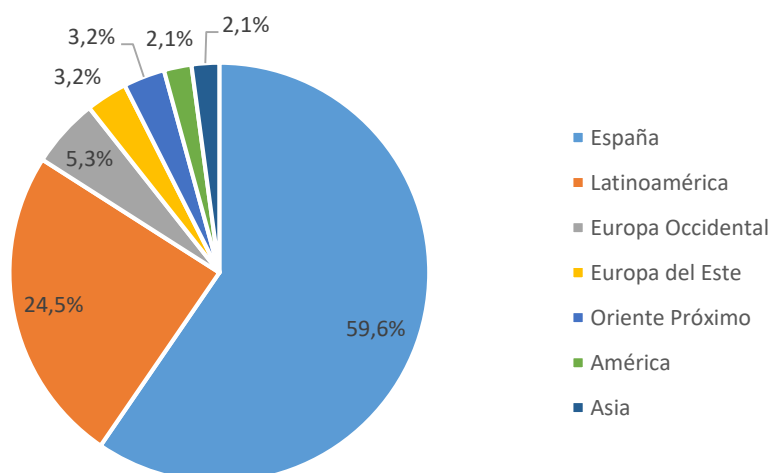


Figura 19. Distribución de los pacientes incluidos en el estudio según el lugar de origen.

En lo referente al nivel de estudios, en 42 sujetos no se registró dicha información. Sin embargo, de los 52 pacientes en los que se obtuvieron estos datos, el 67.3% tenían estudios superiores, el 26.9% estudios secundarios y el 5.8% estudios primarios.

6.2 Características conductuales de los pacientes

Las principales variables que describen las conductas sexuales se resumen en la siguiente tabla (tabla 14):

Características conductuales (n=94)			
Orientación sexual, n (%)	Homosexual masculino	71 (75.5)	
	Heterosexual	20 (21.3)	
	Bisexual	3 (3.2)	
Trabajadores del sexo, n (%)	Sí	9 (9.6)	
	No	85 (90.4)	
Número de parejas sexuales en el último año, n (%)	≤5	32 (34.0)	
	6-10	12 (12.8)	
	11-20	14 (14.9)	
	21-30	2 (2.1)	
	31-40	6 (6.4)	
	41-50	4 (4.3)	
	>50	12 (12.8)	
	Desconocido	12 (12.8)	
Hábitos tóxicos, n (%)	UDI	Sí	2 (2.1)
		No	92 (97.9)
	Usuarios de drogas recreacionales	Sí	61 (64.9)
		No	20 (21.3)
		Desconocido	13 (13.8)

Tabla 14. Características conductuales de los pacientes incluidos en el estudio.

En relación a la orientación sexual de los 84 hombres del estudio, el 84.5% (n=71) eran homosexuales, el 11.9% (n=10) heterosexuales y el 3.6% (n=3) bisexuales. Sin embargo, todas las mujeres eran heterosexuales. En la figura 20 se puede observar la orientación sexual de los sujetos incluidos en el estudio.

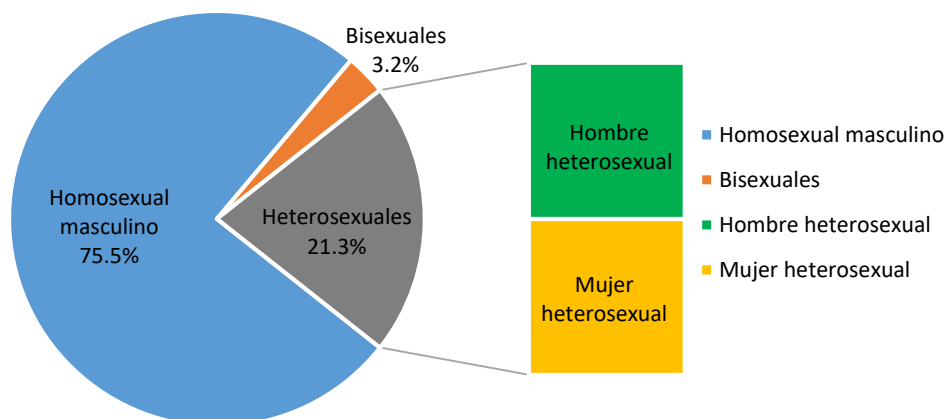


Figura 20. Orientación sexual de los pacientes.

De las 9 personas trabajadoras del sexo, 3 eran mujeres y 6 eran hombres.

Según el número de parejas sexuales en los 12 meses previos, más de la mitad de los pacientes (53.2%) tuvieron más de 5 parejas sexuales y el 12.8% más de 50.

En lo referente al consumo de tóxicos, sólo 2 personas manifestaron tener contacto con drogas inyectables. Sin embargo, el 64.9% (n=61) de los pacientes eran consumidores de drogas recreacionales. Las drogas más utilizadas fueron: el consumo excesivo de alcohol (54.3%), el popper (25.5%), el cannabis (18.1%), la cocaína (16.0%) y el ácido γ -hidroxibutírico (GHB) (14.9%); otros tóxicos representaron menos del 10% de los pacientes (figura 21).

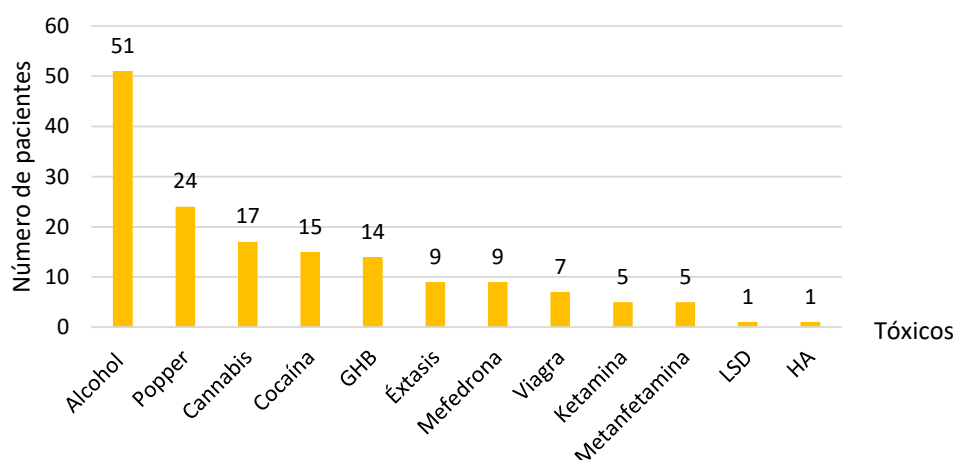


Figura 21. Consumo de drogas recreacionales.

GHB, ácido γ -hidroxibutírico; LSD, dietilamida del ácido lisérgico; HA, hongos alucinógenos.

De los 94 pacientes incluidos en el estudio, en 7 casos (7.4%) no se recogieron datos sobre el uso del preservativo como medida profiláctica en las relaciones sexuales, siendo 2 casos en pacientes heterosexuales y 5 en homosexuales masculinos. En el resto de los pacientes (n=87, 92.6%), los datos sobre las prácticas sexuales desprotegidas se resumen en las tablas 15-17.

Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes Heterosexuales (n=18/20)

Tipo de práctica	Frecuencia	Tipo de pareja sexual (n)		
		Sin especificar el tipo de pareja	Pareja estable	Pareja Ocasional
Sexo oral (sin preservativo)	Siempre	13	3	2
	Frecuente	2	-	1
Coito vaginal (sin preservativo)	Siempre	8	2	-
	Frecuente	3	1	-
	Esporádico	3	-	1
	Nunca	1	-	2
Coito anal (sin preservativo)	No practica	15	-	-
	Siempre	2	1	-
	Nunca	-	-	1

Tabla 15. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes heterosexuales. Frecuente, en $\geq 50\%$ de las relaciones sexuales no utilizaron preservativo. Esporádico, en $< 50\%$ de las relaciones sexuales no utilizaron el preservativo.

Los 18 pacientes heterosexuales siempre o de manera frecuente, es decir, en $\geq 50\%$ de las relaciones sexuales, tuvieron sexo orogenital desprotegido. Con respecto al coito vaginal, únicamente en 3 pacientes nunca fue de manera desprotegida, siendo en 2 casos con parejas sexuales ocasionales. Asimismo, aunque la mayoría de los pacientes heterosexuales (n=15) no practicaban sexo anal, sólo en 1 sujeto el coito anal era protegido con sus parejas ocasionales (figura 22).

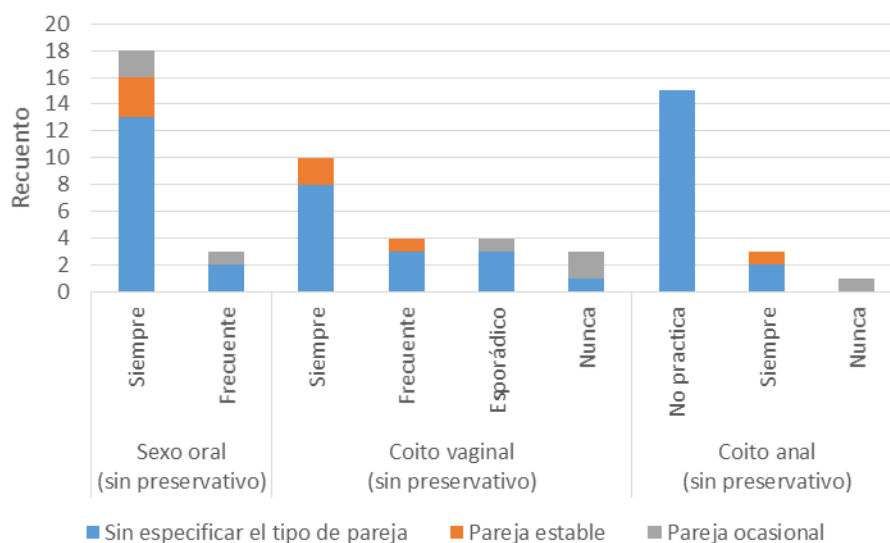


Figura 22. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes heterosexuales.

Frecuente, en $\geq 50\%$ de las relaciones sexuales no utilizaron preservativo. Esporádico, en $< 50\%$ de las relaciones sexuales no utilizaron el preservativo.

Los 3 pacientes bisexuales del estudio, siempre tenían sexo orogenital desprotegido y en dos tercios de los casos (66.7%), el coito vaginal, el CAI y el CAR nunca era de manera desprotegida (tabla 16, figura 23).

Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes Bisexuales (n=3)

Tipo de práctica	Frecuencia	Número de pacientes (sin especificar el tipo de pareja)
Sexo oral (sin preservativo)	Siempre	3
Coito vaginal (sin preservativo)	Esporádico	1
	Nunca	2
Coito anal insertivo (CAI) (sin preservativo)	Esporádico	1
	Nunca	2
Coito anal receptivo (CAR) (sin preservativo)	No practica	1
	Nunca	2

Tabla 16. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes bisexuales. Esporádico, en $< 50\%$ de las relaciones sexuales no utilizaron el preservativo.

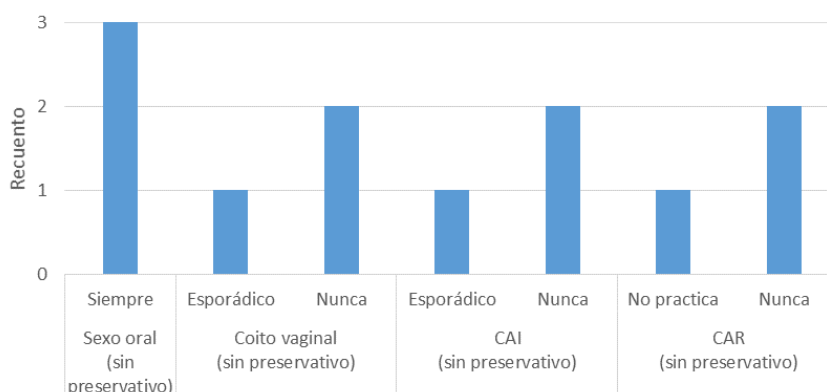


Figura 23. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes bisexuales. Esporádico, en <50% de las relaciones sexuales no utilizaron el preservativo.

Al igual que en el resto de grupos, el sexo orogenital en los pacientes homosexuales masculinos fue siempre desprotegido. No obstante, aunque en la mayoría de este grupo las relaciones anales eran desprotegidas, en 27 casos nunca realizaban ni el CAI, ni el CAR sin preservativo (figura 24, tabla 17).

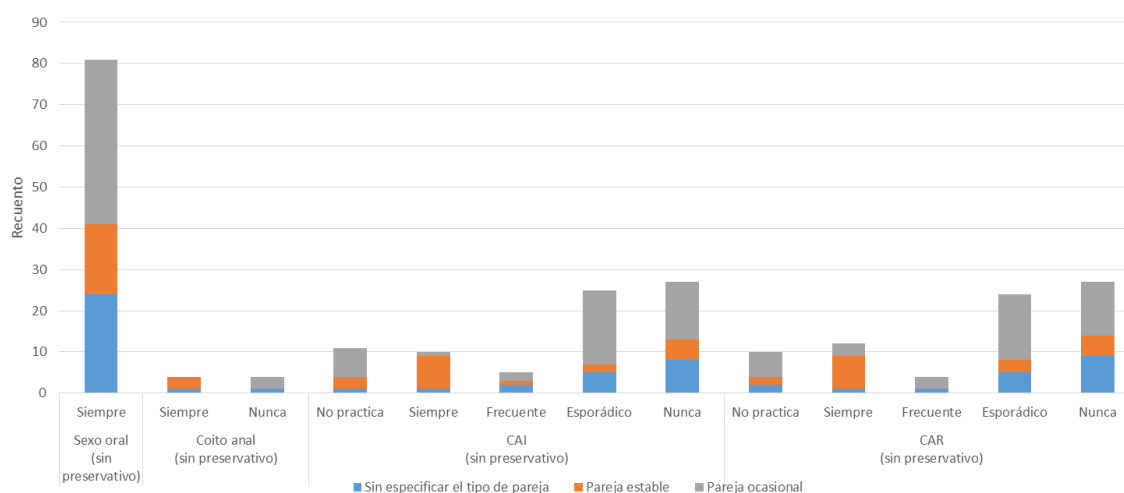


Figura 24. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes homosexuales masculinos. Frecuente, en ≥50% de las relaciones sexuales no utilizaron preservativo. Esporádico, en <50% de las relaciones sexuales no utilizaron el preservativo.

Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes homosexuales masculinos (n=66/71)

Tipo de práctica	Frecuencia	Tipo de pareja sexual (n)		
		Sin especificar el tipo de pareja	Pareja estable	Pareja Ocasional
Sexo oral (sin preservativo)	Siempre	24	17	40
Coito anal (sin especificar si CAI o CAR, sin preservativo)	Siempre	1	3	-
	Nunca	1	-	3
CAI (sin preservativo)	No practica	1	3	7
	Siempre	1	8	1
	Frecuente	2	1	2
	Esporádico	5	2	18
	Nunca	8	5	14
CAR (sin preservativo)	No practica	2	2	6
	Siempre	1	8	3
	Frecuente	1	0	3
	Esporádico	5	3	16
	Nunca	9	5	13

Tabla 17. Prácticas sexuales desprotegidas en pacientes homosexuales masculinos. Frecuente, en $\geq 50\%$ de las relaciones sexuales no utilizaron preservativo. Esporádico, en $< 50\%$ de las relaciones sexuales no utilizaron el preservativo.

6.3 Características clínicas de los pacientes

En el estudio se incluyeron un total de 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de 94 pacientes. Como se verá más adelante, aunque el número de coinfecciones por gonococo fue mayor, tan sólo se incluyeron entre los 104 aislamientos a 9 pacientes con cultivos positivos en varias localizaciones anatómicas. Asimismo, un paciente sufrió dos episodios diferentes de gonorrea rectal.

De los 104 aislamientos, 42 procedían de exudados uretrales, 35 de exudados rectales, 19 de exudados faríngeos y 8 de exudados cervicales. En la figura 25 se puede observar la proporción de aislamientos de *N. gonorrhoeae* atendiendo a su localización anatómica.

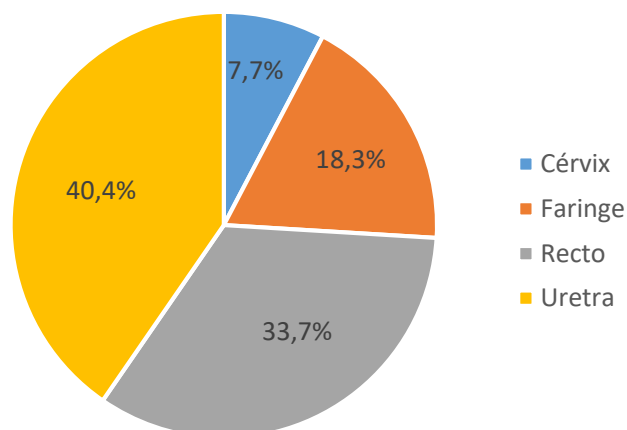


Figura 25. Distribución de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* según la localización anatómica de la muestra.

Del total de aislamientos, 91 (87.5%) se aislaron en hombres y 13 en mujeres (12.5%).

La proporción de muestras extragenitales (51.9%, n=54) fue ligeramente superior a la de muestras genitales (48.1%, n=50).

En las muestras aisladas de hombres, el 53.8% se aislaron de localizaciones extragenitales (38.5% de exudados rectales y 15.3% de exudados faríngeos) mientras que el 46.2% eran de muestras genitales. En el caso de las mujeres, el 38.5% de sus muestras fueron de exudados faríngeos y el 61.5% de exudados cervicales. En la figura 26 se recoge la distribución de los aislamientos de gonococo en función del género.

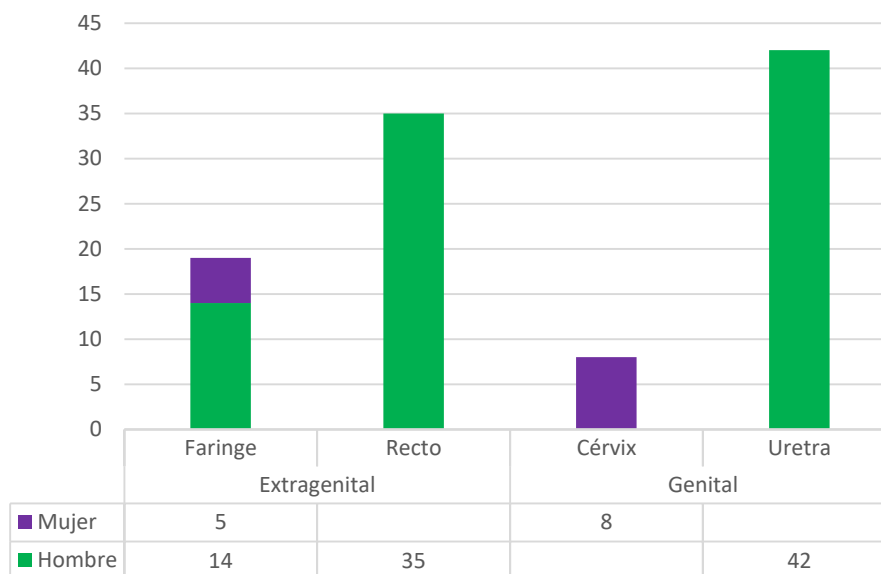


Figura 26. Distribución de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* en función del género.

Atendiendo a la orientación sexual, 23 aislamientos (22.1%) fueron de pacientes heterosexuales y 81 de pacientes HSH (77.9%), que incluyen tanto a los hombres homosexuales como a los bisexuales (Figura 27).

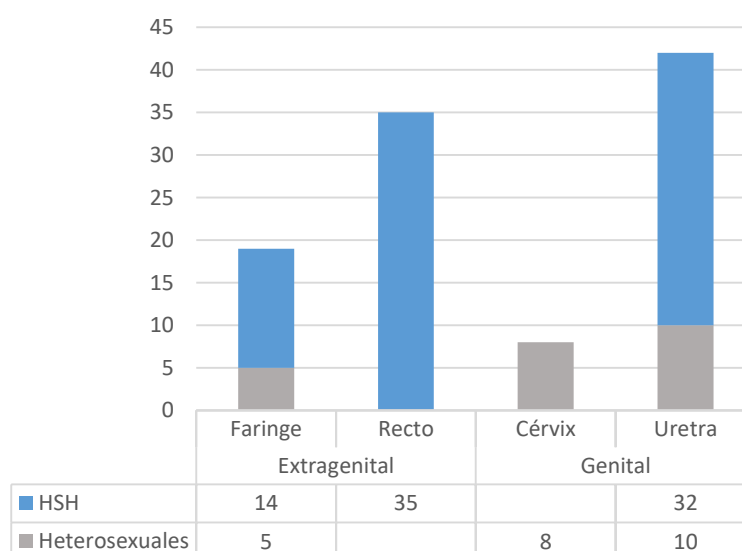


Figura 27. Distribución de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* en función de la orientación sexual.

Respecto a la sintomatología de los pacientes con infección gonocócica, el 57.7% de los individuos (n=60) tuvieron síntomas y el 41.3% (n=43) fueron asintomáticos. Únicamente en una muestra de gonorrea rectal no se dispuso de esta información.

Tal y como se puede observar en la figura 28, las infecciones gonocócicas fueron sintomáticas en todas las infecciones uretrales, en el 40% de las infecciones rectales (n=14), en el 37.5% de las infecciones cervicales (n=3) y en último lugar, en el 5.3% de los pacientes con infección faríngea (n=1). Las muestras de pacientes asintomáticos se recuperaron predominantemente de sitios extragenitales (70.4%, n=38) ($p < 0.01$).

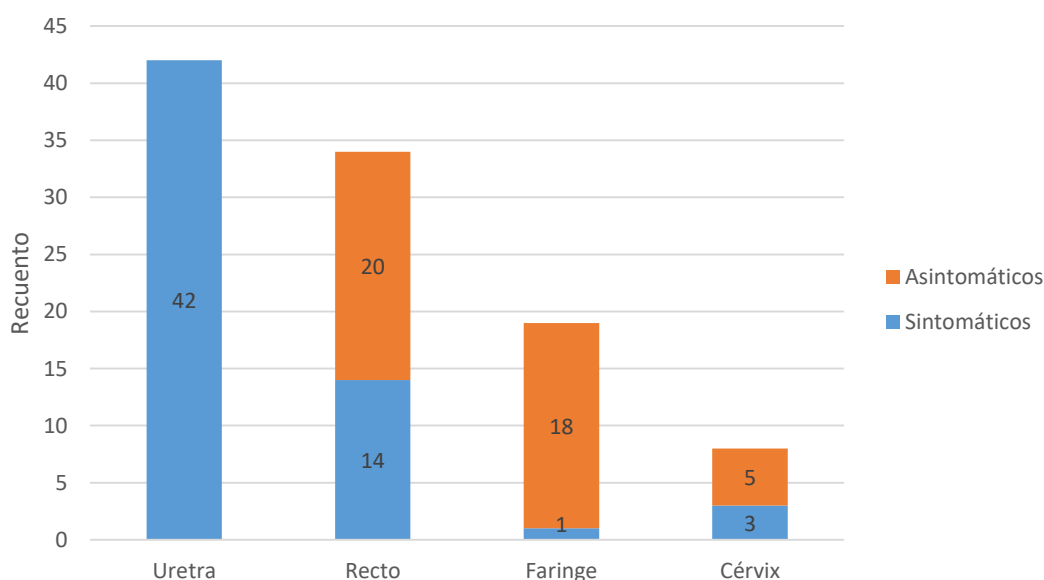


Figura 28. Distribución de la sintomatología de la infección gonocócica según la localización de la infección.

Los principales síntomas de los pacientes con gonorrea se recogen en la tabla 18. El síntoma principal de la uretritis, la infección rectal y la faringitis fue la secreción purulenta. En el caso de las mujeres con cervicitis, fue la leucorrea.

Sintomatología de la infección gonocócica

Tipo de infección	Síntomas	Número de pacientes (%)
Uretritis (n=42)	Secreción uretral purulenta	41 (97.6)
	Disuria	7 (16.7)
	Escozor	2 (4.8)
	Prurito	1 (2.4)
	Dolor testicular	1 (2.4)
Cervicitis (n=3)	Leucorrea amarillo-verdosa	3 (100)
	Mal olor	1 (33.3)
	Vulvitis	1 (33.3)
Infección rectal (n=14)	Secreción purulenta	7 (50)
	Secreción sanguinolenta	5 (35.7)
	Proctitis	5 (35.7)
	Tenesmo rectal	4 (28.6)
	Rectalgia	4 (28.6)
	Fisuras anales	1 (7.1)
	Escozor anal	1 (7.1)
Faringitis (n=1)	Secreción purulenta	1 (100)

Tabla 18. Sintomatología de los pacientes con gonorrea

En relación al tratamiento antimicrobiano, más de la mitad de los pacientes (53.7%, n=51) recibieron la terapia dual recomendada (ceftriaxona más azitromicina), mientras que la mitad restante fue tratada sólo con ceftriaxona (42.1%, n=40), sólo con azitromicina (2.1%, n=2) o no recibió ningún tratamiento (2.1%, n=2). No obstante, algunos de estos pacientes también fueron tratados con otros antimicrobianos ante la sospecha de coinfecciones (tabla 19).

Tratamiento de los pacientes con gonorrea (n=95)^a	
Ceftriaxona 250 mg im MD + Azitromicina 1 g vo MD	49
Ceftriaxona 250 mg im MD	36
Ceftriaxona 250 mg im MD + Azitromicina 1 g vo MD + Penicilina G Benzatina 2.4 MU im MD	2 ^b
Ceftriaxona 250 mg im MD + Doxiciclina 100 mg/12 horas 7 días	2 ^c
Ceftriaxona 250 mg im MD + Doxiciclina 100 mg/12 horas 21 días	1 ^d
Ceftriaxona 250 mg im MD + Claritromicina 250 mg/12 horas 6 días	1 ^e
Azitromicina 1g vo MD	2 ^f
No tratamiento	2

Tabla 19. Tratamiento recibido por los pacientes con infección gonocócica.

^a Un paciente tuvo dos episodios de gonorrea. ^b Pacientes coinfectados con sífilis. ^c Un paciente coinfectado con *C. trachomatis*. ^d Un paciente coinfectado con Linfogramuloma venéreo (LGV) rectal. ^e Paciente con uretritis previa por *Ureaplasma urealyticum*. ^f 2 pacientes recibieron azitromicina como tratamiento empírico antes de conocer el agente etiológico causante de la infección.

El test de cura se realizó en el 35.7% de los casos (n=37) con una mediana de 51 días (IQR: 30-68, rango: 8-117). El resultado del test de cura fue negativo en el 86.5% de los casos (n=32) y positivo en el 13.5% (n=5), con una mediana de 85 días (rango: 50-91). De éstos, únicamente en un caso la cepa fue conservada y pudo ser caracterizada. Este paciente tuvo dos episodios de gonorrea en el que se obtuvieron aislados con diferentes secuenciotipos de NG-MAST. De los 4 casos restantes, 2 fueron positivos exclusivamente por PCR.

Si analizamos las infecciones concomitantes por *N. gonorrhoeae* en más de una localización anatómica, el 20% de los pacientes (n=19) presentaron esta coinfección, siendo las infecciones rectales y faríngeas la combinación más frecuente (tabla 20).

<i>N. gonorrhoeae</i> en más de una localización anatómica (n=95)^a	
Negativo, n (%)	76 (80)
Positivo, n (%)	19 (20)
Localizaciones, n (%)	
Faringe + Recto	9 (9.5)
Cérvix + Faringe	5 (5.3)
Uretra + Recto	2 (2.1)
Uretra + Faringe + Recto	2 (2.1)
Uretra + Faringe	1 (1.1)

Tabla 20. Infección concomitante de *N. gonorrhoeae* en más de una localización anatómica.

^a Un paciente tuvo dos episodios de gonorrea.

A pesar de que 19 pacientes tuvieron una coinfección por gonococo, sólo se pudieron incluir en el estudio los aislamientos de todas las localizaciones de 9 de los pacientes. De los 10 pacientes restantes, únicamente se pudo incluir una cepa por paciente, ya que o bien no se almacenaron los aislamientos o sólo fueron positivos por PCR. Las características principales de los pacientes con infecciones concurrentes por *N. gonorrhoeae* se incluyen en la siguiente tabla (tabla 21):

Gonorrea	Género	Edad (años)	Orientación sexual	Ejercicio prostitución	VIH	ITS concomitantes	ITS último año
Rc+F	Hombre	18	HSH	-	-	-	-
Rc+F	Hombre	20	HSH	+	-	-	+ ^a
Rc+F	Hombre	23	HSH	-	+	-	-
Rc+F	Hombre	23	HSH	-	-	-	+ ^b
Rc+F	Hombre	24	HSH	-	-	-	+ ^c
Rc+F	Hombre	26	HSH	-	-	+ ^d	-
Rc+F	Hombre	29	HSH	-	-	-	+ ^c
Rc+F	Hombre	41	HSH	-	D	-	-
Rc+F	Hombre	42	HSH	-	+	-	+ ^b
C+F	Mujer	18	HTX	-	-	- ^e	-
C+F	Mujer	23	HTX	-	-	- ^e	-
C+F	Mujer	29	HTX	-	-	- ^e	-
C+F	Mujer	43	HTX	-	D	- ^f	-
C+F	Mujer	46	HTX	-	-	- ^g	-
U+Rc	Hombre	35	HSH	-	+	-	-
U+Rc	Hombre	36	HSH	-	-	-	-
U+F+Rc	Hombre	24	HSH	-	-	+ ^d	-
U+F+Rc	Hombre	35	HSH	+	+	+ ^h	-
U+F	Hombre	41	HSH	-	-	-	-

Tabla 21. Características principales de los pacientes con gonorrea en varias localizaciones anatómicas. Rc, recto; F, faringe; U, uretra; C, cérvix; HSH, hombre que tiene sexo con hombre; HTX, heterosexual; +, positivo; -, negativo; D, desconocido. ^a Condilomas perianales, gonorrea rectal y clamidiasis rectal. ^b Sífilis. ^c Gonorrea rectal y faríngea. ^d Clamidiasis rectal. ^e Vaginosis bacteriana. ^f Flora vaginal alterada. ^g Candidiasis vaginal. ^h LGV rectal.

En relación al seroestatus frente al VIH, el 34% de los pacientes estaban coinfectados con el virus, perteneciendo todos los casos positivos a hombres ($p=0.047$). Asimismo, en el 24.2% de los sujetos se detectaron otras ITS simultáneamente a la infección por gonorrea, predominando 1 único patógeno concurrente en el 21.1% de los pacientes, principalmente *C. trachomatis* (tabla

22). Por otro lado y aunque no sea una ITS, todas las mujeres con cervicitis gonocócica presentaron disbacteriosis en su flora vaginal (figura 29).

Coinfecciones	
Seroestatus VIH, n=94 (%)	
Positivo	32 (34.0)
Negativo	57 (60.6)
Desconocido	5 (5.3)
Otras ITS, n=95^a (%)	
Negativo	72 (75.8)
Positivo	23 (24.2)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	12 (12.6) ^b
• Recto	7 (7.4)
• Faringe	3 (3.2)
• Uretra	2 (2.1)
• Cérvix	1 (1.1)
LGV	5 (5.3)
• Recto	4 (4.2)
• Úlcera anal	1 (1.1)
Condilomas acuminados	6 (6.3)
• Genital	3 (3.2)
• Perianal	3 (3.2)
Sífilis primaria	3 (3.2)
Uretritis por <i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 (1.1)
ITS diagnosticadas de forma concurrente (≠VIH), n=95^a (%)	
<u>1 ITS</u>	20 (21.1)
• <i>C. trachomatis</i>	9 (9.5)
• LGV	4 (4.2)
• Condilomas acuminados	4 (4.2)
• Sífilis	3 (3.2)
<u>2 ITS</u>	2 (2.1)
• <i>C. trachomatis</i> + condilomas acuminados	1 (1.1)
• <i>C. trachomatis</i> en 2 localizaciones distintas	1 (1.1) ^b
<u>4 ITS</u>	1 (1.1)
• <i>C. trachomatis</i> + LGV + condilomas acuminados + <i>U. urealyticum</i>	1 (1.1)

Tabla 22. Descripción de las ITS concomitantes a la infección por *N. gonorrhoeae*.

^a Un paciente tuvo dos episodios de gonorrea. ^b Un paciente tuvo *C. trachomatis* en dos localizaciones (faringe + recto).

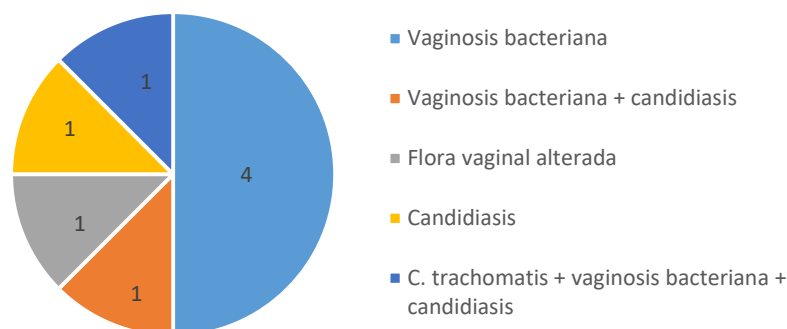


Figura 29. Disbacteriosis en las mujeres con cervicitis gonocócica.

En relación a los antecedentes de ITS durante el año previo al diagnóstico de la infección gonocócica, aproximadamente un tercio de los sujetos (36.2%, n=34) tuvieron alguna ITS. Las más frecuentes fueron la gonorrea (24.5%, n=23), la sífilis (14.9%, n=14) y la clamidiasis (8.5%, n=8) (Tabla 23).

Antecedentes de ITS en los 12 meses previos, n=94 (%)	
Desconocido	1 (1.1)
Negativo	59 (62.8)
Positivo	34 (36.2)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
• Recto	14 (14.9)
• Faringe	8 (8.5)
• Uretra	6 (6.4)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	
• Recto	7 (7.4)
• Uretra	1 (1.1)
LGV rectal	1 (1.1)
Sífilis	
• Primaria	9 (9.6)
• Secundaria	3 (3.2)
• Latente precoz	1 (1.1)
• Latente de duración desconocida	1 (1.1)
Condilomas acuminados	
• Genital	1 (1.1)
• Perianal	3 (3.2)
Uretritis por <i>Mycoplasma hominis</i>	
Uretritis por <i>Ureaplasma urealyticum</i>	
Herpes genital (VHS-2)	
<i>Molluscum contagiosum</i>	
Pediculosis pubis	

Tabla 23. Antecedentes de ITS en los 12 meses previos.
^a 5 pacientes con gonococo en distintas localizaciones.

6.4 Sensibilidad antimicrobiana

Los porcentajes de sensibilidad antimicrobiana de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae* se muestran en la tabla 24.

Antibiótico	EUCAST			CLSI		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Penicilina	4.8	79.8	15.4	4.8	79.8	15.4
Cefixima	97.1	-	2.9	100	-	-
Ceftriaxona	100	-	-	100	-	-
Azitromicina	92.3	5.8	1.9	NA	NA	NA
Ciprofloxacino	57.7	-	42.3	57.7	1.9	40.4
Tetraciclina	79.8	14.4	5.8	47,1	50.0	2.9
Espectinomicina	100	-	-	99	1	-
Gentamicina	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabla 24. Sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *N. gonorrhoeae*. S, sensible; I, intermedio; R, resistente; NA, no aplica.

Globalmente, el 4.8% de los aislamientos (n=5) fueron sensibles a todos los antibióticos testados y aproximadamente un tercio, mostraron resistencia a un único antimicrobiano, principalmente al ciprofloxacino. Sólo una cepa (1.0%) presentó resistencia a 3 antibióticos (penicilina, tetraciclina y ciprofloxacino), de acuerdo con los puntos de corte del EUCAST y no se detectaron aislamientos resistentes a cuatro o más antimicrobianos. No se encontraron cepas de *N. gonorrhoeae* MDR, ya que los aislamientos resistentes a cefixima, tan sólo fueron resistentes a ciprofloxacino y mostraron resistencia intermedia a la penicilina (tabla 25).

Comité interpretación		Resistente	Intermedio	n (%)	
Resistencia 1 antibiótico	EUCAST n=32 (30.8%)	Penicilina	-	4 (3.8)	
		Tetraciclina	Penicilina	1 (1.0)	
		Ciprofloxacino	Penicilina	14 (13.5)	
		Ciprofloxacino	Penicilina + Tetraciclina	12 (11.5)	
		Azitromicina	Penicilina + Tetraciclina	1 (1.0)	
	CLSI n=39 (37.5%)	Penicilina	-	2 (1.9)	
		Penicilina	Tetraciclina	2 (1.9)	
		Penicilina	Espectinomicina	1 (1.0)	
		Tetraciclina	Penicilina	1 (1.0)	
		Tetraciclina	Penicilina + Ciprofloxacino	1 (1.0)	
Resistencia 2 antibióticos	EUCAST n=18 (17.3%)	Ciprofloxacino	Penicilina	10 (9.6)	
		Ciprofloxacino	Penicilina + Tetraciclina	22 (21.2)	
		Penicilina + Ciprofloxacino	-	9 (8.7)	
		Penicilina + Ciprofloxacino	Azitromicina	1 (1.0)	
		Penicilina + Azitromicina	-	1 (1.0)	
	CLSI n=11 (10.6%)	Ciprofloxacino + Tetraciclina	Penicilina	4 (3.8)	
		Cefixima + Ciprofloxacino	Penicilina	3 (2.9)	
		Penicilina + Ciprofloxacino	-	9 (8.7)	
	Resistencia 3 antibióticos	EUCAST n=1 (1.0%)	Penicilina + Ciprofloxacino + Tetraciclina	-	1 (1.0)
			CLSI n=0	-	-

Tabla 25. Distribución de cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a los distintos antimicrobianos.

6.4.1 Penicilina

En el caso de la penicilina, el 4.8% (n=5) de los aislamientos estudiados fueron sensibles, el 79.8% (n=83) presentó sensibilidad intermedia y el 15.4% (n=16) fueron resistentes (figura 30). Todos los aislamientos resistentes se debieron a la producción de betalactamasas plasmídicas.

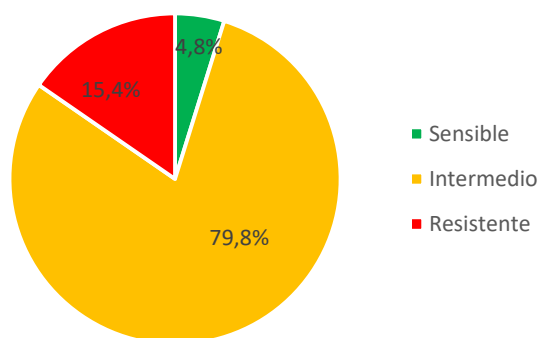


Figura 30. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a penicilina.

La distribución de la CMI a la penicilina en las cepas de gonococo se puede observar en la figura 31. Los rangos de CMI se encontraban entre 0.012 mg/L y >32 mg/L, con una CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0.25 mg/L y 8 mg/L, respectivamente.

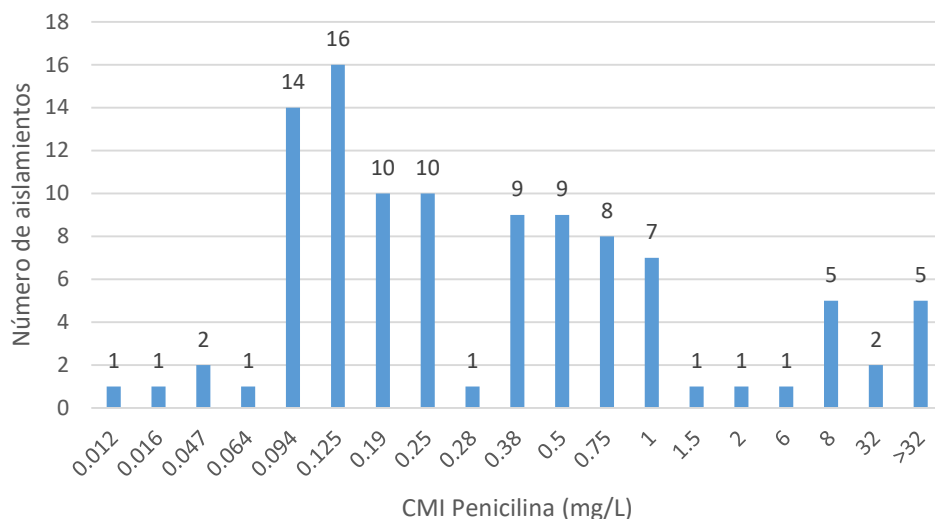


Figura 31. Distribución de la CMI de penicilina de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

En la figura 32 se representan los datos de sensibilidad y resistencia de las cepas de gonococo en base a la localización de la infección. Todos los aislamientos procedentes del cérvix tuvieron sensibilidad intermedia a penicilina y en el resto de localizaciones, los porcentajes de sensibilidad fueron similares ($p=0.791$). Asimismo, al agrupar categorías, tampoco existen diferencias significativas entre las localizaciones genitales y extragenitales ($p=0.781$).

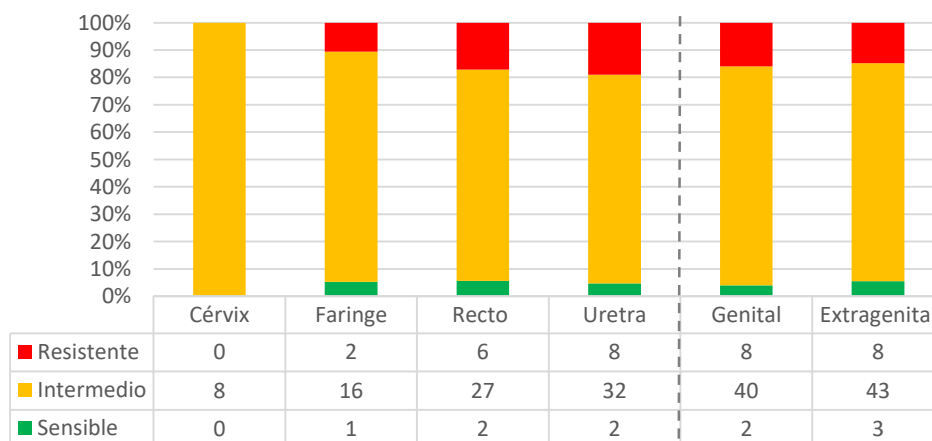


Figura 32. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a penicilina en función de la localización de la infección.

6.4.2 Cefalosporinas

Según los puntos de corte del CLSI, no se detectó resistencia ni a ceftriaxona ni a cefixima. Sin embargo, en el caso del EUCAST, 3 cepas (2.9%) mostraron una CMI de cefixima de 0.19 mg/L, encontrándose este valor ligeramente por encima del punto de corte (categoría resistente: CMI>0.125 mg/L) (Figura 33).

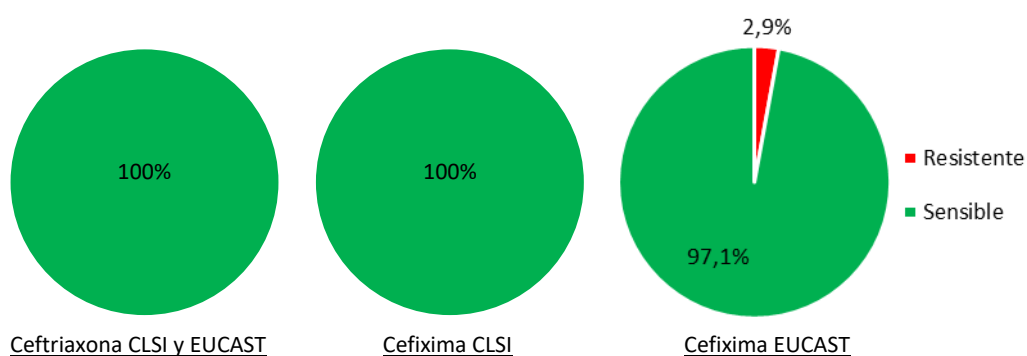


Figura 33. Porcentaje de sensibilidad y resistencia a ceftriaxona y cefixima según EUCAST y CLSI.

El rango de distribución de la CMI a la ceftriaxona osciló entre valores de CMI <0.016 mg/L y de 0.094 mg/L (figura 34). La CMI₅₀ fue de <0.016 mg/L y la CMI₉₀ de 0.047 mg/L. Por otro lado, en el caso de la cefixima el rango de CMI fue de <0.016 mg/L a 0.19 mg/L, con una CMI₅₀ y CMI₉₀ de <0.016 mg/L y 0.047 mg/L, respectivamente (figura 35).

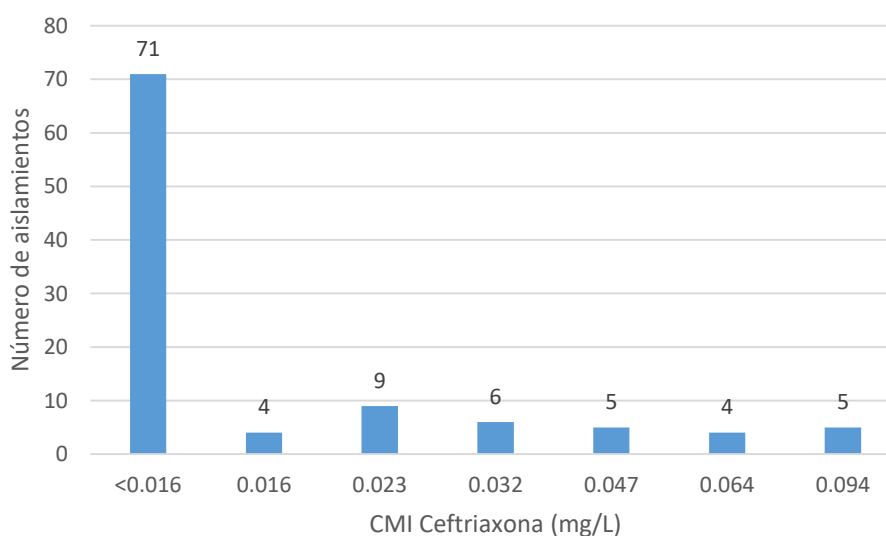


Figura 34. Distribución de la CMI de ceftriaxona de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

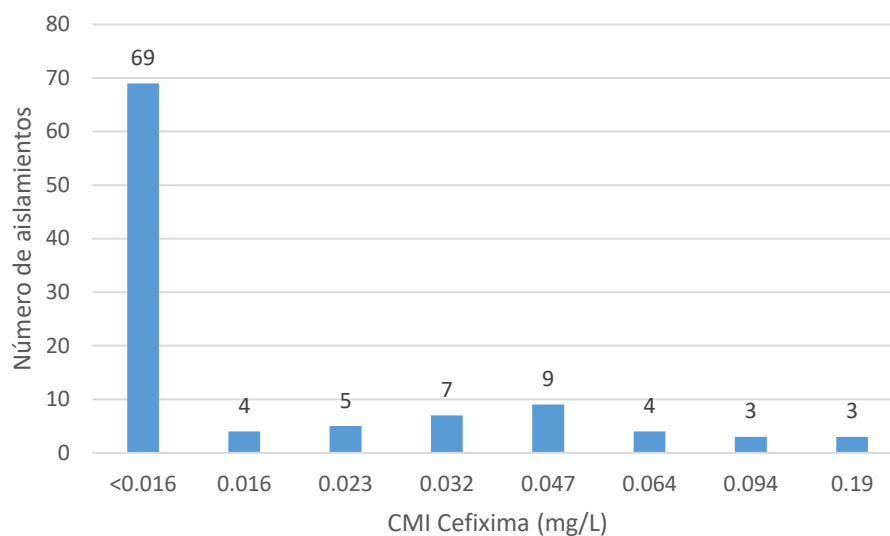


Figura 35. Distribución de la CMI de cefixima de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

Como se ha comentado anteriormente, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST hay 3 aislamientos resistentes a cefixima. Estas 3 cepas se aislaron de la uretra de un varón heterosexual y de la faringe y el cérvix de una mujer, aparentemente sin relación entre ambos. En la figura 36 se representan los porcentajes de sensibilidad y resistencia en función de la localización de la infección. Para este antimicrobiano, no hay diferencias entre el tipo de localización ($p=0.35$) ni entre las categorías “localización genital” y “localización extragenital” ($p=0.595$).

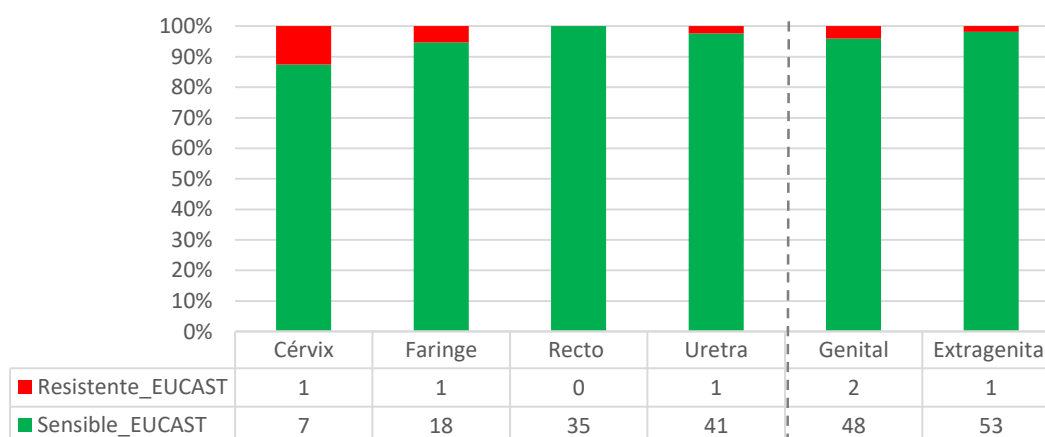


Figura 36. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a cefixima en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST.

6.4.3 Azitromicina

Las CMI de la azitromicina se interpretaron exclusivamente mediante EUCAST, ya que el CLSI no posee puntos de corte para este antibiótico.

El 1.9% de las cepas estudiadas, es decir, 2 aislamientos tuvieron una CMI dentro de la categoría resistente (CMI 1.5 mg/L y 2 mg/L) y el 5.8% en la categoría de sensibilidad intermedia (figura 37).

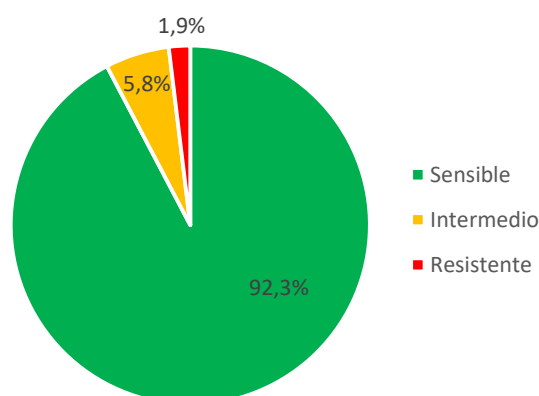


Figura 37. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a la azitromicina.

Los rangos de CMI se encontraban entre 0.023 mg/L y 2 mg/L, con una CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0.125 mg/L y de 0.25 mg/L, respectivamente. La distribución de las CMIs de azitromicina se recoge en la figura 38.

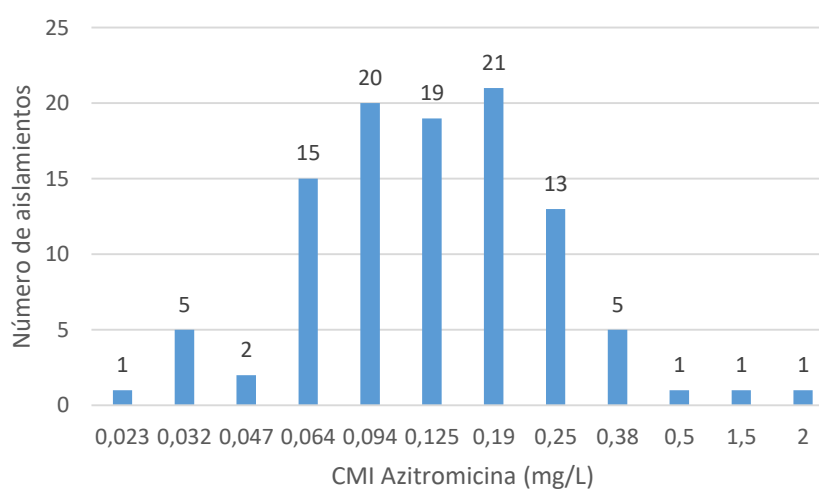


Figura 38. Distribución de la CMI de azitromicina de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

Se concentraron más cepas de sensibilidad disminuida dentro de las localizaciones extragenitales, no obstante, y al igual que con los antibióticos betalactámicos, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.209$) (figura 39).

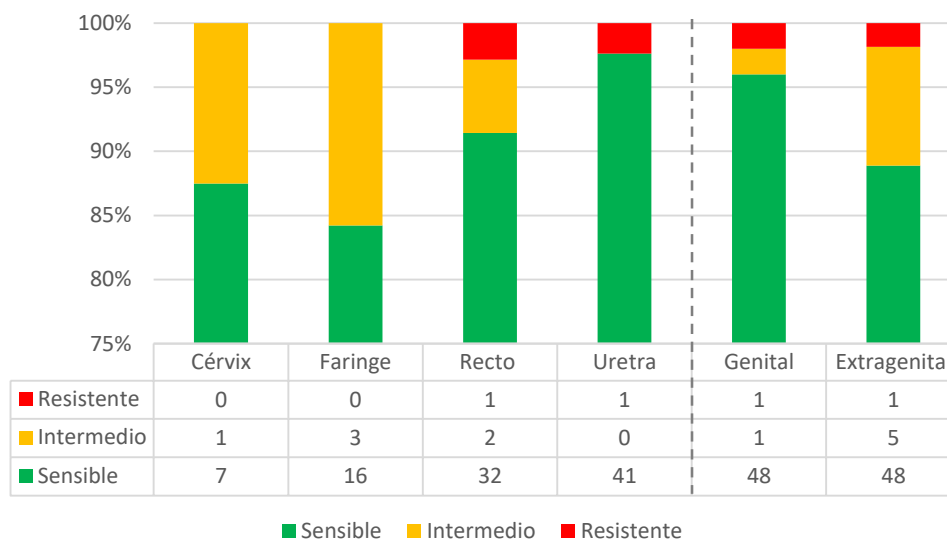


Figura 39. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a la azitromicina en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST.

6.4.4 Ciprofloxacino

En el caso del ciprofloxacino, se registraron porcentajes de resistencia en torno al 40% (42.3 % según criterios EUCAST y 40.4% según criterios CLSI) y de sensibilidad del 57.7% (figura 40).

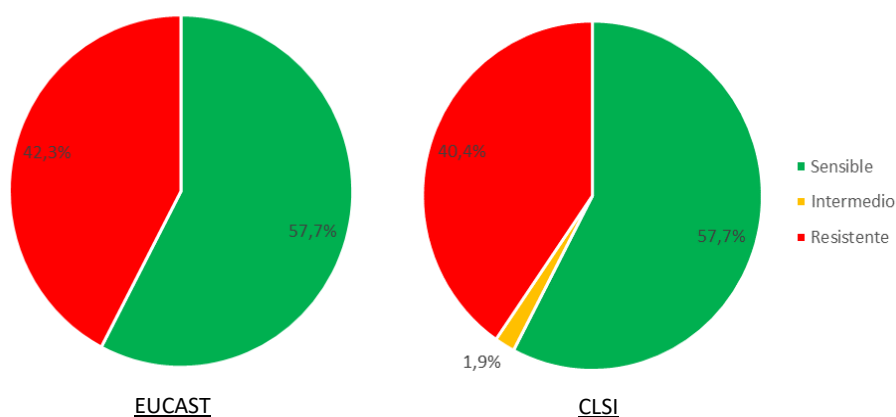


Figura 40. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a ciprofloxacino según EUCAST y CLSI.

El rango de distribución de las CMI's fue de <0.002 mg/L a >32 mg/L, con una CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0.004 mg/L y 16 mg/L, respectivamente (figura 41).

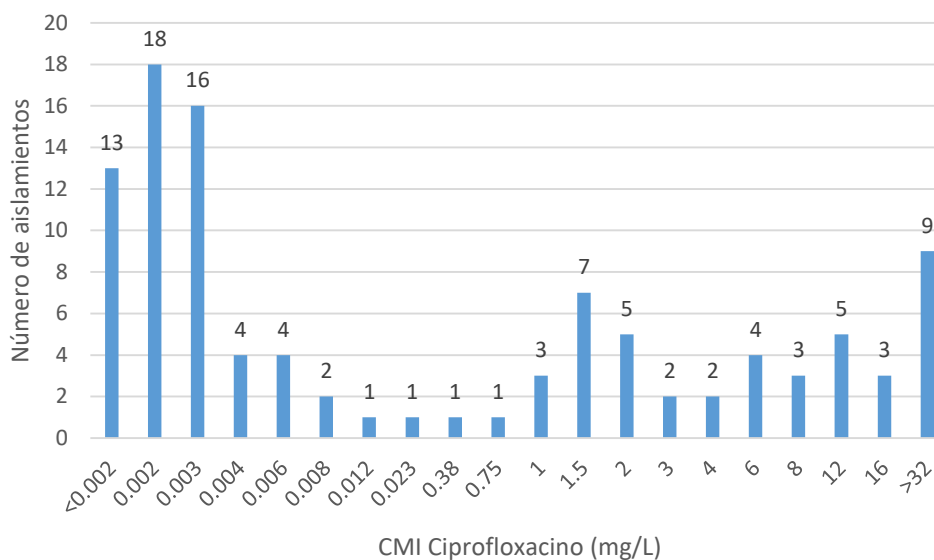


Figura 41. Distribución de la CMI de ciprofloxacino de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

Como puede observarse en la figura 42, si atendemos a la localización de la infección, la única diferencia existente entre los comités de interpretación de CMI's, es que mediante el CLSI hay 2 aislamientos de localización uretral que poseen categoría intermedia (CMI's 0.38 mg/L y 0.75 mg/L) y que EUCAST clasifica como resistentes. En el resto de localizaciones, no hubo diferencias.

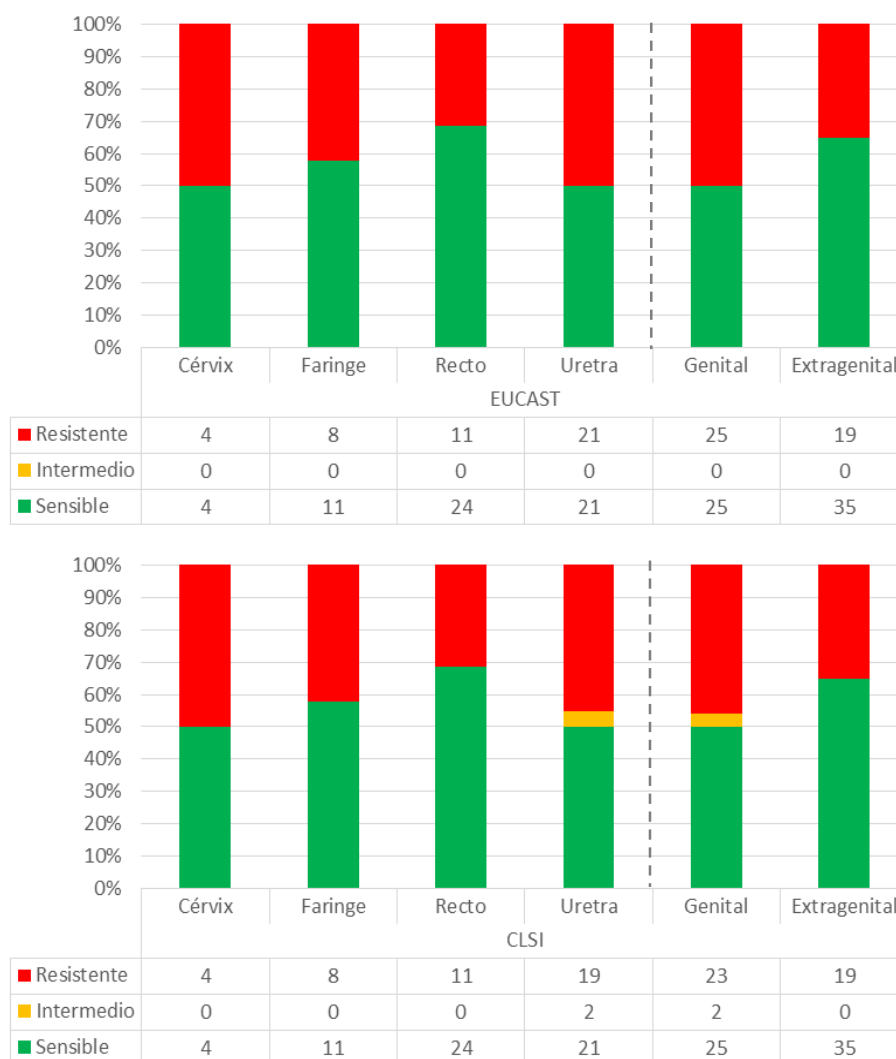


Figura 42. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a ciprofloxacino en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST y del CLSI.

6.4.5 Tetraciclina

Por lo que refiere a las tetraciclinas, en la figura 43 se pueden observar los porcentajes de sensibilidad, sensibilidad intermedia y de resistencia para este antibiótico. En este caso, los porcentajes de sensibilidad variaron significativamente ($p < 0.01$) en función de los criterios de interpretación de CMI's utilizados, con tasas de sensibilidad del 79.8% en el caso del EUCAST y del 47.1% para el CLSI. Sin embargo, aunque los porcentajes de sensibilidad y resistencia variaron en las distintas localizaciones anatómica en función de los criterios utilizados (EUCAST

vs CLSI) (figura 44), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso ($p=0.279$ con EUCAST y $p=0.498$ con CLSI).

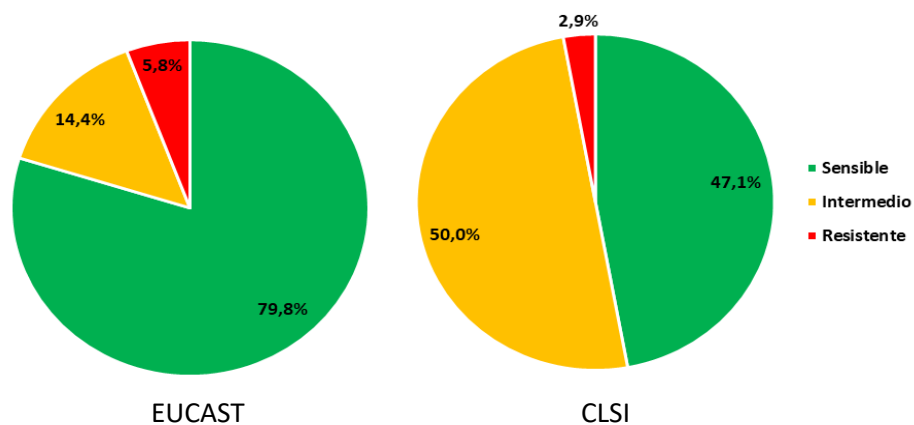


Figura 43. Porcentaje de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a tetraciclina según EUCAST y CLSI.



Figura 44. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a tetraciclina en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST y del CLSI.

Para tetraciclina, la CMI₅₀ fue de 0.38 mg/L y la CMI₉₀ de 1 mg/L, con un rango de CMIs entre valores de 0.032 mg/L y 8 mg/L (figura 45).

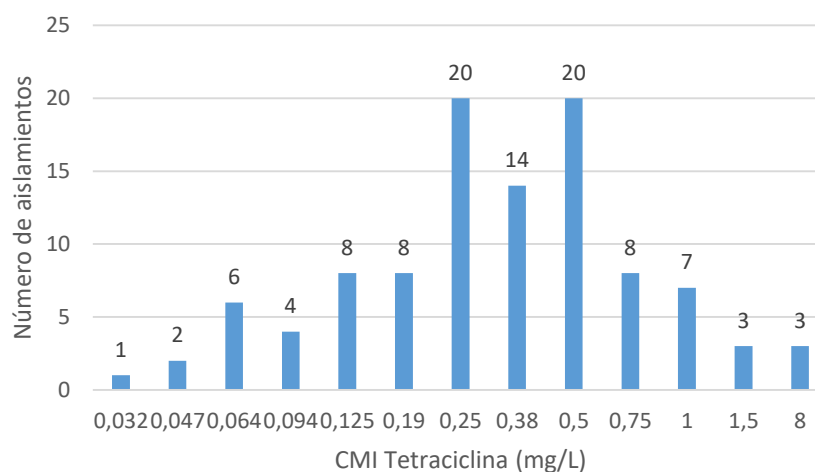


Figura 45. Distribución de la CMI de tetraciclina de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

6.4.6 Espectinomicina

Para este antibiótico, no se detectó ninguna cepa con resistencia. Según los puntos de corte del EUCAST, los 104 aislamientos eran sensibles a espectinomicina. Sin embargo, aplicando los criterios del CLSI, un aislamiento (1.0%) procedente de un exudado rectal mostró sensibilidad intermedia (CMI=48 mg/L) (figura 46).

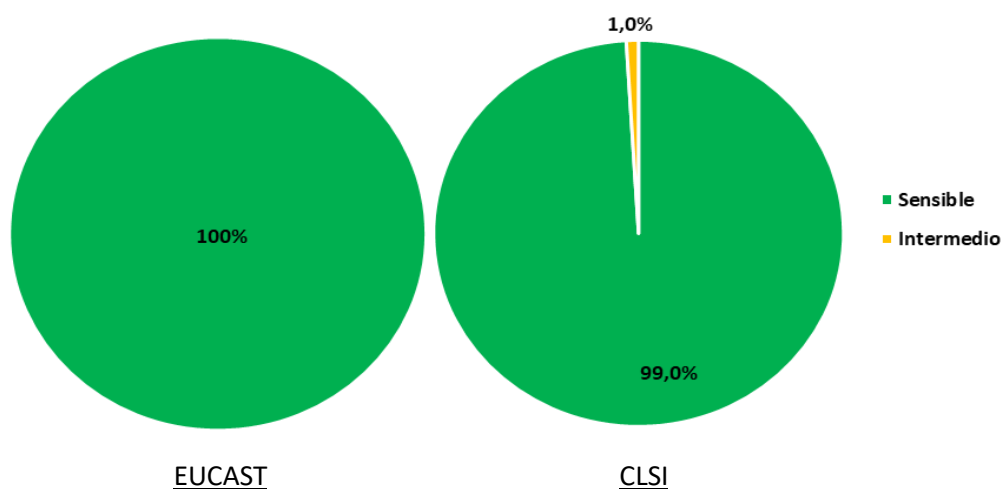


Figura 46. Porcentaje de sensibilidad y sensibilidad intermedia a espectinomicina según EUCAST y CLSI.

El rango de CMI a espectinomicina de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* incluidos en el estudio fue de 2 mg/L a 48 mg/L (figura 47). La CMI₅₀ y CMI₉₀ fue de 6 mg/L y de 12 mg/L, respectivamente.

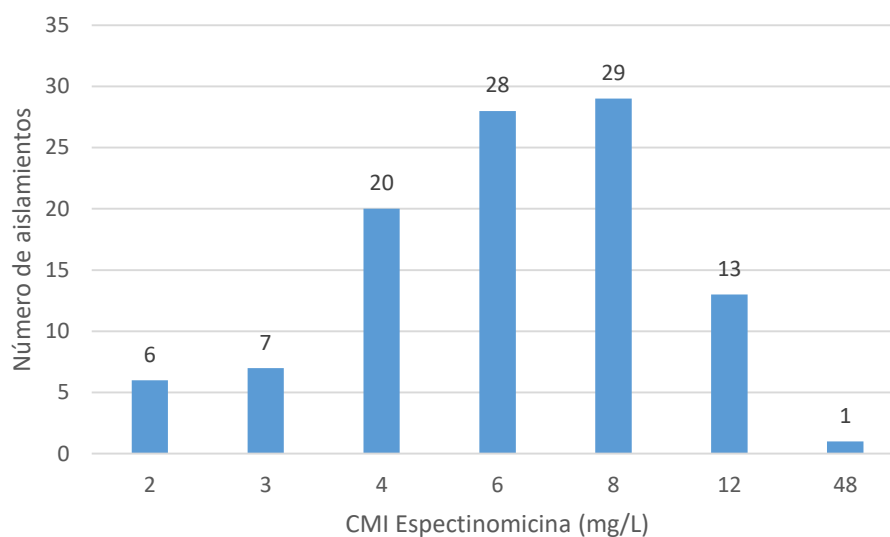


Figura 47. Distribución de la CMI de espectinomicina de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

6.4.7 Gentamicina

En el caso de la gentamicina, el rango de CMI fue de 0.5 mg/L a 8 mg/L distribuyéndose de manera unimodal (figura 48), con una CMI₅₀ de 3 mg/L y una CMI₉₀ de 4 mg/L.

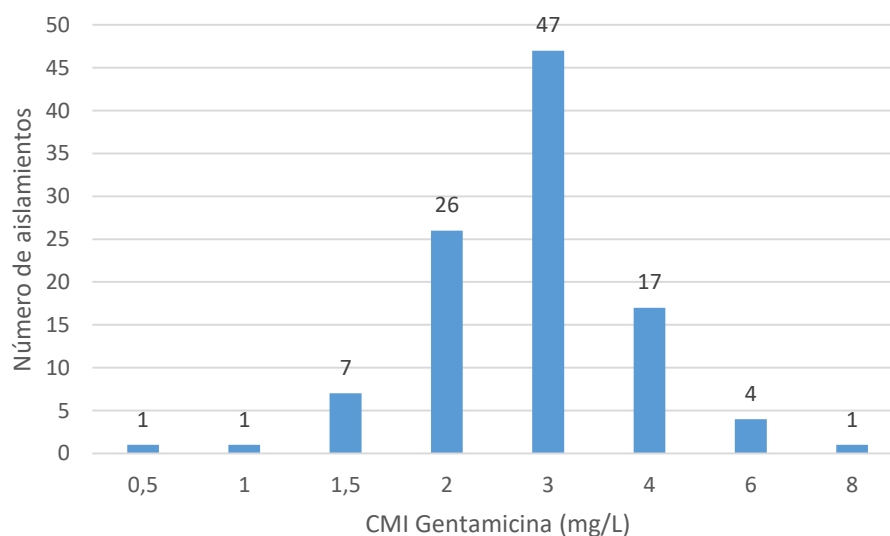


Figura 48. Distribución de la CMI de gentamicina de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae*.

Hasta el momento, las guías no establecen puntos de corte para la interpretación de las CMI de gentamicina. No obstante, algunos estudios aplican los rangos establecidos por Brown *et al.* (82) basados en los ratios de curación y la comparación de CMI, donde la categoría sensible tiene una $CMI \leq 4$ mg/L y la resistente una $CMI \geq 32$ mg/L.

Si aplicamos estos puntos de corte, el 95.2% de las cepas (n=99) fueron sensibles y el 4.8% (n=5) tuvieron una sensibilidad intermedia. Todos los aislamientos procedentes del cérvix y la faringe fueron sensibles y los intermedios se concentraron en las zonas uretrales y rectales (figura 49).

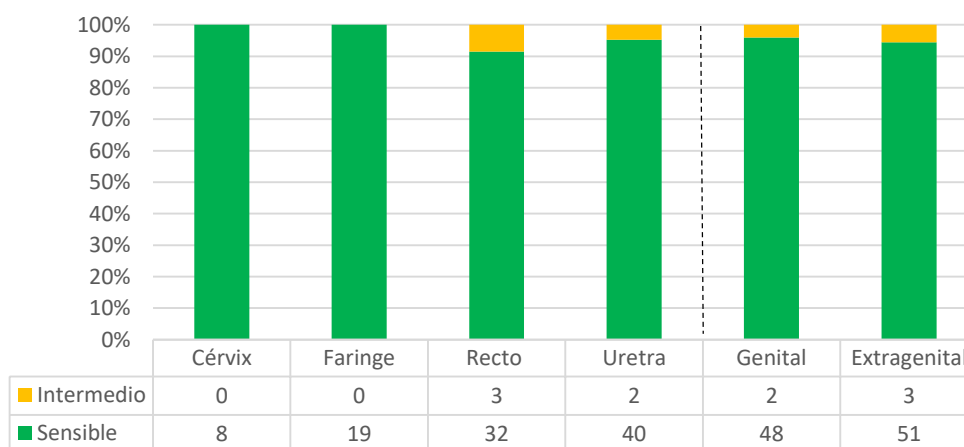


Figura 49. Distribución de la sensibilidad antimicrobiana a gentamicina en función de la localización de la infección, siguiendo los criterios de interpretación de Brown *et al.* (82).

6.5 Factores de riesgo para la infección por *N. gonorrhoeae* resistente a antimicrobianos y con sensibilidad intermedia en población HSH

Debido a que 81 de los 104 aislamientos (77.9%) procedían de HSH, 78 homosexuales y 3 bisexuales, y dado que la orientación sexual está correlacionada con otras variables, el análisis de los factores de riesgo se realizó en este colectivo.

En estas 81 cepas de *N. gonorrhoeae*, no se detectaron resistencias ni a la ceftriaxona, ni a la cefixima, ni a la espectinomicina y, en el caso de la tetraciclina y la azitromicina la prevalencia

de la resistencia encontrada fue baja. Por lo tanto, el análisis de los factores de riesgo se realizó para la resistencia a penicilina y ciprofloxacino. Asimismo, en el caso de la tetraciclina, la azitromicina y la penicilina, también se incluyó el análisis para la sensibilidad intermedia. En las tablas 26-28 se recogen los factores de riesgo que se asocian de manera significativa con la resistencia antimicrobiana.

Para esta cohorte de pacientes, 15 aislamientos (18.5%) fueron resistentes a la penicilina y mediante el análisis de regresión logística univariante, se estableció una asociación significativa ($p < 0.05$) entre la resistencia a este antibiótico y el número de parejas sexuales en el último año (tabla 26). Sin embargo, ninguno de los factores de riesgo incluidos en el análisis multivariante (número de parejas sexuales en el último año, $p = 0.033$, y seroestatus del VIH, $p = 0.089$) se asoció significativamente con la resistencia a penicilina. Del mismo modo, no se asoció significativamente ningún factor de riesgo en los individuos con cepas con sensibilidad disminuida a la penicilina (tabla 26).

El 35.8% ($n = 29$) de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* en HSH fueron resistentes a ciprofloxacino y, aunque dentro de este porcentaje hay 2 aislamientos clasificados en la categoría de sensibilidad intermedia aplicando los criterios del CLSI, con los puntos de corte de EUCAST fueron clasificados como resistentes, por lo que se incluyeron en el análisis. Para la resistencia a este antibiótico, en el análisis univariante se observaron asociaciones significativas con la edad ($p = 0.013$), el uso de drogas intravenosas ($p = 0.04$), el número de parejas sexuales en el último año ($p = 0.051$), el seroestatus al VIH ($p < 0.01$) y el número de localizaciones anatómicas con gonococo ($p = 0.042$). Sin embargo, sólo los pacientes con VIH (VIH positivo, $aOR = 5.206$, $IC95\% = 1.704-15.905$, $p = 0.015$) y con edades comprendidas entre 29 y 39 años ($aOR = 5.340$, $IC95\% = 1.466-19.450$, $p = 0.029$), tuvieron una asociación significativa con dicha resistencia en el análisis de regresión multivariante (tabla 27).

En el caso de la azitromicina, como sólo se encontraron 2 aislados con resistencia ($CMI > 0.5 \text{ mg/L}$) decidimos analizar los aislados con $CMI > 0.25 \text{ mg/L}$ ($n=7$, 8.6%) incluyéndose así, tanto los aislados resistentes como los que presentaban sensibilidad intermedia; la edad fue el único factor de riesgo que de forma independiente se asoció significativamente ($p=0.046$) con este tipo de cepas (tabla 27).

Según los puntos de corte del EUCAST, el 3.7% ($n=3$) de los 81 aislamientos del colectivo HSH fueron resistentes a la tetraciclina y el 12.3% ($n=10$) tuvieron sensibilidad intermedia. En cambio, siguiendo los criterios del CLSI, sólo 2 cepas mostraron resistencia (2.5%) a este agente y 37 sensibilidad intermedia (45.7%). El análisis de regresión logística univariante mostró una asociación significativa ($p < 0.05$) entre el nivel de estudios y el número de localizaciones con gonococo con la resistencia y sensibilidad disminuida a tetraciclina en ambos casos. La edad y el origen, sin embargo, sólo se asociaron significativamente al aplicar los criterios de EUCAST y CLSI, respectivamente. En el análisis ajustado mediante regresión multivariante, únicamente el haber sido diagnosticado con alguna ITS en el año previo se asoció significativamente tanto siguiendo los criterios EUCAST ($aOR=12.706$, $IC95\%=1.805-89.420$, $p=0.038$) como los CLSI ($aOR=5.816$, $IC95\%=1.721-19.650$, $p=0.005$). No obstante, como se puede observar en la tabla 28, la presencia de otros factores de riesgo fue dependiente de los puntos de corte utilizados (la edad en el caso de utilizar los definidos por EUCAST; nivel de estudio y número de localizaciones anatómicas con gonococo en el caso de usar los definidos por CLSI).

Características (n)	Penicilina (R) - EUCAST – CLSI					Penicilina (I+R) - EUCAST – CLSI		
	N ₁ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p	N ₂ (%)	OR (95% IC)	p
Grupo de edad, años								
18-28 (32)	4 (12.5)	1.00	0.327	NA	NA	31 (96.9)	1	0.700
29-39 (25)	7 (28.0)	2.722 (0.696-10.646)		NA		23 (92.0)	0.371 (0.032-4.343)	
40-51 (24)	4 (16.7)	1.400 (0.312-6.274)		NA		23 (95.8)	0.742 (0.044-12.495)	
Origen								
Europa (57)	12 (21.1)	0.800 (0.076-8.397)	0.594	NA	NA	53 (93.0)	0	0.408
Latinoamérica (18)	2 (11.1)	0.375 (0.025-5.572)		NA		18 (100)	1	
Asia (4)	1 (25.0)	1.00		NA		4 (100)	1	
América (2)	0	NA		NA		2 (100)	0.01E+10	
Nivel de estudios								
Primarios (4)	0	NA	0.349	NA	NA	4 (100)	1,35E+08	0.759
Secundarios (13)	2 (15.4)	1.00		NA		12 (92.3)	1	
Superiores (35)	9 (25.7)	1.904 (0.353-10.283)		NA		34 (97.1)	2.833 (0.164-48.926)	
Desconocido (29)	4 (13.8)	0.880 (0.140-5.539)		NA		27 (93.1)	1.125 (0.093-13.636)	
UDI								
No (79)	14 (17.7)	1.00	0.307	NA	NA	75 (94.9)	1	0.651
Sí (2)	1 (50.0)	4.643 (0.274-78.780)		NA		2 (100)	8,62E+07	
Usuarios de drogas recreacionales								
No (20)	1 (5.0)	1	0.127	NA	NA	18 (90.0)	1	0.432
Sí (55)	13 (23.6)	5.881 (0.717-48.261)		NA		53 (96.4)	2.944 (0.386-22.455)	
Desconocido (6)	1 (16.7)	3.800 (0.201-72.000)		NA		6 (100)	1,79E+08	
Número de parejas sexuales en el último año								
≤5 (27)	5 (18.5)	1	0.033	Excluido	NA	26 (96.3)	1	0.540
6-10 (12)	1 (8.3)	0.400 (0.042-3.855)		Excluido		10 (83.3)	0.192 (0.016-2.363)	
11-20 (10)	4 (40.0)	2.933 (0.595-14.454)		Excluido		9 (90)	0.346 (0.020-6.127)	
21-30 (2)	2 (100)	7,11E+09		Excluido		2 (100)	6,21E+07	
31-40 (6)	0	NA		Excluido		5 (100)	6,21E+07	
41-50 (5)	1 (20.0)	1.100 (0.100-12.087)		Excluido		5 (100)	6,21E+07	
>50 (13)	2 (15.4)	0.800 (0.133-4.803)		Excluido		13 (100)	6,21E+07	
Desconocido (6)	0	NA		Excluido		5 (100)	6,21E+07	

Características (n)	Penicilina (R) - EUCAST – CLSI					Penicilina (I+R) - EUCAST – CLSI		
	N ₁ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p	N ₂ (%)	OR (95% IC)	p
Localización anatómica de la infección								
Uretra (32)	8 (25.0)	1	0.307	NA	NA	31 (96.9)	1	0.808
Recto (35)	6 (17.1)	0.621 (0.189-2.038)		NA		33 (94.3)	0.532 (0.046-6.168)	
Faringe (14)	1 (7.1)	0.231 (0.026-2.053)		NA		13 (92.9)	0.419 (0.024-7.224)	
Sintomatología								
No (33)	4 (12.5)	1	0.350	NA	NA	31 (93.9)	1	0.890
Sí (47)	11 (23.4)	2.215 (0.638-7.690)		NA		45 (95.7)	1.452 (0.194-10.863)	
Desconocido (1)	0	NA		NA		1 (100)	1,042E+08	
Seroestatus VIH								
Negativo (43)	5 (11.6)	1	0.089	1	0.066	39 (90.7)	1	0.072
Positivo (35)	10 (28.6)	3.040 (0.928-9.955)		3.040 (0.928-9.955)		35 (100)	1,66E+08	
Desconocido (3)	0	NA		NA		3 (100)	1,66E+08	
Coinfecciones con otras ITS (≠ Gonorrea)								
No (56)	12 (21.4)	1	0.297	NA	NA	53 (94.6)	1	0.791
Sí (25)	3 (12.0)	0.500 (0.128-1.957)		NA		24 (96.0)	1.358 (0.134-13.741)	
ITS diagnosticadas en el último año								
No (47)	8 (17.0)	1	0.728	NA	NA	44 (93.6)	1	0.745
Sí (33)	7 (21.2)	1.312 (0.424-4.060)		NA		32 (97.0)	2.182 (0.217-21.948)	
Desconocido (1)	0	NA		NA		1 (100)	1,101E+08	
Número de localizaciones anatómicas con gonococo								
1 (67)	15 (22.4)	NA	NA	NA	NA	63 (94.0)	1	0.458
2 (12)	0	NA		NA		12 (100)	1,03E+08	
3 (2)	0	NA		NA		2 (100)	1,03E+08	

Tabla 26. Factores de riesgo asociados con la resistencia a penicilina en población HSH.

n, número de aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de HSH; N₁, número de cepas resistentes a penicilina; N₂, número de cepas con resistencia y sensibilidad intermedia a penicilina; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; aOR, OR ajustado; excluido, variable excluida mediante regresión logística con el método wald hacia atrás; NA, no aplica.

Características (n)	Ciprofloxacino - (R) EUCAST – (I+R) CLSI					Azitromicina (I+R) – EUCAST				
	N ₁ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p	N ₂ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p
Grupo de edad, años										
18-28 (32)	6 (18.8)	1	0.013	1	0.029	5 (15.6)	1	0.046	Excluido	NA
29-39 (25)	14 (56.0)	5.515 (1.681-18.095)		5.340 (1.466-19.450)		0	NA		Excluido	
40-51 (24)	9 (37.5)	2.600 (0.773-8.744)		1.433 (0.372-5.519)		2 (8.3)	0.491 (0.087-2.779)		Excluido	
Origen										
Europa (57)	19 (33.3)	1	0.776	NA	NA	5 (8.8)	1	0.671	NA	NA
Latinoamérica (18)	8 (44.4)	1.600 (0.543-4.714)		NA		1 (5.6)	0.612 (0.067-5.609)		NA	
Asia (4)	1 (25.0)	0.667 (0.065-6.847)		NA		1 (25.0)	3.467 (0.302-39.859)		NA	
América (2)	1 (50)	2.000 (0.119-33.755)		NA		0	NA		NA	
Nivel de estudios										
Primarios (4)	3 (75)	16.500 (1.088-250.176)	0.149	NA	NA	0	NA	0.405	NA	NA
Secundarios (13)	2 (15.4)	1		NA		2 (15.4)	1		NA	
Superiores (35)	13 (37.1)	3.250 (0.621-17.013)		NA		4 (11.4)	0.710 (0.114-4.431)		NA	
Desconocido (29)	11 (37.9)	3.361 (0.625-18.089)		NA		1 (3.4)	0.196 (0.016-2.392)		NA	
UDI										
No (79)	27 (34.2)	1	0.040	Excluido	NA	7 (8.9)	1	0.545	NA	NA
Sí (2)	2 (100)	3,111E+09		Excluido		0	NA		NA	
Usuarios de drogas recreacionales										
No (20)	6 (30.0)	1	0.798	NA	NA	2 (10.0)	1	0.565	NA	NA
Sí (55)	21 (38.2)	1.441 (0.480-4.331)		NA		5 (9.1)	0.900 (0.160-5.057)		NA	
Desconocido (6)	2 (33.3)	1.167 (0.166-8.186)		NA		0	NA		NA	
Número de parejas sexuales en el último año										
≤5 (27)	8 (29.6)	1	0.051	Excluido	NA	3 (11.1)	1	0.215	NA	NA
6-10 (12)	4 (33.3)	1.187 (0.277-5.098)		Excluido		0	NA		NA	
11-20 (10)	6 (60.0)	3.562 (0.786-16.142)		Excluido		3 (30.0)	3.429 (0.562-20.914)		NA	
21-30 (2)	2 (100)	3,84E+09		Excluido		0	NA		NA	
31-40 (6)	1 (16.7)	0.475 (0.048-4.740)		Excluido		0	NA		NA	
41-50 (5)	2 (40.0)	1.583 (0.221-11.361)		Excluido		0	NA		NA	
>50 (13)	6 (46.2)	2.036 (0.518-7.995)		Excluido		1 (7.7)	0.667 (0.063-7.109)		NA	
Desconocido (6)	0	NA		Excluido		0	NA		NA	

Características (n)	Ciprofloxacino - (R) EUCAST – (I+R) CLSI					Azitromicina (I+R) – EUCAST				
	N ₁ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p	N ₂ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p
Localización anatómica de la infección										
Uretra (32)	14 (43.8)	1	0.477	NA	NA	2 (6.3)	1	0.736	NA	NA
Recto (35)	11 (31.4)	0.589 (0.217-1.600)		NA		4 (11.4)	1.935 (0.330-11.363)		NA	
Faringe (14)	4 (28.6)	0.514 (0.133-1.991)		NA		1 (7.1)	1.154 (0.096-13.877)		NA	
Sintomatología										
No (33)	11 (33.3)	1	0.577	NA	NA	3 (9.1)	1	0.909	NA	NA
Sí (47)	18 (38.3)	1.241 (0.489-3.154)		NA		4 (8.5)	0.930 (0.194-4.462)		NA	
Desconocido (1)	0	NA		NA		0	NA		NA	
Seroestatus VIH										
Negativo (43)	8 (18.6)	1	<0.01	1	0.015	3 (7.0)	1	0.601	NA	NA
Positivo (35)	18 (51.4)	4.632 (1.680-12.777)		5.206 (1.704-15.905)		4 (11.4)	1.720 (0.358-8.259)		NA	
Desconocido (3)	3 (100)	7,068E+09		7,45E+09		0	NA		NA	
Coinfecciones con otras ITS (≠ Gonorrea)										
No (56)	18 (32.1)	1	0.307	NA	NA	5 (8.9)	1	0.890	NA	NA
Sí (25)	11 (44.0)	1.659 (0.630-4.369)		NA		2 (8.0)	0.887 (0.160-4.914)		NA	
ITS diagnosticadas en el último año										
No (47)	18 (38.3)	1	0.577	NA	NA	5 (10.6)	1	0.701	NA	NA
Sí (33)	11 (33.3)	0.806 (0.317-2.047)		NA		2 (6.1)	0.542 (0.099-2.979)		NA	
Desconocido (1)	0	NA		NA		0	NA		NA	
Número de localizaciones anatómicas con gonococo										
1 (67)	25 (37.3)	1	0.042	Excluido	NA	4 (6.0)	1	0.145	NA	NA
2 (12)	2 (16.7)	0.336 (0.068-1.659)		Excluido		3 (25)	5.250 (1.006-27.388)		NA	
3 (2)	2 (100)	2,714E+09		Excluido		0	NA		NA	

Tabla 27. Factores de riesgo asociados con la resistencia al ciprofloxacino y con la resistencia y la sensibilidad intermedia a la azitromicina en población HSH. n, número de aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de HSH; N₁, número de cepas resistentes a ciprofloxacino por EUCAST y con sensibilidad intermedia y resistentes con CLSI; N₂, número de cepas con resistencia y sensibilidad intermedia a la azitromicina; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; aOR, OR ajustado; excluido, variable excluida mediante regresión logística con el método wald hacia atrás; NA, no aplica.

Características (n)	Tetraciclina (I+R) - EUCAST					Tetraciclina (I+R) - CLSI				
	N ₁ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p	N ₂ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p
Grupo de edad, años										
18-28 (32)	2 (6.3)	1	0.031	1	0.025	14 (43.8)	1	0.806	NA	NA
29-39 (25)	8 (32.0)	7.059 (1.342-37.112)		31.026 (2.296-419.302)		13 (52.0)	1.393 (0.487-3.982)			
40-51 (24)	3 (12.5)	2.143 (0.329-13.960)		7.482 (0.524-106.912)		12 (50.0)	1.286 (0.445-3.719)			
Origen										
Europa (57)	8 (14.0)	1	0.278	NA	NA	29 (50.9)	1	0.038	Excluido	NA
Latinoamérica (18)	5 (27.8)	2.356 (0.659-8.420)		NA		10 (55.6)	1.207 (0.416-3.501)			
Asia (4)	0	NA		NA		0	NA			
América (2)	0	NA		NA		0	NA			
Nivel de estudios										
Primarios (4)	3 (75.0)	16.500 (1.088-250.176)	0.036	Excluido	NA	3 (75.0)	0.900 (0.067-12.179)	0.037	0.089 (0.003-2.339)	0.032
Secundarios (13)	2 (15.4)	1		Excluido		10 (76.9)	1			
Superiores (35)	3 (8.6)	0.516 (0.076-3.502)		Excluido		12 (34.3)	0.157 (0.036-0.679)			
Desconocido (29)	5 (17.2)	1.146 (0.192-6.852)		Excluido		14 (48.3)	0.280 (0.064-1.232)			
UDI										
No (79)	12 (15.2)	1	0.185	NA	NA	38 (48.1)	1	0.958	NA	NA
Sí (2)	1 (50)	5.583 (0.327-95.475)		NA		1 (50)	1.078 (0.065-17.863)			
Usuarios de drogas recreacionales										
No (20)	1 (5.0)	1	0.227	NA	NA	11 (55.0)	1	0.627	NA	NA
Sí (55)	11 (20.0)	4.750 (0.572-39.440)		NA		26 (47.3)	0.734 (0.262-2.050)			
Desconocido (6)	1 (16.7)	3.800 (0.201-72.000)		NA		2 (33.3)	0.409 (0.060-2.769)			
Número de parejas sexuales en el último año										
≤5 (27)	4 (14.8)	1	0.668	NA	NA	16 (59.3)	1	0.379	NA	NA
6-10 (12)	2 (16.7)	1.150 (0.180-7.333)		NA		6 (50)	0.687 (0.175-2.699)			
11-20 (10)	1 (10.0)	0.639 (0.063-6.520)		NA		3 (30)	0.295 (0.062-1.395)			
21-30 (2)	0	NA		NA		0	NA			
31-40 (6)	1 (16.7)	1.150 (0.105-12.616)		NA		2 (33.3)	0.344 (0.053-2.215)			
41-50 (5)	1 (20.0)	1.438 (0.126-16.410)		NA		2 (40)	0.458 (0.065-3.212)			
>50 (13)	4 (30.8)	2.556 (0.523-12.479)		NA		8 (61.5)	1.100 (0.284-4.267)			
Desconocido (6)	0	NA		NA		2 (33.3)	0.344 (0.053-2.215)			

Características (n)	Tetraciclina (I+R) - EUCAST					Tetraciclina (I+R) – CLSI				
	N ₁ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p	N ₂ (%)	OR (95% IC)	p	aOR (95% IC)	p
Localización anatómica de la infección										
Uretra (32)	4 (12.5)	1	0.299	NA	NA	11 (34.4)	1	0.106	NA	NA
Recto (35)	8 (22.9)	2.074 (0.559-7.698)		NA		19 (54.3)	2.267 (0.845-6.084)		NA	
Faringe (14)	1 (7.1)	0.538 (0.055-5.306)		NA		9 (64.3)	3.436 (0.923-12.790)		NA	
Sintomatología										
No (33)	6 (18.2)	1	0.125	NA	NA	20 (60.6)	1	0.068	Excluido	NA
Sí (47)	6 (12.8)	0.659 (0.192-2.256)		NA		18 (38.3)	0.403 (0.162-1.005)		Excluido	
Desconocido (1)	1 (100)	7,270E+09		NA		1 (100)	1,050E+09		Excluido	
Seroestatus VIH										
Negativo (43)	4 (9.3)	1	0.089	Excluido	NA	19 (44.2)	1	0.657	NA	NA
Positivo (35)	9 (25.7)	3.375 (0.940-12.115)		Excluido		18 (51.4)	1.337 (0.546-3.274)		NA	
Desconocido (3)	0	NA		Excluido		2 (66.7)	2.526 (0.213-30.010)		NA	
Coinfecciones con otras ITS (≠ Gonorrea)										
No (56)	7 (12.5)	1	0.193	NA	NA	29 (51.8)	1	0.325	NA	NA
Sí (25)	6 (24.0)	2.211 (0.658-7.568)		NA		10 (41.7)	0.621 (0.238-1.615)		NA	
ITS diagnosticadas en el último año										
No (47)	4 (8.5)	1	0.070	1	0.038	19 (40.4)	1	0.075	1	0.005
Sí (33)	9 (27.3)	4.031 (1.122-14.489)		12.706 (1.805-89.420)		20 (60.6)	2.267 (0.913-5.629)		5.816 (1.721-19.650)	
Desconocido (1)	0	NA		NA		0	NA		NA	
Número de localizaciones anatómicas con gonococo										
1 (67)	11 (16.4)	1	0.003	Excluido	NA	26 (38.8)	1	<0.01	1	0.013
2 (12)	0	NA		Excluido		11 (91.7)	17.326 (2.113-142.399)		29.563 (3.098-282.081)	
3 (2)	2 (100)	8,224E+09		Excluido		2 (100)	2,547E+09		9,395E+09	

Tabla 28. Factores de riesgo asociados con la resistencia y sensibilidad intermedia a tetraciclina en población HSH.

n, número de aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de HSH; N₁, número de cepas resistentes y con sensibilidad intermedia a tetraciclina siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST; N₂, número de cepas resistentes y con sensibilidad intermedia a tetraciclina siguiendo los criterios de interpretación del CLSI; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; aOR, OR ajustado; excluido, variable excluida mediante regresión logística con el método wald hacia atrás; NA, no aplica.

6.6 Serotipia y caracterización molecular

Todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae* se clasificaron dentro del serogrupo IB (II/III).

La caracterización molecular, mediante NG-MAST, agrupó los 104 aislamientos de gonococo analizados en 48 STs diferentes, incluyendo 41 alelos distintos del gen *porB* y 26 alelos del gen *tbpB* (figura 50). De los 48 STs identificados en la población de estudio, 23 de ellos estaban representados únicamente por 1 cepa mientras que los 25 STs restantes, albergaban el 77.9% de los aislamientos (n=81). Los STs más predominantes fueron: ST5441 (n=8), ST2318 (n=7), ST12547 (n=6) y ST2400 (n=5).

El 27.1% (n=13) de los STs (ST14754, ST14758, ST14759, ST14760, ST14764, ST14765, ST14766, ST14767, ST14768, ST14769, ST14770, ST14771 y ST15246), el 14.6% (n=6) de los alelos del gen *porB* (8574, 8575, 8576, 8579, 8580 y 8581) y el 7.7% (n=2) de las variantes alélicas del gen *tbpB* (2466 y 2469) no habían sido descritas con anterioridad.

Las 3 cepas resistentes a cefixima pertenecían al ST13070 (n=3), mientras que las 2 resistentes a la azitromicina se caracterizaron dentro de los STs 8241 (n=1) y 12415 (n=1). La única cepa perteneciente al ST1407 fue resistente a ciprofloxacino, tuvo una sensibilidad intermedia a la penicilina y a la tetraciclina, aunque mostró sensibilidad a las cefalosporinas (CMI ceftriaxona: 0.094 mg/L y CMI de cefixima: 0.047 mg/L).

En el estudio se incluyó a 9 pacientes con aislamientos de gonococo en varias localizaciones anatómicas, identificándose en cada paciente aislamientos con el mismo ST en las diferentes zonas. Asimismo, hubo un paciente con infección rectal con un aislamiento perteneciente al ST14758, que al realizar el test de cura se obtuvo un aislamiento de un secuenciotipo diferente, el ST15246.

Los genogrupos están compuestos por secuenciotipos que comparten uno de los dos alelos y que poseen un porcentaje de similitud $\geq 99\%$ con el otro alelo. En este estudio, los STs que estaban estrechamente relacionados se agruparon en 9 genogrupos en los que se incluyen a 41 cepas de *N. gonorrhoeae* (39.4%), tal y como se puede observar en la figura 50.

Los genogrupos más frecuentes fueron el G2400 (3 STs, n=10), seguido del G2992 (3 STs, n=6). Asimismo, había 4 genogrupos que comprendían 4 aislamientos cada uno: G4186 (2 STs), G5445 (3 STs), G5793 (2 STs) y G11461 (2 STs). Por otro lado, los menos prevalentes, cada uno con 3 aislamientos fueron: G1407 (3 STs), G5444 (2 STs) y G8517 (2 STs).

Se encontraron 2 STs, ST5441 y ST14754, que a pesar de presentar secuencias con menos de un 1% de diferencia (2pb en *porB* y 1pb en *tbpB*), no pudieron ser clasificados dentro de un mismo genogrupo, ya que no cumplían el requisito de compartir uno de los alelos.

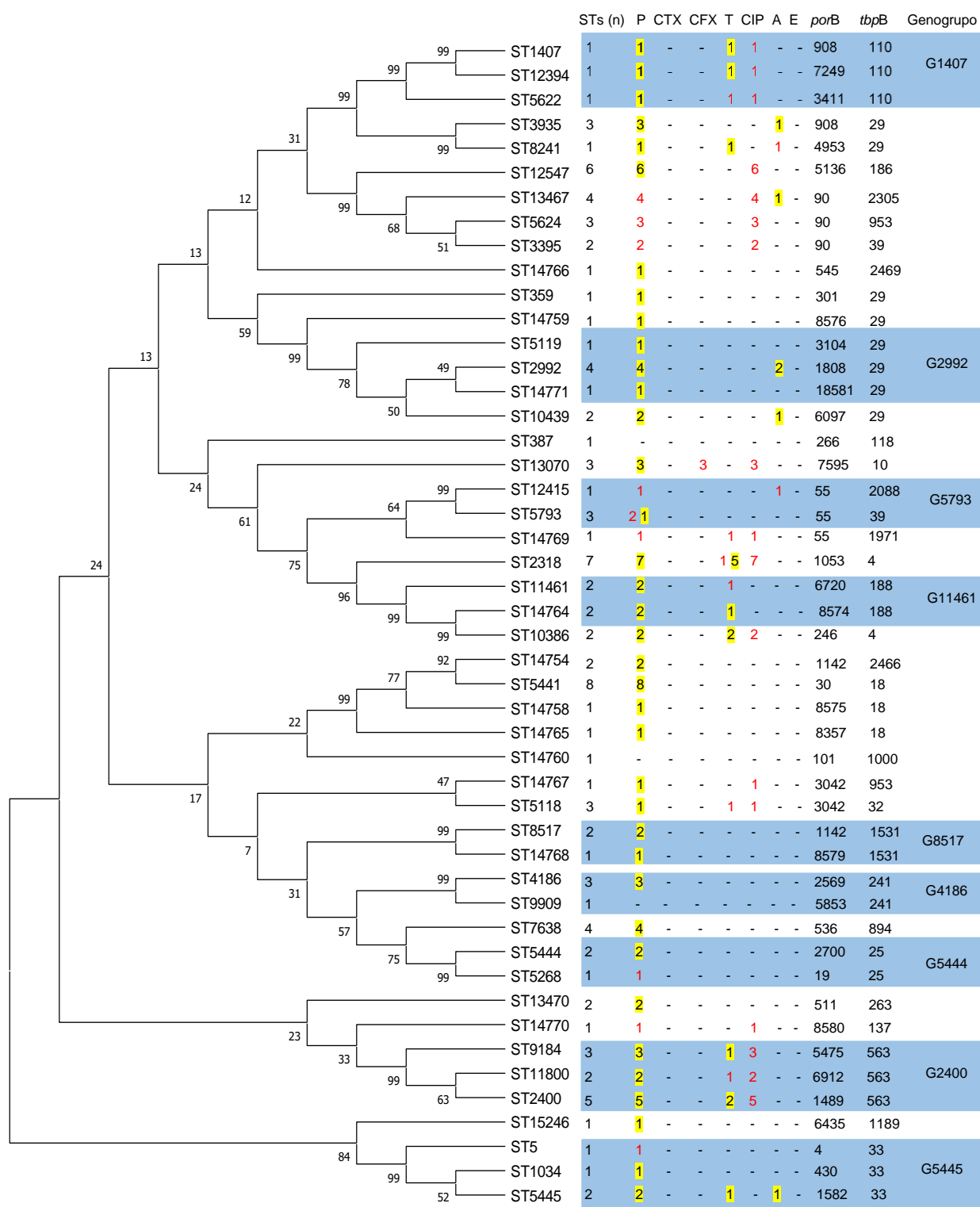


Figura 50. Dendrograma Neighbor-Joining de los diferentes STs encontrados entre los aislamientos de *N. gonorrhoeae* incluidos en el estudio.

Las similitudes entre los 48 STs se analizaron mediante el test de máxima verosimilitud tras concatenar las secuencias de *porB* y *tbpB*. En azul se muestran los STs que se agrupan en un mismo genogrupo. En amarillo aparece el número de aislamientos con sensibilidad intermedia y en rojo los resistentes (EUCAST). P, penicilina. CTX, ceftriaxona. CFX, cefixima. T, tetraciclina. CIP, ciprofloxacino. A, azitromicina. E, espectinomicina.

Las principales características clínicas y epidemiológicas de los genogrupos y de los secuenciotipos más prevalentes en la población de estudio, que representan aproximadamente un tercio de los aislados (n=37, 35.6%) y de los pacientes (n=33, 35.1%), se resumen en la tabla 29. No se encontraron diferencias en cuanto al género, al origen, a la localización anatómica y a la edad. Sin embargo, el genogrupo G2400 se asoció significativamente a los sujetos heterosexuales ($p<0.01$). Respecto a la sensibilidad antimicrobiana, se encontraron diferencias significativas para la resistencia a ciprofloxacino en ST2318, G2400, G2992 y ST5441 ($p<0.05$), para la tetraciclina en ST2318 ($p<0.01$) y para azitromicina en G2992 ($p=0.023$).

	G2400 (n=10)	ST5441 (n=8)	ST2318 (n=7)	ST12547 (n=6)	G2992 (n=6)
STs NG-MAST (n)	ST2400 (5) ST9184 (3) ST11800 (2)	ST5441 (8)	ST2318 (7)	ST12547 (6)	ST2992 (4) ST5119 (1) ST14771 (1)
Penicilina	Intermedio	Intermedio	Intermedio	Intermedio	Intermedio
Ceftriaxona	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Cefixima	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Tetraciclina	Variable ^a	Sensible	Variable^b	Sensible	Sensible
Ciprofloxacino	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible
Azitromicina	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Variable^c
Espectinomocina	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Infección Genital (%)	70	62.5	28.6	83.3	50
Pacientes (n)	8	8	6	6	5
Edad mediana, años (Rango)	33.5 (22-46)	35.5 (19-50)	32.5 (19-49)	37.5 (22-44)	38 (23-49)
Hombres (%)	75	100	100	100	80
Homosexual (%)	25	87.5	83.3	83.3	60
Europeos (%)	75	62.5	33.3	83.3	60
Españoles (%)	75	50	33.3	83.3	40
VIH + (%)	0	25	50	50	20

Tabla 29. Características clínicas y epidemiológicas de los secuenciotipos y genogrupos más prevalentes en la población de estudio.

La interpretación de la sensibilidad antimicrobiana se realizó con criterios EUCAST. Los parámetros que fueron estadísticamente significativos ($p<0.05$) aparecen en negrita. ^a Variable: 60% (n=6) Sensible, 30% (n=3) Intermedio y 10% (n=1) Resistente. ^b Variable: 14.3% (n=1) Sensible, 71.4% (n=5) Intermedio y 14.3% (n=1) Resistente. ^c Variable: 66.7% (n=4) Sensible y 33.3% (n=2) Intermedio.

6.7 Secuenciación del genoma completo (SGC)

Del total de aislamientos de *N. gonorrhoeae* incluidos en el estudio, se analizaron todas las cepas a excepción de una de ellas debido a una pérdida de viabilidad bacteriana, por lo que finalmente, se analizaron mediante la SGC un total de 103 aislados.

En la secuenciación del genoma completo se obtuvo una longitud media de 2.413.517,5 \pm 776.610,97 pb, con un contenido en GC del 52,1 \pm 1,13 %.

La anotación y comparación de los genomas se llevó a cabo utilizando la herramienta “genoma comparador” disponible en la plataforma pubMLST (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_neisseria_isolates&page=plugin&name=GenomeComparator), utilizando como genoma de referencia el de la cepa de *N. gonorrhoeae* FA1090. Del total de 1886 loci anotados en pubMLST, el 92.8% (n=1751) estaban presentes en todos los aislamientos del estudio, el 4.9% (n=92) entre el 90 - <100% y el 2.3% restante (n=43), en menos del 90% de los aislamientos (tabla 30).

Porcentaje de aislamientos	Loci presentes	
	Número	Porcentaje
0 - <5	4	0.2
10 - <15	1	0.1
15 - <20	1	0.1
20 - <25	2	0.1
30 - <35	3	0.2
50 - <55	2	0.1
55 - <60	6	0.3
60 - <65	1	0.1
65 - <70	4	0.2
70 - <75	3	0.2
75 - <80	2	0.1
80 - <85	5	0.3
85 - <90	9	0.5
90 - <95	9	0.5
95 - <100	83	4.4
100	1751	92.8

Tabla 30. Distribución del número de loci presentes entre las de cepas de *N. gonorrhoeae* incluidas en el estudio.

6.7.1 Análisis filogenómico y caracterización molecular

La relación filogenómica de los 103 aislamientos de *N. gonorrhoeae* incluidos en el estudio, realizada en base a los 1751 loci del genoma *core*, se muestra en la figura 51.

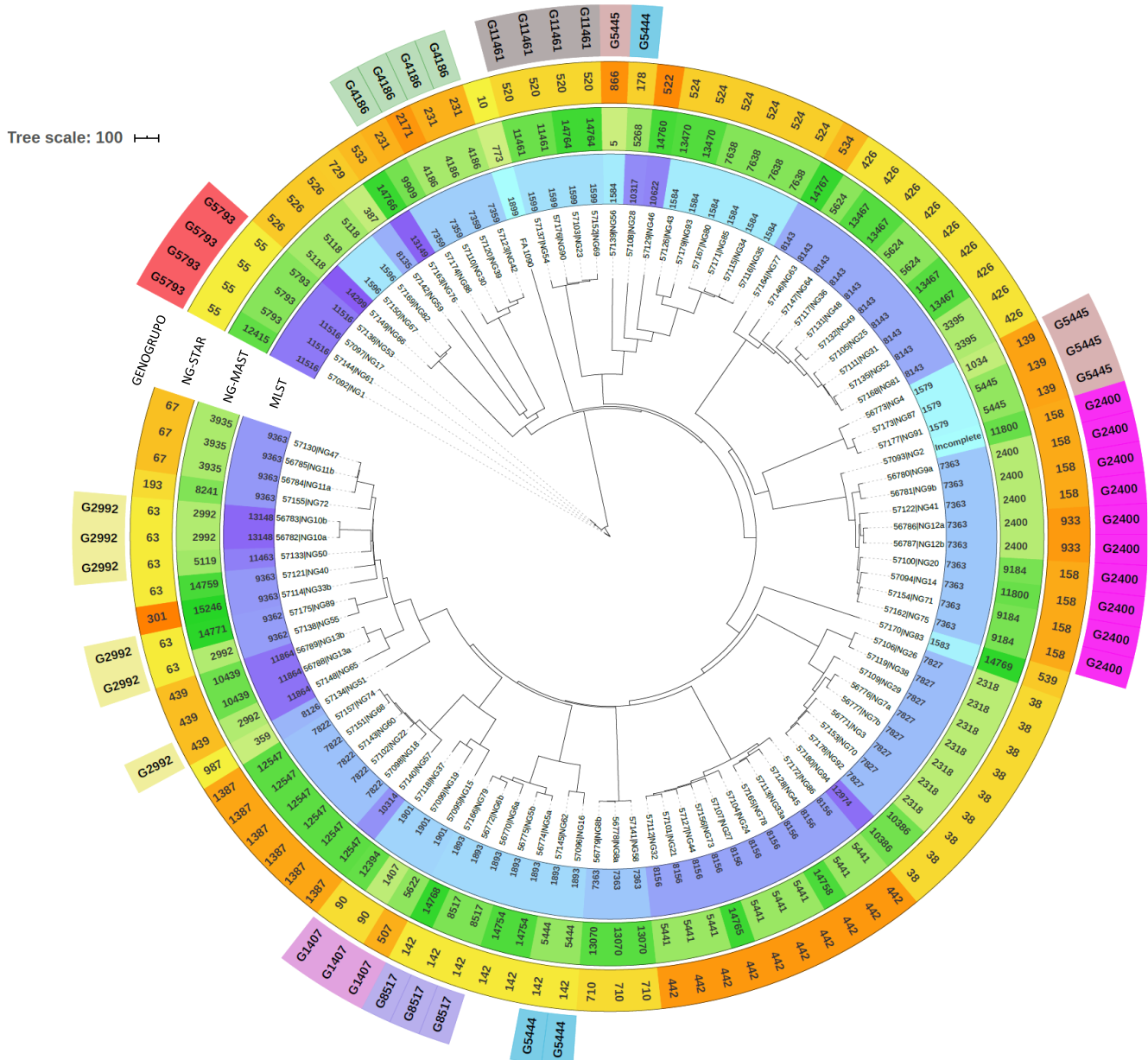


Figura 51. Árbol filogenómico basado en los datos de la SGC de los 103 aislamientos de gonococo incluidos en el estudio, y su comparación con los diferentes métodos de tipado: wgMLST, wgNG-MAST, wgNG-STAR y genogrupos

En los 9 pacientes con infección concomitante de gonococo en varias localizaciones anatómicas, se observó una relación estrecha de los genomas, confirmándose la presencia de la misma cepa en las diferentes localizaciones (figura 51).

Los ensamblados *de novo* generados se utilizaron para inferir *in silico* el MLST (wgMLST), el NG-MAST (wgNG-MAST) y el NG-STAR (wgNG-STAR).

Uno de los 103 aislados secuenciados no pudo caracterizarse mediante wgMLST, ya que no pudo obtenerse correctamente la secuencia del alelo *pgm* que completa el esquema de los 7 genes del MLST. En total, se identificaron 27 STs wgMLST diferentes y de éstos, 10 STs estaban representados por aislamientos únicos y 17 STs, por más de una cepa (tabla 31). Asimismo, se describieron 2 perfiles nuevos, el ST13148 y el ST13149, resultado de nuevas combinaciones de alelos previamente descritos.

Número de aislados	Secuenciotipos (STs)		
	wgMLST	wgNG-MAST (n)	wgNG-STAR (n)
12	7363	2400 (5)	158 (3)
			933 (2)
		9184 (3)	158 (3)
		11800 (1)	158 (1)
		13070 (3)	710 (3)
10	8143	3395 (2)	426 (2)
		5624 (3)	426 (3)
		13467 (4)	426 (4)
		14767 (1)	534 (1)
10	8156	5441 (8)	442 (8)
		14758 (1)	442 (1)
		14765 (1)	442 (1)
8	7827	2318 (7)	38 (7)
		10386 (1)	38 (1)
7	1584	5(1)	866 (1)
		7638 (4)	524 (4)
		13470 (2)	524 (2)
7	1893	5444 (2)	142 (2)
		8517 (2)	142 (2)
		14754 (2)	142 (2)
		14768 (1)	142 (1)
6	9363	3935 (3)	67 (3)
		8241 (1)	193 (1)
		14759 (1)	63 (1)
		15246 (1)	301 (1)
5	7822	12547 (5)	1387 (5)
4	1599	11461 (2)	520 (2)
		14764 (2)	520 (2)

Número de aislados	Secuenciotipos (STs)		
	wgMLST	wgNG-MAST (n)	wgNG-STAR (n)
4	7359	4186 (3)	231 (2)
			2171 (1)
		9909 (1)	231 (1)
4	11516	5793 (3)	55 (3)
		12415 (1)	55 (1)
3	1579	1034 (1)	139 (1)
		5445 (2)	139 (2)
3	1901	1407 (1)	90 (1)
		5622 (1)	507 (1)
		12394 (1)	90(1)
3	11864	2992 (1)	439 (1)
		10439 (2)	439 (2)
2	1596	5118 (2)	526 (2)
2	9362	2992 (1)	63 (1)
		14771 (1)	63 (1)
2	13148	2992 (2)	63 (2)
1	1583	14769 (1)	539 (1)
1	8126	359 (1)	987 (1)
1	8135	387 (1)	729 (1)
1	10314	12547 (1)	1387 (1)
1	10317	5268 (1)	178 (1)
1	10622	14760 (1)	522 (1)
1	11463	5119 (1)	63 (1)
1	12974	10386 (1)	38 (1)
1	13149	14766 (1)	533 (1)
1	14299	5118 (1)	526 (1)
1	Incompleto ^a	11800 (1)	158 (1)

Tabla 31. Tipado MLST, NG-MAST y NG-STAR obtenido *in silico* de la SGC de las cepas de gonococo.

^a Perfil wgMLST incompleto (alelo *abcZ*: 59, alelo *adk*: 39, alelo *aroE*: 67, alelo *fumC*: 78, alelo *gdh*: 148, alelo *pdhC*: 153, el locus *pam* no se pudo obtener mediante SGC).

En general, se observó concordancia entre el análisis filogenómico basado en el genoma *core* y wgMLST. Cada uno de los STs MLST se distribuyó de manera uniforme dentro de un único clado, a excepción del ST7363, que además de ser el más frecuente (n=12), está distribuido en 2 cladros diferentes (figura 51). Esta diferente distribución del ST7363, se corresponde con la resistencia a cefixima observada; entre los 12 aislados agrupados dentro del ST7363 se encuentran los únicos 3 aislados detectados en el estudio con resistencia a cefixima, justo los 3 aislados que se agrupan en un clado diferente al resto de aislados ST7363. Diferenciación que también se observa en el árbol filogenético realizado en base a los datos de NG-MAST, donde estos 3 aislados presentan diferente caracterización (figura 50).

En relación al tipado mediante wgNG-MAST, se obtuvieron un total de 47 STs diferentes (tabla 31) que coincidieron con los obtenidos mediante el NG-MAST realizado de manera tradicional. En el caso de los genogrupos G1407, G2400, G4186, G5793, G8517 y G11461, la distribución de los STs wgNG-MAST en el árbol filogenómico basado en el genoma *core*, confirma la estrecha relación entre los diferentes STs que conforman un mismo genogrupo, que pertenecen también a un mismo ST-wgMLST. Esto no ocurre, sin embargo, en el caso de los genogrupos G2992, G5444 y G5445, en los cuales los STs que los componen se encuentran repartidos en diferentes clados y pertenecen también a diferentes STs-wgMLST (figura 51).

El NG-STAR es un método de tipado basado en el perfil alélico de 7 genes asociados con resistencia: *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC* y 23S ARNr. Los aislados incluidos en el estudio se clasificaron mediante wgNG-STAR en un total de 30 STs diferentes, siendo el ST442 (n=10), el ST38 (n=9), el ST426 (n=9) y el ST158 (n=8) los más predominantes (tabla 31). Se obtuvieron 8 STs que no habían sido descritos previamente (ST520, ST522, ST524, ST526, ST533, ST534, ST539 y ST987).

Entre los 4 STs wgNG-STAR mayoritarios, las cepas pertenecientes al ST442 mostraron sensibilidad intermedia a penicilina y sensibilidad a las cefalosporinas, ciprofloxacino y azitromicina. Los STs 38 y 158 tuvieron un perfil de sensibilidad antibiótica común: sensibilidad a cefalosporinas y azitromicina, sensibilidad intermedia a penicilina y resistencia a ciprofloxacino. El ST426, a diferencia de los STs 38 y 158, posee además resistencia a penicilina y presenta mayoritariamente sensibilidad a la azitromicina (sensible n=8, intermedio n=1). Asimismo, las 3 cepas con resistencia a cefixima se clasificaron en el ST710 (n=3) y las 2 cepas con resistencia a azitromicina en el ST193 (n=1) y en el ST55 (n=4), presentando este último ST cepas que también eran sensibles a azitromicina.

6.7.2 Análisis de los determinantes genéticos asociados con la resistencia antimicrobiana

6.7.2.1 Betalactámicos

A partir de la secuencia completa de los genomas se analizaron los determinantes genéticos asociados con resistencia a betalactámicos localizados en los genes *penA*, *mtrR*, *pilQ*, *ponA*, *penB* y *bla*_{TEM}, cuya distribución entre la población de estudio se puede observar en la figura 52.

En relación a las betalactamasas plasmídicas asociadas con la resistencia a la penicilina, en el 14.6% de los aislamientos (n=15) se identificó el gen *bla*_{TEM}. De éstas, el 33.3% (n=5) pertenecían a las betalactamasas de tipo TEM-1 y el 66.7% (n=10) a las de tipo TEM-135 que poseen la sustitución aminoacídica M182T. Todos los aislamientos mostraron resistencia a la penicilina, a excepción de 1 de ellos.

Entre los 15 casos, en 12 se pudo determinar la secuencia completa del gen, mientras que en los otros 3 aislamientos sólo se obtuvo la secuencia parcial del gen, teniendo en los 3 casos una mayor similitud con el alelo 3. Los alelos más frecuentes fueron el 2 (n=10), seguido de los alelos 3 y 6, con un aislamiento cada uno. Todas las betalactamasas de tipo TEM-135 presentaban el alelo 2. Una de las 15 cepas con el determinante plasmídico (alelo 2), tuvo la prueba de la nitrocefina negativa (CMI de penicilina = 0.19 mg/L) y por el contrario, también hubo un aislamiento con la prueba positiva en la que no se identificó el gen *bla*_{TEM} (CMI penicilina = 1 mg/L) (tabla 32).

Respecto a las resistencias cromosómicas, 97 del total de cepas analizadas presentaron mutaciones asociadas con la resistencia a betalactámicos, concretamente se identificaron mutaciones asociadas con la resistencia a betalactámicos en el gen *mtrR* y/o en su promotor (n=92, 89.3%), en el gen *ponA* (n=51, 49.5%), en *pilQ* (n=49, 47.6%), en *penB* (n=37, 35.9%) y mutaciones en mosaico en el gen *penA* (n=7, 6.8%) (Tabla 32). Todos los aislados en los que se

identificaron alguna de las mutaciones asociadas con resistencia a betalactámicos presentaban un valor de CMI para penicilina > de 0.06 mg/L, con la excepción de un aislado que presentaba la mutación *mtrR* A39T y el alelo I para *pilQ* que presentaba una CMI de 0.047mg/L.

En los 3 aislamientos con CMI a cefixima de 0.19 mg/L (definidos como resistentes siguiendo los criterios EUCAST), se identificó la mutación L421P en el gen *ponA*, el alelo VI del gen *pilQ* con la sustitución N648S y el mosaico de tipo X del gen *penA*, que contiene las mutaciones: V316T, D345a, F504L y G545S (alelo 14). Sólo estos 3 aislados resistentes a cefixima mostraron mosaico tipo X del gen *penA*, mientras que el resto de determinantes fueron identificados también en cepas sensibles a cefixima, por lo tanto, en nuestra población de estudio únicamente la presencia de este tipo de alelo *penA* en mosaico tipo X es determinante para la aparición de resistencia a cefixima.

En las figuras 53-55, se puede observar la distribución conjunta de los determinantes asociados con la de resistencia a betalactámicos en función de la CMI a la penicilina, ceftriaxona y cefixima.

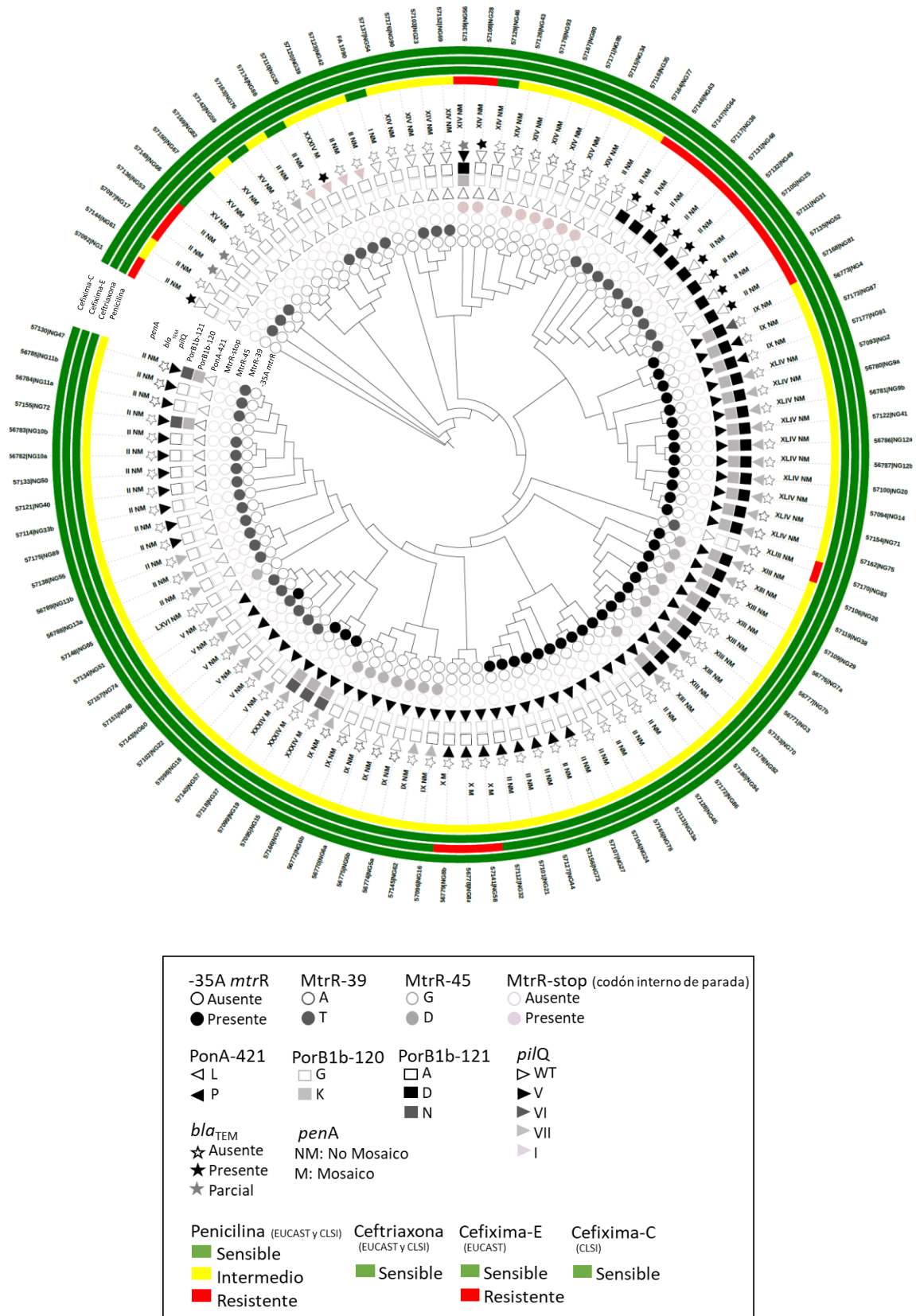


Figura 52. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a betalactámicos.

Número de aislamientos	<i>penA</i>	<i>mtrR</i>				<i>piIQ</i>	<i>ponA</i> L421P	<i>penB</i>			<i>bla</i> _{TEM}	Rango CMI Ceftriaxona (mg/L)	Rango CMI Cefixima (mg/L)	Rango CMI Penicilina (mg/L)/(Nitrocefina)
		-35A promotor	A39T	G45D	Codón interno de parada			A121D	A121N	G120K				
1	II NM					WT					√	<0.016	<0.016	1.5 / (+)
1	II NM					V			√	√		0.016	<0.016	0.5 / (-)
1	II NM					VII						<0.016	<0.016	0.094 / (-)
5	II NM	√				WT	√					<0.016	<0.016	0.094-0.19 / (-)
5	II NM	√				V	√					<0.016	<0.016	0.125-0.19 / (-)
2	II NM		√			WT						<0.016	<0.016	0.094-0.125 / (-)
2	II NM		√			WT					√ ^a	<0.016	<0.016	8 / (+)
9	II NM		√			WT		√			√	<0.016	<0.016	8->32 / (+)
3	II NM		√			I						0.016	0.094	0.047-0.125 / (-)
9	II NM		√			V						<0.016	<0.016-0.023	0.094-0.25 / (-)
1	II NM		√			V			√	√		<0.016	<0.016	0.19 / (-)
3	II NM		√			VII						<0.016	<0.016	0.094-0.19 / (-)
6	V NM		√			VII	√					<0.016	<0.016	0.125-0.25 / (-)
3	IX NM	√				VI	√	√		√		<0.016-0.032	<0.016-0.023	0.5-0.75 / (-)
4	IX NM			√		WT	√					0.016-0.023	0.016-0.032	0.38-1 / (-)
3	IX NM			√		VII	√					<0.016-0.016	<0.016-0.023	0.38-0.5 / (-)
3	XIII NM	√		√		WT	√	√		√		0.094	0.047-0.064	0.75-1 / (-)
6	XIII NM	√		√		VII	√	√		√		0.023-0.094	0.016-0.064	0.38-1 / (-)
1	XIV NM					WT						<0.016	<0.016	0.064 / (-)
4	XIV NM		√			WT						<0.016	<0.016	0.094-0.125 / (-)
6	XIV NM				√	WT						<0.016	<0.016	0.094-0.25 / (-)
1	XIV NM				√	WT					√	<0.016	<0.016	2 / (+)
1	XIV NM				√	VI		√		√	√ ^a	<0.016	<0.016	8 / (+)
4	XV NM					WT						<0.016	<0.016	0.012-0.5 / (-)
1	XLIII NM		√			VII						<0.016	0.047	1 / (+)
10	XLIV NM	√				VII	√	√		√		<0.016-0.064	<0.016-0.047	0.094-0.5 / (-)
1	LXIV NM			√		WT						0.032	0.032	0.25 / (-)
3	X M					VI	√					0.023-0.032	0.19	0.025-0.38 / (-)
1	XXXIV M	√				WT	√		√	√		0.094	0.047	0.75 / (-)
2	XXXIV M	√				VII	√		√	√		0.023-0.047	0.094	0.5-1 / (-)
1	XXXIV M		√			I					√	0.016	0.094	0.19 / (-)

Tabla 32. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con resistencia a betalactámicos en la población de estudio.

^aSecuencia parcial del gen *bla*_{TEM}. √, presente. +, positiva. -, negativa. NM, no mosaico. M, mosaico. WT, *wild type*.

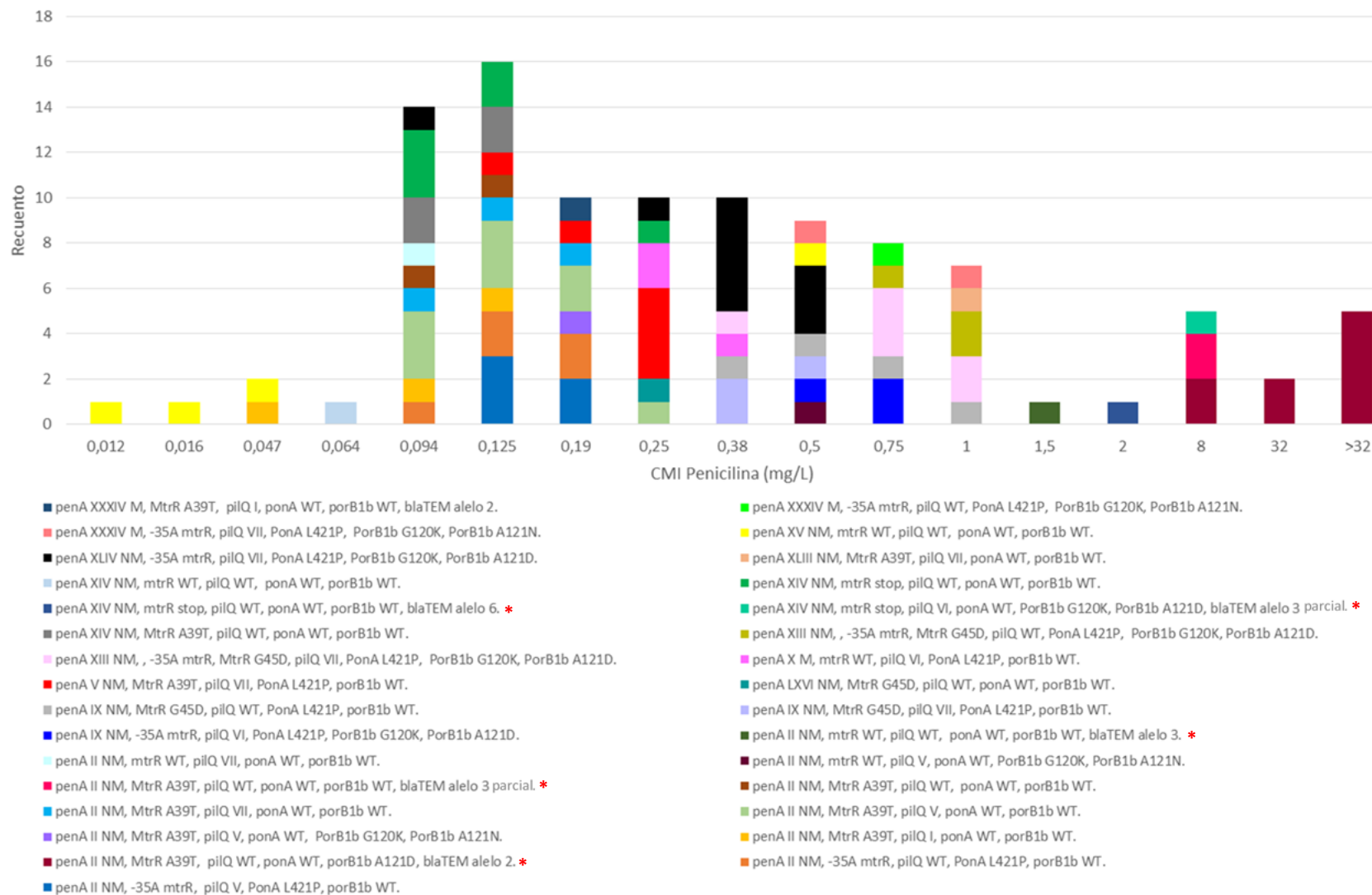


Figura 53. Distribución de los determinantes de resistencia a betalactámicos en función de la CMI a penicilina.

*: Perfiles asociados con resistencia a penicilina en nuestra población de estudio.

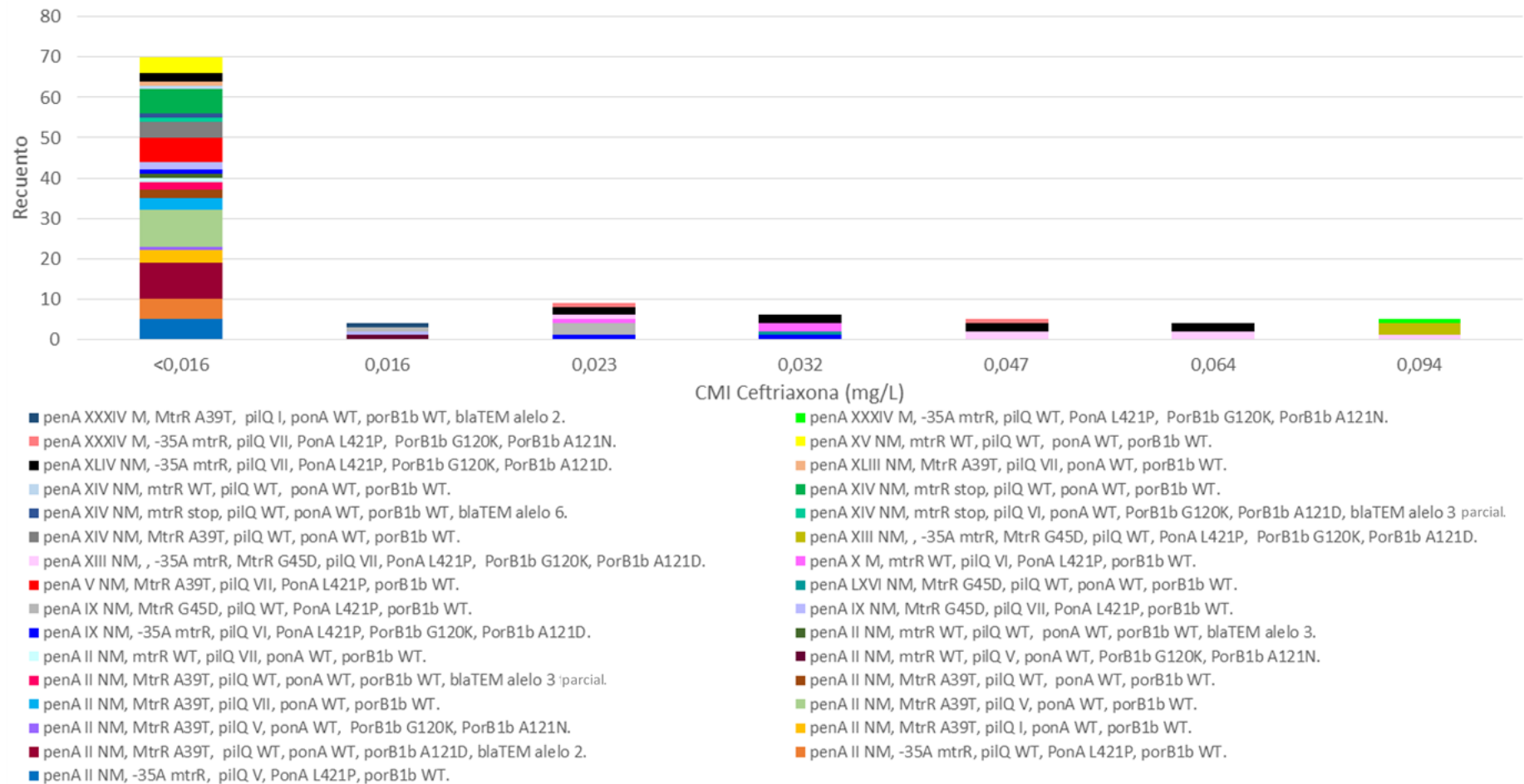
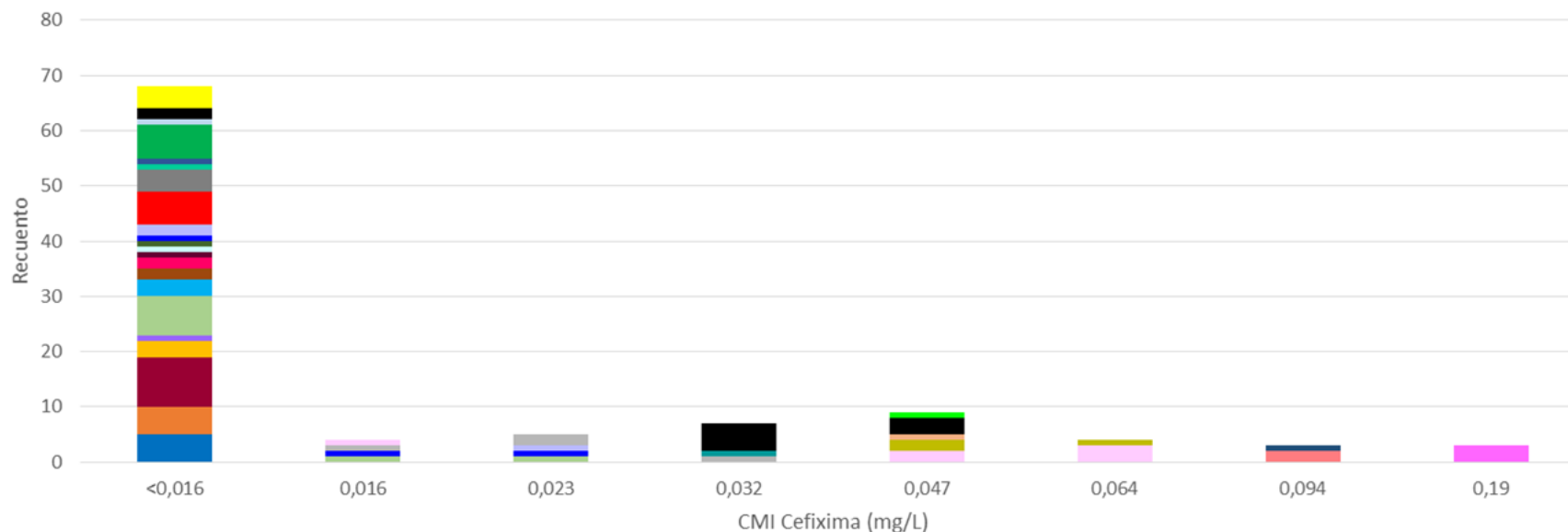


Figura 54. Distribución de los determinantes de resistencia a betalactámicos en función de la CMI a ceftriaxona.



- penA XXXIV M, MtrR A39T, pilQ I, ponA WT, porB1b WT, blaTEM alelo 2.
- penA XXXIV M, -35A mtrR, pilQ VII, PonA L421P, PorB1b G120K, PorB1b A121N.
- penA XLIV NM, -35A mtrR, pilQ VII, PonA L421P, PorB1b G120K, PorB1b A121D.
- penA XIV NM, mtrR WT, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT.
- penA XIV NM, mtrR stop, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT, blaTEM alelo 6.
- penA XIV NM, MtrR A39T, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT.
- penA XIII NM, -, -35A mtrR, MtrR G45D, pilQ VII, PonA L421P, PorB1b G120K, PorB1b A121D.
- penA V NM, MtrR A39T, pilQ VII, PonA L421P, porB1b WT.
- penA IX NM, MtrR G45D, pilQ WT, PonA L421P, porB1b WT.
- penA IX NM, -35A mtrR, pilQ VI, PonA L421P, PorB1b G120K, PorB1b A121D.
- penA II NM, mtrR WT, pilQ VII, ponA WT, porB1b WT.
- penA II NM, MtrR A39T, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT, blaTEM alelo 3 parcial.
- penA II NM, MtrR A39T, pilQ VII, ponA WT, porB1b WT.
- penA II NM, MtrR A39T, pilQ V, ponA WT, PorB1b G120K, PorB1b A121N.
- penA II NM, MtrR A39T, pilQ WT, ponA WT, porB1b A121D, blaTEM alelo 2.
- penA II NM, -35A mtrR, pilQ V, PonA L421P, porB1b WT.
- penA XXXIV M, -35A mtrR, pilQ WT, PonA L421P, PorB1b G120K, PorB1b A121N.
- penA XV NM, mtrR WT, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT.
- penA XLIII NM, MtrR A39T, pilQ VII, ponA WT, porB1b WT.
- penA XIV NM, mtrR stop, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT.
- penA XIV NM, mtrR stop, pilQ VI, ponA WT, PorB1b G120K, PorB1b A121D, blaTEM alelo 3 parcial.
- penA XIII NM, -, -35A mtrR, MtrR G45D, pilQ WT, PonA L421P, PorB1b G120K, PorB1b A121D.
- penA X M, mtrR WT, pilQ VI, PonA L421P, porB1b WT.*
- penA LXVI NM, MtrR G45D, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT.
- penA IX NM, MtrR G45D, pilQ VII, PonA L421P, porB1b WT.
- penA II NM, mtrR WT, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT, blaTEM alelo 3.
- penA II NM, mtrR WT, pilQ V, ponA WT, PorB1b G120K, PorB1b A121N.
- penA II NM, MtrR A39T, pilQ WT, ponA WT, porB1b WT.
- penA II NM, MtrR A39T, pilQ V, ponA WT, porB1b WT.
- penA II NM, MtrR A39T, pilQ I, ponA WT, porB1b WT.
- penA II NM, -35A mtrR, pilQ WT, PonA L421P, porB1b WT.

Figura 55. Distribución de los determinantes de resistencia a betalactámicos en función de la CMI a cefixima.

*: Perfiles asociados con resistencia a cefixima en nuestra población de estudio.

6.7.2.2 Azitromicina

Para llevar a cabo la caracterización de los determinantes genéticos asociados con resistencia a macrólidos, se analizaron los genes 23S ARNr, *mtrR* y su promotor, *rpID*, *rpIV*, *mef(A/B)*, el promotor de la bomba de eflujo MacAB y *erm(A/B/C/F)*. De éstos, sólo se identificaron mutaciones en el gen *mtrR* y/o en su promotor, que tal y como se ha comentado previamente, se identificaron en el 89.3% de los aislamientos analizados (figura 56). Estas mutaciones se encontraron tanto en aislados con fenotipo sensible como con sensibilidad intermedia a la azitromicina, sin embargo, no estuvieron presentes en ninguna de las dos cepas resistentes (CMI= 1.5mg/L y 2 mg/L).

Los genes *rpIV* y *rpID* se encontraron en todos los aislados analizados, concretamente se identificaron 2 variantes alélicas del gen *rpIV* (alelo 1 (n=102) y alelo 2 (n=1)) y cuatro del gen *rpID* (alelo 1 (n=85), alelo 2 (n=15), alelo 3 (n=2) y alelo 4 (n=2)), sin embargo, estas variaciones no se vieron reflejadas en la secuencia aminoacídica que fue idéntica en todos los aislados.

De los genes *erm (A/B/C/F)*, únicamente se detectó la presencia del gen *ermB* que estaba presente en todas las cepas analizadas. Concretamente, el 51.5% presentaba el alelo 7 (n=53), incluidos los dos aislados resistentes, seguido del 44.7% con el alelo 5 (n=46) y las cepas restantes (n=4), contenían el alelo 149.

Entre la población de estudio, no se detectó ninguna de las dos mutaciones en el gen 23S ARNr asociadas con el fenotipo de resistencia a azitromicina (A2059G y C2611T), ni la presencia de los genes *mef(A/E)*, ni la mutación en el promotor de MacAB que produce sobreexpresión de la bomba.

La distribución de los determinantes asociados con la resistencia a los macrólidos encontrados en la población de estudio, así como la distribución de la CMI a azitromicina, se recogen en la tabla 33 y en la figura 57.

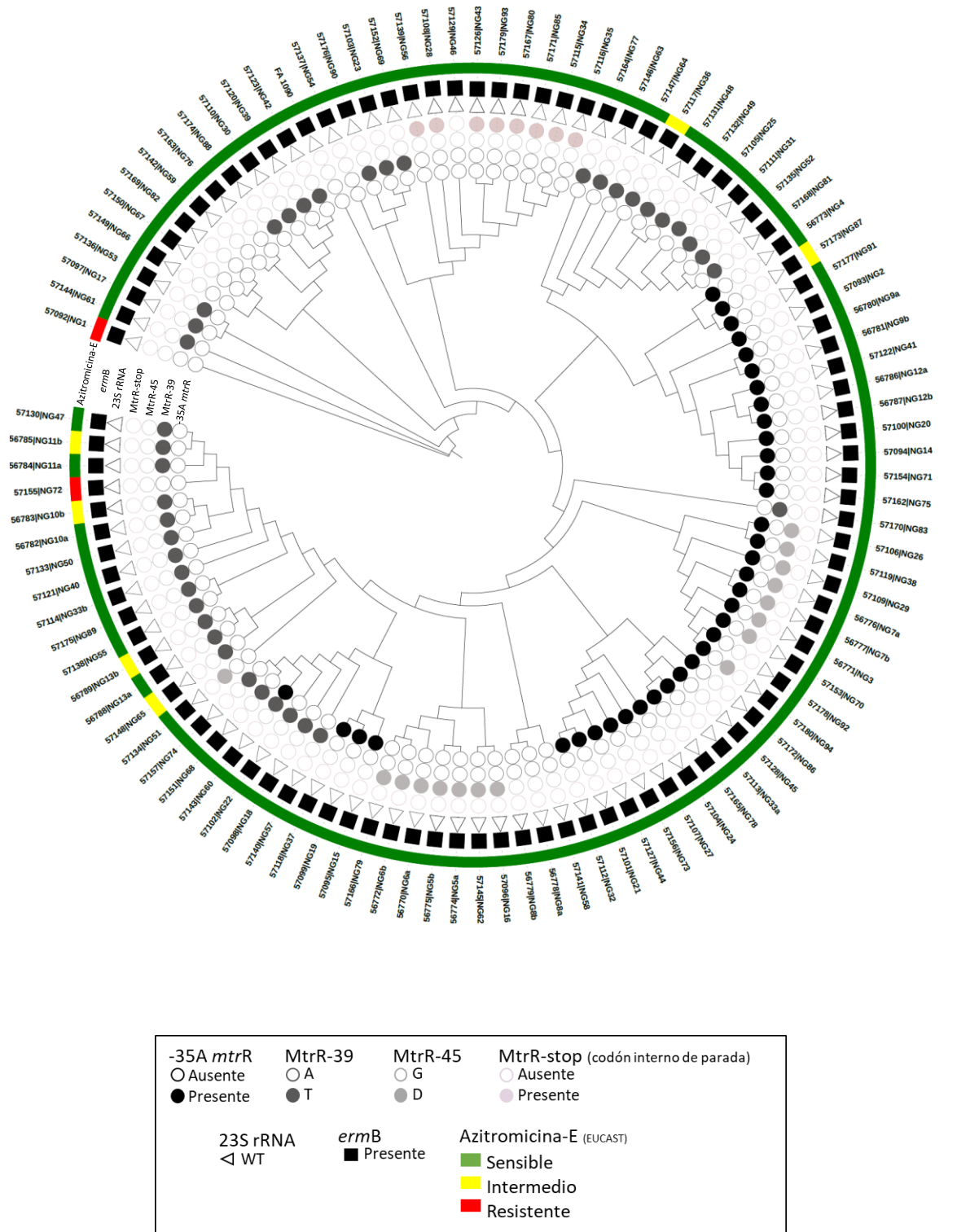


Figura 56. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a azitromicina.

Número de aislamientos	<i>mtrR</i>			<i>ermB</i>	23S ARNr	Azitromicina Rango CMI (mg/L)
	-35A promotor	A39T	G45D Codón interno de parada			
11				√	WT	0.032-2
26	√			√	WT	0.032-0.5
9	√		√	√	WT	0.064-0.25
41		√		√	WT	0.023-0.38
7			√	√	WT	0.125-0.25
1			√	√	NS	0.094
8				√	WT	0.064-0.19

Tabla 33. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con la resistencia a azitromicina en la población de estudio.

√, presente. WT, *wild type*. NS, no secuenciado.

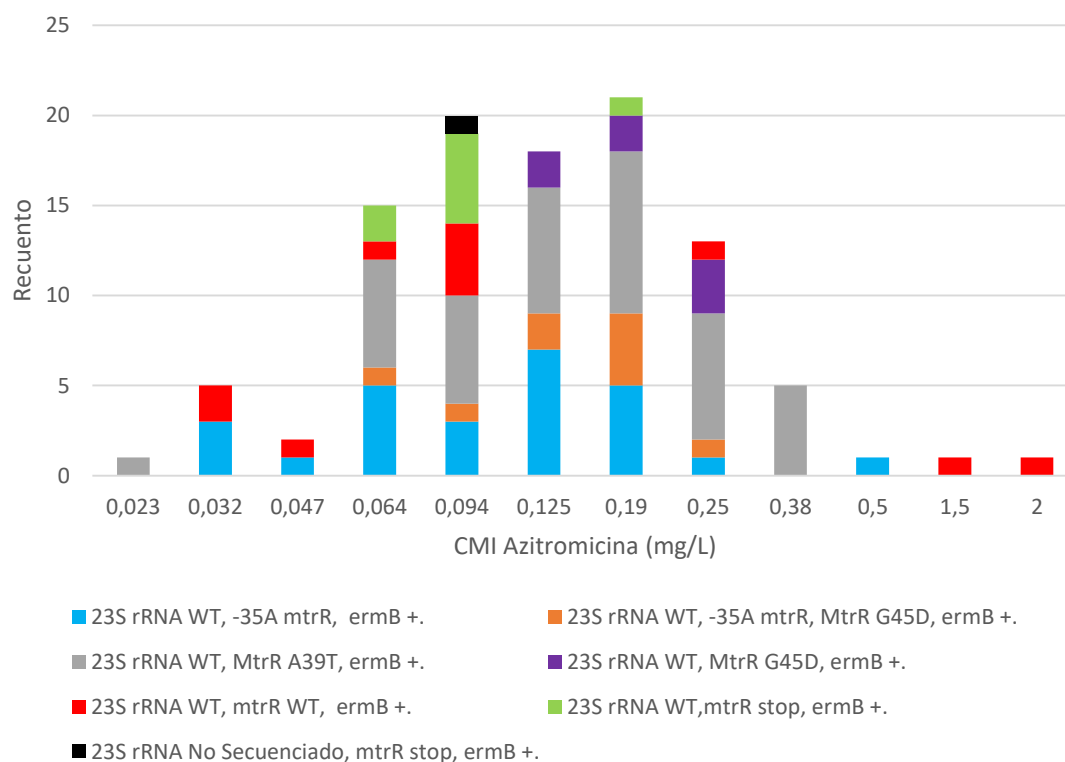


Figura 57. Distribución de los determinantes de resistencia a macrólidos en función la CMI a azitromicina.

6.7.2.3 Ciprofloxacino

En la figura 58, se puede observar la distribución de los determinantes genéticos asociados con la resistencia a fluoroquinolonas en la población de estudio.

De las 43 cepas con fenotipo resistente siguiendo los criterios de interpretación del EUCAST (CMI > 0.06 mg/L), 42 presentaron mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC*, previamente asociadas con resistencia a ciprofloxacino (tabla 34). Sin embargo, uno de los aislados resistentes (CMI=0.38 mg/L, CLSI: categoría intermedia) presentó un genotipo salvaje (sin mutaciones), no pudiéndose asociar su resistencia con ninguno de los mecanismos de resistencia a quinolonas previamente descritos. La sustitución G410V en el gen *parE*, descrita en otros estudios como contribuyente a la resistencia a fluoroquinolonas, no fue encontrada en ninguno de los aislados. Todas las cepas con fenotipo sensible a ciprofloxacino (CMI<0.03 mg/L) (n=60, 58.3%), presentaron genotipo salvaje.

En el caso del ciprofloxacino, se observó una alta correlación (99.03%) entre el fenotipo y el genotipo.

La distribución de los diferentes determinantes asociados con la resistencia a los fluoroquinolonas, así como la distribución de la CMI a ciprofloxacino, se recogen la figura 59.

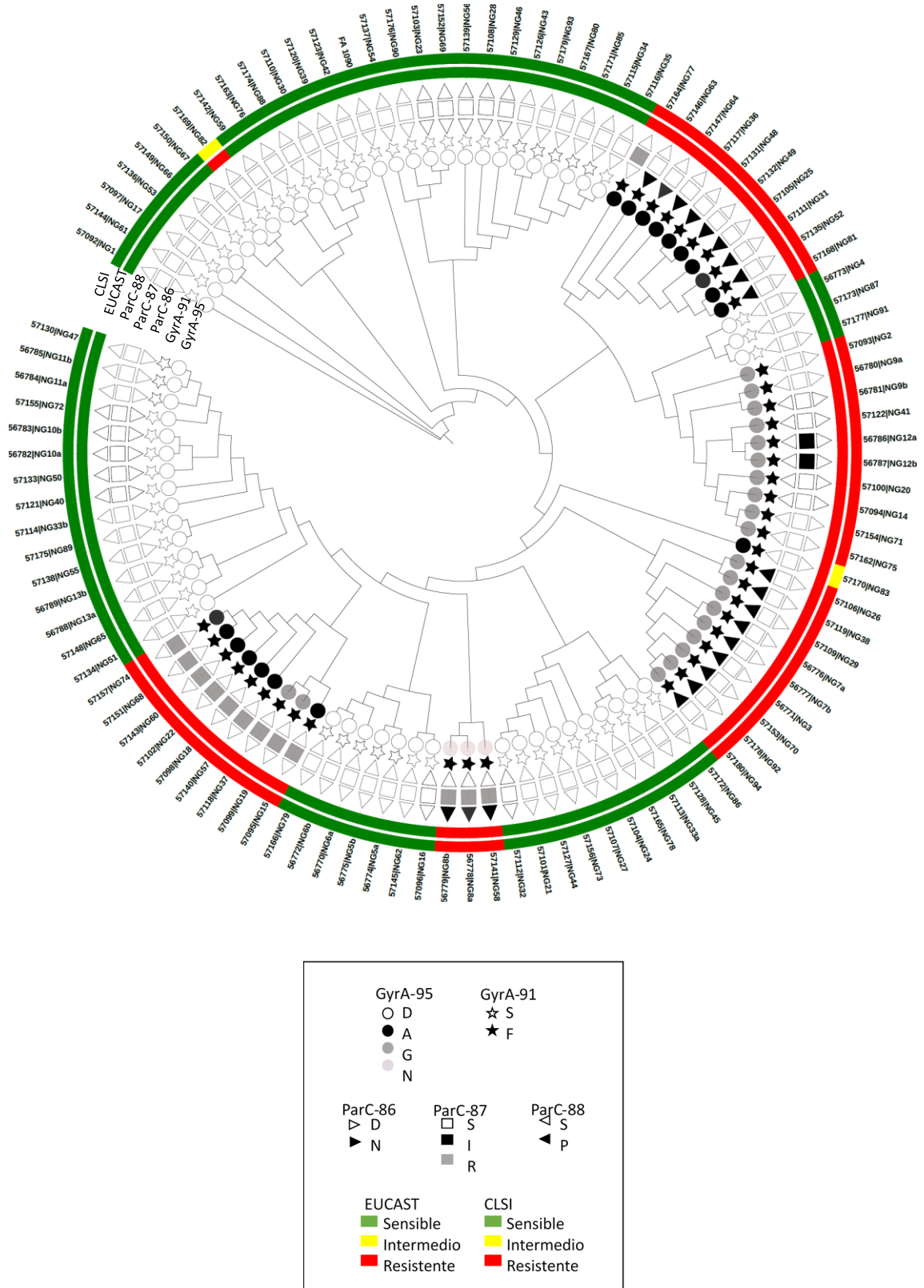


Figura 58. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a ciprofloxacino.

Número de aislamientos	<i>gyrA</i>				<i>parC</i>				Ciprofloxacino Rango CMI (mg/L)
	D95A	D95G	D95N	S91F	D86N	S87I	S87R	S88P	
60									<0.002-0.023
1									0.38
1		✓		✓					0.75
9	✓			✓	✓				1-2
8	✓			✓			✓		1.5->32
8	✓			✓					2->32
9		✓		✓	✓				3->32
3			✓	✓			✓	✓	3-8
2		✓		✓			✓		12->32
2		✓		✓		✓			>32

Tabla 34. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con la resistencia a fluoroquinolonas en la población de estudio.
✓, presente.

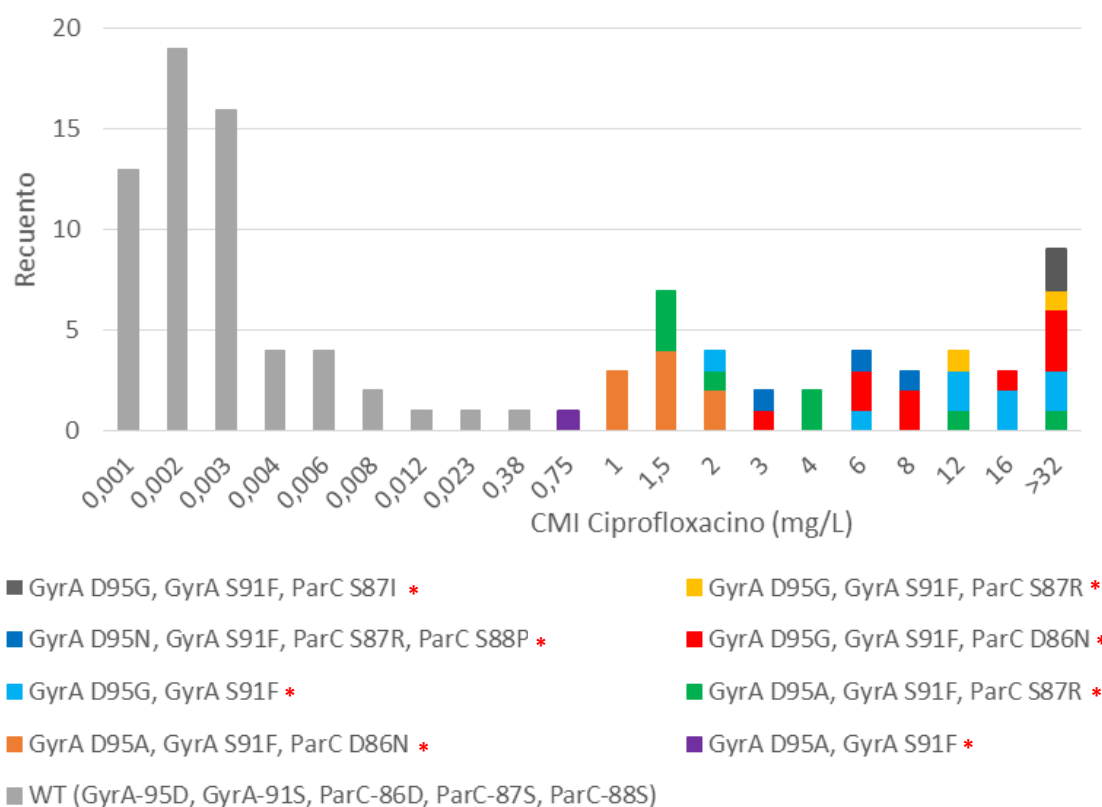


Figura 59. Distribución de los determinantes de resistencia a fluoroquinolonas en función de la CMI a ciprofloxacino.

*: Perfiles asociados con resistencia a ciprofloxacino en nuestra población de estudio.

6.7.2.4 Tetraciclina

En la figura 60, se muestra la distribución de los determinantes genéticos asociados con la resistencia a tetraciclinas en el genoma *core* de los gonococos incluidos en el estudio.

En relación al plásmido *tetM* asociado con resistencia de alto nivel a tetraciclinas, únicamente se identificó este elemento en 2 aislamientos (1.9%) cuya CMI a tetraciclina fue de 8 mg/L. Asimismo, estas dos cepas también poseían la sustitución V57M en el gen *rpsJ* y la mutación A39T en el gen *mtrR*, ambas asociadas previamente también con resistencia a tetraciclinas (tabla 35).

Respecto a las resistencias cromosómicas, además de las mutaciones anteriormente mencionadas que afectan a otras familias de antibióticos, como las producidas en los genes *mtrR* (n=92, 89.3%) y en *penB* (n=37, 35.9%), el 81.6% de las cepas (n=84) poseían el cambio aminoacídico V57M en el gen *rpsJ*. Sin embargo, las mutaciones asociadas con la resistencia cromosómica a tetraciclinas se distribuyeron tanto en aislamientos resistentes como en sensibles (tabla 35, figuras 60 y 61).

Entre la población de estudio, hubo 5 aislamientos con genotipo *wild type* en todos los determinantes asociados con la resistencia a tetraciclinas estudiados, de los cuales 4 de ellos presentaban fenotipo sensible y 1 resistencia de alto nivel a tetraciclina (CMI=8 mg/L).

La distribución de los diferentes determinantes asociados con la resistencia a las tetraciclinas, así como la distribución de la CMI a este antibiótico, se recoge en la tabla 35 y en la figura 61.

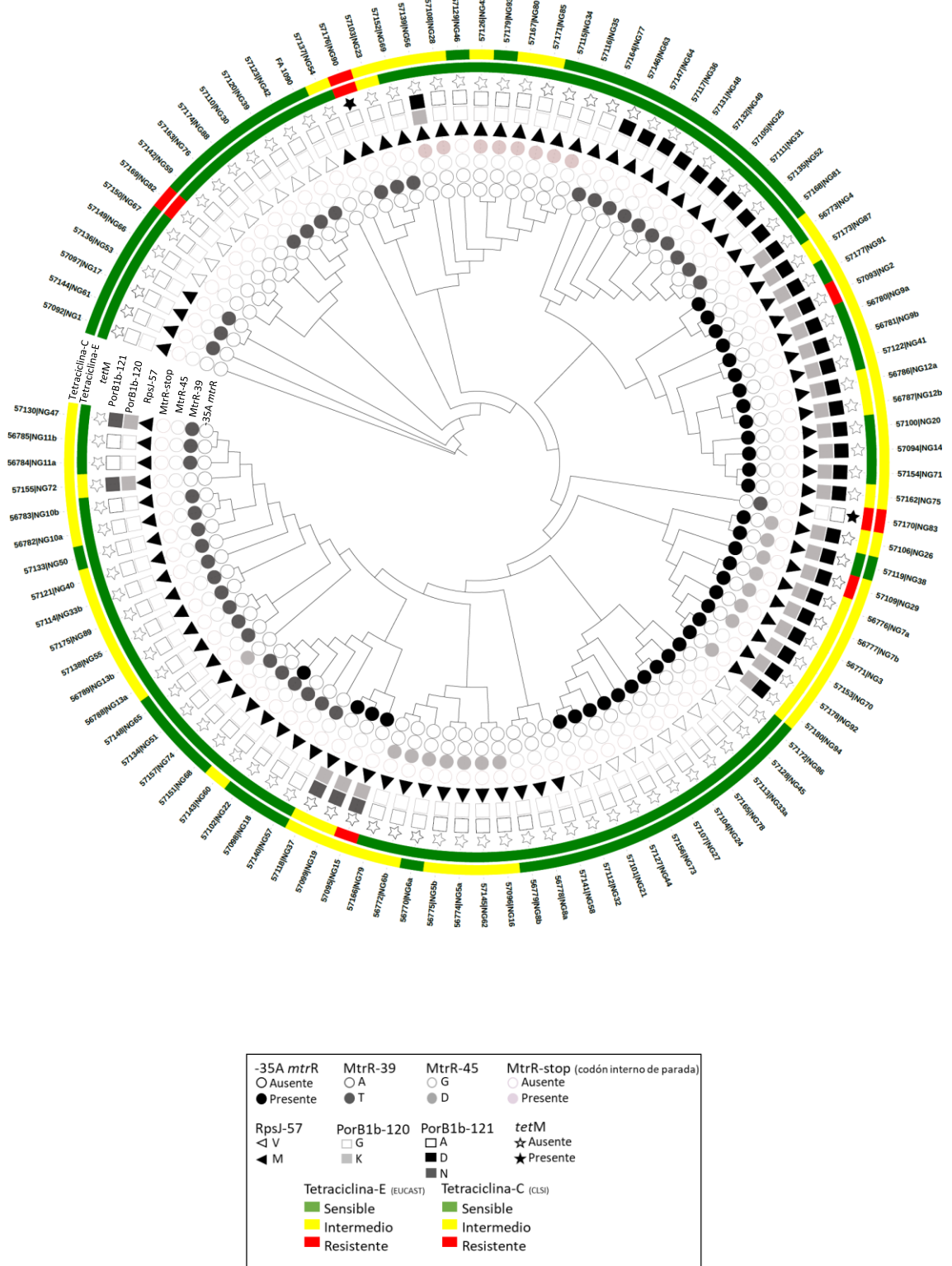


Figura 60. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a tetraciclinas.

Número de aislamientos	<i>rpsJ</i> V57M	<i>mtrR</i>				<i>penB</i>			<i>tetM</i>	Tetraciclina Rango CMI (mg/L)
		-35A promotor	A39T	G45D	Codón interno de parada	A121D	A121N	G120K		
4										0.064-0.094
1										8
4			√							0.032-0.125
10		√								0.047-0.125
5	√									0.19-0.25
9	√		√			√				0.19-0.25
8	√			√						0.25-0.5
7	√				√					0.25-0.5
1	√		√				√	√		0.5
1	√				√	√		√		0.5
25	√		√							0.125-0.75
1	√						√	√		1
9	√	√		√		√		√		0.25-1.5
13	√	√				√		√		0.38-1.5
3	√	√					√	√		0.75-1.5
2	√		√						√	8

Tabla 35. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con resistencia a tetraciclinas en la población de estudio.

√, presente.

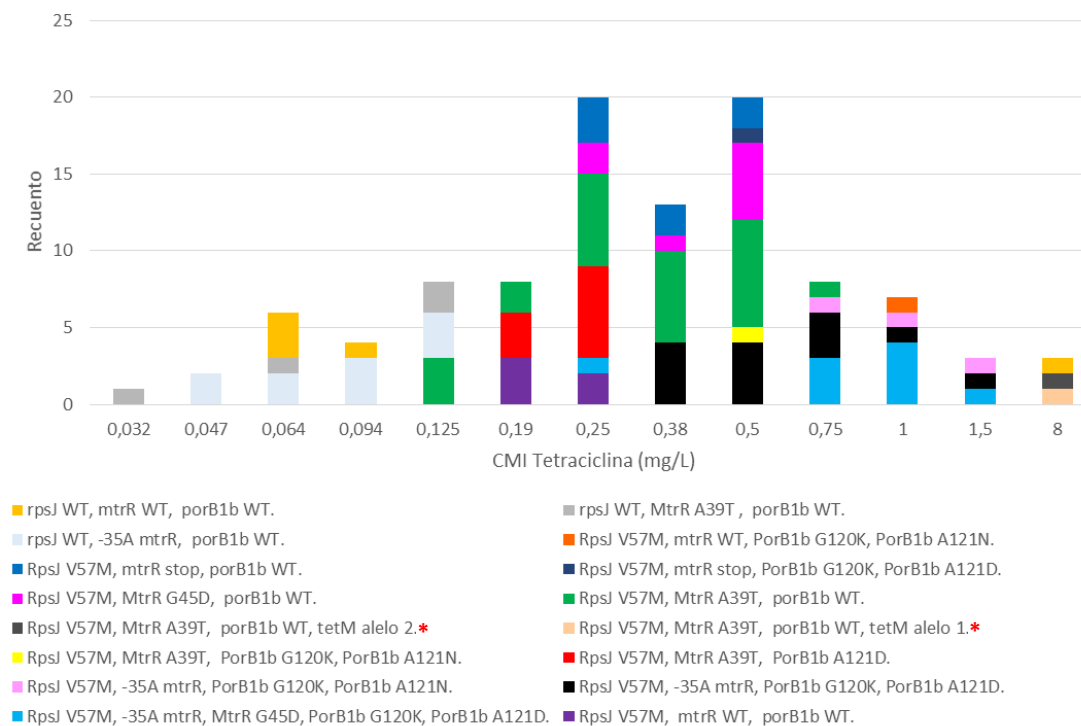


Figura 61. Distribución de los determinantes de resistencia a tetraciclinas en función la CMI a tetraciclina.

*: Perfiles asociados con resistencia a ciprofloxacino en nuestra población de estudio.

6.7.2.5 Espectinomicina

En ninguno de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* analizados se identificaron las mutaciones relacionadas con la resistencia a espectinomicina en los genes 16S ARNr y *rpsE*, lo que concuerda con los resultados del estudio de sensibilidad, ya que ninguno de los aislados mostró resistencia a este antibiótico (figura 62).

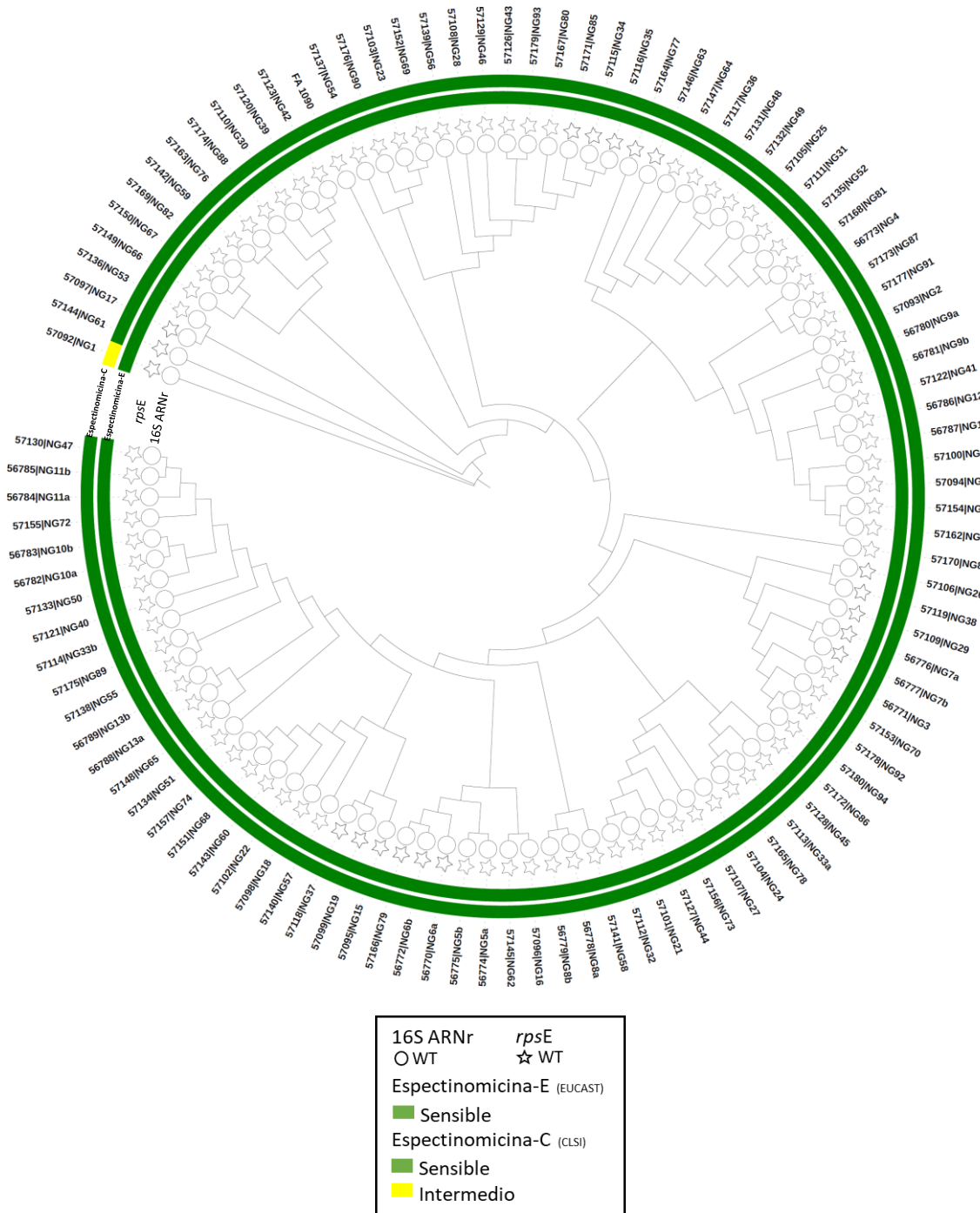


Figura 62. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a espectinomicina.

6.7.2.6 Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron el primer tratamiento utilizado en los pacientes con infección gonocócica pero, a pesar de que este antibiótico dejó de utilizarse hace décadas para tratar la gonorrea, sólo el 5.8% de las cepas (n=6) mostraron genotipo *wild type* en el gen *folP* (figura 63, tabla 36).

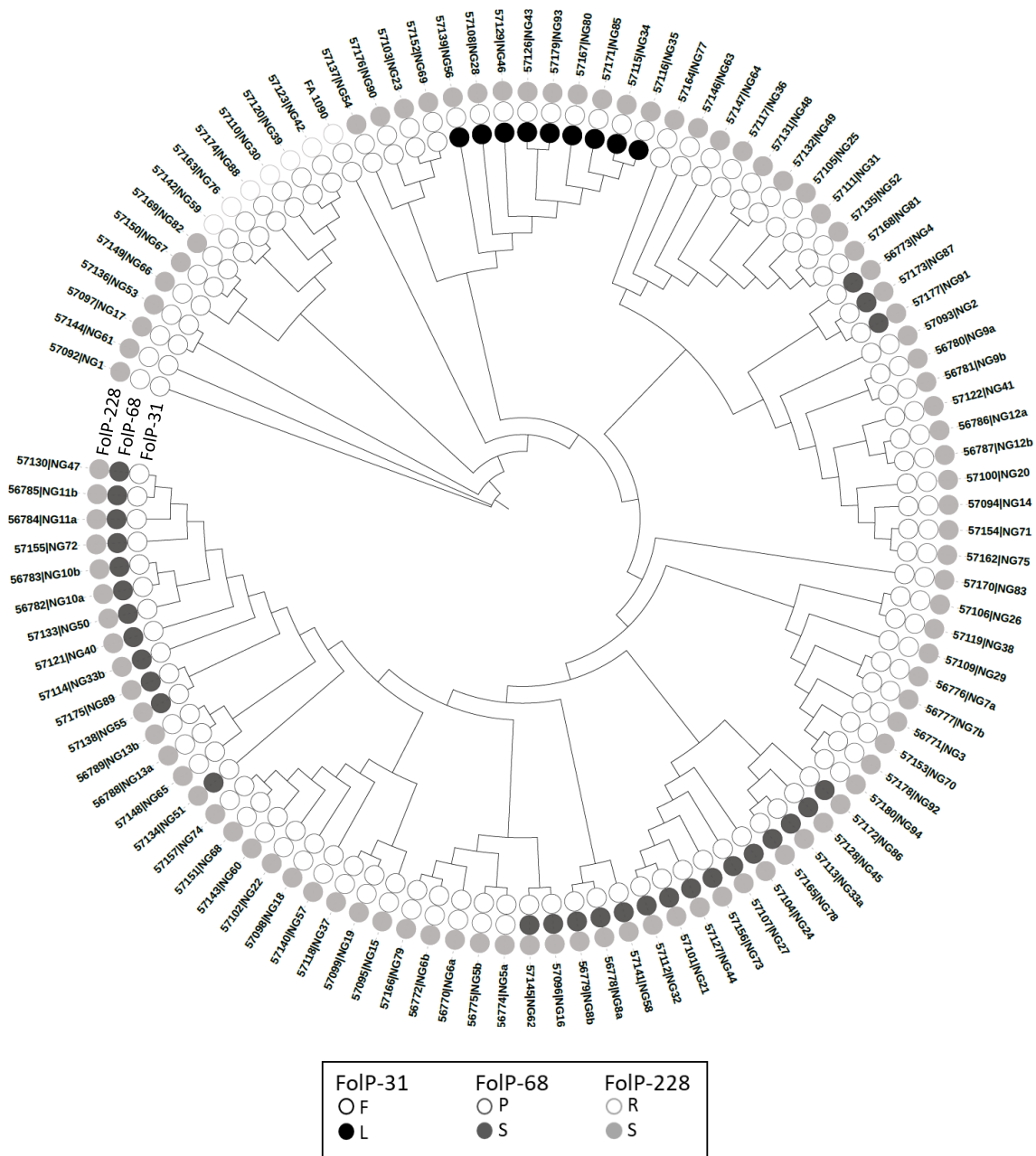


Figura 63. Árbol filogenómico mostrando la distribución de los determinantes genéticos asociados con resistencia a sulfonamidas.

Número de aislamientos	FoIP		
	F31L	P68S	R228S
6			
9	√		√
30		√	√
58			√

Tabla 36. Distribución y caracterización de los determinantes genéticos asociados con resistencia a sulfonamidas en la población de estudio.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1 Características sociodemográficas de los pacientes

La incidencia global de las ITS ha aumentado notablemente en los últimos años y tanto es así, que las últimas estimaciones sobre la clamidiasis, la gonorrea, la tricomoniasis y la sífilis, es decir, sobre las ITS que a día de hoy aún se pueden curar, ponen el foco en un total de 376.4 millones de infecciones urogenitales nuevas durante el año 2016. Esta estimación corresponde aproximadamente a 1 millón de nuevos contagios cada día, lo que de manera más concreta se traduce para la infección gonocócica, en una incidencia anual de 86.9 millones (1).

En España, durante la década de 1990 hubo un marcado descenso en el número de casos de gonorrea probablemente impulsado por el miedo a contraer el VIH. Sin embargo, esta tendencia cambió a partir de 2001, incrementándose anualmente las cifras hasta alcanzar un total de 8722 casos notificados durante 2017 (tasa de 18.74 por 100000 habitantes) (114). Este hecho, hace que resulte importante conocer las características de las personas diagnosticadas, con el fin de establecer programas de prevención no sólo dirigidos a la población en general, sino más concretamente a los grupos *core*, que son los principales responsables del mantenimiento y la propagación de la infección.

En nuestro estudio, durante un periodo de 4 meses en el año 2016, se analizó una muestra aleatoria de 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de 94 pacientes que acudieron a las consultas de un centro monográfico de infecciones venéreas en Madrid, el Centro Sanitario Sandoval.

Las principales características sociodemográficas de estos 94 pacientes incluyen un 89.4% de hombres, con una edad mediana de 30.5 años, siendo el grupo de edad comprendido entre los 18 y los 28 años el más afectado, con un 41.5% de los casos. Asimismo, el 59.6% eran de origen

español y aunque en el 44.7% de sujetos no había información relacionada con el nivel de estudios, en un 37.2% constaba la realización de estudios superiores.

Según los últimos datos publicados sobre la información epidemiológica poblacional de las ITS en España obtenido a través de RENAVE, en 2017 el 83.8% de los diagnósticos de gonorrea fueron en varones (114), por lo que al compararlos con nuestros datos, aunque éstos son ligeramente superiores a los del conjunto nacional, observamos que las cifras son muy similares (89.4% vs 83.8%); sin embargo, estas diferencias son algo mayores con respecto a la media europea que se sitúa alrededor del 75% (96). Las diferencias con los datos nacionales pueden deberse a que los hombres y en particular los HSH, tienen una mayor incidencia de ITS y acuden con mayor frecuencia a recibir asistencia especializada en clínicas monográficas. Sin embargo, en las mujeres al tener una incidencia menor, acuden a otros servicios asistenciales como atención primaria y ginecología. Asimismo, tanto nuestros datos como los del conjunto nacional, podrían presentar sesgos hacia el género masculino, ya que las mujeres habitualmente presentan infecciones asintomáticas por lo que no acuden a recibir asistencia sanitaria. En este sentido, algunos organismos como el CDC, recomiendan el cribado a las mujeres sexualmente activas menores de 25 años (38), por lo que quizás estas cifras podrían variar.

En relación a la edad, en una revisión efectuada por diversas unidades de ITS españolas durante los años 2006 a 2010, se puede observar que la mediana de edad al diagnóstico de la infección gonocócica no varía respecto a nuestros datos (30.5 vs 29 años), ni a los de la media española (30 años) (102,114). Por otro lado, aunque el porcentaje de pacientes pueda variar ligeramente entre los datos europeos y americanos, los diagnósticos entre la población joven, en una horquilla de 20 a 35 años, son los más representados y en los que habría que realizar mayores esfuerzos de prevención (96,97,102,114).

Si analizamos la procedencia de los pacientes, en nuestro estudio el 59.6% de los pacientes eran de origen español, sin embargo, los datos no son homogéneos dentro del territorio español, ya

que un estudio realizado en el País Vasco durante los años 2011 a 2015, tuvo mayores proporciones de pacientes procedentes de España (72.2%) (115) y en contraposición, en Almería se aisló una menor proporción de gonococos en pacientes autóctonos (48.6%) (116). La heterogeneidad observada en los datos a nivel nacional podría deberse, por una lado, al tipo de centro asistencial de cada estudio, ya que en nuestro caso el elevado porcentaje de población inmigrante se debe a las características intrínsecas del Centro Sanitario Sandoval que atiende a grupos poblacionales especialmente vulnerables y de difícil captación por el sistema sanitario normalizado. Por otro lado, también puede influir el sector económico principal del que se sustenta la población de cada lugar. En este sentido, una carencia tanto de este estudio como el de la mayoría de publicaciones, es que no se dispone del dato de la ocupación que podría ayudar a entender la dinámica poblacional en la infección gonocócica.

Una limitación tanto de este trabajo como de otros realizados dentro y fuera España, es que en un elevado porcentaje de pacientes no se dispone de la información sobre el nivel académico (102,105), lo que dificulta la comparación y el análisis de estos datos, impidiendo extraer información concluyente.

En nuestra población, a pesar del bajo número de pacientes que, además, se encuentran acotados tanto temporal como geográficamente, se pueden observar similitudes de las características sociodemográficas respecto de la población general, lo que podría indicar un cierto patrón de los pacientes con gonorrea.

7.2 Características conductuales de los pacientes

Con respecto a la orientación sexual, en nuestro estudio encontramos una elevada proporción de HSH (78.7%). Este porcentaje es más elevado que los datos procedentes de los últimos informes europeos y del CDC, donde en 2017 encontramos cifras del 47 y 41.7%,

respectivamente (96,97). A nivel nacional, en los informes de la RENAVE no disponemos todavía de los datos sobre las características conductuales de los pacientes con gonococia (114). No obstante, algunas comunidades autónomas poseen este registro como es el caso de Cataluña, que en 2017, aunque sólo el 31% de los casos notificados completaron la encuesta epidemiológica, el 44% eran HSH (117). Estas cifras son similares a las observadas a nivel global en Europa y EEUU mencionadas anteriormente.

A pesar de que algunos estudios nacionales que no estaban realizados específicamente en clínicas de ITS, sitúan la infección gonocócica en HSH en cifras inferiores al 50% (102,105,115,117), en un estudio realizado entre 2009 y 2014 por Fuertes *et al.* donde la mayoría de pacientes procedían de una unidad de ITS en Barcelona, encontraron cifras más parecidas a nuestros datos (73.3%)(100). Asimismo, en Francia la proporción de HSH a nivel nacional con infección gonocócica es del 71% (118), lo que pone de manifiesto que aunque las cifras puedan fluctuar entre países e incluso zonas dentro del propio país, la población HSH en un grupo *core*, especialmente vulnerable para la infección gonocócica.

Al contrario de lo que ocurre en la mayoría de estudios donde hay un claro predominio de muestras genitales (96,97,105,115,116), la mayor proporción de aislamientos incluidos en nuestro estudio procedían de muestras extragenitales (51.9%). Como en la mayoría de ocasiones las ITS, sobre todo de localización extragenital, cursan de manera asintomática, además de realizar una correcta exploración física, es fundamental identificar las prácticas sexuales y el uso del preservativo en cada localización. De este modo, se logra determinar el riesgo individual de cada paciente, efectuando un adecuado despistaje clínico de las ITS para así, establecer un consejo preventivo individualizado (119). A este respecto, la mayor proporción de HSH en nuestro estudio puede deberse principalmente a las características propias del Centro Sanitario Sandoval, que hace que lo diferencien del resto de dispositivos asistenciales, ya que la posibilidad de anonimato que se ofrece facilita que la relación del clínico con el paciente sea

más fluida y de este modo, el paciente puede expresarse con menor dificultad en la esfera sexual, facilitando una correcta anamnesis.

Otro grupo de riesgo para la adquisición de una ITS es el ejercicio de la prostitución. En nuestra serie, el 9.6% de los sujetos eran trabajadores del sexo, siendo el 3.2% mujeres y el 6.4% hombres. En España, a pesar de que este colectivo tradicionalmente estaba muy concienciado con el uso del preservativo en el ámbito laboral, debido principalmente al riesgo de infectarse por el VIH (120), la proporción de diagnósticos de ITS ha aumentado durante los últimos años (121,122), por lo que los trabajadores del sexo continúan siendo un grupo vulnerable sobre el que seguir haciendo hincapié en el uso de las medidas profilácticas.

En relación a los hábitos sexuales, nuestros datos muestran un bajo número de prácticas sexuales seguras, lo que refleja la falta de percepción del riesgo a contraer una ITS. Más de la mitad de los pacientes tuvieron más de 5 parejas sexuales en el último año y a este hecho hay que sumarle el elevado porcentaje de prácticas sexuales desprotegidas, principalmente en las relaciones orogenitales. Respecto a este tipo de prácticas, la literatura ha mostrado controversia sobre el grado de transmisibilidad de la infección a través de la saliva. Sin embargo, los últimos estudios apuntan a que existe un alto peso en el contagio de la gonorrea mediante el sexo oral e incluso, cuando se utiliza la saliva como lubricante en las relaciones con preservativo (123).

Apuntando en la misma dirección que nuestros datos sobre la falta de hábitos sexuales seguros, en 2017 se llevó a cabo una encuesta europea realizada online que estaba orientada a los HSH, donde casi el 20% de los encuestados había sufrido algún episodio de gonorrea alguna vez en su vida. Cuando se les preguntó sobre sus hábitos sexuales, alrededor del 40% de los encuestados manifestaron tener más de 5 parejas ocasionales en el último año y un 60%, tuvo alguna vez relaciones desprotegidas con sus parejas ocasionales (124).

En lo referente a los hábitos tóxicos, el 64.9% eran consumidores de drogas recreacionales y de manera anecdótica, el 2.1% eran consumidores de drogas inyectables. Las drogas más utilizadas

fueron: el consumo excesivo de alcohol (54.3%), el poppers (25.5%), el cannabis (18.1%), la cocaína (16.0%) y el GHB (14.9%).

Datos similares se han encontrado entre la población HSH en España, donde las drogas más consumidas fueron el cannabis, el poppers y la cocaína. Además, en esta población los modelos de regresión logística ajustados mostraron un riesgo de sexo anal no protegido 1.5 veces mayor entre los consumidores de drogas, en relación con los que no las habían consumido (125). Apuntando en este sentido, otros estudios realizados en población HSH, han mostrado que el consumo de algunas drogas recreacionales aumenta el riesgo de tener una infección gonocócica con respecto a los HSH que no consumen (126).

Asimismo, otro dato a tener en cuenta es que las personas que se pueden beneficiar de la profilaxis pre-exposición (PrEP), habitualmente consumen algunas de estas drogas que pueden tener interacciones con los fármacos antirretrovirales, aumentando su toxicidad o incluso, llegando a tener una pérdida de eficacia de la PrEP (127,128).

Una de las limitaciones de nuestro estudio en lo que se refiere al consumo de tóxicos, es que no disponíamos de la información sobre las relaciones sexuales no protegidas bajo el efecto de las drogas y de la práctica del *chemsex*, es decir, del consumo intencionado de drogas para tener sexo durante un largo periodo de tiempo. Tradicionalmente, sólo la metanfetamina, la mefedrona y el GHB eran las drogas que se incluían en la definición de *chemsex*, aunque actualmente esta definición es mucho más amplia, ya que se incluyen otras sustancias como la cocaína y la ketamina (129,130). No obstante, a pesar de no contar con estos datos, en nuestra población encontramos sujetos que consumen algunas de las drogas definitorias del *chemsex*, por lo que alguna parte de los pacientes también podrían tener este tipo de comportamiento.

7.3 Características clínicas de los pacientes

Aunque del total de los 104 aislamientos de *N. gonorrhoeae* el 40.4% de los gonococos se aislaron de exudados uretrales, a nivel global, aproximadamente la mitad de las muestras procedían de localizaciones extragenitales (51.9%), manteniéndose esta tendencia en el caso de los hombres. Sin embargo, en las mujeres la localización genital juega un papel más relevante, recuperándose el 61.5% en exudados cervicales. Además, el 20% de los pacientes presentó una infección gonocócica concomitante en más de una localización anatómica, siendo la combinación de las muestras de recto y faringe, las más frecuentes. No obstante, no todas las cepas se pudieron incluir en el estudio, ya sea o bien porque no se almacenaron o porque únicamente fueron positivas por PCR.

Desde 2009 y de manera anual, el ECDC lleva a cabo el *European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme* (Euro-GASP), un programa de vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana de gonococo en Europa. En su último informe publicado, sobre los datos del año 2017 en el que participaron 27 países, el 72.8% de las cepas estudiadas procedían de muestras genitales (131). En nuestro caso, la mayor representatividad de muestras extragenitales con respecto al Euro-GASP 2017 y a otros estudios nacionales (100,102,105,115,116), se debe probablemente a los protocolos que utiliza el Centro Sanitario Sandoval, ya que gracias a una anamnesis amplia y estructurada, permiten conocer las prácticas sexuales de estos pacientes, lo que hace que se incluya la toma de las muestras extragenitales en pacientes totalmente asintomáticos. De hecho, las muestras recogidas de pacientes asintomáticos se recuperaron predominantemente de sitios extragenitales ($p < 0.01$), lo que recalca la importancia de estudiar estas muestras para romper la cadena de transmisión.

La mayoría de los pacientes (95.8%) recibieron ceftriaxona como tratamiento, con o sin azitromicina, 2 pacientes fueron tratados únicamente con azitromicina y en los 2 casos restantes, los pacientes no acudieron a por los resultados, por lo que no recibieron tratamiento.

La mayoría de las guías clínicas (38,40,76,77) recomiendan el uso combinado de ceftriaxona más azitromicina para el tratamiento de la gonorrea, sin embargo, en nuestra población de estudio no se siguieron estas recomendaciones en aproximadamente la mitad de los pacientes (46.3%), prefiriendo el tratamiento de estos casos únicamente con ceftriaxona (42.1%). Actualmente, se están revisando las pautas de tratamiento de las ITS y, por ejemplo, la guía clínica del Reino Unido (BASHH) sobre el manejo de la infección gonocócica recomienda la monoterapia con ceftriaxona en su última actualización de 2019 (78).

Aproximadamente en un tercio de los pacientes se efectuó el test de cura y en los 5 casos en los que el resultado del control fue positivo, únicamente en un paciente se pudo comprobar que la cepa pertenecía a un secuenciotipo diferente, por lo que no se trataba de un fracaso del tratamiento, sino de una reinfección con otra cepa distinta. No obstante, el resto de los pacientes con resultados positivos del test de cura, probablemente se deban a reinfecciones, ya que este control se llevó a cabo en un rango de 50-91 días, siendo difícil determinar la posibilidad de fallo terapéutico. Es por esta razón por la que las diferentes guías clínicas para garantizar la erradicación bacteriana, recomiendan la realización del control microbiológico en un periodo de 3 semanas post-tratamiento si se utiliza las TAANs o pasados al menos 3 días por cultivo bacteriano (38,40,78).

En este trabajo, el 34% de los pacientes estaban coinfectados con el VIH y el 24.2% presentaba otras ITS concurrentes a la gonorrea, predominando la infección bacteriana por *C. trachomatis*. Asimismo, un tercio de los sujetos tuvieron alguna ITS en el año previo al diagnóstico de la infección gonocócica, principalmente gonorrea, sífilis y clamidia.

En Europa, los porcentajes de coinfección de gonococo con otras ITS, principalmente con *C. trachomatis*, rondan las cifras de nuestro trabajo. Sin embargo, el porcentaje de pacientes coinfectados con el VIH es bastante menor, prácticamente la mitad al encontrado en nuestro estudio (15.4% vs 24.2%) (131). Con todo ello, independientemente de las discrepancias en estos

últimos datos que pueden deberse a las características intrínsecas de la procedencia de las muestras, diversos estudios indican una asociación de la infección gonocócica con la transmisión sexual del VIH (132), por lo que esta interrelación puede utilizarse para poner el foco en pacientes que potencialmente tienen más riesgo de adquisición del VIH. Asimismo, como la gonorrea tiene un período de incubación corto, es un buen indicador de prácticas sexuales de riesgo que pueden facilitar la transmisión no sólo del VIH, sino de otras ITS. De hecho, la presencia de una ITS, como la sífilis, la gonorrea o el VHS, aumenta considerablemente (de dos a tres veces en algunas poblaciones) el riesgo de contraer o transmitir la infección por VIH (133).

7.4 Sensibilidad antimicrobiana y determinantes moleculares de resistencia

Con el fin de poder detectar de manera precoz la aparición de resistencias antimicrobianas en las cepas circulantes de *N. gonorrhoeae* y de esta manera, contribuir a la actualización de las guías clínicas de tratamiento local para llevar a cabo un adecuado manejo de los pacientes con gonorrea y así, realizar una vigilancia epidemiológica activa, diversos objetivos de esta tesis están encaminados al estudio de la sensibilidad antibiótica y a la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia antimicrobiana.

En nuestra población se mantienen tasas de resistencia bajas para todos los antimicrobianos testados (penicilina, cefixima, ceftriaxona, azitromicina, tetraciclina, espectinomicina y gentamicina), excepto para el ciprofloxacino. Asimismo, no encontramos diferencias significativas entre la sensibilidad de las cepas aisladas de zonas genitales y las extragenitales.

7.4.1 Penicilina

Desde hace décadas, debido a la aparición de resistencias la penicilina ha dejado de ser una opción de tratamiento en la infección gonocócica. Tanto es así, que algunos programas de vigilancia de resistencias antimicrobianas, han dejado de aportar datos sobre la distribución de las CMIs a este antibiótico y sólo incluyen los datos referentes a la detección fenotípica de cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinas plasmídica (PPNG) (97,134,135).

En EEUU, anualmente el CDC publica los datos de monitorización de resistencias a través del programa *Gonococcal Isolate Surveillance Project* (GISP) y en Europa, tal y como se ha comentado anteriormente, estos datos se recogen a través del Euro-GASP. En sus últimos informes, ambos sistemas de vigilancia sitúan el porcentaje de cepas PPNG en torno al 15% (97,134). Nuestro estudio está en consonancia con estos informes, ya que el 15.4% de los aislamientos de gonococo fueron resistentes a la penicilina, debido en todos los casos a cepas PPNG. Estas cifras, desaconsejan volver a introducir la penicilina en el tratamiento de la gonorrea.

En nuestro estudio, hemos utilizado la secuenciación del genoma completo para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la resistencia antimicrobiana. En el caso de la penicilina, tal y como se ha comentado en la introducción, la resistencia puede deberse a múltiples mecanismos como la producción de betalactamasas plasmídicas, la alteración de las PBPs, la expulsión activa del antibiótico y/o la disminución de su entrada.

Sin embargo, en la colección de cepas incluidas en este estudio, la resistencia a penicilina se debe principalmente a la presencia de la penicilinas plasmídica *bla*_{TEM}, presente en 15 de los 16 aislados resistentes (en uno de ellos no fue posible realizar la SGC), de los cuales el 66.7% presentaban la variante TEM-135. Este hecho es importante, puesto que la acumulación de una mutación adicional en TEM-135 podría dar lugar a una BLEE, que afectaría también a las cefalosporinas (3). No obstante, existen diferencias geográficas en la distribución de los

plásmidos, ya que por ejemplo en un estudio realizado en 2012 en Reino Unido, el 27% de sus penicilinasas fueron del tipo TEM-135 (136) y, sin embargo, en otro estudio en Nueva Zelanda en el que realizaron la SGC a 425 gonococos aislados durante 2014 y 2015, todas las betalactamasas que detectaron pertenecieron al tipo TEM-1 (137). Es importante, por tanto, seguir caracterizando molecularmente la resistencia plasmídica en *N. gonorrhoeae*.

A pesar de que también se detectaron mutaciones cromosómicas en la población de estudio, éstas se encontraron principalmente en las cepas con categoría intermedia a la penicilina, por lo que la presencia de betalactamasas plasmídicas, al igual que en otros trabajos publicados (63,137,138), es el determinante que más contribuye en la resistencia a penicilina. Hay que señalar que en dos de los aislamientos analizados se encontraron discrepancias entre el fenotipo y el genotipo, es decir, mediante SGC identificamos la presencia de betalactamasa en un aislado que dio negativo en la prueba de la nitrocefina, y otro aislado en el que a pesar de obtener un resultado positivo en la prueba de la nitrocefina no se detectó molecularmente la presencia de betalactamasa. La CMI obtenida en el primero de los casos (SGC +, nitrocefina -) fue 0.19 mg/L, lo que tendría concordancia con ausencia de betalactamasa y, por tanto, un resultado negativo en la prueba de la nitrocefina; lo que indicaría que a pesar de detectarse la presencia del gen codificante de betalactamasa ésta no ha llegado a expresarse. En el segundo de los casos discordantes (SGC-, nitrocefina +) se obtuvo una CMI de 1 mg/L, por lo que probablemente en este caso la no detección molecular se deba a una baja cobertura de esta región génica mediante la SGC, dificultando en esta muestra una buena resolución del plásmido *bla*_{TEM}. No obstante, estas discrepancias han sido observadas también en otros estudios (138). Aunque la mayoría de los estudios basados en SGC de *N. gonorrhoeae* no incluyen la penicilina entre los antibióticos que analizan, es importante que el análisis de este antimicrobiano se siga realizando, ya que ayudaría a entender mejor la posible epistasis génica que también puede afectar a la resistencia de las cefalosporinas, tratamiento actual de la gonorrea.

7.4.2 Cefalosporinas

Tras la aparición en Japón, Francia y España de los primeras cepas XDR que poseían un alto nivel de resistencia a ceftriaxona (8–10), la OMS publicó en 2012 un plan de acción global para controlar la propagación y el impacto de la resistencia a los antimicrobianos en gonococo. Entre sus directrices, recomendaba que el tratamiento empleado debía cumplir el requisito de curar al menos el 95% de los casos y remarcaba la importancia de realizar antibiogramas para controlar las resistencias a las ESCs (12).

Entre los gonococos testados en este estudio, cuando se utilizaron los criterios del CLSI para interpretar las CMI a las cefalosporinas, todos los aislamientos fueron sensibles, tanto a la cefixima como a la ceftriaxona. Sin embargo, al utilizar los puntos de corte del EUCAST, 3 cepas (2.9%) fueron resistentes a la cefixima (CMI=0.19 mg/L).

En otras regiones de España, como en Barcelona, Serra-Pladevall *et al.* publicaron que en 2013 tuvieron una tasa de resistencia a la cefixima del 8.2% y del 0.6% a la ceftriaxona, con CMIs 50 y 90 para estos antibióticos más elevadas que nuestros resultados (139). Asimismo, en Almería durante los años 2012-2014, Cobo *et al.* encontraron entre sus 65 gonococos aislados, porcentajes de resistencia a cefixima y ceftriaxona del 6.1% y 4.6%, respectivamente (140). Sin embargo, en el País Vasco durante 2015 no tuvieron aislamientos resistentes ni a la cefixima, ni a la ceftriaxona (115), por lo que en este sentido y como se observa en nuestro estudio, la resistencia a las ESCs ha ido disminuyendo en los últimos años. Este hecho, también se observa en el Euro-GASP de 2017, en el que como en años previos, no hubo resistencia a la ceftriaxona entre los países Europeos aunque, en el caso de la resistencia a la cefixima, la media europea se situó en un 1.9%, elevándose hasta el 5.5% en las cepas procedentes de nuestro país (131).

El análisis de las mutaciones asociadas con la resistencia a las cefalosporinas reveló que a pesar de encontrar mutaciones en el promotor y/o en el gen *mtrR* (n=92, 89.3%), en los genes *ponA* (n=51, 49.5%), *pilQ* (n=49, 47.6%), *penB* (n=37, 35.9%) y *penA* (n=7, 6.8%); sólo la presencia del

alelo *penA* en mosaico tipo X fue el responsable de la resistencia a cefixima en nuestra población de estudio.

En otros estudios en los que se analizaron los determinantes asociados con la resistencia a las cefalosporinas en cepas de Europa, EEUU, Canadá y Nueva Zelanda (141–145,137), se encontró que el alelo *penA* en mosaico tipo X estaba más asociado con la resistencia a cefixima y el alelo *penA* en mosaico tipo XXXIV, más relacionado con la resistencia a la ceftriaxona. En nuestro estudio, las cepas que tenían el determinante en mosaico tipo XXXIV fueron sensibles a las ESCs, aunque sus CMI's fueron más elevadas que las cepas que no tenían alelos *penA* en mosaico.

En el año 2015, se detectó en Japón una cepa *N. gonorrhoeae*, conocida como FC428, con resistencia a las ESCs y que se ha diseminado internacionalmente a China, Dinamarca, Canadá, Australia e Irlanda (146–149,70). Es importante señalar que al contrario de lo ocurrido con los gonococos XDRs H041 y F89, esta cepa ha logrado expandirse de manera sostenida en el tiempo y aunque en nuestro estudio no hemos encontrado la presencia del alelo *penA* en mosaico tipo LX, responsable de su resistencia, es importante monitorizar su presencia debido al mayor *fitness* biológico de este clon.

7.4.3 Azitromicina

En el informe Euro-GASP 2017 (131), el porcentaje de resistencia a la azitromicina para nuestro país fue del 5.5% y de manera global, para el conjunto de los países participantes, alcanzó el 7.5%, cifra que se mantiene estable desde 2014. En nuestro estudio, el porcentaje de resistencia a este antibiótico fue del 1.9%, situándose por debajo, tanto de los datos de la media europea como de lo reportado anteriormente en España (100,131,139,140).

Entre la población de estudio, no se detectaron las mutaciones A2059G y C2611T en el 23S ARNr, responsables del fenotipo de resistencia a azitromicina en otros estudios (63,137,141,143,150).

Asimismo, en nuestro caso al igual que lo reportado previamente por Demczuk *et al.* (150), la presencia de los genes *ermB* y de mutaciones en *mtrR* no tuvieron efecto en la resistencia a este antibiótico.

Actualmente, como se ha comentado en la introducción, hay diferentes guías clínicas que recomiendan la terapia dual con ceftriaxona y azitromicina para el tratamiento de la infección gonocócica no complicada (38,40,76,77). La introducción de la azitromicina en la terapia empírica se realizó con el fin de mejorar la eficacia terapéutica, retrasando la aparición de resistencias a las cefalosporinas y también, debido al elevado número de personas coinfectadas con clamidia (12). No obstante, en algunos estudios ya se han observado tasas de resistencia de *C. trachomatis* y *M. genitalium* por encima del 5% (151–153). Por otro lado, la BASHH en la última actualización de las guías clínicas de tratamiento de *C. trachomatis* (154), desaconseja el uso de azitromicina en monodosis para el tratamiento de las clamidiasis no complicadas. Esto se debe, principalmente, por la menor eficacia de la azitromicina en el tratamiento de la clamidiasis rectal en comparación con el uso de doxiciclina y a la capacidad para seleccionar cepas de *M. genitalium* resistentes a los macrólidos. Del mismo modo, esta sociedad científica en 2019 actualizó las guías clínicas del manejo de la gonorrea (78), cambiando el tratamiento empírico a la monoterapia con ceftriaxona 1 g im y en caso de disponer del antibiograma, la recomendación que realizan es ciprofloxacino 500 mg vo monodosis.

En nuestra población, ni las cefalosporinas ni la azitromicina alcanzan un nivel de resistencia del 5%, por lo que en este caso, se podría evitar el uso de la terapia dual y utilizar únicamente la ceftriaxona para las infecciones por *N. gonorrhoeae* no complicadas, evitando el uso de la azitromicina para prevenir la aparición de resistencias en otras ITS bacterianas. No obstante, es importante la monitorización de la sensibilidad antimicrobiana para detectar cambios en la epidemiología de las cepas de gonococo circulantes y así, poder adecuar las guías locales de tratamiento empírico.

7.4.4 Ciprofloxacino

En 2018 Reino Unido, en su programa de vigilancia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, publicó una tasa de resistencia a ciprofloxacino de aproximadamente un 40%, cifras similares a las de la media europea y a las encontradas en nuestro estudio (131,135). A pesar de estas cifras y como se ha comentado anteriormente, las guías clínicas de este país, con la finalidad de reducir la presión selectiva sobre las ESCs, recomiendan esta fluoroquinolona como tratamiento de elección, siempre teniendo presente que se tiene que disponer del antibiograma (78). Sin embargo, la Agencia Europea del Medicamento debido a las reacciones adversas musculoesqueléticas y del sistema nervioso que producen esta familia de antibióticos, no recomienda su utilización, si existe alternativa terapéutica (155).

En España, los datos de resistencia a ciprofloxacino recogidos en los informes del Euro-GASP de los años 2017 y 2016 fueron del 53.9% y 57.5%, respectivamente (131,134). Sin embargo, al contrario que en nuestra población, la mayoría de las cepas españolas incluidas en el Euro-GASP 2016 se aislaron de hombres heterosexuales (21.3% vs. 72.3%), en los que se encontró una tasa más alta de resistencia a este antibiótico (134). En otras regiones de España (100,105), se ha descrito la asociación entre los hombres heterosexuales y las cepas de gonococo con resistencia a ciprofloxacino. Este hecho también lo observamos en este estudio, en el que a pesar del bajo número de varones heterosexuales, las tasas de resistencias en este colectivo fueron más altas (70%) que en población HSH, donde estas cifras cayeron a la mitad.

Al igual que en otros estudios (63,138,141), existe muy buena la correlación entre el fenotipo y el genotipo para esta clase de antibióticos, estando implicados en la resistencia a ciprofloxacino las posiciones aminoácidas 91 y 95 del gen *gyrA*. Asimismo, la mayoría de cepas resistentes presentaba mutaciones concomitantes en *parC*. Entre los aislamientos analizados, se observó una correlación del 99.03%, hallándose únicamente una cepa en la que no se pudo asociar su resistencia con ninguno de los mecanismos de resistencia a quinolonas descritos previamente.

7.4.5 Tetraciclina

A pesar de que existen algunas diferencias entre los criterios de interpretación del CLSI y del EUCAST (64,65), sólo encontramos diferencias significativas entre las tasas de resistencia a la tetraciclina ($p < 0.01$), lo que confirma los esfuerzos por armonizar los puntos de corte clínicos.

Para este antibiótico en particular, encontramos un 5.8% y un 2.9% de resistencia según los criterios de EUCAST y el CLSI, respectivamente. Estas cifras, son inferiores a las presentadas en otras regiones (97,115,135,156). Sin embargo, el hecho de que existan estas diferencias entre comités, dificulta la comparación de los resultados de sensibilidad con otros sistemas de vigilancia antimicrobiana.

La sustitución V57M del gen *rpsJ*, asociada previamente con la reducción de la afinidad de las tetraciclinas con la subunidad ribosomal 30S, al igual que en otros estudios (137,156), la hemos identificado tanto en la población sensible, como en la resistente. En cambio, el plásmido *tetM*, es el que contribuye a la resistencia de alto nivel en nuestros aislamientos. Sólo una cepa que mostraba resistencia de alto nivel a tetraciclina, no pudo asociarse ni con la resistencia plasmídica, ni con la cromosómica.

7.4.6 Espectinomicina

Actualmente, al igual que en nuestro estudio, no se detectan cepas resistentes a espectinomicina en Europa (134). Además, hay una perfecta correlación del fenotipo con el genotipo, ya que no hemos identificado ninguna de las mutaciones del 16S ARNr y del gen *rpsE*, relacionadas con la resistencia a este antibiótico.

La espectinomicina dejó de estar disponible en muchos países debido a la rápida diseminación de cepas resistentes y a su falta de eficacia en el tratamiento de las infecciones faríngeas (3).

Pese a esto, las guías clínicas lo recomiendan como tratamiento alternativo, sobre todo en casos de fracaso terapéutico o en cepas con resistencia a la ceftriaxona (38,40,76,78).

7.4.7 Gentamicina

En nuestro estudio hemos obtenido valores de CMI₅₀ de 3 mg/L y de CMI₉₀ de 4 mg/L y aunque no existen puntos de corte clínicos oficiales para la gentamicina, basándonos en los criterios establecidos por Brown *et al.* (82) no encontramos resistencia entre nuestros aislamientos. En el Euro-GASP de 2016 se observaron cifras ligeramente superiores a las de nuestro estudio, con valores de CMI₅₀ y de CMI₉₀ de 4 y 8 mg/L, respectivamente entre un total de 1507 cepas (134).

Desde 1993 la gentamicina se ha utilizado en Malawi en el tratamiento sintomático de las uretritis sin que se haya reportado un aumento en el número de fracasos terapéuticos (157). Este antibiótico es una opción más económica que otros tratamientos, posee una sencilla posología, ya que se administra intramuscularmente y en dosis única, lo que conlleva que el paciente no tenga problemas de adherencia al tratamiento. Además, ha dado buenos resultados en diversos ensayos clínicos (83,84) y al igual que en el caso de la espectinomicina, este aminoglucósido se recomienda ante fracasos terapéuticos con las cefalosporinas (40,76,78). Sin embargo, en diversos estudios recientes se ha visto que este antibiótico no es eficaz para tratar la gonorrea faríngea (158,159), por lo que entre nuestros pacientes, debido al elevado porcentaje de infección faríngea, no sería una opción terapéutica.

7.5 Factores de riesgo para la infección por *N. gonorrhoeae* resistente a antimicrobianos y con sensibilidad intermedia en población HSH

En el período de estudio, tal y como se ha comentado anteriormente, las infecciones por *N. gonorrhoeae* ocurrieron principalmente en población HSH, más concretamente el 78.7% de nuestros pacientes tenía esta orientación sexual. Además, al igual que en otros estudios previos (96,100,124,139,160), este colectivo se identifica como un grupo vulnerable tanto para la infección gonocócica como para otras ITS, incluyendo la infección por VIH. Pese a esto, hay pocos estudios en los que se analicen los factores de riesgo relacionados con la resistencia antimicrobiana en este grupo *core*.

Para enfocar mejor los tratamientos y llevar a cabo estrategias de intervención en salud pública, es necesario no sólo identificar los grupos de población más vulnerables a la infección gonocócica, sino también, aquellas personas con mayor riesgo de adquirir cepas resistentes a los antimicrobianos. Por ello, dado que los HSH eran nuestro grupo predominante y que la orientación sexual se correlaciona con otras muchas variables, analizamos en estos pacientes los factores de riesgo asociados con las cepas de gonococo resistentes y con sensibilidad disminuida a los antibióticos testados.

En nuestro estudio encontramos una asociación estadísticamente significativa entre los HSH con VIH y la resistencia a ciprofloxacino. Asimismo, también se observó una asociación con aquellos con edades comprendidas entre los 29 y los 39 años. En un estudio llevado a cabo en los Países Bajos, aunque no se analizó específicamente la población HSH, se observó que la infección por *N. gonorrhoeae* resistente a ciprofloxacino era más probable en hombres VIH positivos, que en VIH negativos, aunque esto no se pudo confirmar al realizar el análisis multivariable. Además, también encontraron asociación con los varones mayores de 35 años (161). Por otro lado, en el Euro-GASP 2017 y en otros estudios, sin hacer una estratificación basada en la orientación

sexual, la resistencia a esta fluoroquinolona se asoció a las personas mayores de 25 años (131,160).

En ese mismo informe europeo (131), en 2017 la resistencia a azitromicina fue más alta en aislamientos de HSH (8.3%), seguido de hombres heterosexuales (7.2%) y más baja en mujeres (6.8%). La resistencia a la azitromicina se asoció significativamente con los pacientes menores de 25 años. En nuestra población, únicamente en el análisis univariante, también encontramos una asociación significativa entre la edad y la sensibilidad disminuida a la azitromicina.

En el caso de la tetraciclina, como hemos comentado anteriormente, debido a que existen diferencias entre los criterios de interpretación del CLSI y del EUCAST, los factores de riesgo relacionados con las cepas de gonococo con sensibilidad intermedia y resistencia a este antibiótico varían en función del comité. Sin embargo, en ambos casos coincide el haber sido diagnosticado con alguna ITS en el año previo. Aunque en muchos estudios no analizan la implicación de este antibiótico, ya que actualmente no se utiliza de manera generalizada en el tratamiento de la gonorrea, el haber tenido algún episodio de infección gonocócica en los últimos 12 meses, no sólo se asocia a tener más riesgo de sufrir otra vez una infección por *N. gonorrhoeae*, sino también a cepas resistentes a antimicrobianos (100,106).

7.6 Caracterización de los aislamientos de *N. gonorrhoeae*

7.6.1 Serotipia

Como se ha comentado en la introducción, la porina es un factor de virulencia en *N. gonorrhoeae*. Los gonococos que expresan en su superficie bacteriana PorB1A están asociados con infecciones diseminadas, mientras que los que expresan la proteína PorB1B, se relacionan con infecciones localizadas en las mucosas (2).

En la práctica clínica, el método de coagulación phadebact se utiliza mayoritariamente para la identificación del gonococo y no tanto con fines de serotipado. Sin embargo, es una manera muy útil de saber las porinas que están expresando los aislamientos de nuestra población y de este modo, hacernos una idea de la virulencia de las cepas circulantes. En nuestro caso, no tuvimos infecciones diseminadas y todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae* pertenecieron al serotipo IB.

7.6.2 NG-MAST

Al caracterizar las 104 cepas de gonococo con el método de tipado molecular NG-MAST, obtuvimos 48 secuenciotipos diferentes, de los cuales aproximadamente la mitad de los STs estaban representados únicamente por un solo aislamiento. Este hecho podría estar relacionado con dificultades en el manejo de las parejas sexuales de los pacientes o bien que sus contactos hayan sido diagnosticados y tratados en otros centros asistenciales.

A pesar de la diversidad genética encontrada en nuestra población de estudio, el 77.9% de las cepas se agruparon en 25 STs diferentes y, alrededor de un 40%, en 9 genogrupos, siendo el G2400 y el G2992 los más predominantes. Aunque la mayoría de nuestros aislamientos procedían de HSH, encontramos una relación estadísticamente significativa entre el G2400 y los pacientes heterosexuales, mientras que el G2992 se distribuyó aleatoriamente entre los pacientes HSH y los heterosexuales. Al contrario que en nuestro estudio, en diversas regiones de España y en Europa han encontrado una relación estadísticamente significativa entre estos dos genogrupos y el colectivo HSH (55,105,115,141).

En nuestra población los clones más prevalentes, de mayor a menor frecuencia, fueron el G2400, el ST5441, el ST2318, el ST12547 y el G2992. A pesar del tamaño relativamente pequeño de nuestros datos, observamos una diferencia con respecto a la epidemiología de los últimos informes del Euro-GASP, tanto a nivel del conjunto de Europa como a nivel nacional, ya que salvo

los genogrupos G2400 y G2992 el resto de clones, o no estaban representados o su frecuencia era baja (55,141).

Por otro lado, aunque el G1407 ha sido el genogrupo más prevalente, tanto en nuestro país como en otras regiones (55,115,116,139,141), fue uno de los genogrupos menos representados en nuestro estudio, con tan sólo 3 cepas. Este cambio en la epidemiología parece observarse también en Europa, ya que si bien el G1407 sigue siendo el clon más frecuente, se ha observado una reducción significativa de su prevalencia con respecto a años previos (141). Este hecho es importante, ya que este clon está asociado no sólo con resistencia a la cefixima y a la ceftriaxona (3,9,55,162), sino también con fracasos de tratamiento a nivel internacional (9). En nuestro estudio, uno de los factores que podría haber contribuido a la reducción del reservorio del clon G1407 en nuestra área, podría ser el mayor número de diagnósticos de gonorrea en muestras extragenitales en combinación con una terapia dual apropiada. De hecho, los clones ST5441 y ST2318, que son los STs más predominantes, se aislaron en una gran proporción de muestras extragenitales, 37.5% y 71.4%, respectivamente. Estos hallazgos ponen de relevancia la necesidad de una monitorización continua de las poblaciones de *N. gonorrhoeae* para identificar los cambios temporales y la expansión de nuevos clones que podrían ocupar el nicho ecológico de otras cepas.

7.6.3 Secuenciación del genoma completo

Las técnicas de secuenciación masiva nos permiten disponer de una mayor cobertura del genoma bacteriano, lo que en última instancia, permite realizar un análisis epidemiológico más exacto en comparación con los esquemas clásicos basados en el análisis de un número de genes limitado. En nuestro estudio, se establecieron las relaciones filogenómicas en función de los 1751 loci que compartían todas los aislados de nuestra población.

Actualmente, la plataforma BIGSdb (<https://pubmlst.org/neisseria/>) dispone de un nuevo esquema de tipado basado en el genoma *core* (cg) de *N. gonorrhoeae* que incluye un total de 1649 loci. Este esquema denominado cgMLST, se encuentra todavía en fase experimental y en el futuro ayudará a realizar mejores comparaciones epidemiológicas. No obstante, con el análisis *in silico* de los datos de la SGC, se puede obtener la caracterización wgNG-MAST, wgMLST y el wgNG-STAR que nos permiten, además de realizar comparaciones con otras cepas secuenciadas mediante SGC, efectuarlas entre laboratorios que carecen de esta tecnología. En nuestro estudio, las cepas de *N. gonorrhoeae* se agruparon en 27 STs al analizar el wgMLST, 30 STs mediante wgNG-STAR y 47 STs con wgNG-MAST (48 STs NG-MAST, ya que una cepa no se pudo incluir en la secuenciación masiva). El esquema MLST, debido a que se basa en el análisis de genes conservados, es el método de tipado con menor capacidad de discriminación, aunque ninguno de los tres esquemas es comparable en cuanto a la capacidad de resolución alcanzable con el análisis completo del genoma *core*.

En general, en nuestra población de estudio, se observó concordancia entre el análisis filogenómico en base al genoma *core* y el MLST. Al estudiar la relación de cada ST-MLST con la SGC, observamos que cada uno de los ST-MLST se distribuyó de manera uniforme dentro de un único clado, a excepción del ST mayoritario, el ST7363, que lo hizo en dos clados diferentes y alejados entre sí. Esta diferente distribución coincide con la resistencia a cefixima observada, ya que los únicos 3 aislados con resistencia a cefixima encontrados entre la población de estudio son justamente los que se distribuyen de manera diferente al resto de aislados de este mismo ST, agrupándose en un clado diferente y confirmando el bajo poder de discriminación del esquema MLST. Al igual que en nuestro estudio, en el programa nacional de vigilancia de *N. gonorrhoeae* de China de los años 2012 y 2013 (163), los aislamientos pertenecientes al ST-MLST 7363 no se distribuían en un único clado y, además, todas las cepas de este ST contenían alelos *penA* en mosaico. En nuestro estudio, en cambio, sólo estos 3 aislados (25%) contenían el alelo *penA* en mosaico tipo X dentro del clon.

En la mayor parte de los países Europeos, incluido España, el ST-MLST 1901 fue el clon más prevalente del Euro-GASP 2013 (141), a diferencia de lo que observamos en nuestro estudio donde el ST1901 tuvo una baja representación (n=3).

Al contrario de lo que sucede con el MLST, tanto el NG-STAR como el NG-MAST son métodos de tipado que reflejan mejor la diversidad de los clones de gonococo y que permiten detectar cambios temporales en las poblaciones. Uno de los puntos fuertes del NG-MAST es que tan sólo con el análisis de los fragmentos hipervariables de dos genes, el *porB* y el *tbpB*, nos permite caracterizar la variabilidad genética de la población de gonococo. Este método, si bien no realiza de una manera directa la relación con los genes de resistencia, ha permitido establecer la asociación de algunos clones no sólo con el antibiograma, sino también con otras características de interés epidemiológico (55,105,115,141).

Ante la gran diversidad de STs del NG-MAST y con el fin de realizar mejores asociaciones clínico-epidemiológicas, en el estudio de Chisholm *et al.* (55) se acuñó el término genogrupo para agrupar a los STs estrechamente relacionados que, compartiendo uno de los dos alelos, mostraban una similitud $\geq 99\%$ en el otro alelo. Como se ha comentado anteriormente, en nuestro estudio obtuvimos un total de 9 genogrupos, sin embargo, al comparar la distribución de los STs que forman parte de cada genogrupo con los datos obtenidos de las relaciones filogenómicas del genoma *core* de nuestros aislamientos, hemos observado que los STs que componen los genogrupos G5444, G5445 y G2992 se encuentran en diferentes clados. En el estudio de Harris *et al.* (141), al analizar mediante SGC los aislamientos de gonococo del Euro-GASP de 2013, observaron que aunque los genogrupos se ajustaron relativamente bien a la filogenia de la SGC, el G1407 se distribuyó entre clados diferentes y algunos genogrupos como el G25 y el G2992 se fusionaron en un único clado.

Ante estos hallazgos y debido a que actualmente aún hay muchos laboratorios clínicos que no tienen acceso a las técnicas de secuenciación masiva, se pone en evidencia la necesidad de

realizar más estudios que permitan establecer una definición más precisa de los STs que pertenecen a cada genogrupo. De esta manera, los centros con menos recursos económicos podrán establecer relaciones epidemiológicas más fiables y, por tanto, realizar programas de intervención y prevención adecuados para su población. No obstante, a medida que las técnicas de SGC se hagan extensibles a todos los laboratorios, se obtendrá un mejor conocimiento de la dinámica poblacional de *N. gonorrhoeae*, lo que nos ayudará a entender mejor la diseminación de los clones de gonococo facilitando, en última instancia, el desarrollo de estrategias de intervención mejor dirigidas.

La principal ventaja del NG-STAR sobre el resto de métodos, es que además de caracterizar epidemiológicamente las cepas, ofrece información sobre la resistencia a betalactámicos, macrólidos y quinolonas. Sin embargo, este método no está muy extendido entre la comunidad científica, debido a que es un método de tipado descrito recientemente, en 2017, y que además al compararlo con el NG-MAST, hay que secuenciar un mayor número de genes para obtener el secuenciotipo. No obstante, el uso creciente de las técnicas de secuenciación masiva ayudará a ampliar la base de datos de este nuevo esquema de tipado, permitiendo una mejor monitorización de la diseminación global de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antimicrobianos.

En este sentido, los STs-NG-STAR más prevalentes de nuestra población difieren con los obtenidos en algunos estudios realizados en Canadá, Australia y Japón (56,164,165). Encontramos similitudes en el perfil de sensibilidad del ST63 (n=6) que no presenta resistencia a ninguno de los antibióticos que analiza este esquema y, en cambio, el ST90 (n=2) que se ha relacionado con sensibilidad disminuida a cefalosporinas y resistencia a quinolonas, en nuestro estudio difiere únicamente en las cefalosporinas, ya que los 2 aislados pertenecientes a este clon, que a su vez pertenecían al genogrupo 1407 del NG-MAST, fueron sensibles tanto a ceftriaxona como a cefixima (56).

7.7 Limitaciones del estudio

Nuestro estudio fue llevado a cabo en una clínica de ITS de Madrid durante un periodo de 4 meses, por lo que al número relativamente bajo de pacientes se le añade la sobrerrepresentación del colectivo HSH, por lo tanto, al no ser una muestra representativa de la población general, nuestros hallazgos no serían extrapolables ni a otros sistemas de atención médica ni a otras áreas geográficas. Aun así, es importante señalar que en España la infección gonocócica afecta mayoritariamente a los hombres (114) y en una gran proporción a los HSH (100,102,105,115,117) que constituyen un grupo de riesgo especialmente vulnerable, tanto para las clínicas monográficas de ITS como para el resto de sistemas asistenciales, lo que justifica en gran medida la necesidad de estudios que analicen la situación en estos grupos *core* específicos.

Otra de las limitaciones de este estudio es la falta de datos sobre algunas variables sociodemográficas y conductuales que son necesarias para conocer con mayor exactitud las características de la población, como por ejemplo la ocupación, datos más completos sobre el nivel académico, la práctica del *chemsex* o el uso de redes sociales y aplicaciones para practicar sexo.

Tal y como indica el dogma central de la biología molecular, la transcripción es el proceso intermedio en el flujo desde la información del material genético hasta las proteínas, que son los elementos responsables del fenotipo de expresión celular. En este trabajo hemos analizado los genes asociados con la resistencia a diferentes antimicrobianos. Sin embargo, aunque su estudio es el primer paso, para lograr entender mejor el fenotipo de resistencia de los diferentes aislamientos de *N. gonorrhoeae*, además de caracterizar las mutaciones implicadas a nivel genómico, es necesario estudiar si estos genes son transcripcionalmente activos y realizar estudios de proteómica para lograr entender las interacciones que finalmente se producen en el fenotipo de resistencia (57).

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. El perfil que caracteriza a los pacientes con infección gonocócica es el del varón, mayoritariamente HSH, de procedencia española, con edades comprendidas entre los 18 y los 28 años y con estudios superiores en un tercio de los casos. Además, son consumidores de alcohol y de otras drogas recreativas y presentan hábitos sexuales poco seguros, ya que hay un elevado porcentaje de prácticas sexuales desprotegidas, con múltiples parejas sexuales, lo que refleja la falta de percepción del riesgo de contraer una ITS.

2. Los pacientes HSH son el principal grupo de riesgo en nuestra población (78.7%) y a los que se deben dirigir de manera preferente programas específicos de control y prevención de la infección.

3. La prevalencia de otras ITS concurrentes al diagnóstico de la gonorrea es elevada, predominando la infección por el VIH y por *C. trachomatis*. Asimismo, un tercio de los sujetos tuvieron alguna ITS en el año previo al diagnóstico. Por ello, es importante realizar un completo despistaje de otras infecciones de transmisión sexual en los pacientes diagnosticados de gonorrea y llevar a cabo un seguimiento periódico.

4. La gonorrea extragenital cursa fundamentalmente de manera asintomática y de manera global, es más frecuente que la infección genital. Por consiguiente, para romper la cadena de transmisión es importante incorporar la toma de muestras faríngeas y rectales en los pacientes con sospecha de ITS.

5. En nuestro trabajo se observan niveles de resistencia antimicrobiana más bajos que los reportados en otros lugares de España. No se ha detectado resistencia a ceftriaxona, espectinomicina y gentamicina. En cambio, se debe seguir evitando el tratamiento empírico con ciprofloxacino, penicilina y tetraciclina, debido a que a pesar de que su utilización no está

recomendada en el tratamiento de la infección gonocócica, se siguen observando tasas más altas de resistencia. La azitromicina y la cefixima muestran valores de resistencia inferiores al 3% al aplicar los puntos de corte del EUCAST.

6. En este estudio no hemos encontrado diferencias entre la sensibilidad de las cepas aisladas de zonas genitales y extragenitales. Ante los datos presentados, la ceftriaxona continúa siendo una buena opción de tratamiento, pudiéndose utilizar en monoterapia y evitando la terapia dual con azitromicina para prevenir la aparición de resistencias en otras ITS bacterianas.

7. A pesar de la utilización de los criterios de interpretación del CLSI y del EUCAST, no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los antibióticos testados, con la excepción de la tetraciclina.

8. En la población HSH, los pacientes con edades comprendidas entre los 29 y los 39 años, así como aquellos con VIH, poseen un mayor riesgo de tener una infección con cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino. Asimismo, el diagnóstico previo de una ITS se asocia con aislamientos que no son sensibles a tetraciclina.

9. En nuestra población de estudio, los mecanismos moleculares principalmente implicados en la resistencia a penicilina y a tetraciclina son los plásmidos *bla*_{TEM} y *tetM*, respectivamente. El alelo *penA* en mosaico tipo X es el responsable de la resistencia a cefixima y en el caso de las fluoroquinolonas, las mutaciones en las posiciones aminoacídicas 91 y 95 del gen *gyrA*, junto con cambios en los aminoácidos 86, 87 y 88 del gen *parC*, son los responsables del fenotipo de resistencia. En el caso de la azitromicina, a pesar de detectarse dos cepas resistentes, no se identificó ninguno de los determinantes moleculares de resistencia previamente descritos, lo que sugiere la implicación de otros factores aún no descritos cuya identificación requiere ser investigada en más detalle.

10. En comparación con las técnicas tradicionales de tipado, el análisis del genoma *core* en *N. gonorrhoeae* permite establecer relaciones filogenómicas más exactas con las que se logran un mejor análisis epidemiológico. Asimismo, con los 3 esquemas de tipado estudiados se observa una enorme variabilidad genética, sin embargo, el MLST posee menor capacidad de discriminación, mientras que el NG-STAR y el NG-MAST reflejan mejor la diversidad de los clones de gonococo.

11. Los clones NG-MAST más prevalentes son el ST5441, asociado con la sensibilidad a todos los antimicrobianos testados y el ST2318, asociado con infecciones extragenitales. Estos clones están pocos representados en estudios previos tanto a nivel nacional como europeo. Por el contrario, destaca la escasa presencia del genogrupo G1407, asociado con resistencia a ESC, y descrito anteriormente como uno de los más prevalentes. Estos datos podrían sugerir un cambio en la población gonocócica, los ST5441 y ST2318 podrían haber ocupado el nicho ecológico del G1407 reducido en gran parte por una mejora en el control y la vigilancia de las infecciones extragenitales.

12. En nuestro estudio hemos identificado 9 genogrupos. Los mayoritarios son el G2400, asociado con pacientes heterosexuales y el G2992, que se distribuye indistintamente entre los diferentes pacientes. Todos los genogrupos se ajustan relativamente bien a la filogenia basada en el genoma *core*, a excepción del G5444, el G5445 y el G2992, cuyos STs se distribuyen en diferentes clados. Por lo tanto, es necesario establecer nuevos criterios para la asociación de secuenciotipos basados en las relaciones del genoma *core*.

13. Los programas continuos de vigilancia molecular y de sensibilidad antimicrobiana son necesarios para detectar cambios en la población y proporcionar datos de calidad para adecuar las guías locales de tratamiento empírico.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. 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 Aug 1;97(8):548-562P.
2. Bennett J, Dolin R, Blaser M. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. Vol. 2. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2015.
3. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul;27(3):587-613.
4. Ligon BL. Albert Ludwig Sigismund Neisser: discoverer of the cause of gonorrhea. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005 Oct;16(4):336-41.
5. Kampmeier RH. Identification of the gonococcus by Albert Neisser. 1879. *Sex Transm Dis*. 1978;5(2):71-2.
6. Ledermann W. Una historia personal de las bacterias. 2007th ed. RIL Editores.
7. Unemo M, Del Rio C, Shafer WM. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. *Microbiol Spectr*. 2016 Jun;4(3).
8. 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 Jul;55(7):3538-45.
9. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1273-80.
10. Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012 Apr;30(4):218-9.
11. 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 Jun 23;374(25):2504-6.
12. World Health Organization (WHO). Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* [Internet]. World Health Organization.; 2012 [citado 11 Sep 19]. Disponible en: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/>
13. World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. World Health Organization.; 2017 [citado 8 Octubre 2019]. Disponible en:

- <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
14. Tønjum T. Neisseria. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [Internet]. American Cancer Society; 2015 [citado 5 Marzo 2019]. p. 1–48. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm00981>
 15. Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Ritcher S, *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Vol. 1. Washinton: ASM Press; 2015.
 16. Hill SA, Masters TL, Wachter J. Gonorrhoea - an evolving disease of the new millennium. *Microb Cell Graz Austria*. 2016 Sep 5;3(9):371–89.
 17. Kallstrom H, Blackmer Gill D, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol*. 2001 Mar;3(3):133–43.
 18. Edwards JL, Brown EJ, Uk-Nham S, Cannon JG, Blake MS, Apicella MA. A co-operative interaction between *Neisseria gonorrhoeae* and complement receptor 3 mediates infection of primary cervical epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2002 Sep;4(9):571–84.
 19. Lenz JD, Dillard JP. Pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* and the Host Defense in Ascending Infections of Human Fallopian Tube. *Front Immunol*. 2018;9:2710.
 20. Chen A, Seifert HS. Structure-function studies of the *Neisseria gonorrhoeae* major outer membrane porin. *Infect Immun*. 2013 Dec;81(12):4383–91.
 21. Martin IMC, Ison CA, Aanensen DM, Fenton KA, Spratt BG. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis*. 2004 Apr 15;189(8):1497–505.
 22. Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Apr;16(4):226–40.
 23. Lytton EJ, Blake MS. Isolation and partial characterization of the reduction-modifiable protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med*. 1986 Nov 1;164(5):1749–59.
 24. Gulati S, Mu X, Zheng B, Reed GW, Ram S, Rice PA. Antibody to reduction modifiable protein increases the bacterial burden and the duration of gonococcal infection in a mouse model. *J Infect Dis*. 2015 Jul 15;212(2):311–5.
 25. Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jamelson J. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. Vol. 1. New York: McGraw Hill; 2004.
 26. Kandler JL, Acevedo RV, Dickinson MK, Cash DR, Shafer WM, Cornelissen CN. The genes that encode the gonococcal transferrin binding proteins, TbpB and TbpA, are differentially regulated by MisR under iron-replete and iron-depleted conditions. *Mol Microbiol*. 2016 Oct;102(1):137–51.
 27. Schaub RE, Dillard JP. The Pathogenic Neisseria Use a Streamlined Set of Peptidoglycan Degradation Proteins for Peptidoglycan Remodeling, Recycling, and Toxic Fragment Release. *Front Microbiol*. 2019;10:73.

28. Palmer A, Criss AK. Gonococcal Defenses against Antimicrobial Activities of Neutrophils. *Trends Microbiol.* 2018 Dec;26(12):1022–34.
29. Lorenzen DR, Gunther D, Pandit J, Rudel T, Brandt E, Meyer TF. *Neisseria gonorrhoeae* porin modifies the oxidative burst of human professional phagocytes. *Infect Immun.* 2000 Nov;68(11):6215–22.
30. Barbera MJ, Serra-Pladevall J. Gonococcal infection: An unresolved problem. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019 Feb 4;37(7):458–66.
31. 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.
32. Bleich AT, Sheffield JS, Wendel GDJ, Sigman A, Cunningham FG. Disseminated gonococcal infection in women. *Obstet Gynecol.* 2012 Mar;119(3):597–602.
33. Beatrous SV, Grisoli SB, Riahi RR, Matherne RJ, Matherne RJ. Cutaneous manifestations of disseminated gonococemia. *Dermatol Online J.* 2017 Jan 15;23(1).
34. Suzuki S, Hoshi S-I, Sekizawa A, Sagara Y, Tanaka M, Kinoshita K, *et al.* Current status of *Neisseria gonorrhoeae* cervicitis in pregnant women in Japan. *PLoS One.* 2019;14(2):e0211595.
35. Warr AJ, Pintye J, Kinuthia J, Drake AL, Unger JA, McClelland RS, *et al.* Sexually transmitted infections during pregnancy and subsequent risk of stillbirth and infant mortality in Kenya: a prospective study. *Sex Transm Infect.* 2019 Feb;95(1):60–6.
36. Unemo M, Ballard R, Ison CA, Lewis F, Ndowa F, Peeling R. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. [Internet]. World Health Organization.; 2013 [citado 28 Junio 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/85343>
37. Galán JC, Lepe JA, Otero L, Serra J, Vázquez F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. [Internet]. Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2019 [citado 28 Junio 2019].* Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento24a.pdf>
38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015 [Internet]. *MMWR Recomm Rep* 2015;64(3); [citado 8 Agosto 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/tg-2015-print.pdf>
39. Otero-Guerra L, Fernandez-Blazquez A, Vazquez F. Diagnóstico rápido de las infecciones de transmisión sexual. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017 Sep;35(7):444–50.
40. Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2013 Feb;24(2):85–92.
41. Young H, Paterson IC, McDonald DR. Rapid carbohydrate utilization test for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis.* 1976 Jun;52(3):172–5.

42. Kulkarni S, Bala M, Risbud A. Performance of tests for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. Indian J Med Res. 2015 Jun;141(6):833–5.
43. Dillon JR, Carballo M, Pauzé M. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitex, Gonocheck II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI Test, and Syva MicroTrak Test. J Clin Microbiol. 1988 Mar;26(3):493–7.
44. Turner A, Gough KR, Jephcott AE. Comparison of three methods for culture confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* strains currently circulating in the UK. J Clin Pathol. 1995 Oct;48(10):919–23.
45. De las Cuevas C, Balsalobre L, Guerrero MD, Alarcón T. Microbiología aplicada: Hacia el diagnóstico rápido mediante genómica y proteómica. In: Manual de Infecciones Perioperatorias. 2ª. Ergon; 2017. p. 53–66.
46. Buchanan R, Ball D, Dolphin H, Dave J. Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Sep;22(9):815.e5-815.e7.
47. Carannante A, De Carolis E, Vacca P, Vella A, Vocale C, De Francesco MA, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of *Neisseria gonorrhoeae*. BMC Microbiol. 2015 Jul 24;15:142.
48. Jordana-Lluch E, Martro Catala E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012 Dec;30(10):635–44.
49. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* 2014. MMWR Recommendations and Reports ; 63 (No. RR-2);
50. Food and Drug Administration (FDA). FDA clears first diagnostic tests for extragenital testing for chlamydia and gonorrhea [Internet]. [citado 7 Marzo 2019]. Disponible en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-clears-first-diagnostic-tests-extragenital-testing-chlamydia-and-gonorrhea>
51. Dona V, Low N, Golparian D, Unemo M. Recent advances in the development and use of molecular tests to predict antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Expert Rev Mol Diagn. 2017 Sep;17(9):845–59.
52. Food and Drug Administration (FDA). Nucleic Acid Based Tests [Internet]. [citado 7 Marzo 2019]. Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/vitro-diagnostics/nucleic-acid-based-tests>
53. Unemo M, Dillon J-AR. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. Clin Microbiol Rev. 2011 Jul;24(3):447–58.

54. Liao M, Helgeson S, Gu W-M, Yang Y, Jolly AM, Dillon J-AR. Comparison of *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing and porB sequence analysis for identification of clusters of *N. gonorrhoeae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb;47(2):489–91.
55. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, *et al*. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2013 Jan 17;18(3).
56. Demczuk W, Sidhu S, Unemo M, Whiley DM, Allen VG, Dillon JR, *et al*. *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance, a Novel Antimicrobial Resistance Multilocus Typing Scheme for Tracking Global Dissemination of *N. gonorrhoeae* Strains. *J Clin Microbiol*. 2017 May;55(5):1454–68.
57. Harrison OB, Schoen C, Retchless AC, Wang X, Jolley KA, Bray JE, *et al*. *Neisseria* genomics: current status and future perspectives. *Pathog Dis*. 2017 Aug 31;75(6).
58. Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI, Charette SJ. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods*. 2017 Jul;138:60–71.
59. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, Garcia-Cobos S, *et al*. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol*. 2017 Feb 10;243:16–24.
60. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Apr;24(4):335–41.
61. Abrams AJ, Trees DL. Genomic sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* to respond to the urgent threat of antimicrobial-resistant gonorrhea. *Pathog Dis*. 2017 Jun 1;75(4).
62. Mortimer TD, Grad YH. Applications of genomics to slow the spread of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann N Y Acad Sci*. 2019 Jan;1435(1):93–109.
63. Eyre DW, De Silva D, Cole K, Peters J, Cole MJ, Grad YH, *et al*. WGS to predict antibiotic MICs for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Jul 1;72(7):1937–47.
64. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. [Internet]. [citado 21 Julio 2019]. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf
65. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.;
66. EUCAST, Redefining susceptibility testing categories S, I and R. [Internet]. [citado 20 Julio 2019]. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2018/EUCAST_-_Intermediate_category_-_information_for_all.pdf

67. World Health Organization. WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. [Internet]. 2016 [citado 23 Julio 2019]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246114>
68. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol*. 2012 Dec;7(12):1401–22.
69. Eyre DW, Sanderson ND, Lord E, Regisford-Reimmer N, Chau K, Barker L, *et al*. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2018 Jul;23(27).
70. Eyre DW, Town K, Street T, Barker L, Sanderson N, Cole MJ, *et al*. Detection in the United Kingdom of the *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, October to December 2018. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2019 Mar;24(10).
71. Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Sep;7(7):821–34.
72. Unemo M, Golparian D, Eyre DW. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and Treatment of Gonorrhoea. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1997:37–58.
73. Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2018. 18th ed. Barcelona: Antares; 2018.
74. Roberts M, Elwell LP, Falkow S. Molecular characterization of two beta-lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. 1977 Aug;131(2):557–63.
75. Jacobsson S, Golparian D, Cole M, Spiteri G, Martin I, Bergheim T, *et al*. WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC >2 mg/L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe from 2009 to 2014. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Nov;71(11):3109–16.
76. Grupo de estudio del SIDA SEIMC (GESIDA). Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes. [Internet]. GESIDA; 2017 [citado 8 Agosto 2019]. Disponible en: <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/otras-guias-vigentes/>
77. World Health Organization. WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. [Internet]. World Health Organization; 2016 [citado 8 Agosto 2019]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246114>
78. Fifer H, Saunders J, Soni S, Sadiq ST, FitzGerald M. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Neisseria gonorrhoeae* (2019) [Internet]. BASHH; 2019 [citado 15 Octubre 2019]. Disponible en: <https://www.bashh.org/guidelines/>
79. Rogstad K, Thomas A, Williams O, Forster G, Munday P, Robinson A, *et al*. United Kingdom National Guideline on the Management of Sexually Transmitted Infections and Related

- Conditions in Children and Young People - 2010 [Internet]. BASHH; 2010 [citado 15 Octubre 2019]. Disponible en: <https://www.bashh.org/guidelines/>
80. Lewis DA. New treatment options for *Neisseria gonorrhoeae* in the era of emerging antimicrobial resistance. *Sex Health*. 2019 Jul 11;
 81. Unemo M, Shafer WM. Future treatment of gonorrhoea--novel emerging drugs are essential and in progress? *Expert Opin Emerg Drugs*. 2015 Sep;20(3):357–60.
 82. Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, Mapanje C, Kanyamula H, Banda B, *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis*. 2010 Mar;37(3):169–72.
 83. Brittain C, Childs M, Duley L, Harding J, Hepburn T, Meakin G, *et al.* Gentamicin versus ceftriaxone for the treatment of gonorrhoea (G-TOG trial): study protocol for a randomised trial. *Trials*. 2016 Nov 24;17(1):558.
 84. Kirkcaldy RD, Weinstock HS, Moore PC, Philip SS, Wiesenfeld HC, Papp JR, *et al.* The efficacy and safety of gentamicin plus azithromycin and gemifloxacin plus azithromycin as treatment of uncomplicated gonorrhoea. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2014 Oct 15;59(8):1083–91.
 85. Unemo M, Golparian D, Limnios A, Whiley D, Ohnishi M, Lahra MM, *et al.* In vitro activity of ertapenem versus ceftriaxone against *Neisseria gonorrhoeae* isolates with highly diverse ceftriaxone MIC values and effects of ceftriaxone resistance determinants: ertapenem for treatment of gonorrhoea? *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jul;56(7):3603–9.
 86. Singh V, Bala M, Bhargava A, Kakran M, Bhatnagar R. In vitro efficacy of 21 dual antimicrobial combinations comprising novel and currently recommended combinations for treatment of drug resistant gonorrhoea in future era. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193678.
 87. Zboromyrska Y, Guerrero-Torres MD, Benítez MÁ. Is fosfomicin a good alternative drug for gonorrhoea treatment in our setting? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020 Jan;38(1):38–9.
 88. Yuan Z, He C, Yan S, Ke Y, Tang W. Randomized controlled clinical trial on the efficacy of fosfomicin trometamol for uncomplicated gonococcal urethritis in men. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Jun;22(6):507–12.
 89. Hook EW 3rd, Golden MR, Taylor SN, Henry E, Tseng C, Workowski KA, *et al.* Efficacy and Safety of Single-Dose Oral Delafloxacin Compared With Intramuscular Ceftriaxone for Uncomplicated Gonorrhoea Treatment: An Open-Label, Noninferiority, Phase 3, Multicenter, Randomized Study. *Sex Transm Dis*. 2019 May;46(5):279–86.
 90. Chen MY, McNulty A, Avery A, Whiley D, Tabrizi SN, Hardy D, *et al.* Solithromycin versus ceftriaxone plus azithromycin for the treatment of uncomplicated genital gonorrhoea (SOLITAIRE-U): a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2019 Aug;19(8):833–42.
 91. Rice PA, Shafer WM, Ram S, Jerse AE. *Neisseria gonorrhoeae*: Drug Resistance, Mouse Models, and Vaccine Development. *Annu Rev Microbiol*. 2017 Sep 8;71:665–86.

92. Edwards JL, Jennings MP, Seib KL. *Neisseria gonorrhoeae* vaccine development: hope on the horizon? *Curr Opin Infect Dis*. 2018 Jun;31(3):246–50.
93. Petousis-Harris H, Paynter J, Morgan J, Saxton P, McArdle B, Goodyear-Smith F, *et al*. Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study. *Lancet Lond Engl*. 2017 Sep 30;390(10102):1603–10.
94. Semchenko EA, Tan A, Borrow R, Seib KL. The Serogroup B Meningococcal Vaccine Bexsero Elicits Antibodies to *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2019 Sep 13;69(7):1101–11.
95. Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud, Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2016 [Internet]. Madrid, 2018.; [citado 15 Agosto 2019]. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-d8ee271b6f>
96. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonorrhoea. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017 [Internet]. Stockholm: ECDC; 2019 [citado 26 Febrero 2020]. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2017.pdf>
97. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017 [Internet]. [citado 26 Febrero 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/stats17/gonorrhea.htm>
98. Gesink DC, Sullivan AB, Miller WC, Bernstein KT. Sexually transmitted disease core theory: roles of person, place, and time. *Am J Epidemiol*. 2011 Jul 1;174(1):81–9.
99. Lewis DA. The role of core groups in the emergence and dissemination of antimicrobial-resistant *N gonorrhoeae*. *Sex Transm Infect*. 2013 Dec;89 Suppl 4:iv47-51.
100. Fuertes de Vega I, Baliu-Pique C, Bosch Mestres J, Vergara Gomez A, Valles X, Alsina Gibert M. Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhea. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018 Mar;36(3):165–8.
101. Public Health England. Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales 2017 [Internet]. Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP); 2018 [citado 15 Agosto 2019]. Disponible en: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/746261/GRASP_2017_report.pdf
102. Diaz A, Garriga C, Varela JA, Fernandez E, Sanz I, Boronat J, *et al*. Gonorrhoea diagnoses in a network of STI clinics in Spain during the period. *BMC Public Health*. 2013 Nov 25;13:1093.
103. Glynn RW, Byrne N, O’Dea S, Shanley A, Codd M, Keenan E, *et al*. Chemsex, risk behaviours and sexually transmitted infections among men who have sex with men in Dublin, Ireland. *Int J Drug Policy*. 2018 Feb;52:9–15.

104. Brookmeyer KA, Haderxhanaj LT, Hogben M, Leichter J. Sexual risk behaviors and STDs among persons who inject drugs: A national study. *Prev Med*. 2019 Jul 15;126:105779.
105. Serra-Pladevall J, Barbera MJ, Callarisa AE, Bartolome-Comas R, Andreu A. Differences in *Neisseria gonorrhoeae* population structure and antimicrobial resistance pattern between men who have sex with men and heterosexuals. *Epidemiol Infect*. 2017 Jan;145(2):379–85.
106. Fowler T, Caley M, Johal R, Brown R, Ross JDC. Previous history of gonococcal infection as a risk factor in patients presenting with gonorrhoea. *Int J STD AIDS*. 2010 Apr;21(4):277–8.
107. Asamblea Médica Mundial (AMM). Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. [Internet]. 64^a Asamblea General, Fortaleza, Brasil.; 2013 [citado 17 Agosto 2019]. Disponible en: <file:///C:/Users/MariaDolores/Downloads/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos.pdf>
108. Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 2018 May 2;35(6):1547–9.
109. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2014 Aug 1;30(15):2114–20.
110. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al*. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol*. 2012 May;19(5):455–77.
111. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013 Apr 15;29(8):1072–5.
112. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3:124.
113. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W256–9.
114. Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2017. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación; 2019.
115. Ibarroyen Garcia U, Nieto Toboso MC, Azpeitia EM, Imaz Perez M, Hernandez Ragpa L, Alava Menica JA, *et al*. Epidemiological surveillance study of gonococcal infection in Northern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019 Jun 26;
116. Cobo F, Cabezas-Fernandez MT, Avivar C. Typing and antimicrobial susceptibility of 134 *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter*. 2019 Apr;32(2):114–20.

117. Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT). Vigilància epidemiològica de les infeccions de transmissió sexual a Catalunya. Informe anual 2017. Badalona: CEEISCAT; 2018.
118. Ndeikoundam Ngangro N, Viriot D, Fournet N, Pioche C, De Barbeyrac B, Goubard A, *et al.* Bacterial sexually transmitted infections in France: recent trends and patients' characteristics in 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2019 Jan;24(5).
119. Del Romero J, Garcia-Perez JN, Espasa-Soley M. Prevention and treatment of sexually transmitted infections in high-risk individuals, including patients with HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019 Feb;37(2):117–26.
120. Folch C, Sanclemente C, Esteve A, Martro E, Molinos S, Casabona J. [Social characteristics, risk behaviours and differences in the prevalence of HIV/sexually transmitted infections between Spanish and immigrant female sex workers in Catalonia, Spain]. *Med Clin (Barc).* 2009 Mar 21;132(10):385–8.
121. Folch C, Casabona J, Sanclemente C, Esteve A, Gonzalez V. [Trends in HIV prevalence and associated risk behaviors in female sex workers in Catalonia (Spain)]. *Gac Sanit.* 2014 Jun;28(3):196–202.
122. Ballester-Arnal R, Salmeron-Sanchez P, Gil-Llario MD, Castro-Calvo J. Male Sex Workers in Spain: What has Changed in the Last Lustrum? A Comparison of Sociodemographic Data and HIV Sexual Risk Behaviors (2010–2015). *AIDS Behav.* 2017 Aug;21(8):2295–305.
123. 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 Aug;22 Suppl 6(Suppl 6):e25354.
124. European Centre for Disease Prevention and Control. EMIS-2017: The European men who have sex with men internet survey [Internet]. ECDC; 2019 [citado 26 Octubre 2019]. Disponible en: http://sigmaresearch.org.uk/files/EMIS-2017_-_The_European_MSM_Internet_Survey_-_findings_from_50_countries.pdf
125. Folch C, Fernandez-Davila P, Ferrer L, Soriano R, Diez M, Casabona J. High prevalence of drug consumption and sexual risk behaviors in men who have sex with men. *Med Clin (Barc).* 2016 Jul 1;147(1):47.
126. Kohli M, Hickson F, Free C, Reid D, Weatherburn P. Cross-sectional analysis of chemsex drug use and gonorrhoea diagnosis among men who have sex with men in the UK. *Sex Health.* 2019 Feb 14;
127. Ayerdi-Aguirrebengoa O, Vera-García M, Puerta-López T, Raposo-Utrilla M, Rodríguez-Martín C, Del Romero-Guerrero J. ¿A quién proponer la profilaxis preexposición al virus de la inmunodeficiencia humana? *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 2017;35(5):299–302.
128. Redondo Dominguez D, Picazo L, Docavo Barrenechea-Moxo ML, Gonzalez Del Castillo J. Chemsex: are we prepared? *Adicciones.* 2018 Apr 15;30(2):158–9.

129. Giorgetti R, Tagliabracci A, Schifano F, Zaami S, Marinelli E, Busardo FP. When “Chems” Meet Sex: A Rising Phenomenon Called “ChemSex”. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(5):762–70.
130. Maxwell S, Shahmanesh M, Gafos M. Chemsex behaviours among men who have sex with men: A systematic review of the literature. *Int J Drug Policy*. 2019 Jan;63:74–89.
131. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe – Results summary 2017 [Internet]. Stockholm: ECDC; 2019 [citado 26 Febrero 2020]. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Euro-GASP-2017.pdf>
132. Cano S, Fuentes M, Ballesteros J, Clavo P, Menéndez B, Del Romero J. Diagnósticos de gonorrea en un centro de infecciones de transmisión sexual y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana y otras infecciones de transmisión sexual, Madrid 2005. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2009;27(6):338–41.
133. World Health Organization (WHO). Global health sector strategy on Sexually Transmitted Infections, 2016–2021 [Internet]. WHO; 2016 [citado 27 Febrero 2020]. Disponible en: <https://web.archive.org/web/20181019130311/http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/ghss-stis/en/>
134. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2016. [Internet]. Stockholm: ECDC; 2018 [citado 11 Septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-in-europe-2016.pdf>
135. Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales 2018 [Internet]. 2019 [citado 11 Septiembre 2019]. Disponible en: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/834924/GRASP__2018_report.pdf
136. Cole MJ, Unemo M, Grigorjev V, Quaye N, Woodford N. Genetic diversity of blaTEM alleles, antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological characteristics of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Dec;70(12):3238–43.
137. Lee RS, Seemann T, Heffernan H, Kwong JC, Goncalves da Silva A, Carter GP, *et al*. Genomic epidemiology and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in New Zealand. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Feb 1;73(2):353–64.
138. Harrison OB, Clemence M, Dillard JP, Tang CM, Trees D, Grad YH, *et al*. Genomic analyses of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an association of the gonococcal genetic island with antimicrobial resistance. *J Infect*. 2016 Dec;73(6):578–87.
139. Serra-Pladevall J, Barbera MJ, Rodriguez S, Bartolome-Comas R, Roig G, Juve R, *et al*. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Barcelona: penA, ponA, mtrR, and porB mutations and NG-MAST sequence types associated with decreased susceptibility to cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2016 Sep;35(9):1549–56.

140. Cobo F, Cabezas-Fernandez MT, Cabeza-Barrera MI. Antimicrobial susceptibility and typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012-2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016 Jan;34(1):3–7.
141. Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, Sanchez-Buso L, Golparian D, Jacobsson S, *et al*. Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis*. 2018 Jul;18(7):758–68.
142. Ezewudo MN, Joseph SJ, Castillo-Ramirez S, Dean D, Del Rio C, Didelot X, *et al*. Population structure of *Neisseria gonorrhoeae* based on whole genome data and its relationship with antibiotic resistance. *PeerJ*. 2015;3:e806.
143. Grad YH, Harris SR, Kirkcaldy RD, Green AG, Marks DS, Bentley SD, *et al*. Genomic Epidemiology of Gonococcal Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins, Macrolides, and Fluoroquinolones in the United States, 2000-2013. *J Infect Dis*. 2016 Nov 15;214(10):1579–87.
144. Grad YH, Kirkcaldy RD, Trees D, Dordel J, Harris SR, Goldstein E, *et al*. Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime in the USA: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis*. 2014 Mar;14(3):220–6.
145. Demczuk W, Lynch T, Martin I, Van Domselaar G, Graham M, Bharat A, *et al*. Whole-genome phylogenomic heterogeneity of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased cephalosporin susceptibility collected in Canada between 1989 and 2013. *J Clin Microbiol*. 2015 Jan;53(1):191–200.
146. Nakayama S-I, Shimuta K, Furubayashi K-I, Kawahata T, Unemo M, Ohnishi M. New Ceftriaxone- and Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strain with a Novel Mosaic penA Gene Isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jul;60(7):4339–41.
147. Lee K, Nakayama S-I, Osawa K, Yoshida H, Arakawa S, Furubayashi K-I, *et al*. Clonal expansion and spread of the ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain FC428, identified in Japan in 2015, and closely related isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Jul 1;74(7):1812–9.
148. Golparian D, Rose L, Lynam A, Mohamed A, Bercot B, Ohnishi M, *et al*. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate, belonging to the internationally spreading Japanese FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, Ireland, August 2018. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2018 Nov;23(47).
149. Chen S-C, Han Y, Yuan L-F, Zhu X-Y, Yin Y-P. Identification of Internationally Disseminated Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strain FC428, China. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jul;25(7):1427–9.
150. Demczuk W, Martin I, Peterson S, Bharat A, Van Domselaar G, Graham M, *et al*. Genomic Epidemiology and Molecular Resistance Mechanisms of Azithromycin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014. *J Clin Microbiol*. 2016 May;54(5):1304–13.
151. Gratrix J, Brandley J, Dane M, Plitt SS, Smyczek P, Read R, *et al*. A Retrospective Review of Treatment Failures Using Azithromycin and Doxycycline in the Treatment of Rectal Chlamydia Infections in Women and Men Who Have Sex With Men. *Sex Transm Dis*. 2016 Feb;43(2):110–2.

152. Kissinger PJ, White S, Manhart LE, Schwebke J, Taylor SN, Mena L, *et al.* Azithromycin Treatment Failure for *Chlamydia trachomatis* Among Heterosexual Men With Nongonococcal Urethritis. *Sex Transm Dis.* 2016 Oct;43(10):599–602.
153. Manhart LE, Jensen JS, Bradshaw CS, Golden MR, Martin DH. Efficacy of Antimicrobial Therapy for *Mycoplasma genitalium* Infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015 Dec 15;61 Suppl 8:S802-817.
154. British Association for Sexual Health and HIV (BASHH). Update on the treatment of *Chlamydia trachomatis* (CT) infection [Internet]. BASHH; 2018 [citado 16 Noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.bashhguidelines.org/media/1191/update-on-the-treatment-of-chlamydia-trachomatis-infection-final-16-9-18.pdf>
155. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Quinolonas y fluoroquinolonas de administración sistémica: nuevas restricciones de uso. [Internet]. [citado 19 Noviembre 2019]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2018/docs/NI_MUH_FV-14-2018-quinolonas-fluoroquinolonas.pdf
156. Gianecini RA, Golparian D, Zittermann S, Litvik A, Gonzalez S, Oviedo C, *et al.* Genome-based epidemiology and antimicrobial resistance determinants of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in Argentina in 2011-16. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Jun 1;74(6):1551–9.
157. Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, Mapanje C, Kanyamula H, Banda B, *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis.* 2010;37(3):169–72.
158. Barbee LA, Soge OO, Morgan J, LeClair A, Bass T, Werth BJ, *et al.* Gentamicin Alone Inadequate to Eradicate *Neisseria gonorrhoeae* from the Pharynx. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2019 Nov 12;
159. Cole MJ, Tan W, Fifer H, Brittain C, Duley L, Hepburn T, *et al.* Gentamicin, azithromycin and ceftriaxone in the treatment of gonorrhoea: the relationship between antibiotic MIC and clinical outcome. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Oct 31;
160. Cole MJ, Spiteri G, Town K, Unemo M, Hoffmann S, Chisholm SA, *et al.* Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. *Sex Transm Dis.* 2014 Dec;41(12):723–9.
161. Koedijk FDH, van Veen MG, de Neeling AJ, Linde GB, van der Sande MAB. Increasing trend in gonococcal resistance to ciprofloxacin in The Netherlands,. *Sex Transm Infect.* 2010 Feb;86(1):41–5.
162. Camara 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 Aug;67(8):1858–60.
163. Peng J-P, Yin Y-P, Chen S-C, Yang J, Dai X-Q, Zheng H-P, *et al.* A Whole-genome Sequencing Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in China: An Observational Study. *EClinicalMedicine.* 2019 Feb 14;7:47–54.

164. Al Suwayyid BA, Coombs GW, Speers DJ, Pearson J, Wise MJ, Kahler CM. Genomic epidemiology and population structure of *Neisseria gonorrhoeae* from remote highly endemic Western Australian populations. BMC Genomics. 2018 Feb 27;19(1):165–165.
165. Yang Y, Yang Y, Martin I, Dong Y, Diao N, Wang Y, *et al.* NG-STAR genotypes are associated with MDR in *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in 2017 in Shanghai. J Antimicrob Chemother. 2020 Mar 1;75(3):566–70.

ANEXOS

ANEXO I: EVALUACIÓN DE LA TESIS POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Madrid, a 14 de noviembre de 2016 El

Comité de Ética de La Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario de la Princesa en su reunión del día 10-11-16 (acta 20/16) evaluó el siguiente proyecto de investigación:

TITULO: Caracterización molecular de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y estudio de resistencia antibiótica.

TIPO: Proyecto de investigación de tesis doctoral

CODIGO: N/A

Nº EudraCT: N/A

Nº de Registro: 2923*

Investigador Principal: María Dolores Guerrero Torres (Residente de Microbiología y Parasitología clínica, 4º año, H.U. La Princesa), Tutora (Dra. Teresa Alarcón, Servicio de Microbiología y Parasitología clínica del H.U. La Princesa)

Promotor: N/A

CEIm: N/A

Decisión tomada: Aprobación (10-11-16)

Este Comité de Ética de La Investigación con Medicamentos considera que el proyecto de investigación es ética y metodológicamente aceptable. Asimismo, considera que los investigadores son competentes para llevar a cabo este proyecto que está enmarcado dentro de las líneas de investigación prioritarias del Hospital Universitario de La Princesa.

Fdo: Dra. M^a de Mar Ortega Gómez
Secretaria del C.E.I.M.

ANEXO II: CUESTIONARIO SOCIODEMOGRÁFICO Y DE EVALUACIÓN DE RIESGO PARA LAS ITS

CENTRO SANITARIO SANDOVAL (Comunidad de Madrid)
CUESTIONARIO SOCIODEMOGRÁFICO Y DE EVALUACIÓN DE RIESGOS PARA LAS ITS (260113)

1ª Consulta		Revisión Nº		Nº Historia	
G. R.		Fecha		Nº Hª P. E.	

Fecha nacim. _____ País origen _____ Fecha reside en España _____
 Sexo: Hombre Mujer Transexual Estado civil _____ Provincia residencia _____
 Trabaja: No Sí Actividad: _____ Nº hijos _____ G/A _____
 Nivel estudios: Ninguno Primar. Medios Sup. Edad 1ª relac. sex.: _____ Nº parejas sex/vida: _____
 Antecedentes de ITS: Nunca Sí Tipo, nº episodios y año _____

Alergias a medicamentos?: No ; Sí : ¿cuáles?: _____
 Otros antecedentes clínicos: No ; Sí : ¿cuáles?: _____
 Medicación actual?: No ; Sí : ¿Cuál? _____
 Donante de sangre?: Nunca Sí : Nº de veces: _____ Fecha última donación _____
 Test VIH previos?: Nunca ; Sí : Nº veces _____ Fecha últ. VIH (-) _____ Fecha primer VIH (+) _____
 Diagnosticad@ de Hepatitis: No ; Sí : ¿Cuál?: VHA ; VHB ; VHC ; No sabe .
 Vacunad@ de Hepatitis B: No ; Sí ; No sabe ; Vacunad@ de Hepatitis A: No ; Sí ; No sabe

HISTORIA SEXUAL RECIENTE (CARACTERIZACIÓN DE PAREJAS Y PRÁCTICAS SEXUALES ÚLTIMO AÑO)

Nº Parejas sex/úa: _____ [Nº Relaciones Sexuales/Semana (media úa)]: _____]
 Pareja estable (ú.a.): No ; Sí : desde: _____ Sexo: Hombre ; Mujer ; Trans. ; Serol. PE: VIH+ ; VIH(-) ; VIH desc.
 Parejas ocasionales (ú.a.): No ; Sí : Sexo: Hombres ; Mujeres ; Transexuales
 ITS actual: No ; Sí ¿Cuál? _____
 Nueva ITS desde la última revisión: No procede ; No ; Sí ¿Cuál? _____
 Ejercicio prostitución: Nunca Sí Desde _____ Hasta _____ Cliente prostitución (úa): No ; Sí
 Métodos anticoncep. ó prevent. (úa.): No ; Sí : Preservat. ; ACH ; Interruptus ; Ligad/Vasect. ; DIU ; Otros

TIPO Y FRECUENCIA DE PRÁCTICAS SEXUALES NO PROTEGIDAS

(Hasta 1ª visita/Desde última revisión)

NP: No práctica; N: Nunca E: Esporádico < 50% F: Frecuente > 50%; S: Siempre	Pareja Estable					Parejas ocasionales/Clientes					Fecha última práctica sexual vaginal o anal sin preservativo			
	NP	N	E	F	S	NP	N	E	F	S	<3 meses	3-12 meses	>12 meses	
Sexo oral sin preservativo														
Coito vaginal sin preservativo											Accidente uso preservativo (3 ú.m.)		NO <input type="checkbox"/>	SÍ <input type="checkbox"/>
Coito anal insertivo sin preservativo											Tipo de práctica sex. con accid. pstvo. (3 ú. m.):		CAI <input type="checkbox"/>	CAR <input type="checkbox"/>
Coito anal receptivo sin preservativo													CV <input type="checkbox"/>	

HÁBITOS TÓXICOS

Consumo **drogas inyectadas (UDI)**: Nunca Sí : desde (año 1ª vez): _____ hasta (año última vez): _____
 Consumo **excesivo de alcohol** (úa): No ; Sí : Ocasional Frecuente : _____ veces/mes. **Tabaco** (úa): No Sí nº cig./día: _____
 Consumo **drogas no inyectadas** (úa): No Sí ¿Cuál/es? _____
 Relaciones sexuales de riesgo bajo los efectos del alcohol/drogas (úa): No Sí : Especificar sustancias: _____
 Otros factores: Tatuajes Piercing ; RTS ; Exposición sexual accidental ; PPE ; Gestante ; Otros

ANEXO III: ARTÍCULO CIENTÍFICO DERIVADO DE LA TESIS

Epidemiology and Infection

cambridge.org/hyg

Original Paper

*Present address: Microbiology Service of Consorci del Laboratori Intercomarcal de l'Alt Penedès, l'Anoia i el Garraf, Vilafranca del Penedès, Spain.

Cite this article: Guerrero-Torres MD *et al* (2019). Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016. *Epidemiology and Infection* **147**, e274, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S095026881900150X>

Received: 18 February 2019

Revised: 6 August 2019

Accepted: 7 August 2019

Key words:

Antimicrobial resistance; epidemiology; *Neisseria gonorrhoeae*; NG-MAST; risk factors



Author for correspondence:

M. D. Guerrero-Torres,
E-mail: maguetor@gmail.com

© The Author(s) 2019. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016

M. D. Guerrero-Torres^{1,*} , M. B. Menéndez², C. S. Guerras², E. Tello², J. Ballesteros², P. Clavo², T. Puerta², M. Vera², O. Ayerdi², J. C. Carrio², I. Mozo², J. Del Romero², J. A. Vázquez¹ and R. Abad¹ 

¹Neisseria Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain and ²Centro Sanitario Sandoval, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

Abstract

With the aim to elucidate gonococcal antimicrobial resistance (AMR)–risk factors, we undertook a retrospective analysis of the molecular epidemiology and AMR of 104 *Neisseria gonorrhoeae* isolates from clinical samples (urethra, rectum, pharynx and cervix) of 94 individuals attending a sexually transmitted infection clinic in Madrid (Spain) from July to October 2016, and explored potential links with socio-demographic, behavioural and clinical factors of patients. Antimicrobial susceptibility was determined by *E*-tests, and isolates were characterised by *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing. Penicillin resistance was recorded for 15.4% of isolates, and most were susceptible to tetracycline, cefixime and azithromycin; a high incidence of ciprofloxacin resistance (~40%) was found. Isolates were grouped into 51 different sequence types (STs) and 10 genogroups (G), with G2400, ST5441, ST2318, ST12547 and G2992 being the most prevalent. A significant association ($P = 0.015$) was evident between HIV-positive MSM individuals and having a ciprofloxacin-resistant strain. Likewise, a strong association ($P = 0.047$) was found between patient age of MSM and carriage of isolates expressing decreased susceptibility to azithromycin. A decrease in the incidence of AMR gonococcal strains and a change in the strain populations previously reported from other parts of Spain were observed. Of note, the prevalent multi-drug resistant genogroup G1407 was represented by only three strains in our study, while the pan-susceptible clones such as ST5441, and ST2318, associated with extragenital body sites were the most prevalent.

Introduction

Sexually transmitted infection (STI) caused by *Neisseria gonorrhoeae* is a major public health problem with a high global incidence. In 2012, the World Health Organization (WHO) estimated 78 million new cases of gonorrhoea infections among adults worldwide [1].

Between 2009 and 2011, the first strains with high-level resistance to all extended-spectrum cephalosporins appeared in Japan, France and Spain [2–4]. To mitigate the spread of resistant strains, several clinical guidelines were published in 2012, 2015 and 2016 which recommended dual therapy with ceftriaxone 250–500 mg intramuscularly as a single dose plus azithromycin 1–2 g as single oral dose [5–7]. However, high rates of azithromycin resistance were reported [8] and the failure of dual therapy was observed in a number of studies [9–12].

In response to this emergent public concern, action plans to detect and prevent the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) in *N. gonorrhoeae* have been recommended by both the WHO [13,14] and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) [15]. In this way, monitoring of strain populations by molecular techniques and determination of antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae* isolates became imperative, as well as gathering of data on clinical and social risk factors associated with AMR in order to identify at-risk patient groups and provide evidence-based data for the implementation of public health control programmes [16].

With the aim of further elucidating gonococcal AMR–risk factors, we carried out a retrospective analysis of the molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae* isolates obtained from patients attending an STI reference clinic in Madrid (Spain) over a 4-month period in 2016, and potential links with socio-demographic, behavioural and clinical factors of the patients.

Material and methods

Patients and sample collection

This was a retrospective study among patients attending the STI outpatient clinic Centro Sanitario Sandoval, in Madrid. This centre works as a walk-in clinic and offers free and anonymous services to more than 30 000 patients/year. A total of 360 patient samples, positive for *N. gonorrhoeae* by PCR, between July and October 2016 were collected; 211 of these were also culture positive. A randomly selected panel of 104 *N. gonorrhoeae* isolates (cervix ($n = 8$), pharynx ($n = 19$), rectum ($n = 35$) and urethra ($n = 42$)) from 94 patients were included in the study.

Data on patient socio-demographic, behavioural and clinical factors were collected from standardised questionnaires and clinical histories.

The study was approved by the Ethics Committee of University Hospital La Princesa, in Madrid, Spain (reference number 2923*).

Bacterial strains

All samples were cultured on Thayer-Martin medium and incubated for 48 h at 35–37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. *N. gonorrhoeae* isolates were identified by colony morphology, Gram staining, the oxidase test, biochemical tests (API NH; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and PCR (RealTime CT/NG; Abbot, Des Plaines, IL, USA). Isolates were stored at –80 °C in trypticase soy broth with 10% glycerol and transported to the reference laboratory at the National Centre for Microbiology (Institute of Health Carlos III, Spain) for antimicrobial susceptibility testing, serotyping and molecular characterisation.

Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of penicillin, ceftriaxone, cefixime, azithromycin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin and spectinomycin were determined by *E*-test (bioMérieux) on GC agar base supplemented with 1% IsoVitalax, according to the manufacturer's instructions. MIC (mg/l) values were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2016 breakpoints [17, 18]. All isolates were tested for penicillinase production using nitrocefin solution (Oxoid, Hampshire, UK). The ATCC *N. gonorrhoeae* strain 49 226 was used as an internal control.

Serotyping and molecular characterisation

All isolates were serotyped with Phadebact® Monoclonal GC Test (MKL Diagnostics, Sollentuna, Sweden) and characterised by the *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) system as previously described [19].

NG-MAST genogroups were defined by clusters of tightly associated sequence types (STs) that shared one of the two alleles with the other showing ≥99% similarity (≤5 bp difference for *porB* and ≤4 bp for *tbpB*). Genogroups were designated G followed by the predominant ST within each group [20] or by using the lowest frequent ST when the genogroup had the same proportion of STs. For analysis of genogroups, the *porB* and *tbpB* sequences were concatenated and their similarities determined using the maximum likelihood test. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method by the Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7 (MEGA7) software [21].

Statistical analysis

Categorical data were compared using χ^2 , Fisher exact or McNemar test, and continuous variables with Mann–Whitney *U* test. Determinants associated with AMR and/or decreased susceptibility (DS) were assessed by logistic regression analyses. Multivariable analysis was performed including all determinants associated in the univariable analysis ($P < 0.1$) and using backward selection. Statistical analysis was performed with SPSS statistics v23.0 and significance was set at $P < 0.05$.

Results

A total of 211 *N. gonorrhoeae* isolates were collected in the study period; from these, a randomly selected panel of 104 isolates from 94 patients was studied further. Nine patients had *N. gonorrhoeae*-positive cultures in two anatomical sites (four pharynx and rectum, three pharynx and cervix, two pharynx and urethra), and one patient had two different episodes of gonorrhoea.

Clinical and epidemiological data

The demographic and behavioural characteristics of the 94 study patients are summarised in Table 1. The median age was 30.5 years, 84 were male, 71 of which had sex with men (MSM) and 56 were of Spanish origin. The majority (61) reported being recreational drug users. The most commonly used drugs were: alcohol (excessive consumption 54.3%), poppers (25.5%), cannabis (18.1%), cocaine (16.0%) and γ -hydroxybutyric acid (14.9%); other narcotics accounted for <10% of users.

Gonococcal infections were symptomatic in all 42 patients presenting with urethral infections (Table 2); symptomatic rates for other infection sites were 40% of rectal, 37.5% of cervical and one of 19 patients with pharyngeal infection. Positive samples from asymptomatic patients were predominantly recovered from extragenital sites (70.4%) ($P < 0.01$).

Only half of the patients (53.7%) received the recommended dual therapy (ceftriaxone plus azithromycin), while the remaining half were treated only with ceftriaxone (40%) or azithromycin (2%), or did not receive any treatment (2%).

The therapeutic cure rate was 35.6% of cases with a median of 51 days (range: 8–117). Of these, five cases were *N. gonorrhoeae* PCR-positive (median 85 days, range: 50–91), but only in one of them, the strain proved to be of a different ST different from the primary isolate.

Twenty per cent of patients presented with gonococcal infections in more than one body site with rectal and pharyngeal infections being the most frequent combination. Only 28 isolates from these patients could be included in the study; in five cases, the isolates were not stored, and in seven cases, although positives by PCR, an isolate could not be obtained. Thirty-two patients were co-infected with human immunodeficiency virus (HIV), all of them males ($P = 0.047$). Other different HIV and gonorrhoea STIs were also presented in 23 of the total patients, half of them (13) co-infected with *Chlamydia trachomatis* (Table 2).

Antimicrobial susceptibility

The antimicrobial susceptibility of isolates is summarised in Table 3. All penicillin-resistant isolates ($n = 16$) were positive for β -lactamase production. According to CLSI breakpoints, no resistance to ceftriaxone or cefixime was detected. However, three isolates showed

Table 1. Demographic and behavioural characteristics of the study population

Epidemiological characteristics (<i>n</i> = 94)	
Gender, <i>n</i> (%)	
Male	84 (89.4)
Female	10 (10.6)
Median age, years (range)	30.5 (18–51)
Age group, <i>n</i> (%)	
18–28	39 (41.5)
29–39	31 (33.0)
40–51	24 (25.5)
Origin, <i>n</i> (%)	
European	64 (68.1)
Latin American	23 (24.5)
American	2 (2.1)
Asian	5 (5.3)
Education Level, <i>n</i> (%)	
Elementary	3 (3.2)
Secondary	14 (14.9)
Higher	35 (37.2)
Unknown	42 (44.7)
Sexual behaviour, <i>n</i> (%)	
MSM	71 (75.5)
Heterosexual	20 (21.3)
Bisexual	3 (3.2)
Sex workers, <i>n</i> (%)	
Yes	9 (9.6)
No	85 (90.4)
Toxic habits	
IDU, <i>n</i> (%)	
Yes	2 (2.1)
No	92 (97.9)
Recreational drug users, <i>n</i> (%)	
Yes	61 (64.9)
No	20 (21.3)
Unknown	13 (13.8)
Sex partners in the previous year, <i>n</i> (%)	
≤5	32 (34.0)
6–10	12 (12.8)
11–20	14 (14.9)
21–30	2 (2.1)
31–40	6 (6.4)
41–50	4 (4.3)
>50	12 (12.8)
Unknown	12 (12.8)

N, number; MSM, men who have sex with men; IDU, injecting drug users.

cefixime MICs of 0.19 mg/l which is slightly above the EUCAST resistant breakpoint of >0.125 mg/l. Likewise, all isolates were susceptible to spectinomycin but one showed intermediate susceptibility (MIC = 48 mg/l) by CLSI. Only two isolates showed azithromycin resistance (MIC = 1.5 and 2 mg/l), and six were classified as intermediate susceptible (MIC range = 0.38–0.5 mg/l).

A high rate of resistance to ciprofloxacin (42.3%/40.4%; EUCAST/CLSI, respectively) was recorded, whereas resistance to tetracycline was relatively uncommon. Gentamicin MICs ranged between 0.5 and 8 mg/l, distributed as a unimodal curve (data not shown); the MIC₅₀ and MIC₉₀ were 3 and 4 mg/l, respectively. Only five isolates were susceptible to all antimicrobials tested. Overall, most isolates showed resistance to a single antimicrobial, mostly to ciprofloxacin (25.0% and 30.8% EUCAST/CLSI), and generally expressed intermediate susceptibility to penicillin. Eighteen isolates were resistant to two antimicrobials by EUCAST and 11 isolates by CLSI, most of them showing resistance to penicillin and ciprofloxacin (9.6%). Only one isolate was resistant to three antimicrobials (penicillin, tetracycline and ciprofloxacin) according to EUCAST breakpoints. Notably, all cefixime-resistant isolates were also resistant to ciprofloxacin and intermediate resistant to penicillin. Of all antimicrobials tested, only for tetracycline were significant differences evident between EUCAST and CLSI breakpoints criteria ($P < 0.01$).

Risk factors for antimicrobial resistance and/or decreased susceptibility in MSM.

Since 78 of the 104 isolates originated from MSM, and sexual orientation is highly correlated with many other variables, risk factors analysis was only performed for MSM.

No resistance to ceftriaxone, cefixime or spectinomycin was detected in any of the 78 isolates, and as the prevalence of other AMR in our population was low, the analysis of risk factors was focused on those individuals harbouring isolates clearly resistant to penicillin and ciprofloxacin, and those isolates with DS to tetracycline and azithromycin (Supplementary Tables S1–S3).

Only 15/78 (19.2%) isolates from this patient cohort were fully resistant to penicillin. Nevertheless, univariable logistic regression analysis showed a significant association ($P < 0.05$) between penicillin resistance and the number of sexual partners in the previous year. However, by multivariable analysis, none of the other risk factors (number of sexual partners in the previous year, $P = 0.04$, and HIV status, $P = 0.08$) was significantly associated with penicillin resistance (Table 4). Likewise, none of the foregoing risk factors proved to be significant for individuals harbouring an isolate with DS to penicillin (Table S1).

By univariate analysis, significant associations ($P < 0.05$) with age, educational level, history of intravenous drug use, HIV status and number of gonococcal-infected sites were observed for MSM with ciprofloxacin-resistant isolates (28/78). However, only HIV-positive patients remained significantly associated with such resistance on multivariable regression analysis (adjusted odds ratio (aOR) = 5.415; 95% confidence interval (CI) 1.733–16.922; $P = 0.015$) (Table 4, Table S2).

Of the 78 MSM isolates, only three and two (EUCAST/CLSI breakpoints, respectively) showed tetracycline resistance; and 10 (12.8%) and 37 (47.4%) isolates exhibited DS to this agent. Educational level, other STI in the previous year and number of gonococcal-infected sites were independent factors significantly

Table 2. Clinical characteristics of the study population

Clinical characteristics	
Anatomical site, <i>n</i> = 104 (%)	
Urethra	42 (40.4)
Rectum	35 (33.7)
Pharynx	19 (18.3)
Cervix	8 (7.7)
Symptomatology, <i>n</i> = 104 (%)	
Yes	60 (57.7)
No	43 (41.3)
Unknown	1 (1.0)
Treatment for gonorrhoea, <i>n</i> = 95 ^a (%)	
Ceftriaxone ^b + azithromycin ^c	51 (53.7)
Ceftriaxone ^b	40 (42.1)
Azithromycin ^c	2 ^d (2.1)
No treatment	2 (2.1)
Test of cure, <i>n</i> = 104 (%)	
Yes	37 (35.6)
No	67 (64.4)
Co-infections	
Gonorrhoea in others sites, <i>n</i> = 95 ^a (%)	
Negative	76 (80.0)
Positive	19 ^e (20.0)
Pharyngeal + rectal	9 (9.5)
Cervical + pharyngeal	5 (5.3)
Urethral + rectal	2 (2.1)
Urethral + pharyngeal + rectal	2 (2.1)
Urethral + pharyngeal	1 (1.1)
HIV status, <i>n</i> = 94 (%)	
Positive	32 (34.0)
Negative	57 (60.6)
Unknown	5 (5.3)
Other STI different from gonorrhoea, <i>n</i> = 95 ^a (%)	
Negative	72 (75.8)
Positive	23 (24.2)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	12 ^f (12.6)
Rectal	7 (7.4)
Pharyngeal	3 (3.2)
Urethral	2 (2.1)
Cervical	1 (1.1)
LGV	5 (5.3)
Rectal	4 (4.2)
Anal ulcer	1 (1.1)
Condylomas	6 (6.3)
Genital	3 (3.2)

(Continued)

Table 2. (Continued.)

Clinical characteristics	
Perianal	3 (3.2)
Primary syphilis	3 (3.2)
Urethritis due to <i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 (1.1)
Other STI in the previous year, <i>n</i> = 94 (%)	
Unknown	1 (1.1)
Negative	59 (62.8)
Positive	34 (36.2)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	23 ^g (24.5)
Rectal	14 (14.9)
Pharyngeal	8 (8.5)
Urethral	6 (6.4)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	8 (8.5)
Rectal	7 (7.4)
Urethral	1 (1.1)
LGV rectal	1 (1.1)
Syphilis	14 (14.9)
Primary	9 (9.6)
Secondary	3 (3.2)
Early latent syphilis	1 (1.1)
LSUD	1 (1.1)
Condylomas	4 (4.3)
Genital	1 (1.1)
Perianal	3 (3.2)
Urethritis due to <i>Mycoplasma hominis</i>	1 (1.1)
Urethritis due to <i>Ureaplasma urealyticum</i>	3 (3.2)
Genital herpes (VHS-2)	2 (2.1)
<i>Molluscum contagiosum</i>	1 (1.1)
Pediculosis pubis	2 (2.1)

N, number; HIV, human immunodeficiency virus; STI, sexually transmitted infections; LGV, *Lymphogranuloma venereum*; LSUD, latent syphilis of unknown duration.

^aOne patient had two episodes in the period of study.

^bCeftriaxone 250 IM in a single dose.

^cAzithromycin 1 g orally in a single dose.

^dTwo patients received azithromycin as an empirical treatment before learning the aetiology of the infection. Subsequently, they did not go to receive the correct treatment.

^eThere were 19 patients with *N. gonorrhoeae* infection in several anatomical sites, 12 isolates were not included in this study due to seven strains were only positive by PCR and the remaining five isolates could not be conserved.

^fOne patient had *C. trachomatis* in two localisations.

^gFive patients had *N. gonorrhoeae* infection in several anatomical sites.

associated ($P < 0.05$) with the latter. Notably, age was also significantly associated with EUCAST breakpoint alone; tetracycline decreased susceptible isolates, by both breakpoint criteria, were significantly associated in the adjusted analysis with having had an STI in the previous year (aOR = 5.108/6.243; 95% CI 1.242–21.005/1.797–21.686; $P = 0.024/0.004$ EUCAST/CLSI). The 29–39 age group was also significantly associated with tetracycline DS (EUCAST aOR = 9.196; 95% CI 1.577–53.639; $P = 0.03$); and two gonorrhoea-infected sites with CLSI tetracycline (aOR = 27.589; 95%CI 2.865–265.686; $P = 0.016$) (Table 4, Table S3).

Table 3. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates

Antimicrobial	MIC range (mg/l)	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)	EUCAST ^a			CLSI ^b		
				S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Penicillin	0.012–>32	0.25	8	4.8	79.8	15.4	4.8	79.8	15.4 ^c
Cefixime	<0.016–0.19	<0.016	0.047	97.1	–	2.9	100	–	–
Ceftriaxone	<0.016–0.094	<0.016	0.047	100	–	–	100	–	–
Azithromycin	0.023–2	0.125	0.25	92.3	5.8	1.9	NA	NA	NA
Ciprofloxacin	<0.002–>32	0.004	16	57.7	–	42.3	57.7	1.9	40.4
Tetracycline	0.032–8	0.38	1	79.8	14.4	5.8	47.1	50.0	2.9
Spectinomycin	2–48	6	12	100	–	–	99	1	–
Gentamicin	0.5–8	3	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA

MIC, minimum inhibitory concentration; MIC₅₀ and MIC₉₀, minimum inhibitory concentration of an antibiotic at which 50% and 90% of the isolates were inhibited, respectively; S, susceptibility; I, intermediate susceptibility; R, resistance; NA, not applicable.

^aEUCAST 2016 MIC breakpoints: penicillin: susceptible (S) ≤ 0.06, resistant (R) > 1; ceftriaxone: S ≤ 0.125, R > 0.125; cefixime: S ≤ 0.125, R > 0.125; azithromycin: S ≤ 0.25, R > 0.5; ciprofloxacin: S ≤ 0.03, R > 0.06; tetracycline: S ≤ 0.5, R > 1; spectinomycin: S ≤ 64, R > 64.

^bCLSI 2016 MIC breakpoints: penicillin: susceptible (S) ≤ 0.06, resistant (R) ≥ 2; ceftriaxone: S ≤ 0.25; cefixime: S ≤ 0.25; ciprofloxacin: S ≤ 0.06, R ≥ 1; tetracycline: S ≤ 0.25, R ≥ 2; spectinomycin: S ≤ 32, R ≥ 128.

^cAll penicillin-resistant isolates produced β-lactamase.

Age was the only independent factor significantly associated with azithromycin decreased susceptible isolates ($P = 0.047$) (Table S2).

Serotyping and molecular characterisation

All isolates were serotype IB. Although 51 different STs were found by NG-MAST (Fig. 1), representing 42 and 28 different *porB* and *tbpB* alleles, most of the isolates (74.0%) fell into 24 STs; the remaining 27 STs each representing a single strain. The most predominant STs were ST5441 ($n = 8$), ST2318 ($n = 7$), ST12547 ($n = 6$), ST2400 ($n = 5$) and ST7638 ($n = 4$). Sixteen STs (ST14754, ST14757, ST14758, ST14759, ST14760, ST14761, ST14762, ST14764, ST14765, ST14766, ST14767, ST14768, ST14769, ST14770, ST14771 and ST15246), seven *porB* alleles (8574, 8575, 8576, 8577, 8579, 8580 and 8581) and four *tbpB* alleles (2466, 2467, 2468 and 2469) had not been previously described.

Closely related STs were clustered into 10 genogroups (Fig. 1) encompassing 44 of the 104 isolates; the most frequent were G2400 (three STs, ten strains) followed by G2992 (four STs, six strains). There were four genogroups each comprising four isolates, G4186 (two STs), G5445 (three STs), G5793 (two STs) and G13467 (two STs). The less prevalent genogroups, each with three isolates, were G1407 (three STs), G5444 (two STs), G8517 (two STs) and G11461 (two STs).

STs 5441 and 14754 do not meet the requirements to be classified as a genogroup due to the fact that do not share either *porB* or *tbpB* alleles. However, these STs differ by <1%, i.e. only 2 bp in *porB* alleles and 1 bp in *tbpB* alleles.

Cefixime-resistant strains belonged to ST13070, and the azithromycin-resistant strains were characterised as ST8241 and ST12415. The single ST1407 strain was resistant to ciprofloxacin, showed DS to penicillin and tetracycline, but was ceftriaxone and cefixime susceptible (MICs 0.094 and 0.047 mg/l, respectively).

The analysis of the more prevalent genogroups and STs, accounting for approximately one-third of the isolates and individual patients, is summarised in Table 5. There were no differences in gender, origin, anatomical site and age among the patients harbouring the more prevalent genogroups and STs,

but G2400 was significantly associated with heterosexual subjects ($P < 0.01$). In this cohort, significant differences were found for ciprofloxacin resistance in ST2318 ($P = 0.031$), G2400 ($P < 0.01$), G2992 ($P < 0.01$) and G5441 ($P < 0.01$); for tetracycline in ST2318 ($P < 0.01$) and for azithromycin in G2992 ($P = 0.023$).

Discussion

A randomly selected sample of 104 *N. gonorrhoeae* isolates recovered from patients attending an STI outpatient clinic in Madrid over a 4-month period in 2016 was investigated to determine their antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology, and explore statistical associations of isolate characteristics with socio-demographic, behavioural and clinical factors of patients.

We detected resistance to penicillin (15.4%), ciprofloxacin (42.3%/40.4% EUCAST/CLSI criteria), tetracycline (5.8%/2.9% EUCAST/CLSI), cefixime (2.5% EUCAST) and azithromycin (1.9%). According to the 2015 European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP) [8], the observed rates were similar to the European average, except for azithromycin (7.1%), and to the overall average for Spain, except for ciprofloxacin (65.3%). Contrary to our study, most of the Spanish strains included in 2015 Euro-GASP were isolated from heterosexual men (21.3% vs. 60%) in which the highest ciprofloxacin resistance rate was found [8]. A significant association between heterosexual men and ciprofloxacin resistance has been previously described in other Spanish regions [22, 23], and this was confirmed in the present study with ciprofloxacin resistance being highest in heterosexual males (70%), but was half as frequent in MSM.

In our study, resistance to azithromycin was rare (1.9%), well below the previously observed European average in 2015 (7.1%), and lower than previously reported from Spain for 2009–2014 [8, 23, 24]. Azithromycin resistance in Spain averaged 3% in 2015, and showed a continued decline compared to previous years [8], which was also found in our study sample.

If CLSI criteria are applied, all isolates tested were susceptible to cefixime and ceftriaxone, whereas according to EUCAST criteria, three strains (2.9%) were cefixime-resistant (MIC = 0.19 mg/l). Comparing with other Spanish regions, Serra-Pladevall *et al.* [25]

Table 4. Epidemiological and clinical characteristics associated with gonococcal antimicrobial resistance and/or decreased susceptibility by logistic regression analysis, in MSM (*n* = 78)

Characteristics (<i>n</i>)	<i>N</i> (%)	OR (95% CI)	<i>P</i>	aOR (95% CI)	<i>P</i>
<i>Penicillin (R) – EUCAST – CLSI</i>					
Sex partners in the previous year					
≤5 (26)	5 (19.2)	1	0.044	Excluded	NA
6–10 (12)	1 (8.3)	0.382 (0.040–3.687)		Excluded	
11–20 (10)	4 (40.0)	2.8 (0.567–13.833)		Excluded	
21–30 (2)	2 (100)	0.68E + 10		Excluded	
31–40 (5)	0	NA		Excluded	
41–50 (5)	1 (20.0)	1.050 (0.095–11.558)		Excluded	
>50 (13)	2 (15.4)	0.764 (0.127–4.596)		Excluded	
Unknown (5)	0	NA	Excluded		
<i>Ciprofloxacin (R) – EUCAST – CLSI</i>					
Age group					
18–28 (31)	6 (19.4)	1	0.024	1	0.059
29–39 (24)	13 (54.2)	4.924 (1.484–16.340)		4.607 (1.245–17.044)	
40–51 (23)	9 (39.1)	2.679 (0.789–9.098)		1.436 (0.367–5.613)	
Educational level					
Elementary (3)	3 (100)	0.89E + 10	0.031	Excluded	NA
Secondary (13)	2 (15.4)	1		Excluded	
Higher (35)	13 (37.1)	3.250 (0.621–17.013)		Excluded	
Unknown (27)	10 (37.0)	3.235 (0.593–17.658)		Excluded	
IDU					
No (76)	26 (34.2)	1	0.041	Excluded	NA
Yes (2)	2 (100)	0.31E + 10		Excluded	
HIV status					
– (40)	7 (17.5)	1	0	1	0.015
+ (35)	18 (51.4)	4.992 (1.745–14.278)		5.415 (1.733–16.922)	
Unknown (3)	3 (100)	0.76E + 10		0.77E + 10	
Number of anatomical sites with gonorrhoeae					
1 (64)	24 (37.5)	1	0.042	Excluded	NA
2 (12)	2 (16.7)	0.333 (0.067–1.652)		Excluded	
3 (2)	2 (100)	0.27E + 10		Excluded	
<i>Tetracycline (I + R) – EUCAST</i>					
Age group					
18–28 (31)	2 (6.5)	1	0.029	1	0.030
29–39 (24)	8 (33.3)	7.250 (1.371–38.335)		9.196 (1.577–53.639)	
40–51 (23)	3 (13.0)	2.175 (0.333–14.221)		2.161 (0.313–14.939)	
Educational level					
Elementary (3)	3 (100)	0.89E + 10	0.005	Excluded	NA
Secondary (13)	2 (15.4)	1		Excluded	
Higher (35)	3 (8.6)	0.516 (0.076–3.502)		Excluded	
Unknown (27)	5 (18.5)	1.250 (0.208–7.505)		Excluded	
Other STI in the previous year					

(Continued)

Table 4. (Continued.)

Characteristics (n)	N (%)	OR (95% CI)	P	aOR (95% CI)	P
No (46)	4 (8.7)	1	0.020	1	0.024
Yes (31)	9 (29.0)	4.295 (1.187–15.539)		5.108 (1.242–21.005)	
Unknown (1)	0	NA		NA	
Number of anatomical sites with gonorrhoeae					
1 (64)	11 (17.2)	1	0.003	Excluded	NA
2 (12)	0	NA		Excluded	
3 (2)	2 (100)	0.78E + 10		Excluded	
Tetracycline (I + R) – CLSI					
Educational level					
Elementary (3)	3 (100)	0.05E + 10	0.009	0.01E + 10	0.031
Secondary (13)	10 (76.9)	1		1	
Higher (35)	12 (34.3)	0.323 (0.072–1.440)		0.071 (0.012–0.405)	
Unknown (27)	14 (51.9)	0.157 (0.036–0.679)		0.158 (0.028–0.897)	
Other STI in the previous year					
No (46)	19 (41.3)	1	0.045	1	0.004
Yes (31)	20 (64.5)	2.584 (1.008–6.622)		6.243 (1.797–21.686)	
Unknown (1)	0	NA		NA	
Number of anatomical sites with gonorrhoeae					
1 (64)	26 (40.63)	1	0.001	1	0.016
2 (12)	11 (91.7)	16.077 (1.955–132.211)		27.589 (2.865–265.686)	
3 (2)	2 (100)	0.24E + 10		6.243	

n, number of *N. gonorrhoeae* strains isolated from MSM; MIC, minimum inhibitory concentration; Penicillin (R) – EUCAST – CLSI, penicillin resistance (MIC \geq 1 mg/l) according to EUCAST and CLSI breakpoints; Ciprofloxacin (R) – EUCAST – CLSI, ciprofloxacin resistance (MIC $>$ 0.06 mg/l) according to EUCAST and CLSI breakpoints; Tetracycline (I + R) – EUCAST, tetracycline decreased susceptibility (MIC $>$ 0.5 mg/l) according to EUCAST breakpoints; Tetracycline (I + R) – CLSI, tetracycline decreased susceptibility (MIC $>$ 0.25 mg/l) according to CLSI breakpoints; N, number of penicillin-resistant strains/ciprofloxacin-resistant strains/tetracycline decreased susceptible isolates; OR, odds ratio; CI, confident interval; aOR, adjusted OR; NA, not applicable; Excluded, variable excluded by backward method in logistic regression analysis. $P < 0.05$ are shown in bold.

reported a cefixime resistance rate of 8.2% among gonococcal isolates during 2013 in Barcelona and 0.6% resistance to ceftriaxone. Likewise, Cobo *et al.* found the rates of cefixime and ceftriaxone resistance were 6.1% and 4.6%, respectively, in 65 isolates collected during 2012–2014 in southern Spain [24]. In this sense, as is observed in our study, the resistance to extended spectrum cephalosporins appears to have been decreasing in recent years. Indeed, the 2015 Euro-GASP report [8] gave an average of 2.4% in Spain with no resistance to ceftriaxone.

Even though there remain some differences between EUCAST and CLSI criteria [17, 18], we only found significant differences between tetracycline resistance rates ($P < 0.01$), thus confirming efforts to harmonise the clinical breakpoints.

European guidelines recommend the use of dual therapy with ceftriaxone and azithromycin for uncomplicated gonorrhoea [5] in order to improve therapeutic efficacy and slow the emergence of resistance to cephalosporins. Moreover, the use of dual therapy is justified by the high number of people co-infected with gonorrhoea and chlamydia [13], although rates of azithromycin resistance above 5% of threshold in *C. trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* infections have been observed in some studies [26–28]. According to our data, neither cephalosporins nor azithromycin reaches a resistance threshold of 5% in our specific population, so, perhaps dual therapy should not be recommended for uncomplicated gonorrhoea infections in order to prevent the

emergence of increased resistance to azithromycin in other bacterial STIs.

Most of the patients (95.7%) were administered ceftriaxone with or without azithromycin as treatment, two patients were treated only with azithromycin and treatment was unknown for the remaining two. Clinical cure was achieved in over a third of patients although five cases again became culture-positive; however, in the latter cases, test of cure was performed over a range of 60–120 days, so these most likely represent reinfections rather than treatment failures. Test of cure is recommended in all gonorrhoea cases to ensure effective eradication, especially for pharyngeal infection which is substantially harder to treat than genital and rectal infections, and identify emerging resistance [5, 6].

Some guidelines recommend the use of gentamicin when treatment failures with cephalosporins are suspected [5, 6]. Gentamicin was first introduced for syndromic management of urethritis in Malawi in 1993, and there has been no reported increase in the number of therapeutic failures [29]. Moreover, a clinical trial showed that gentamicin was no clinically worse than ceftriaxone for gonorrhoea treatment [30] and a microbiological cure was achieved for all patients who received gentamicin 240 mg intramuscularly plus azithromycin 2 g orally [31]. Although there are no official clinical breakpoints for gentamicin, high rates of *in vitro* susceptibility have been shown in Europe [32]. According to the Malawi established breakpoints [33],

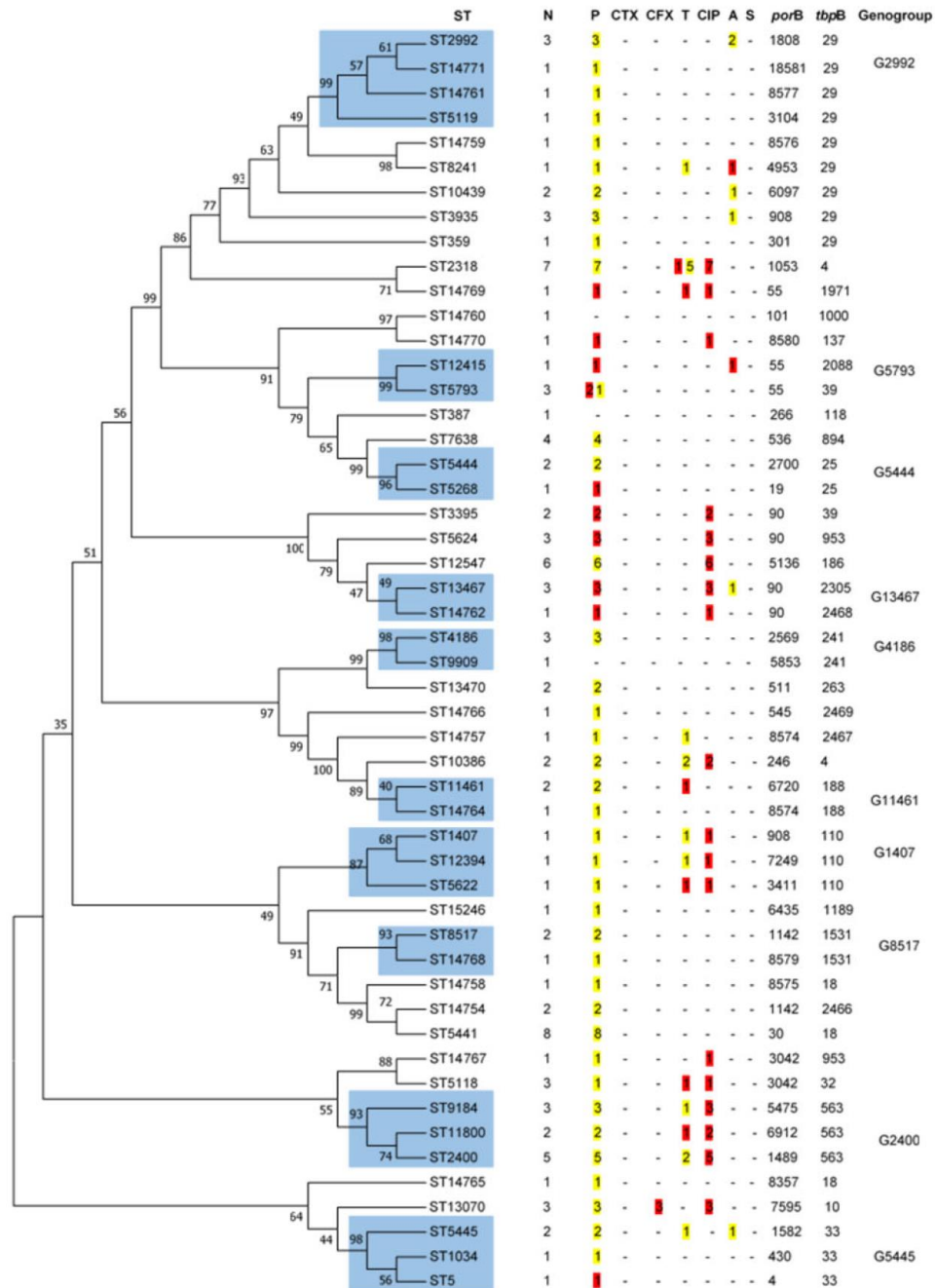


Fig. 1. Dendrogram constructed by Neighbor-Joining method applying 1000 replicates of bootstrap. The similarities between the 51 STs of *N. gonorrhoeae* strains were analysed using the maximum likelihood test after concatenating *porB* and *tpbB* sequences. In blue are shown the cluster of STs that share 99% of identity and belong to the same genogroup. N, number. P, penicillin. CTX, ceftriaxone. CFX, cefixime. T, tetracycline. CIP, ciprofloxacin. A, azithromycin. S, spectinomycin. In yellow are shown the number of isolates with intermediate susceptibility and in red with resistance following EUCAST breakpoints.

Table 5. Epidemiological and clinical characteristics of the more prevalent genogroups and STs

	G2400 (n = 10)	ST5441 (n = 8)	ST2318 (n = 7)	ST12547 (n = 6)	G2992 (n = 6)
NG-MAST ST (n)	ST2400 (n = 5) ST9184 (n = 3) ST11800 (n = 2)	ST5441 (n = 8)	ST2318 (n = 7)	ST12547 (n = 6)	ST2992 (n = 3) ST5119 (n = 1) ST14761 (n = 1) ST14771 (n = 1)
Penicillin	Intermediate	Intermediate	Intermediate	Intermediate	Intermediate
Ceftriaxone	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility
Cefixime	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility
Tetracycline	Variable ^a	Susceptibility	Variable^b	Susceptibility	Susceptibility
Ciprofloxacin	Resistance	Susceptibility	Resistance	Resistance	Susceptibility
Azithromycin	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Variable^c
Spectinomycin	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility
Genital infection (%)	70	62.5	28.6	83.3	50
Subjects (n)	8	8	6	6	5
Median age, years (range)	33.5 (22–46)	35.5 (19–50)	32.5 (19–49)	37.5 (22–44)	38 (23–49)
Males (%)	75	100	100	100	80
Homosexual (%)	25	87.5	83.3	83.3	60
European (%)	75	62.5	33.3	83.3	60
HIV+ (%)	0	25	50	50	20

N, number. Antimicrobial susceptibility values were interpreted in accordance with EUCAST. Parameters in which significant differences were found are shown in bold.

^aVariable: 60% (n = 6) susceptibility, 30% (n = 3) intermediate and 10% (n = 1) resistance.

^bVariable: 14.3% (n = 1) susceptibility, 71.4% (n = 5) intermediate and 14.3% (n = 1) resistance.

^cVariable: 66.7% (n = 4) susceptibility and 33.3% (n = 2) intermediate.

none of the isolates studied here showed gentamicin resistance (MIC \geq 32 mg/l); the great majority (95.2%) were gentamicin susceptible (MIC \leq 4 mg/l), and only five isolates were classed as intermediate susceptible (MIC = 6 mg/l, 4; and MIC = 8 mg/l).

As in other countries such as Germany and the UK, no spectinomycin-resistant isolates [34, 35] were found. This antimicrobial is not available in many countries so its limited use might explain the lack of resistance. Overall, with the exception of ciprofloxacin, relatively low AMR was evident in our population. Nevertheless, continuous antimicrobial surveillance is necessary to monitor the prevalence and distribution of changes in resistance in order to provide quality data for appropriate local treatment guidelines.

Despite the genetic diversity (51 STs) of *N. gonorrhoeae* strains in our study population, just over half of them represented single strains. Most (74%) fell in to 24 different STs, which were clustered in 10 genogroups, with G2400 and G2992 being the most predominant. Contrary to our results, a statistically significant relationship between the latter genogroups and MSM has been previously reported [20, 22]. Although three-quarters of our isolates were recovered from MSM, we found a statistically significant relationship between G2400 and heterosexual patients, while G2992 seemed arbitrarily distributed between MSM and heterosexual subjects. It is also noteworthy that G1407, the most prevalent genogroup seen in the previous studies [20, 22, 24], was one of the less prevalent genogroups found here and represented only by three strains. G1407, which is widely disseminated, has been associated with cefixime and ceftriaxone resistance [3, 20, 36], and specifically with cephalosporin treatment failures internationally [3]. An increase in the testing of extragenital samples

combined with appropriate dual therapy (ceftriaxone + azithromycin) may have contributed to reducing the G1407 reservoir in our region. Despite the relatively small size of our study dataset which might not be representative of the general STI population, our data do show a difference to previously reported epidemiology in that the four most prevalent clones (G2400, ST5441, ST2318 and ST12547) were poorly represented in the last Euro-GASP survey at both a European and Spanish level [20]. We observed a decrease in the prevalence of G1407, and an increase in ST5441 and ST2318. Since 71.4% and 37.5% of the ST2318 and ST5441 strains, respectively, were isolated from extragenital samples, these STs could have occupied the G1407 ecological niche. These findings emphasise the need for continuous monitoring of gonococcal strain populations to identify temporal changes and expansion of new clones.

Identification of gonococcal transmission networks, as well as those individuals with a higher risk for acquiring AMR *N. gonorrhoeae*, is needed to focus on treatments and underpin public health intervention strategies. Our study sample was mainly derived from young people (18–28 years) and who were MSM. It is also notable that one-third of the subjects had a higher level of education. In accordance with the previous studies [8, 23–25, 37], in which MSM is generally identified as an increased vulnerable population for both STI and HIV infections, the highest gonococcal positivity rate was for males (89.4%), and particularly from MSM (75.5%). Moreover, significant proportions of our MSM patients were HIV-positive (45.1%), also presented with STI other than gonorrhoea (32.4%), and had had another STI in the previous year (40.8%). Since MSM were predominant, and sexual orientation is highly correlated with many other

variables, we analysed the risk factors for AMR and decreased susceptible isolates from MSM. There was a significant association between HIV-positive MSM and carriage of a ciprofloxacin-resistant gonococcal strain. In a previous study in the Netherlands [38], it was observed that infection with *N. gonorrhoeae* resistant to ciprofloxacin was more likely in HIV-positive men than in HIV-negative men, although this was not confirmed by multivariable analysis. However, they did not specifically analyse the MSM population, as performed here. We also found a significant association between age and being carriers of decreased susceptible isolates to azithromycin in MSM, in agreement with the previous studies reporting this significant association with any AMR strain [19, 37, 39].

The relatively low number of patients in this cohort, which was conducted at one STI clinic, and the over-representation of MSM, are the main limitations of our study, and thus may not be a representative sample of the general population.

In conclusion, we found a decrease in the rate of AMR gonococcal isolates which contrasts with some previously reported studies and confirmed the validity of both EUCAST and CLSI breakpoints for the classification of resistance phenotypes. The widely disseminated multi-drug resistant genogroup, G1407, was quite rare, while more susceptible clones such as ST5441, associated with susceptibility to all antimicrobials tested, and ST2318, associated with extragenital locations, were the most prevalent. Continuous molecular and antimicrobial surveillance programmes are necessary to detect population changes and to provide quality data to support treatment guidelines.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S095026881900150X>.

Acknowledgements. We would like to acknowledge the members of the ISCIII Genomics Unit for their support.

Financial support. This work was supported by the National Centre for Microbiology (Instituto de Salud Carlos III).

Conflict of interest. None.

References

- Newman L *et al.* (2015) Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PLoS ONE* **10**, 1–17.
- Ohnishi M *et al.* (2011) Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 3538–3545.
- Unemo M *et al.* (2012) High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**, 1273–1280.
- Carnicer-Pont D *et al.* (2012) First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia Spain, May 2011. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **30**, 218–219.
- Bignell C and Unemo M (2013) 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *International Journal of STD and AIDS* **24**, 85–92.
- Workowski KA *et al.* (2015) Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports* **64**, 1–137.
- World Health Organization (2016) WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. World Health Organization. Available at <http://www.who.int/iris/handle/10665/246114> (Accessed 11 January 2019).
- European Centre for Disease Prevention and Control (2017) *Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Europe, 2015*. Stockholm: ECDC. Available at <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2015.pdf> (Accessed 5 February 2019).
- Fifer H *et al.* (2016) Failure of dual antimicrobial therapy in treatment of gonorrhoea. *New England Journal of Medicine* **374**, 2504–2506.
- Eyre DW *et al.* (2018) Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Eurosurveillance* **23**, 1800323.
- Eyre DW *et al.* (2019) Detection in the United Kingdom of the *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, October to December 2018. *Eurosurveillance* **24**, 1900147.
- Golparian D *et al.* (2018) Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate, belonging to the internationally spreading Japanese FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, Ireland, August 2018. *Eurosurveillance* **23**, 1800617.
- World Health Organization (2012) *Global Action Plan to Control the Spread and Impact of Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: World Health Organization. Available at <http://www.who.int/iris/handle/10665/44863> (Accessed 3 February 2019).
- World Health Organization (2015) *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Geneva: World Health Organization. Available at <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/> (Accessed 9 May 2019).
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Response Plan to Control and Manage the Threat of Multidrug-Resistant Gonorrhoea in Europe, 2012*. Stockholm: ECDC. Available at <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1206-ECDC-MDR-gonorrhoea-response-plan.pdf> (Accessed 13 January 2019).
- Cole MJ *et al.* (2017) Overall low extended-spectrum cephalosporin resistance but high azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in 24 European countries, 2015. *BMC Infectious Diseases* **17**, 617.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2016) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2016) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 26th Edn. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Martin IM *et al.* (2014) Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *Journal of Infectious Diseases* **189**, 1497–1505.
- Chisholm SA *et al.* (2013) Molecular epidemiological typing within the European gonococcal antimicrobial resistance surveillance programme reveals predominance of a multidrug resistant clone. *Eurosurveillance* **18**, 1–10.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874.
- Serra-Pladevall J *et al.* (2017) Differences in *Neisseria gonorrhoeae* population structure and antimicrobial resistance pattern between men who have sex with men and heterosexuals. *Epidemiology and Infection* **145**, 379–385.
- Fuertes I *et al.* (2018) Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhoea. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **36**, 194–195.
- Cobo F, Cabezas-Fernández MT and Cabeza-Barrera MI (2016) Antimicrobial susceptibility and typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012–2014. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **34**, 3–7.
- Serra-Pladevall J *et al.* (2016) *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Barcelona: penA, ponA, mtrR, and porB mutations and NG-MAST sequence types associated with decreased susceptibility to cephalosporins. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **35**, 1549–1556.
- Gratrix J *et al.* (2016) A retrospective review of treatment failures using azithromycin and doxycycline in the treatment of rectal chlamydia infections in women and men who have sex with men. *Sexually Transmitted Diseases* **43**, 110–112.

27. Kissinger P *et al.* (2016) Azithromycin treatment failure for *Chlamydia trachomatis* among heterosexual men with nongonococcal urethritis. *Sexually Transmitted Diseases* **43**, 599–602.
28. Manhart LE *et al.* (2015) Efficacy of antimicrobial therapy for *Mycoplasma genitalium* infections. *Clinical Infectious Diseases* **61**, S802–S817.
29. Brown LB *et al.* (2010) *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sexually Transmitted Diseases* **37**, 169–172.
30. Brittain C *et al.* (2016) Gentamicin versus ceftriaxone for the treatment of gonorrhoea (G-TOG trial): study protocol for a randomised trial. *Trials* **17**, 558.
31. Kirkcaldy RD *et al.* (2014) The efficacy and safety of gentamicin plus azithromycin and gemifloxacin plus azithromycin as treatment of uncomplicated gonorrhoea. *Clinical Infectious Diseases* **59**, 1083–1091.
32. Dowell D and Kirkcaldy RD (2012) Effectiveness of gentamicin for gonorrhoea treatment: a systematic review. *Sexually Transmitted Infections* **88**, 589–594.
33. Daly CC *et al.* (1997) Development of an antimicrobial susceptibility surveillance system for *Neisseria gonorrhoeae* in Malawi: Comparison of methods. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2985–2988.
34. Public Health England (2016) Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Available at https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/771134/GRASP_Report_2016.pdf (Accessed 1 February 2019).
35. Regnath T, Mertes T and Ignatius R (2016) Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in south-west Germany, 2004 to 2015: increasing minimal inhibitory concentrations of tetracycline but no resistance to third-generation cephalosporins. *Eurosurveillance* **21**, 1–7.
36. Unemo M and Shafer WM (2014) Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clinical Microbiology Reviews* **27**, 587–613.
37. Cole MJ *et al.* (2014) Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. *Sexually Transmitted Diseases* **41**, 723–729.
38. Koedijk FD *et al.* (2010) Increasing trend in gonococcal resistance to ciprofloxacin in The Netherlands, 2006–8. *Sexually Transmitted Infections* **86**, 41–45.
39. Lewis DA (2013) The role of core groups in the emergence and dissemination of antimicrobial-resistant *N. gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Infections* **89**(suppl. 4), 47–51.

ANEXO IV: CARTA CIENTÍFICA NO INCLUIDA EN LA TESIS

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2020;38(1):38–43



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Carta científica

¿Es la fosfomicina una buena alternativa terapéutica para la gonorrea en nuestro medio?



Is fosfomycin a good alternative drug for gonorrhoea treatment in our setting?

El 27 de febrero de 2017 la OMS publicó la lista de los 10 microorganismos resistentes a los antibióticos prioritarios en la búsqueda de soluciones terapéuticas¹. *Neisseria gonorrhoeae* resistente a las cefalosporinas y quinolonas es uno de ellos. Aunque las tasas de resistencia de *N. gonorrhoeae* a ceftriaxona siguen siendo muy bajas en Europa², en el artículo de Fuertes de Vega et al. un 9,1% de cepas de gonococo aisladas de un hospital de tercer nivel en Barcelona fueron resistentes a cefotaxima, y un 17,3% resistentes/intermedias a azitromicina³. La creciente resistencia a los antibióticos disponibles, unido al retraso en el desarrollo y comercialización de nuevos antibióticos activos, han despertado el interés por la reintroducción de «viejos» antibióticos como la fosfomicina.

Hemos estudiado la sensibilidad a fosfomicina de cepas de gonococo aisladas en pacientes de 5 comarcas de la provincia de Barcelona: Anoia, Alt Penedès, Garraf, Baix Llobregat y Barcelonès. Se han incluido prospectivamente las cepas aisladas en frotis uretral (96), vaginal (3), endocervical (2), balanoprepucial (1) y semen (1) desde enero de 2017 hasta marzo de 2018. La tinción de Gram demostró la presencia de diplococos Gram negativos en 100/101 de muestras con tinción realizada. Para el aislamiento de gonococo las muestras se sembraron en medios de agar chocolate y agar Thayer-Martin (bioMérieux). La identificación de *N. gonorrhoeae* se ha realizado mediante MALDI-ToF-MS. Para el estudio de sensibilidad mediante tiras de gradiente (E-test) se ha usado el medio CG II agar (Becton Dickinson), ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland en suero fisiológico. Las placas se han incubado a 35 °C, en atmósfera con 5–7% de CO₂ durante 20–24 horas antes de realizar la lectura. Los resultados se interpretaron de acuerdo con los puntos de corte de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), Versión 8.1, 2018-05-15, para enterobacterias. Ningún aislamiento presentó resistencia a ceftriaxona, pero sí al resto de antibióticos testados (tabla 1). La detección molecular de *Chlamydia trachomatis* y *N. gonorrhoeae* se ha realizado en 48 pacientes con cultivo positivo, siendo positiva para gonococo en todos los casos, resaltando una excelente sensibilidad del método molecular comparado con el cultivo. La coinfección con *C. trachomatis* se ha detectado en 11/48 casos (22,9%). El elevado porcentaje de coinfecciones con clamidia confirma la necesidad de añadir el segundo antibiótico al tratamiento con fosfomicina en el caso de sospecha de uretritis gonocócica.

A lo largo del tiempo *N. gonorrhoeae* ha ido adquiriendo resistencias a los principales antibióticos empleados⁴. Actualmente el tratamiento recomendado es la combinación de ceftriaxona con azitromicina⁵. La aparición de cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, o incluso a la combinación de 2 fármacos, ha despertado las alertas sobre encontrarnos ante casos de gonorrea intratable. La fosfomicina utilizada en el pasado como una

Tabla 1
Sensibilidad antibiótica en *N. gonorrhoeae*

	% (n.º) de cepas sensibles	% (n.º) de cepas intermedias	% (n.º) de cepas resistentes
Penicilina	11,6 (12)	67 (69)	21,4 (22)
Ceftriaxona	100 (103)	-	-
Ciprofloxacino	35 (36)	-	65 (67)
Tetraciclina	62,1 (64)	15,6 (16)	22,3 (23)
Fosfomicina	94,2 ^a (97)	-	5,8 ^b (6)

^a CMI ≤ 32 mg/l (punto de corte de EUCAST para enterobacterias).

^b CMI > 32 mg/l.

alternativa para el tratamiento⁶ permite mejor biodisponibilidad del fármaco con sus formulaciones actuales. En su estudio Yuan et al. demostraron la no-inferioridad entre la pauta de fosfomicina trometamol 3 g diarios en los días 1, 3 y 5 comparada con la pauta de ceftriaxona más azitromicina⁷. La mayoría de las cepas en nuestro estudio presentaron una CMI ≤ 32 µg/ml para la fosfomicina, punto de corte de sensibilidad propuesto para otros microorganismos por EUCAST. Si consideramos la sensibilidad según los puntos de corte de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (sensible ≤ 64 mg/l, intermedio = 128 mg/l y resistente ≥ 256 mg/l), solo una cepa fue resistente y una presentó una sensibilidad intermedia. A pesar de su eficacia en monoterapia, es más probable que fosfomicina se use en tratamiento combinado. Barbee et al. han estudiado la combinación de ceftriaxona con fosfomicina, y pese a no haber sinergia se ha observado un índice de concentración inhibitoria fraccionada más bajo (0,96) comparado con otras combinaciones estudiadas⁸. Otro estudio tampoco demostró sinergia de las combinaciones de fosfomicina con azitromicina o ceftriaxona⁹. Asimismo, se necesitan más estudios para asegurar las concentraciones adecuadas de fosfomicina en el foco de infección. Recientemente Wijma et al. han demostrado una importante variabilidad en farmacocinética de fosfomicina entre los voluntarios sanos, lo que podría explicar fallos terapéuticos de tratamiento de ITU no complicada con el régimen recomendado de 3 g de fosfomicina oral en dosis única¹⁰. Aun así, los datos disponibles posicionan a fosfomicina como una alternativa terapéutica prometedora para los casos no complicados de localización genital.

Bibliografía

- World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO: Geneva, Switzerland, 2017 [consultado 24 Jun 2018]. Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short-Summary-25Feb-ET_NM.WHO.pdf.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2015. Stockholm: ECDC; 2017 [consultado 24 Jun 2018]. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2015.pdf>.
- Fuertes de Vega I, Baliu-Pique C, Bosch Mestres J, Vergara Gomez A, Valles X, Alsina Gibert M. Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhoea. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36:165–8.
- Suay-García B, Perez-Gracia MT. Future prospects for *Neisseria gonorrhoeae* treatment. *Antibiotics* (Basel). 2018;7.

ANEXO V: TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS

Derivados de la tesis:

- **Dinámica poblacional y resistencia antibiótica de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en un centro de ITS de Madrid.**
M.D. Guerrero, M.B. Menéndez, E. Tello, S. Guerras, J. Ballesteros, P. Clavo, T. Puerta, M. Vera, O. Ayerdi, J.C. Carrio, I. Mozo, J.A. Vázquez, J. del Romero, Raquel Abad.
XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 11-13 de Mayo 2017. Málaga. Comunicación oral.
- **Análisis de determinantes genéticos asociados con resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* mediante secuenciación del genoma completo.**
M.D. Guerrero-Torres, M.B. Menéndez, J. Del Romero, J.A. Vázquez, R. Abad.
XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 23-25 de Mayo 2019. Madrid. Presentación tipo póster.
- **Análisis molecular de las regiones determinantes de resistencia a quinolonas en aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* mediante secuenciación del genoma completo.**
M.D. Guerrero-Torres, M.B. Menéndez, J. Del Romero, J.A. Vázquez, R. Abad.
XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 23-25 de Mayo 2019. Madrid. Madrid. Presentación tipo póster.

No incluidos en la tesis:

- **Evaluación de Aptima Combo 2TM para la detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.**
M.D. Guerrero, M.B. Menéndez, S. Guerras, E. Tello, J. Ballesteros, P. Clavo, T. Puerta, M. Vera, O. Ayerdi, J.C. Carrio, I. Mozo y J. del Romero.
XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 11-13 de Mayo 2017. Málaga. Presentación tipo póster.
- **Creación de una Unidad de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) en la Comarca del Alt Penedès.**
L. Gabarró Julià, M. Serbassi , N. Domingo Gou , A. Risueño Burgos , A.M. Otero Mitjans , C. Rebull , C. Marcó De Mas , Y. Zboromyrska , A. Cebollero , **M.D. Guerrero** , M. Álvaro , C. Heras , M. Cuscó.

XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 23-25 de Mayo 2019. Madrid. Presentación tipo póster.

- **¿Está justificada la identificación y el tratamiento de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*?**

M.D. Guerrero-Torres, A. García, P. Alemany, Y. Zboromyrska, M.Á. Benítez.

XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 23-25 de Mayo 2019. Madrid. Presentación tipo póster.

