



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

**VIGILANCIA DE LA SUSCEPTIBILIDAD
ANTIBIÓTICA Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA
DE AISLADOS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*
EN LA COMUNIDAD VALENCIANA:
PROYECTO MULTICÉNTRICO GONOVIG
[PERIODO 2013 - 2018]**

Autor **ALEIX BORJA FABREGAT BOLUFER**
Director **Dr. JAVIER COLOMINA RODRÍGUEZ**

Programa de Doctorado en Medicina

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

Agosto 2020

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director:

Apellidos y nombre: Colomina Rodríguez, Javier N.I.F. 22556004-L. Departamento/Instituto: Microbiología. Centro: Hospital Clínico de Valencia.

Tutor:

Apellidos y nombre: Navarro Ortega, David. N.I.F. 73912387-R. Departamento/Instituto: Microbiología y Ecología. Centro: Hospital Clínico de Valencia. Catedrático de Universidad del Departamento de Microbiología y Ecología.

Director y tutor, respectivamente, de la tesis doctoral: "Vigilancia de la susceptibilidad antibiótica y caracterización genotípica de aislados de *Neisseria gonorrhoeae* en la Comunidad Valenciana: proyecto multicéntrico GONOVig"

de D/Dña. Aleix Borja Fabregat Bolufer,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable (*favorable/desfavorable*) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Valencia, a 31 de agosto de 2020.

Fdo.: Javier Colomina Rodríguez.



Director/a

Fdo.: David Navarro Ortega



Tutor/a

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

“Lo único constante es el cambio”

Heráclito de Éfeso

“The thoughtless person playing with penicillin treatment is morally responsible for the death of the man who succumbs to infection with the penicillin-resistant organism.”

Alexander Fleming

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta Tesis no hubiese sido posible sin el apoyo incondicional de un gran número de personas. Es por tanto, mérito de todos ellos, el trabajo realizado y la obtención de los resultados a continuación expuestos.

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Javier Colomina, director de la presente Tesis, la confianza depositada en mí desde el primer momento. Ha llovido mucho desde que, siendo yo un recién aterrizado residente, comenzase a hablarme de la infección gonocócica y las resistencias bacterianas. A lo largo de este camino he aprendido, más de lo que él se imagina, de su experiencia y conocimientos. Su perseverancia y capacidad de trabajo hasta a la extenuación le definen. Gracias.

A mi compañero de fatigas y de Tesis, Koke, por ser la persona más ordenada y organizada que conozco. Sin su ayuda ningún documento hubiera sido entregado en su debido plazo. Por estar siempre ahí sin importar la distancia, el tiempo u otras circunstancias de la vida, gracias.

También deseo agradecer al Dr. David Navarro su tutorización durante dicha etapa, tan necesaria para el desarrollo de este estudio.

De igual manera, quisiera destacar a todas aquellas personas que durante mis años de residencia colaboraron sin excepción durante el desarrollo experimental del Proyecto GONOVig. Técnicos, residentes y facultativos del Laboratorio del Hospital Universitario de La Ribera fueron imprescindibles en las horas más exigentes de trabajo. Independientemente del tiempo que pase y las vueltas que dé la vida, siempre recordaré vuestra inestimable ayuda así como los momentos compartidos durante cuatro intensos años.

Por descontado, deseo agradecer la importante contribución de FISABIO durante el periodo de caracterización molecular de las cepas. No solo prestaron sus manos y medios a la hora de llevar a cabo dicho proceso técnico, sino que además me transmitieron sus amplios conocimientos en la materia con gran empeño y profesionalidad. Especial mención quiero dedicar al profesor Fernando González, así como a Paula y Carlos, cuya generosidad y ayuda desinteresada ha sido esencial. Muchas gracias.

Quisiera dedicar unas palabras a la *meva nina*. Su dulzura, cariño y paciencia destacan incluso sobre su delicada belleza. Gracias por ilusionarme de nuevo cada vez que me miras. Gracias por seguir a mi lado a pesar de mis incontables defectos. Gracias por cuidarme y ayudarme a ser un poquito mejor cada día.

A todos mis amigos -ellos saben quiénes son- que pese a la distancia y las obligaciones permanecen a mi lado incondicionalmente, interesándose y engrandeciendo cada pequeño objetivo alcanzado. Me siento muy afortunado de haber podido crecer y aprender con ellos, y me tranquiliza saber que, pase lo que pase, envejeceremos juntos. A ellos, que siempre están ahí, gracias.

Y por supuesto, quiero agradecer absolutamente todo a mi familia, origen de cada pequeño detalle que hoy me compone.

A mi abuelita por ser su nieto preferido y a mi tía Mari, por ensalzar siempre todo lo que hago.

A mis hermanas Ari y Laia por cuidar de mí cada día, cada minuto, cada segundo, sin límite ni condición.

A mis sobrinas Olympia y Leyre y a mi sobrino Marcel, por hacerme feliz cada día con su inocencia, sencillez e ilusión. Por romper mis esquemas, hacerme reflexionar y restar importancia a todas aquellas cosas que en realidad no la tienen. Por hacer que esta vida tenga sentido.

A Pepe y a Pepi por traerme a este mundo e inculcarme, a mi parecer, los valores más fundamentales de una forma impecable. Vosotros me habéis enseñado lo poco que sé de la vida. Vosotros sois y seréis mi ejemplo y mi camino a seguir. Os quiero.

A la propia vida por darme cada día la magnífica oportunidad de vivir, aprender, errar, rectificar, entender y seguir viviendo.

A todos, y por todo, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20
1.1.1. Consideraciones iniciales	20
1.1.2. Historia de la enfermedad gonocócica	23
1.1.3. Taxonomía	23
1.1.4. Fisiología y estructura	24
1.1.4.1. Características microbiológicas	24
1.1.4.2. Estructuras de superficie	26
1.1.5. Patogenia e inmunidad	31
1.1.5.1. Desarrollo de vacunas	34
1.1.6. Sintomatología de la infección gonocócica	35
1.1.7. Diagnóstico de laboratorio	39
1.1.7.1. Toma de muestra	39
1.1.7.2. Diagnóstico clásico	40
1.1.7.3. Identificación	42
1.1.8. Estudio de sensibilidad antibiótica	46
1.2. Epidemiología de la gonorrea y comparación con otras ITS	47
1.2.1. Global	47
1.2.2. Europa	49
1.2.3. España	55
1.3. Tratamiento y resistencia antibiótica	58
1.3.1. Tratamiento actual de la infección gonocócica	58
1.3.2. Evolución del tratamiento de la gonorrea a lo largo de la historia	60
1.3.3. Mecanismos de resistencia antibiótica	65
1.3.4. Sistemas de vigilancia de las resistencias	72

1.4. Caracterización Molecular	74
1.4.1. Caracterización del gen <i>porB</i>	75
1.4.2. NG-MAST (<i>N. gonorrhoeae multiantigen sequence typing</i>).....	75
1.4.3. MLST (<i>Multilocus sequence typing</i>).....	76
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	78
2.1. Objetivos principales.....	79
2.2. Objetivos secundarios.....	80
3. MATERIAL Y MÉTODOS	81
3.1. Ámbito de estudio y población	82
3.2. Diseño del estudio - Proyecto GONOVig	86
3.3. Solicitud de cepas	87
3.4. Centros participantes	88
3.4.1. Toma de muestra.....	88
3.4.2. Procesado de la muestra.....	89
3.4.3. Transporte de la muestra.....	90
3.4.4. Envío de la muestra y documentación identificativa.....	91
3.5. Centro de referencia	94
3.5.1. Recogida de datos.....	94
3.5.2. Cultivo.....	95
3.5.3. Identificación.....	95
3.5.4. Estudio de sensibilidad antibiótica.....	98
3.5.5. Tipificación molecular.....	105
3.6. Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA)	109
3.7. Análisis estadístico de los datos	110
3.8. Consideraciones éticas	111

4.	RESULTADOS	112
4.1.	Procedencia de las muestras	113
4.2.	Periodo de estudio	116
4.3.	Población de estudio	117
4.4.	Sensibilidad antibiótica	119
4.4.1.	Azitromicina	119
4.4.2.	Cefixima	123
4.4.3.	Ceftriaxona	127
4.4.4.	Ciprofloxacino	131
4.4.5.	Espectinomicina	134
4.4.6.	Tetraciclina	135
4.4.7.	Penicilina	138
4.4.8.	Producción de β -lactamasa	140
4.4.9.	Multirresistencia	140
4.5.	Caracterización molecular	142
4.5.1.	Secuenciotipos y genogrupos encontrados	142
4.5.2.	Relación entre sensibilidad antibiótica y características demográficas de los secuenciotipos más prevalentes	147
4.5.3.	Relación entre características moleculares y cepas resistentes	151
4.5.3.1.	Azitromicina	151
4.5.3.2.	Cefixima	152
4.5.3.3.	Ceftriaxona	154
4.5.3.4.	Ciprofloxacino	155
4.5.3.5.	Tetraciclina	156
4.5.3.6.	Penicilina	157
4.5.3.7.	Cepas PPNG	158
4.5.3.8.	Nuevos secuenciotipos	159
4.6.	Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana	160
4.6.1.	Procedencia de las muestras	160
4.6.2.	Población de estudio	161

4.6.3.	Pruebas diagnósticas, evolución de resultados positivos e incidencia de la gonorrea en la Comunidad Valenciana.....	163
4.6.4.	Sensibilidad antibiótica.....	168
4.6.4.1.	Azitromicina.....	168
4.6.4.2.	Cefixima.....	170
4.6.4.3.	Ceftriaxona.....	172
4.6.4.4.	Ciprofloxacino.....	174
4.6.4.5.	Espectinomicina.....	175
4.6.4.6.	Tetraciclina.....	176
4.6.4.7.	Penicilina.....	177
4.6.4.8.	Gentamicina.....	178
4.6.4.9.	Fosfomicina.....	179
4.6.4.10.	Multirresistencia.....	180
5.	DISCUSIÓN	181
5.1.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , una superbacteria en constante transformación.....	182
5.2.	Proyecto GONOVig y RedMIVA. Población y periodo de estudio. Procedencia, tipos de muestras y pruebas diagnósticas utilizadas. Incidencia de la gonorrea en la Comunidad Valenciana.....	189
5.3.	Evolución de la sensibilidad antibiótica del gonococo desde 1930.....	195
5.4.	Sensibilidad antibiótica actual de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en la Comunidad Valenciana.....	198
5.4.1.	Tratamiento empírico.....	200
5.4.1.1.	Azitromicina.....	201
5.4.1.2.	Cefalosporinas.....	205
5.4.2.	Otros antimicrobianos.....	212
5.4.2.1.	Ciprofloxacino.....	212
5.4.2.2.	Espectinomicina.....	214
5.4.2.3.	Tetraciclina.....	215
5.4.2.4.	Penicilina y cepas productoras de β -lactamasa.....	216

5.4.2.5.	Gentamicina.....	217
5.4.2.6.	Fosfomicina.....	218
5.4.3.	Multirresistencia.....	219
5.5.	Tratamiento de la gonorrea y perspectivas de futuro.....	220
5.5.1.	Nuevos y viejos antimicrobianos útiles en la infección gonocócica.....	221
5.5.2.	Estrategias no farmacológicas frente a bacterias multirresistentes.....	224
5.6.	Tipificación molecular de los aislados de gonococo pertenecientes al proyecto GONOVig.....	225
5.6.1.	Secuenciotipos y genogrupos mayoritarios, relación con sensibilidad antibiótica y características demográficas.....	226
5.6.2.	Resistencia antimicrobiana y secuenciotipos asociados.....	232
5.7.	Limitaciones del estudio y financiación recibida.....	235
6.	CONCLUSIONES.....	236
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	239

GLOSARIO

CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DHPS	Dihidropteroato sintetasa
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ESC	<i>Extended-spectrum cephalosporin</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Euro-GASP	<i>European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISABIO	Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana
HSH	Hombres que practican sexo con hombres
ITS	Infección de transmisión sexual
LOS	Lipooligosacárido
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-flight</i>
MDR	<i>Multidrug-resistance</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NG-MAST	<i>Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PPNG	<i>Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae</i>
RedMIVA	Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i>
TAAN	Técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

SUMARIO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Árbol filogenético de las relaciones existentes dentro del género <i>Neisseria</i>	24
Figura 2.	Fases de la infección causada por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	33
Figura 3.	Objetivo estratégico de la OMS para la reducción de la incidencia de la gonorrea en un 90% en el año 2030.....	48
Figura 4.	Prevalencia estimada en hombres de las ITS más frecuentes en el mundo.....	48
Figura 5.	Prevalencia estimada en mujeres de las ITS más frecuentes en el mundo.....	49
Figura 6.	Número de casos de gonorrea detectados en Europa por cada 100.000 habitantes, año 2017.....	51
Figura 7.	Ratio hombres-mujeres con infección gonocócica por países, año 2017.....	52
Figura 8.	Evolución de la tasa de infección en Europa por cada 100.000 habitantes, periodo 2008 – 2017.....	53
Figura 9.	Casos confirmados por cada 100.000 habitantes por edad y sexo.....	54
Figura 10.	Porcentaje de casos por género y categoría de transmisión.....	54
Figura 11.	Número de casos notificados de gonococia y tasa de infección por cada 100.00 habitantes en España durante el período 1995 – 2018.....	55
Figura 12.	Distribución de los casos de gonorrea en España en el año 2018 por grupos de edad y sexo.....	57
Figura 13.	Incidencia de la infección gonocócica en España por Comunidades Autónomas durante el año 2018.....	57
Figura 14.	Cronología del desarrollo de resistencia a antibióticos.....	61
Figura 15.	Resumen de los mecanismos de resistencia antibiótica presentes en <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	65
Figura 16.	Transferencia horizontal de genes entre especies comensales y patógenas de <i>Neisseria</i>	66
Figura 17.	Genoma circular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . Cepa FA1090 compuesta por 2.153.944 pares de bases.....	74
Figura 18.	Mapa sanitario de la Comunidad Valenciana.....	84
Figura 19.	Flujo de envío de las cepas estudiadas en el Proyecto GONOVig desde cada centro participante al centro de referencia, así como las acciones realizadas en cada uno de ellos.....	92

Figura 20. Anexo con datos identificativos del paciente, centro participante, técnicas y resultados obtenidos de las mimas, cumplimentado para cada aislado a estudio.....	93
Figura 21. Características morfológicas de las colonias de <i>N. gonorrhoeae</i> tras 24 y 48 horas de crecimiento, en colonias con resultado negativo y positivo para la prueba de la β -lactamasa.....	96
Figura 22. Distribución de los aislados analizados obtenidos en los hospitales de la provincia de Valencia.....	114
Figura 23. Distribución de los aislados analizados obtenidos en los hospitales de la provincia de Alicante.....	114
Figura 24. Distribución de los aislados analizados obtenidos en los hospitales de la provincia de Castellón.....	115
Figura 25. Distribución por años de los aislados recogidos durante los dos periodos de estudio...	116
Figura 26. Sexo de los pacientes.....	117
Figura 27. Distribución de la población de estudio por rangos de edad y sexo.....	118
Figura 28. Distribución de las CMI observadas frente a azitromicina.....	120
Figura 29. Cepa <i>non-wild-type</i>	121
Figura 30. Porcentaje de aislados salvajes (WT) y no salvajes (NWT) frente a azitromicina obtenido en cada periodo de estudio.....	121
Figura 31. Evolución de la CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de azitromicina durante ambos periodos de estudio.....	122
Figura 32. Distribución de las CMI obtenidas frente a cefixima durante los dos periodos de estudio.....	123
Figura 33. Porcentaje de aislados sensibles y resistentes frente a cefixima durante los dos periodos de estudio, según criterios CLSI y EUCAST.....	124
Figura 34. Cepa resistente a cefixima.....	125
Figura 35. Número total de aislados sensibles y resistentes frente a cefixima durante todo el estudio, según criterios CLSI y EUCAST.....	125
Figura 36. Evolución de la CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de cefixima durante los dos periodos de estudio.....	126
Figura 37. Distribución de las CMI obtenidas frente a ceftriaxona durante los dos periodos de estudio.....	127
Figura 38. Porcentaje de aislados sensibles y resistentes frente a ceftriaxona durante los dos periodos de estudio, según criterios CLSI y EUCAST.....	128
Figura 39. Cepa resistente a ceftriaxona.....	129
Figura 40. Número total de aislados sensibles y resistentes frente a ceftriaxona durante todo el estudio, según criterios CLSI y EUCAST.....	129

Figura 41. Evolución de la CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de ceftriaxona durante los dos periodos de estudio.....	130
Figura 42. Distribución de las CMI obtenidas frente a ciprofloxacino durante los dos periodos de estudio.....	131
Figura 43. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a ciprofloxacino entre los dos periodos de estudio, según criterios CLSI.....	132
Figura 44. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a ciprofloxacino entre los dos periodos de estudio, según criterios EUCAST.....	133
Figura 45. Distribución de las CMI obtenidas frente a espectinomicina durante los dos periodos de estudio.....	134
Figura 46. Distribución de las CMI obtenidas frente a tetraciclina durante los dos periodos de estudio.....	135
Figura 47. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a tetraciclina entre los dos periodos de estudio, según criterios CLSI.....	136
Figura 48. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a tetraciclina entre los dos periodos de estudio, según criterios EUCAST.....	137
Figura 49. Distribución de las CMI obtenidas frente a penicilina durante los dos periodos de estudio.....	138
Figura 50. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a penicilina entre los dos periodos de estudio, según criterios CLSI.....	139
Figura 51. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a penicilina entre los dos periodos de estudio, según criterios EUCAST.....	139
Figura 52. Porcentaje de cepas productoras de β -lactamasa.....	140
Figura 53. Tasa de resistencia combinada observada a diferentes asociaciones de antimicrobianos, según criterios CLSI y EUCAST.....	141
Figura 54. Distribución de secuenciotipos observados en cepas <i>non-wild-type</i> (NWT) frente a la azitromicina (CMI >1mg/L).....	151
Figura 55. Distribución de los secuenciotipos observados en cepas con resistencia frente a cefixima.....	152
Figura 56. Distribución de los alelos <i>tbpB</i> observados en cepas con resistencia frente a cefixima.....	153
Figura 57. Distribución de los secuenciotipos observados en cepas con resistencia frente a ceftriaxona.....	154
Figura 58. Distribución de los secuenciotipos más frecuentemente observados en cepas con resistencia a ciprofloxacino.....	155

Figura 59. Distribución de los secuenciotipos con más frecuencia observados en cepas con resistencia a tetraciclina.....	156
Figura 60. Distribución de los secuenciotipos mayoritarios en cepas con resistencia o sensibilidad intermedia a penicilina.....	157
Figura 61. Sensibilidad antimicrobiana de los nuevos secuenciotipos analizados.....	159
Figura 62. Procedencia de las muestras estudiadas de RedMIVA con resultado positivo para gonococo y analizadas durante el periodo 2013 - 2019.....	161
Figura 63. Distribución de pacientes con gonorrea por sexo.....	161
Figura 64. Tipos de muestras y porcentaje de las mismas con resultado positivo para <i>N. gonorrhoeae</i>	163
Figura 65. Casos positivos y pruebas diagnósticas utilizadas durante los años 2013 - 2019.....	164
Figura 66. Evolución de los casos positivos de gonorrea detectados en la Comunidad Valenciana.....	165
Figura 67. Evolución de la incidencia de la infección gonocócica en la Comunidad Valenciana durante el periodo 2013 – 2019.....	166
Figura 68. Evolución de la incidencia de la infección gonocócica desglosada por provincias durante el periodo 2013 – 2019.....	167
Figura 69. Evolución de la resistencia a azitromicina durante los años 2014 – 2019.....	168
Figura 70 Evolución de la CMI ₅₀ y CMI ₉₀ (mg/L) de azitromicina durante los años 2014 – 2019.....	169
Figura 71. Evolución de la resistencia a cefixima durante los años 2015 – 2019.....	170
Figura 72. Evolución de la CMI ₅₀ y CMI ₉₀ (mg/L) de cefixima durante los años 2015 – 2019.....	171
Figura 73. Evolución de la resistencia a ceftriaxona durante los años 2015 – 2019.....	172
Figura 74. Evolución de la CMI ₅₀ y CMI ₉₀ (mg/L) de ceftriaxona durante los años 2015 - 2019.....	173
Figura 75. Evolución de la resistencia a ciprofloxacino durante los años 2013 – 2019.....	174
Figura 76. Distribución de las CMI obtenidas en 398 cepas de gonococo frente a espectinomicina.....	175
Figura 77 Evolución de la resistencia a tetraciclina durante los años 2013 – 2019.....	176
Figura 78. Evolución de las cepas resistentes e intermedias frente a penicilina durante los años 2013 – 2019.....	177
Figura 79. Distribución de las CMI obtenidas en 197 cepas de gonococo frente a gentamicina.....	178
Figura 80. Distribución de las CMI obtenidas en 170 cepas de gonococo frente a fosfomicina.....	179
Figura 81. Evolución del tratamiento utilizado frente a <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	195

Figura 82.	Distribución de las CMI obtenidas frente a azitromicina, distinguiendo aquellas cepas salvajes (<i>wild-type</i>) o sin presencia de mutaciones, de las cepas no salvajes (<i>mutant</i>) que presentaron las mutaciones C2611T (A) y A2059G (B) del RNAr 23S.....	202
Figura 83.	Distribución de las CMI de azitromicina obtenidas en los 15.496 aislados de gonococo estudiados por el GISP entre los años 2014 - 2016.....	203
Figura 84.	Países participantes en el estudio de susceptibilidad antibiótica europeo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Euro-GASP) y porcentaje de resistencia observado frente a cefixima en el año 2017.....	206
Figura 85.	Distribución de las CMI frente a cefixima presentada en el informe anual europeo del año 2017.....	207
Figura 86.	Distribución de las CMI frente a ceftriaxona presentada en el informe anual europeo del año 2017.....	210
Tabla 1.	Características bioquímicas de microorganismos Gram negativos, oxidasa positivos....	43
Tabla 2.	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos actualmente aprobadas por la FDA para la identificación de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	44
Tabla 3.	Número de casos confirmados y ratio por cada 100.000 habitantes registrados en el conjunto de países europeos. Periodo 2013 – 2017.....	50
Tabla 4.	Distribución por edad y sexo de la población española infectada de gonococo en el año 2018.....	56
Tabla 5.	Número total de habitantes en los 24 departamentos de salud de la Conselleria de Sanitat durante el año 2018.....	85
Tabla 6.	Antibióticos testados frente a <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y rangos de concentraciones presentes en la tiras de E-test.....	100
Tabla 7.	Antibióticos testados y CMIs establecidas para el control de calidad realizado mediante la cepa <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 49226 ATCC.....	101
Tabla 8.	Puntos de corte de los diferentes antimicrobianos y clasificación de los aislados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en función de su CMI, atendiendo criterios CLSI y EUCAST.....	103
Tabla 9.	Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen <i>porB</i>	107
Tabla 10.	Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen <i>tbpB</i>	107
Tabla 11.	Cepas aportadas por cada centro participante del proyecto GONOVig.....	113
Tabla 12.	Secuenciotipos y número de aislados en los que fueron identificados, frecuencia y alelos que los componen.....	143

Tabla 13.	Secuenciotipos más frecuentes encontrados en el proyecto GONOVig.....	145
Tabla 14.	Genogrupos principales encontrados durante el estudio.....	146
Tabla 15.	Resultados obtenidos de la caracterización molecular de las cepas no clasificables según la base de datos de NG-MAST, así como sexo, edad y hospital de procedencia de los pacientes.....	147
Tabla 16.	Sensibilidad frente a azitromicina (AZM), cefixima (CFM), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE), penicilina (P), sexo masculino (M) o femenino (F), hospital y año de recogida de aquellos aislados pertenecientes a los secuenciotipos más frecuentes en nuestro estudio.....	148
Tabla 17.	Secuenciotipos encontrados en cepas con resistencia plasmídica a la penicilina (PPNG).....	158
Tabla 18.	Edad media, desviación estándar, rango de edades y total de pacientes analizados en sujetos masculinos, femeninos y así como en conjunto.....	162
Tabla 19.	Número de casos positivos, población y tasa de incidencia estimada por cada 100.000 habitantes y por año de estudio en el conjunto de la Comunidad Valenciana.....	166
Tabla 20.	Número de cepas analizadas y reportadas al Euro-GASP durante los años 2013 – 2017 por los diferentes países europeos, y número de cepas analizadas y reportadas en España notificadas en estos informes.....	199
Tabla 21.	Número y porcentaje de cepas resistentes a cefixima, azitromicina, ciprofloxacino y productoras de β -lactamasa (PPNG) provenientes de España, notificadas en los informes presentados por el Euro-GASP durante los años 2013 - 2017.....	200

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *NEISSERIA GONORRHOEAE*

1.1.1. Consideraciones iniciales

Las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) constituyen un problema real de salud pública a nivel mundial debido, fundamentalmente, a la alta prevalencia así como al aumento persistente de su incidencia en las últimas décadas. Las complicaciones y secuelas que acarrearán son especialmente graves si no se diagnostican y tratan rápida y correctamente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que, tan solo en el año 2016, se produjeron más de 376 millones de nuevas ITS, lo que supone que, cada día, más de 1 millón de personas contraen una infección de transmisión sexual (1). Por este motivo, en la 69ª Asamblea Mundial de la Salud organizada por la OMS, se adoptaron importantes estrategias mundiales aplicadas durante el periodo comprendido entre los años 2016 y 2021 con el objeto de controlar y disminuir el conjunto de ITS (2).

Existen más de 30 bacterias, virus y parásitos que se transmiten por contacto sexual, aunque tan solo 8 de estos patógenos son causantes de la mayoría de las ITS que se reportan en el mundo. Así pues, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* y *Trichomonas vaginalis* producen infecciones curables (3), mientras que el virus de la hepatitis B (VHB), el virus del herpes simple (VHS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del papiloma humano (VPH), producen infecciones que, a día de hoy, se consideran incurables.

En el caso concreto de la gonorrea, esta supone la segunda ITS de etiología bacteriana más prevalente, estimándose en 86 millones los nuevos contagios producidos en el año 2016 (4) frente a los 78 millones reportados por la OMS en el año 2012 (5), confirmándose así el persistente y alarmante aumento de su incidencia en todo el mundo. Dichas cifras, en adición, pueden estar infraestimadas debido al desconocimiento del número real de personas infectadas que permanecen asintomáticas, las cuales contribuyen a la continua diseminación de la infección

gonocócica. Tan solo en Estados Unidos, en el año 2017 se produjeron 555.608 nuevos casos de infecciones por *Neisseria gonorrhoeae*, dato que supone un incremento del 18,6% respecto al año 2016, y un aumento del 75,2% respecto al año 2009 (6).

Neisseria gonorrhoeae posee unas características innatas que le han permitido desarrollar, a lo largo de la historia, resistencia a todos los antimicrobianos utilizados para combatir su infección (7). En este sentido, en los últimos años se han documentado fracasos terapéuticos a los antibióticos considerados hasta el momento de “primera línea”, las cefalosporinas de amplio espectro de acción (ESC), como son la ceftriaxona y la cefixima (8)(9)(10)(11). Este hecho es síntoma inequívoco de que están apareciendo cepas circulantes de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a las mismas.

Por esta razón, las sociedades americana (12), europea (13) e inglesa (14) entre otras, recomiendan en sus guías actualizadas para el tratamiento empírico de la infección gonocócica la utilización de una terapia combinada, basada en una cefalosporina de tercera generación (C3G), cefixima o ceftriaxona, junto con un macrólido de segunda generación, la azitromicina. Ello es debido a que la asociación de fármacos con diferente mecanismo de acción es considerada una estrategia eficaz en la erradicación de microorganismos altamente resistentes.

No obstante, y de forma similar a lo ocurrido en el pasado, en el año 2018 se detectaron los primeros fracasos terapéuticos a dicha terapia combinada limitando, cada vez más, el arsenal terapéutico del que disponemos en la actualidad para combatir el gonococo (15)(16)(17). Así pues, esta terapia dual podría no ser efectiva en un futuro no muy lejano, convirtiendo al agente causal de la gonorrea en un microorganismo polifarmacorresistente y pasando a considerarse la gonococia, por tanto, una infección incurable.

En adición, el abuso en la utilización de antibióticos tanto en animales como en humanos favorece la disminución de la eficacia del régimen actual establecido. En el caso concreto de España, y a pesar de los esfuerzos realizados en los últimos años para la disminución del consumo de antimicrobianos, este sigue siendo uno de los países occidentales que más antibióticos consume en todo el mundo (18). Por otro lado, el

hecho de que dicho tratamiento combinado no siempre está disponible en los países en vías de desarrollo, donde la gonorrea tiene una mayor prevalencia y los recursos para la educación y vigilancia epidemiológica de las ITS son escasos, condiciona también el desarrollo de las temidas resistencias antibióticas.

El surgimiento de cepas multirresistentes (MDR) de *Neisseria gonorrhoeae*, actualmente catalogada como “superbacteria”, conllevará la aparición cada vez más frecuente de nuevos fracasos terapéuticos. Este escenario, sumado a la ausencia de vacunas efectivas, nos obliga a buscar métodos de diagnóstico fiables y accesibles así como nuevos agentes y regímenes de tratamiento eficaces contra el gonococo, proceso que requiere de un elevado coste económico.

Por todo ello, es necesario establecer programas de control de la gonorrea con el fin de poder monitorizar los patrones de sensibilidad antibiótica en diferentes áreas geográficas del mundo. Solo así, será posible mantener actualizadas las guías de tratamiento en los diferentes lugares en función de las cepas allí encontradas.

Estudiar los mecanismos fenotípicos y genotípicos de sensibilidad antibiótica es por tanto una herramienta necesaria para combatir dicha infección, anticiparse a la generación de aislados resistentes y determinar dianas terapéuticas que posibiliten encontrar nuevos fármacos efectivos.

Los estudios de epidemiología molecular nos proporcionarán información valiosa para entender los mecanismos de transmisión de *N. gonorrhoeae* así como la transferencia de dicho patógeno entre la población, hecho especialmente importante en aquellas redes de alto riesgo. Todo ello con el objeto de establecer planes de actuación que nos permitan intervenir en la idiosincrasia de estos mecanismos y así evitar su diseminación incontrolada.

Es por ello que, en el presente estudio, se pretende analizar los patrones de sensibilidad antibiótica de *Neisseria gonorrhoeae*, así como caracterizar molecularmente los aislados obtenidos en diferentes hospitales representativos de la Comunidad Valenciana durante el periodo 2013 – 2018.

1.1.2. Historia de la enfermedad gonocócica

La gonorrea, enfermedad producida por *N. gonorrhoeae*, conocida también con los nombres de "blenorragia", "purgaciones" o "gota militar", constituye una infección persistente desde inicios del siglo XIX, con incrementos y disminuciones periódicas en su epidemiología, considerándose en la actualidad una de las enfermedades bacterianas más prevalentes en los seres humanos. Esta entidad que data desde la antigüedad, es hoy una de las ITS que afecta a más personas cada año a nivel mundial.

La gonorrea fue estudiada ya en tiempos de Galeno (siglo II a.C.), quien la denominó con las palabras griegas *gonor* ("semen") y *rhoia* ("flujo"), para sugerir que la enfermedad estaba relacionada con el flujo de semen. También se encontraron referencias a esta infección en el Antiguo Testamento y en historias escritas de varias culturas. Aunque fue reconocida como ITS en el siglo XIII, la gonorrea no se distinguió de la sífilis hasta mediados del siglo XIX.

En 1897, Albert Neisser, médico y bacteriólogo de la Universidad de Breslau, Alemania, observó por primera vez *Neisseria gonorrhoeae*, el agente etiológico de la gonorrea, en exudados purulentos del aparato genital y de la conjuntiva. El aislamiento previo del microorganismo, la inoculación en voluntarios humanos y su reisolamiento por Bumm en el año 1885, permitieron establecer la relación causal entre el microorganismo y la enfermedad.

1.1.3. Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Neisseria gonorrhoeae* ha variado desde que fuera publicada por primera vez en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* en 1984 (19).

Actualmente, *Neisseria gonorrhoeae* se ubica en el Dominio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Clase: Beta Proteobacteria; Orden: *Neisseriales*; Familia: *Neisseriaceae*; Género: *Neisseria*; Especie: *Neisseria gonorrhoeae* (20).

Tres géneros con relevancia médica se hallan en la familia *Neisseriaceae*: *Neisseria*, *Eikenella* y *Kingella*. Los restantes géneros incluidos en esta familia rara vez originan enfermedad en el ser humano.

El género *Neisseria* engloba 28 especies, con 12 especies detectadas en el ser humano, dos de las cuales, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*, son patógenas estrictas del ser humano (21) tal y como se muestra en la Figura 1. Es por ello que, la presencia de estas dos bacterias en una muestra clínica siempre se considera significativa.

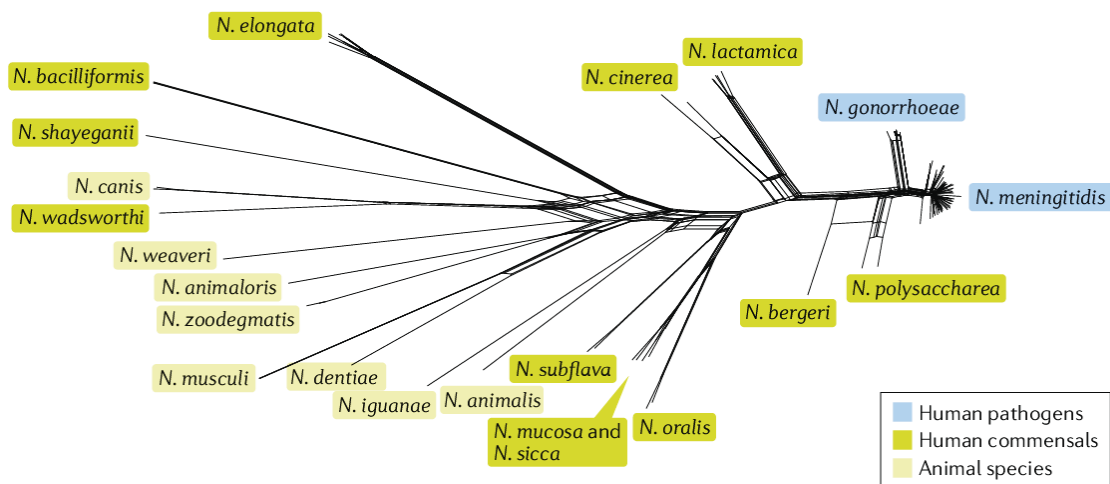


Figura 1. Árbol filogenético de las relaciones existentes dentro del género *Neisseria* (22).

1.1.4. Fisiología y estructura

1.1.4.1. Características microbiológicas

Las especies de *Neisseria* son bacterias Gram negativas aerobias, normalmente con forma cocoide (diámetro comprendido entre 0,6 y 1 μm), que se disponen en parejas (diplococos) cuyos lados adyacentes se aplanan para adoptar una morfología semejante a la de un grano de café. Todas las especies son oxidasa positiva, y casi

todas sintetizan catalasa, enzima que degrada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno (O_2), propiedades que, junto a la morfología en la tinción de Gram, hacen posible la identificación rápida ante la sospecha de su presencia en una muestra clínica.

Neisseria gonorrhoeae es un microorganismo aerobio o anaerobio facultativo, inmóvil, no capsulado y que no produce esporas. Entre otras características referentes al metabolismo de los hidratos de carbono cabe destacar que dicha bacteria produce ácido tras la oxidación de la glucosa, a diferencia de levaduras y bacterias anaerobias que lo hacen por fermentación. Otros carbohidratos no son oxidados por dicha especie, por lo que dicho patrón de utilización de carbohidratos es útil en la diferenciación de las cepas patógenas de otras especies de *Neisseria*.

Las especies no patógenas de *Neisseria* crecen en agar sangre y agar nutriente (medio general para bacterias sin requerimientos nutricionales exigentes) incubado a una temperatura de 35°C a 37°C. Por el contrario, *N. gonorrhoeae* no crece en este medio ya que posee unos requerimientos nutricionales complejos. Todas las cepas de *N. gonorrhoeae* requieren cistina y una fuente de energía (como por ejemplo glucosa, piruvato o lactato) y muchas cepas han de ser complementadas con medios enriquecidos con aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. También se añade almidón soluble a dichos medios de cultivo con el fin de neutralizar el efecto tóxico de los ácidos grasos.

Por tanto, *N. gonorrhoeae* no crece en el agar sangre, pero sí lo hace en el agar chocolate y otros medios de cultivo complementados. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 35°C y 37°C, resultando dicho proceso complejo a temperaturas inferiores. Una atmósfera complementada con dióxido de carbono al 5% es necesaria para el crecimiento de *N. gonorrhoeae*, o lo favorece.

Aunque la naturaleza exigente de este microorganismo hace difícil su recuperación de las muestras clínicas, su transmisión por vía sexual de una persona a otra es extremadamente sencilla.

1.1.4.2. Estructuras de superficie

Las siguientes estructuras están relacionadas con la adherencia, la penetración tisular y celular, la citotoxicidad y la evasión del sistema inmunitario del hospedador (23)(24).

Membrana externa

La conformación de la pared celular de *N. gonorrhoeae* es la habitual de las bacterias Gram negativas, ya que incluye una envoltura celular compuesta por tres capas; la membrana citoplasmática, la pared celular formada por el peptidoglucano y una membrana externa constituida por el lipooligosacárido (LOS), fosfolípidos y diversas proteínas.

Este LOS conforma un antígeno destacado de la pared celular del patógeno, el cual se compone de lípido A y de una región central del oligosacárido. No obstante, dicho LOS carece del antígeno polisacárido O habitualmente presente en bacilos Gram negativos, el cual es denominado LPS. La adición de ácidos siálicos a los glúcidos del núcleo del LOS protege los epítomos tanto de este como de las porinas presentes en el gonococo, característica que confiere resistencia frente a los anticuerpos bactericidas. En adición, estos glúcidos sufren con frecuencia variaciones antigénicas que pueden contribuir a la patogenia de la infección. El grupo del lípido A posee actividad de endotoxina.

N. gonorrhoeae libera de manera espontánea porciones de la membrana externa durante su crecimiento rápido. Estas porciones contienen LOS y proteínas de superficie, y pueden favorecer la toxicidad mediada por la endotoxina y proteger a las bacterias en fase de replicación mediante la captación de anticuerpos frente a proteínas.

La superficie externa de *N. gonorrhoeae* no se encuentra recubierta de una verdadera cápsula de carbohidratos. Sin embargo, la superficie celular de *N. gonorrhoeae* tiene una carga negativa de tipo capsular.

Pilis.

Las cepas patógenas y no patógenas de *Neisseria* poseen pilis que se extienden desde la membrana citoplasmática hacia la membrana externa. Estos pilis están compuestos por subunidades proteicas repetidas (pilinas), cuya expresión está controlada por el conjunto de genes *pil*.

Este pili o fiambriae interviene en diversas funciones, como la unión a las células del hospedador, la transferencia de material genético y la movilidad, siendo las más importantes las fimbrias tipo IV. La presencia de estas estructuras en *N. gonorrhoeae* parece revestir una gran importancia en su capacidad patógena. Así pues, la expresión de los pilis se asocia a la virulencia de dicho microorganismo, ya que estos intervienen en la adhesión a las células epiteliales no ciliadas a la vez que proporcionan un mecanismo de resistencia ante la destrucción mediada por los neutrófilos.

Las pilinas son proteínas que tienen una región conservada en el extremo aminoterminal y una región hipervariable en el extremo carboxiterminal expuesto. La porción carboxiloterminal de las pilinas puede fosforilarse y glucosilarse, asociándose a una segunda proteína denominada PilC. Esta última, favorece la generación de diversidad antigénica de las pilinas presentes en el gonococo.

Dicho proceso, conocido como variación antigénica de fase, contribuye a burlar el sistema inmunológico del hospedador (25). Esta heterogeneidad en las pilinas del gonococo dificulta la posibilidad de desarrollar una vacuna eficaz frente a *N. gonorrhoeae*.

Porinas.

En la membrana externa se localizan otra importante familia de proteínas, las porinas. Con un peso molecular de 32 a 36 kD, representan un grupo de proteínas integrales de dicha membrana externa de naturaleza hidrófoba que forman poros o

canales para permitir el paso de nutrientes al interior de la célula, así como para facilitar la salida de los productos de desecho.

N. gonorrhoeae posee dos genes que codifican para estas porinas, *porA* y *porB*, siendo sus productos génicos las proteínas *porA* y *porB*, respectivamente. Ambas proteínas se expresan en *Neisseria meningitidis*, no siendo así en el caso de *N. gonorrhoeae*, cuyo gen *porA* se encuentra silenciado.

En consecuencia, *porB* conforma alrededor del 60% de las proteínas de la membrana externa del gonococo, constituyendo la principal proteína de dicha membrana externa. Es por ello que *N. gonorrhoeae* requiere que la porina *porB* funcione correctamente para permitir su supervivencia.

A primera vista, esta peculiaridad podría ser una diana lógica para conseguir desarrollar una vacuna eficaz contra el gonococo. Sin embargo, *porB* se expresa en forma de dos clases diferentes de antígenos, conocidos con los nombres de *porB1A* y *porB1B*, hecho que confiere un gran número de variantes serológicas y dificulta enormemente este propósito.

Por su parte, las cepas que expresan *porB1A* se han relacionado con mayor capacidad de resistencia del gonococo al efecto bactericida del suero humano y, consecuentemente, mayor capacidad de generar bacteriemia.

Por tanto, aunque todos los gonococos expresan la proteína *porB* y esta podría constituir una de las principales dianas para el desarrollo de la vacuna antigonocócica, la gran cantidad de variantes antigénicas posibles en dicho polipéptido obstaculizan el uso de esta proteína en el desarrollo de inmunidad artificial que nos permita protegernos frente al gonococo.

Así mismo, *porB* representa un componente destacado en la capacidad de virulencia de *N. gonorrhoeae*, ya que esta proteína bloquea la desgranulación de los leucocitos polimorfonucleados del huésped. Esto significa que se opone a la fusión del fagolisosoma que comportaría la destrucción de las bacterias intracelulares, hecho que

confiere protección al microorganismo frente a la respuesta inflamatoria del hospedador.

Además, la proteína porB junto con otras adhesinas facilita la invasión de las células epiteliales y, algunos antígenos aquí expresados, inhiben también la destrucción sérica del gonococo mediada por el sistema del complemento.

Proteínas Opa

Las proteínas Opa o de opacidad, son una familia de proteínas con un peso molecular de 20 a 28 kD insertadas en la membrana externa del gonococo. Intervienen en la unión con las células epiteliales y las células fagocíticas, y desempeñan una importante función en la señalización intercelular y evasión del sistema inmune.

El nombre de dichas proteínas deriva del característico aspecto opaco que muestran las cepas de *N. gonorrhoeae* que expresan dichas proteínas Opa. Las colonias opacas se presentan con más frecuencia en pacientes con enfermedad localizada (como endocervicitis, uretritis, faringitis, proctitis) mientras que las colonias transparentes se asocian principalmente a enfermedad inflamatoria pélvica y a infecciones diseminadas.

Proteínas Rmp

El siguiente grupo de proteínas presentes en la membrana externa del gonococo son unas moléculas altamente conservadas, las proteínas Rmp o proteínas de reducción modificable. Estas proteínas inhiben los anticuerpos bloqueantes presentes en el huésped, evitando su actividad bactericida frente a las neisserias patógenas. Se cree que pueden estar relacionadas con los fenómenos de reinfección con *N. gonorrhoeae* que se producen en algunos pacientes.

Proteínas para la captación de hierro

El gonococo presenta requerimientos nutricionales complejos. Además de zinc y manganeso, el hierro es un elemento fundamental en el desarrollo y metabolismo de

N. gonorrhoeae, pues su carencia provoca disminución de la respiración celular así como problemas en la replicación del DNA.

Para conseguir dicho mineral, este patógeno es capaz de competir con el hospedador por sus reservas de hierro. Este proceso lo lleva a cabo adhiriéndose a la transferrina humana mediante ciertos receptores presentes en la superficie bacteriana, y utilizando como nexo las proteínas *tbpA* y *tbpB* (26). Es probable que la especificidad de unión a la transferrina del huésped constituya el motivo principal por el cual *N. gonorrhoeae* es un patógeno estricto del ser humano. Dicho requerimiento, exclusivo de este patógeno, no lo es sin embargo en otras bacterias capaces de sintetizar pequeñas moléculas denominadas sideróforos, las cuales permiten obtener el mineral mediante un proceso de quelación de átomos de hierro.

Igualmente, los gonococos poseen un amplio abanico de receptores superficiales específicos así como proteínas capaces de obtener hierro del hospedador que le permiten unirse a la lactoferrina (*lbpA*, *lbpB*), a la hemoglobina (*hmbR*) o al complejo hemoglobina - haptoglobina (*hpuAB*).

Proteasas

N. gonorrhoeae sintetiza un enzima denominado proteasa de IgA_1 , cuya función es la destrucción de dicha inmunoglobulina. La IgA_1 es un anticuerpo abundante en mucosas, lugar de infección del gonococo, que forma parte del sistema inmunitario del huésped en el proceso de defensa frente a dicho patógeno. La función de esta proteasa es escindir la región bisagra de la IgA_1 , generando fragmentos *Fc* y *Fab* inmunológicamente inactivos.

Algunas cepas de *N. gonorrhoeae* también poseen β -lactamasas obtenidas mediante transmisión plasmídica, las cuales son capaces de degradar antibióticos β -lactámicos como la penicilina.

1.1.5. Patogenia e inmunidad

Conocer los mecanismos que utiliza el gonococo para interactuar y evadir el sistema inmune del hospedador resulta imprescindible en la prevención de nuevas infecciones, así como para controlar su diseminación en diferentes áreas geográficas, implementar nuevos métodos diagnósticos y desarrollar vacunas o tratamientos eficaces (27).

Neisseria gonorrhoeae, a diferencia de *Neisseria meningitidis*, requiere de contacto directo para su transmisión. Como se ha comentado, se trata de un patógeno primario, exclusivamente humano, y que causa fundamentalmente uretritis en hombres y cervicitis en mujeres. Esto es debido a que muestra preferencia por las mucosas genitales, aunque es capaz de infectar otras localizaciones anatómicas como el recto, la faringe o la conjuntiva (28)(29)(30).

Tras un contacto sexual con una persona infectada, el riesgo de desarrollar la infección es mayor en mujeres que en hombres, hecho que se debe a las diferencias anatómicas entre ambos sexos (31)(32). En el caso de las mujeres, la probabilidad de adquirir la infección después de un único contacto con un hombre infectado es del 50%, mientras que los hombres presentan un riesgo de contraer la infección gonocócica de alrededor del 20% tras tener un único contacto con una mujer infectada. No obstante, dicho porcentaje aumenta hasta el 80% tras cuatro exposiciones.

El principal reservorio del gonococo son las personas que presentan infecciones asintomáticas. En algunas ocasiones, los síntomas ceden en el transcurso de unas semanas en aquellos individuos con enfermedad no tratada, estableciéndose entonces el estado de portador asintomático. Dicho patógeno es capaz de fijarse a los espermatozoides, hecho que facilita su diseminación mediante el eyaculado masculino (33). La localización de la infección también condiciona el desarrollo de la infección indolente, siendo la gonorrea rectal y faríngea más frecuentemente asintomática que la genital.

La infección por *N. gonorrhoeae* suele ser localizada, y en hombres da lugar a una intensa respuesta inflamatoria asociada a una secreción purulenta característica de la uretritis gonocócica. En cambio, debido a diferencias anatómicas, la infección en mujeres resulta asintomática en un mayor número de ocasiones. No obstante, y al contrario de lo que se pensaba, recientes estudios demuestran que la gonorrea asintomática es prevalente en ambos sexos (34)(27)(35).

Así pues, una vez contraída la infección, los gonococos se adhieren y penetran en las células mucosas, son internalizados en vacuolas fagocíticas donde son capaces de evitar la muerte intracelular, replicarse y posteriormente migrar a los espacios subepiteliales. Tanto los pili tipo IV, el LOS, como las proteínas Opa y porB, intervienen en la fijación y la penetración del patógeno en las células del hospedador. Las fases de la infección provocada por *Neisseria gonorrhoeae* se resumen en la Figura 2.

Por su parte, el LOS gonocócico estimula la respuesta inflamatoria y la liberación del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el cual es responsable de la mayoría de los síntomas que se asocian a la enfermedad gonocócica. También se liberan citoquinas de carácter proinflamatorio, como la IL-6 e IL-8, que contribuyen enormemente en la generación de dicho ambiente inflamatorio.

La IgG₃ es el principal anticuerpo que se forma en el hospedador para combatir la infección gonocócica. Aunque la respuesta humoral contra la proteína porB es mínima, se detectan con facilidad anticuerpos séricos frente a la pilina, la proteína Opa y el LOS. Los anticuerpos que atacan a esta última molécula pueden activar el complemento, liberando el componente C5a del mismo, el cual ejerce un efecto quimioatractivo sobre los neutrófilos. Sin embargo, los anticuerpos IgG e IgA secretados y dirigidos contra la proteína Rmp pueden inhibir el desarrollo de la infección.

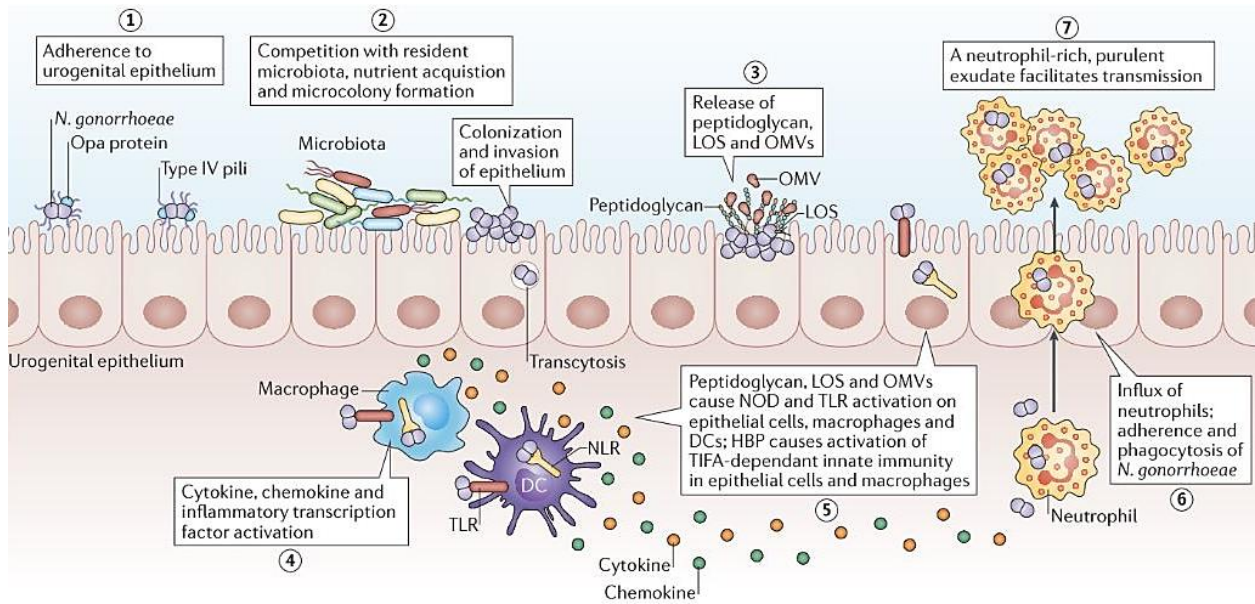


Figura 2. Fases de la infección causada por *Neisseria gonorrhoeae* (27).

En primer lugar, el gonococo se adhiere a las células epiteliales del huésped a través de las proteínas Opa y los pilis tipo IV, momento en el que se replica y comienza a formar microcolonias y biofilms compitiendo con la microbiota residente. Durante este proceso, invade y traspasa el epitelio mediante transcitosis.

En este punto, comienzan a liberarse fragmentos de peptidoglucano, lipooligosacárido (LOS) y vesículas de membrana externa (OMV). Este proceso activa receptores *Toll-like* (TLR) y proteínas con dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) que favorecen la secreción de citocinas proinflamatorias. Se inicia la liberación de heptosa-1,7-bisfosfato (HBP) y se activa la interacción entre proteínas con dominios asociados al receptor del TNF (TRAF) y relacionados con el sistema inmune (TIFA) en células epiteliales y macrófagos. Comienza entonces a reclutarse grandes cantidades de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el lugar de infección, que interactúan y fagocitan a *N. gonorrhoeae*.

Finalmente, se produce la salida de los PMN, constituyendo estos el exudado purulento característico de la gonorrea y que actúa facilitando la transmisión (27).

1.1.5.1. Desarrollo de vacunas

En el año 2014, la OMS estableció un plan para el desarrollo de vacunas frente a las principales ITS a nivel mundial (36). Los esfuerzos dedicados a la obtención de una vacuna antigonocócica son cada vez mayores, dada la amenaza creciente de las cepas de gonococo multirresistentes.

A pesar de la intensa respuesta inflamatoria que característicamente produce la infección por *N. gonorrhoeae* en el hospedador, el organismo no adquiere un mecanismo inmunitario de forma natural contra dicho microorganismo. Ello dificulta la comprensión del tipo de respuesta inmune que podría protegernos frente al gonococo.

Esta falta de inmunidad protectora se debe, principalmente, a la gran diversidad antigénica existente entre diferentes cepas gonocócicas. Este hecho explica también que, las personas con conductas sexuales de riesgo puedan padecer múltiples reinfecciones.

Entre las posibles opciones para el desarrollo de una vacuna frente al gonococo, se ha estudiado el uso de anticuerpos originados contra los antígenos de los pili, en concreto frente a la región variable del extremo carboxiterminal de las pilinas, porción inmunodominante de la molécula. Estos anticuerpos protegen de una posible reinfección por una cepa homóloga, pero la gran diversidad antigénica que presentan estas proteínas en distintas cepas conlleva una baja eficacia en este tipo de vacunas.

Otras estructuras de superficie contempladas como posibles candidatas son las porinas porB1A y porB1B. Estas se consideran lo suficientemente antigénicas como para desarrollar una vacuna (37). No obstante, a día de hoy no somos capaces de detectar anticuerpos frente a estas proteínas, como tampoco frente al lipooligosacárido (LOS) del gonococo.

Por otro lado, se están probando vacunas relacionadas con los sistemas de adquisición de nutrientes, tales como los receptores de la transferrina (tbpA y tbpB) o de la lactoferrina (lbpA y lbpB) relacionados con el metabolismo del hierro.

Otra alternativa son estructuras altamente conservadas de los sistemas que posee el gonococo para evadir la respuesta inmune. Ejemplo de ello es la bomba de expulsión MtrC-D-E o el enzima α -2,3-sialiltransferasa (Lst) encargado de sializar el LOS del gonococo, mecanismo que permite que este sea menos sensible a la acción de los leucocitos PMN del hospedador (38).

Otra posible diana es la nitrito reductasa (AniA) necesaria para la formación del biofilm y que permitiría al gonococo su supervivencia en condiciones anaerobias (39).

Estudios recientes sugieren que existe evidencia epidemiológica que demuestra que las vacunas contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B, las cuales basan su mecanismo de inmunización en el uso de las vesículas de la membrana externa (OMV), podrían ser también útiles para este propósito (40)(41).

La obtención de una vacuna contra el gonococo sería especialmente interesante para abordar el problema de la infección gonocócica en poblaciones de alta prevalencia, como son los países en vías de desarrollo o grupos sociales con elevado riesgo de contraer la infección, disminuir las comorbilidades asociadas tales como la infertilidad originada por la enfermedad inflamatoria pélvica, e impedir la alarmante diseminación de las cepas multirresistentes.

1.1.6. Sintomatología gonocócica

Como se ha explicado, la infección por *Neisseria gonorrhoeae* se produce casi de forma exclusiva por contacto sexual o perinatal, afectando sobre todo a las mucosas de la uretra y del cuello uterino y, con menor frecuencia, al recto, orofaringe y conjuntiva.

Los síntomas y signos de la infección varían según la localización de la infección así como del estado de salud del paciente, además de si este presenta coinfección con otros microorganismos causantes de ITS.

Uretritis

La infección genital en el hombre se restringe principalmente a la uretra. Tras un periodo de 2 a 8 días de incubación, aparece un exudado uretral característico acompañado de disuria, resultando sintomáticos hasta el 90% de los hombres. Dicha secreción uretral de inicio agudo es purulenta hasta en el 80% de la infecciones, diferenciándose de esta manera de las uretritis causadas por otros microorganismos. Aunque las complicaciones son infrecuentes, puede darse epididimitis, linfangitis, prostatitis y abscesos periuretrales (42).

En la exploración, además del exudado, se suele observar eritema y edema del meato uretral, y en varones no circuncidados puede apreciarse balanitis. La secreción uretral es más evidente cuando han pasado al menos 2 horas desde la última micción, que es el tiempo mínimo indicado para la adecuada toma de muestra. Si en la exploración no se observa exudado, este se puede obtener tras comprimir suavemente la uretra (43). No obstante, la sintomatología puede variar en función de factores dependientes tanto del microorganismo como del hospedador. Por ejemplo, algunas serovariedades porB1A se han asociado con mayor frecuencia a infecciones asintomáticas en hombres.

Cervicitis

El principal lugar de infección en mujeres es el cuello uterino, consecuencia de la adhesión de la bacteria a las células del epitelio cilíndrico del endocervix. Tras un periodo de incubación de 8 a 10 días, se puede producir un exudado cervicovaginal moderado, sangrado vaginal y/o dolor abdominal o pélvico. En contraposición, el microorganismo no puede infectar a las células del epitelio escamoso que recubre la vagina de las mujeres que han pasado la pubertad.

Entre el 50% y el 95% de las infecciones gonocócicas en mujeres pueden ser asintomáticas (44), y la no detección o el tratamiento inadecuado puede provocar complicaciones importantes. Las pacientes sintomáticas experimentan generalmente flujo vaginal, disuria y dolor abdominal, siendo estas manifestaciones de carácter más agudo e intenso que las causadas por *Chlamydia trachomatis*.

Hasta en un 14% de los casos no tratados en mujeres, la infección puede extenderse en sentido ascendente y originar enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), que incluye endometritis, salpingitis y peritonitis, muchas veces simultáneas e indiferenciables clínicamente entre sí, causando leucorrea, metrorragias, menorragias, dolor hipogástrico, fiebre y leucocitosis (45).

Además, puede propiciar problemas relacionados con la gestación como el aborto espontáneo, corioamnionitis, parto prematuro o afectación del feto. La infección gonocócica favorece la transmisión de otras ITS, incluyendo el VIH.

Infecciones anorectales

Producen prurito anal, dolor rectal, exudado purulento y tenesmo rectal, siendo la población de mayor prevalencia la de hombres que mantienen sexo con hombres (HSH). No obstante, tanto en hombres como en mujeres, más de la mitad de las infecciones rectales por *Neisseria gonorrhoeae* son asintomáticas, las cuales pueden dar lugar, en caso de no tratarse, a proctitis sintomáticas (46).

Infecciones faríngeas

Alrededor del 90% de estas infecciones pueden ser asintomáticas y, aproximadamente el 20% de las mujeres con gonorrea cervical, presentan coinfección con gonorrea faríngea. Esta infección también es frecuente en HSH y pacientes VIH positivos. Los síntomas incluyen eritema orofaríngeo, exudados y linfadenopatías cervicales.

La afectación faríngea puede remitir, pero también se ha relacionado con la diseminación hematógena de la infección. El diagnóstico suele realizarse de forma casual durante la realización de un cribado de ITS o en el estudio de contactos de un caso de gonococia (47).

Gonococcemia

Las infecciones diseminadas o septicemias junto con las infecciones de la piel y de las articulaciones son afecciones poco frecuentes que se observan entre el 1% y 3%

de los pacientes infectados con *Neisseria gonorrhoeae* (44), aunque constituye la causa más frecuente de artritis infecciosa en pacientes sexualmente activos previamente sanos. La mayor proporción de las septicemias se producen en mujeres debido a la asintomatología de algunas infecciones que padecen, y se relaciona con la menstruación, el tercio final del embarazo y la localización faríngea de la infección (48).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad diseminada son fiebre, artralgias migratorias, artritis supurativa de muñecas, rodillas y tobillos y un exantema pustular sobre una base eritematosa en las extremidades, ausente en cabeza y tronco. Las lesiones cutáneas tales como petequias, máculas, pápulas y vesículas están presentes hasta en el 75% de los pacientes con bacteriemia por gonococo.

Las articulaciones más frecuentemente afectadas son las muñecas, tobillos, manos y pies. Muy raramente puede evolucionar a perihepatitis (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis), meningitis o endocarditis (46).

Infección gonocócica en neonatos

La infección neonatal se produce como consecuencia de la exposición del feto al cérvix infectado de la madre, siendo las complicaciones más frecuentes la sepsis, conjuntivitis, meningitis y artritis (12), aunque también puede manifestarse como faringitis, rinitis, uretritis y raramente como neumonía.

La *ophthalmia neonatorum* es una conjuntivitis del recién nacido que este adquiere a su paso por el canal del parto. Se manifiesta a los 2 - 5 días del nacimiento con un exudado purulento abundante, inflamación palpebral, celulitis periorbitaria, queratitis y perforación del globo ocular que puede llevar a la ceguera.

La profilaxis consiste en administrar al recién nacido una aplicación de colirio o pomada oftálmica de eritromicina al 0,5% (o bien pomada oftálmica de tetraciclina al 1% o colirio de nitrato de plata al 1%) en cada ojo, tanto tras un parto vaginal como tras una cesárea (43).

1.1.7. Diagnóstico de laboratorio

1.1.7.1. Toma de muestra

La obtención de la muestra, su transporte y procesamiento revisten especial importancia en el diagnóstico de la infección gonocócica, especialmente cuando se realiza el cultivo, ya que *Neisseria gonorrhoeae* es muy sensible a las condiciones ambientales.

Dicho proceso dependerá de la clínica que presente el paciente, así como de sus prácticas sexuales y posible vía de infección. Por ello, en todos los casos deberá recogerse una muestra del tracto genital así como una segunda muestra si el paciente lleva a cabo prácticas sexuales orogenitales o anogenitales. En el caso de que exista sospecha de infección sistémica será necesario tomar una muestra sanguínea y realizar un hemocultivo (24).

Si se obtienen varias muestras de una misma localización anatómica, las torundas destinadas al cultivo deben recogerse en primer lugar con el objeto de obtener la máxima carga bacteriana posible. Actualmente se dispone de diversos hisopos comerciales con el medio de transporte adecuado para mantener la viabilidad del microorganismo hasta su procesamiento, aunque los escobillones flocados en medio de transporte líquido tipo Stuart-Amies presentan un alto porcentaje de recuperación debido a que las cortas fibras dispuestas de forma perpendicular garantizan una absorción máxima de la muestra y una buena elución en el medio líquido de transporte.

Dichas torundas han de introducirse de 2 a 3 cm en la uretra masculina y de 1 a 2 cm en el canal endocervical. Acto seguido, se han de rotar de 2 a 3 veces. Aunque el endocérvix es la zona más frecuente de infección en las mujeres, los cultivos rectales pueden ser las únicas muestras positivas en mujeres portadoras de infecciones asintomáticas, sucediendo de igual manera en hombres homosexuales o bisexuales.

Las condiciones de transporte pueden variar en función de la localización y el clima, por lo que la validación local de dichos requisitos de envío es necesaria para asegurar el correcto procesamiento de la muestra. No obstante, recientemente se ha demostrado que la conservación y supervivencia del gonococo es muy superior si los escobillones con medio de transporte se mantienen refrigerados a 4°C (49).

Es fundamental prestar atención a la obtención de dicha muestra, ya que el cometido del laboratorio consistirá en la detección del agente causal de la gonorrea en los especímenes genitales o extragenitales, bien a través de la detección directa del microorganismo teñido bajo el microscopio, tras la siembra en los medios de cultivo adecuados, o mediante la identificación de su material genético empleando técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos (TAAN).

El *Centers of Diseases Control and Prevention* (CDC) recomienda en mujeres el frotis vaginal para el diagnóstico mediante TAAN, ya que presenta la misma sensibilidad y especificidad que el exudado endocervical y permite la toma de la muestra por el propio paciente (50). En mujeres que, por su sintomatología se requiera un examen pélvico, el exudado endocervical tomado por el clínico será el más indicado. También es posible utilizar la parte inicial de la micción, aunque esta posee una sensibilidad un 10% inferior en comparación a la mostrada en muestras vaginales o endocervicales (43). En hombres, tanto la porción inicial de la micción como el escobillón uretral presentan rendimientos diagnósticos similares. Estas muestras, al no ser invasivas, facilitarán su recogida por parte del propio paciente.

1.1.7.2. Diagnóstico clásico

Microscopía

La observación en el exudado uretral de leucocitos PMN con diplococos Gram negativos intracelulares posee una elevada sensibilidad (>90%) y especificidad (98%) en la detección de las infecciones gonocócicas en hombres con uretritis purulenta cuando la lleva a cabo un observador experto. Sin embargo, su sensibilidad para

detectar la infección en los hombres asintomáticos es igual o menor al 60%. De la misma manera, esta prueba presenta un porcentaje de sensibilidad de entre el 40% y 60% en la detección de la cervicitis gonocócica tanto en mujeres sintomáticas como asintomáticas, aunque se considera fiable un resultado positivo si el microscopista con experiencia visualiza diplococos Gram negativos en el interior de los PMN.

Por tanto, la tinción de Gram se puede utilizar para diagnosticar de forma fiable las infecciones en los hombres con uretritis purulenta, mientras que todos los resultados negativos en mujeres y en hombres asintomáticos se deben confirmar.

La tinción de Gram también es útil en el diagnóstico precoz de la artritis purulenta, pero carece de sensibilidad para la detección de *N. gonorrhoeae* en los pacientes con lesiones cutáneas, infecciones anorrectales o faringitis. Las especies comensales de *Neisseria* de la orofaringe y las bacterias morfológicamente parecidas que residen en el aparato digestivo se pueden confundir con *N. gonorrhoeae*.

Cultivo

A pesar de que *N. gonorrhoeae* posee requerimientos nutritivos complejos, puede aislarse fácilmente a partir de muestras genitales cuando estas se obtienen y procesan de manera cuidadosa. Debido a que otros microorganismos comensales colonizan habitualmente las mucosas, todas las muestras genitales, rectales y faríngeas se deben inocular tanto en medios no selectivos (agar chocolate) como en medios selectivos (Thayer-Martin, Martin-Lewis o New York City), los cuales contienen agentes antimicrobianos como vancomicina, colistina y nistatina entre otros, que actúan inhibiendo el crecimiento de hongos y distintas bacterias contaminantes (51).

Es necesario utilizar también medios no selectivos debido a que algunas cepas de gonococo que necesitan para su crecimiento arginina, hipoxantina y uracilo, son inhibidas por la vancomicina o trimetropim presente en la mayor parte de los medios selectivos. El desarrollo de estos microorganismos se ve dificultado, igualmente, por los ácidos grasos y por los restos de metales presentes en dichos ácidos grasos, en los hidrolizados de peptona y en el agar de los medios de crecimiento habituales (agar sangre, agar nutritivo).

Los gonococos, altamente lábiles a las condiciones externas, mueren muy rápidamente si las muestras se dejan secar. Por tanto, se debe evitar la desecación y las bajas temperaturas realizando la inoculación directa de la muestra en un medio atemperado en el momento en que se recoge la muestra, o mediante la conservación en los medios tipos Stuart-Amies anteriormente mencionados. Las muestras se deben incubar a 35 - 37°C durante 48 - 72 horas en microaerofilia y en atmósfera al 5% de CO₂. No debe prolongarse la incubación más de 72 horas ya que las colonias pueden desaparecer al tercer día por autólisis.

En los pacientes con enfermedad diseminada, los hemocultivos suelen ser positivos para *N. gonorrhoeae* únicamente durante la primera semana de la infección. Además, las muestras de sangre han de ser procesadas de un modo específico con el fin de asegurar la recuperación correcta de los gonococos, debido a que los conservantes habitualmente presentes en los medios de los hemocultivos pueden ser tóxicos para *Neisseria*.

Los cultivos de muestras articulares son positivos para gonococo si estas se recolectan en el momento en que aparece la artritis. Los cultivos de muestras dermatológicas acostumbran a ser negativos.

Como conclusión, el cultivo de *N. gonorrhoeae* es económico, altamente específico y sensible, siempre y cuando las condiciones de toma y transporte de la muestra sean las adecuadas. Su principal ventaja, como después desarrollaremos, es que permite el estudio de la sensibilidad antimicrobiana así como la caracterización molecular si fuera necesaria.

1.1.7.3. Identificación

El gonococo puede crecer formando colonias con diferente morfología. Una vez aislado el microorganismo, la identificación presuntiva se realiza mediante la

observación en la tinción de Gram de diplococos Gram negativos, los cuales resultan positivos en las pruebas de la citocromo oxidasa y catalasa.

No obstante, la identificación definitiva requiere el estudio bioquímico basado en el patrón de oxidación de los carbohidratos y otras pruebas seleccionadas (Tabla 1).

Species	Acid from					Nitrate reduction	Polysaccharide from sucrose	Superoxol
	Glucose	Maltose	Sucrose	Fructose	Lactose			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+*	-†	-	-	-	-	-	Strong (4+) positive 'explosive'
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	-	-	-	-	Weak (2+) positive
<i>Kingella denitrificans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Neisseria cinerea</i>	-	-	-	-	-	-	-	Weak (2+) positive
<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>subflava</i>	+	+	-	-	-	-	-	Weak (2+) positive
<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>flava</i>	+	+	-	+	-	-	-	Weak (2+) positive
<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>perflava</i>	+	+	+	+	-	-	+	Weak (2+) positive
<i>Neisseria sicca</i>	+	+	+	+	-	-	+	Weak (2+) positive
<i>Neisseria mucosa</i>	+	+	+	+	-	+	+	Weak (2+) positive
<i>Neisseria flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	+	Weak (2+) positive

*+ most strains positive; †- most strains negative.

Tabla 1. Características bioquímicas de microorganismos Gram negativos, oxidasa positivos (51).

Desde hace unos años, es posible utilizar la espectroscopia de masas conocida como *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) para identificar las bacterias como *N. gonorrhoeae* tomando colonias directamente del medio de cultivo. El resultado obtenido se considera la “huella dactilar” espectral determinada de un solo microorganismo.

Dicho método ha sido aceptado para la identificación del gonococo (52) demostrando un valor predictivo positivo (VPP) del 99,3% (53). No obstante, los resultados han de interpretarse con cautela debido a las similitudes entre el agente etiológico de la gonorrea y las especies comensales de *Neisseria* aisladas en zonas extragenitales, especialmente aquellas presentes en la orofaringe (54).

Pruebas basadas en los ácidos nucleicos (TAAN)

Se han desarrollado pruebas de amplificación de los ácidos nucleicos (TAAN) específicas de *N. gonorrhoeae* para su detección directa en muestras clínicas, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las pruebas de este tipo son altamente sensibles (>95%) y específicas (>99%), además de rápidas, ya que los resultados están disponibles en 1 o 2 horas. Además, tal y como se muestra en la Tabla 2, existen gran cantidad ensayos de TAAN comerciales aprobados por la FDA que detectan *Neisseria gonorrhoeae* en una sola reacción. También existen actualmente ensayos PCR multiplex que permiten, simultáneamente, la detección de los agentes causales de las ITS más prevalentes (55).

Assay (Company)	Ng Targets	Cleared Specimen Types
Abbott RealTime CT/NG (Abbott)	Opa gene	Women: urine, swabs (vaginal, endocervical) Men: urine, urethral swab
cobas CT/NG (Roche)	Two different targets in the DR 9 region	Women: urine, swabs (vaginal, endocervical) Men: urine
APTIMA Combo 2 Assay (Hologic)	16S-rRNA	urine swabs (vaginal, endocervical, urethral, rectal, pharyngeal)
BD MAX GC BD MAX CT/GC BD MAX CT/GC/TV	OpcA gene	urine (20-60mL of first morning urine recommended), swabs (vaginal endocervical)
BD ProbeTec Neisseria gonorrhoeae (GC) Qx Amplified DNA Assay	Pilin-gene inverting protein homologue	Women: urine, swabs (vaginal, endocervical) Men: urine, urethral swab
BDProbeTec ET Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae Amplified DNA Assays	Pilin-gene inverting protein homologue	Women: urine, endocervical swab Men: urine, urethral swab
Xpert CT/NG (Cepheid)	Two distinct chromosomal targets	urine swabs (vaginal, endocervical, rectal, pharyngeal)
binx io CT/NG Assay (binx health)	Not specified	vaginal swabs

Tabla 2. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos actualmente aprobadas por la FDA para la identificación de *Neisseria gonorrhoeae* (55).

Recientes estudios han demostrado que los TAAN son métodos sensibles y robustos (56)(57)(58). Estas técnicas poseen una serie de ventajas respecto al cultivo. La primera es que el transporte y conservación de la muestra es más sencilla, ya que no necesitan que el microorganismo sea viable para el diagnóstico.

La segunda es que son técnicas que se pueden automatizar, por lo que el tiempo de respuesta es muy inferior y permiten la detección simultánea de varias dianas en una sola reacción. La tercera es que gracias a la alta sensibilidad, se pueden utilizar en

muestras no invasivas como es la orina o los exudados. Por todas estas razones, el CDC recomienda estas técnicas para el diagnóstico tanto de las infecciones que presentan síntomas como de aquellas asintomáticas.

No obstante, la principal desventaja en el diagnóstico de *N. gonorrhoeae* mediante las TAAN reside en la imposibilidad de monitorizar las resistencias antibióticas de los patógenos identificados. Por ello, en aquellos lugares donde se utilicen como método rutinario de diagnóstico, será necesario realizar el cultivo en pacientes en los que se produzca un fracaso terapéutico con la pauta dual establecida actualmente. Por otro lado, el tiempo requerido para repetir el análisis y comprobar la curación del paciente no está establecido (43). También cabe tener en cuenta que existen diferentes ensayos comerciales que presentan diferentes porcentajes de sensibilidad y, sobre todo, de especificidad en la detección de *N. gonorrhoeae* debido a las especies saprófitas del género *Neisseria* que se encuentran en la faringe, recto e incluso en el tracto urogenital. Estas especies comensales pueden originar reacciones cruzadas proporcionando resultados falsamente positivos y disminuyendo el valor predictivo positivo (VPP) en poblaciones con baja prevalencia de infección gonocócica (13)(59)(60).

Pruebas basadas en la detección de antígenos

Las pruebas antigénicas para la detección de *N. gonorrhoeae* forman parte de algunos dispositivos *Point of Care* (POCT), los cuales poseen menor sensibilidad y especificidad que los cultivos o las TAAN. Además, estos valores de sensibilidad y especificidad varían ampliamente en función del dispositivo comercial empleado (61)(62). Por ello, tan solo se recomiendan en países en vías de desarrollo donde carezcan de técnicas de referencia como el cultivo o las TAAN (55).

Pruebas de Inmuno-fluorescencia directa (IFD)

Se utilizan anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*. Después de realizarse la tinción, la preparación se observa bajo el microscopio de fluorescencia. No obstante, algunas cepas de gonococo no se

tiñen adecuadamente, hecho que condiciona una disminución de la sensibilidad y desaconseja dicha técnica para la identificación del gonococo.

Existen también pruebas serológicas y de enzimoimmunoanálisis, pero que hoy en día carecen de utilidad para el diagnóstico de la infección gonocócica.

1.1.8. Estudio de sensibilidad antibiótica

El método de la dilución cuantitativa en agar para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es considerado el *Gold standard* y es el recomendado por la OMS. No obstante, se trata de una técnica laboriosa y poco idónea para el estudio de rutina de la sensibilidad antimicrobiana.

Por ello, el método de difusión mediante E-test para la determinación de esta CMI se considera comparable al método de dilución en agar, resultando en un proceso más sencillo que propicia que su uso sea mucho más frecuente.

Por otro lado, el método de difusión mediante discos solamente está recomendado cuando la CMI no se puede determinar mediante tiras de E-test debido a la falta de recursos.

Por tanto, ante cualquier aislado sospechoso de presentar un determinado perfil de resistencia será necesario recurrir a alguno de los métodos anteriormente citados.

Respecto a la interpretación del antibiograma, los puntos de corte son útiles para traducir los datos numéricos (diámetros del halo de inhibición o CMI) en categorías clínicas que indican la probabilidad de respuesta de un microorganismo ante la presencia de un antibiótico concreto a las dosis recomendadas para esta localización.

Existen diferentes sociedades que establecen dichos puntos de corte teniendo en cuenta factores como la distribución de las CMI, la presencia o ausencia de mecanismos de resistencia conocidos, factores farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) y su correlación con la clínica.

Las principales sociedades que establecen dichos *breakpoints* son el “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) (63) y el “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*” (EUCAST) (64). Cabe señalar que, los puntos de corte propuestos por ambas sociedades no coinciden en ciertos antibióticos, generando estas divergencias diferencias en la clasificación de algunas cepas de gonococo.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA GONORREA Y COMPARACIÓN CON OTRAS ITS

Desde principios de los años 90, se ha documentado un notable incremento en el número total de casos de ITS declarados a nivel mundial debido, entre otras causas, a un aumento en los comportamientos sexuales de alto riesgo.

1.2.1. Global

En el informe emitido por la OMS en el año 2016, esta organización estimó que anualmente se contraen 376 millones de nuevas ITS en todo el mundo, siendo las principales las causadas por *Chlamydia trachomatis* (127 millones), *Neisseria gonorrhoeae* (87 millones), *Treponema pallidum* (6 millones) y *Trichomonas vaginalis* (156 millones).

La OMS ha implementado diversas estrategias para el control de las principales ITS, fijando como objetivo prioritario reducir la incidencia de la gonorrea en un 90% en el año 2030 (Figura 3), partiendo del dato de la incidencia estimada calculada en el año 2018 (86,9 millones) (65).

INCIDENCIA DE LA GONORREA

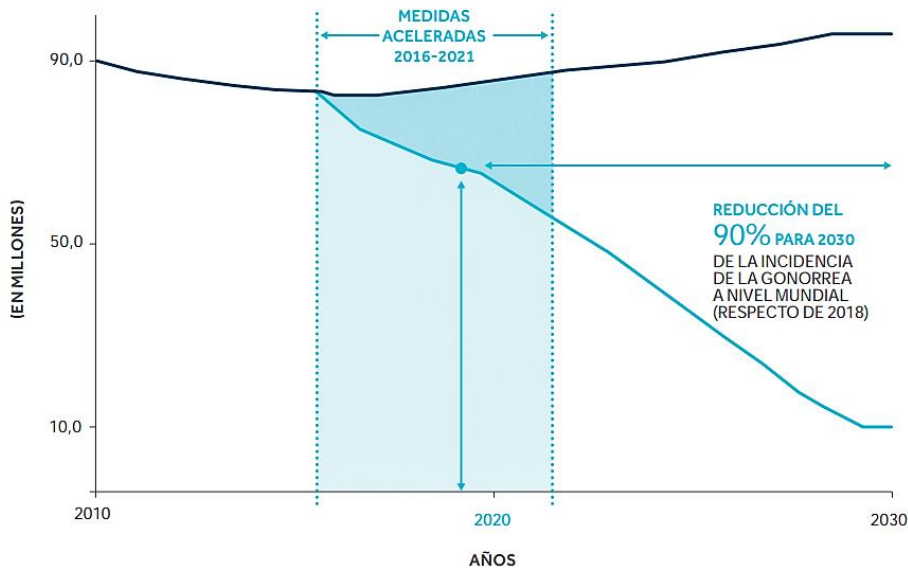


Figura 3. Objetivo estratégico de la OMS para la reducción de la incidencia de la gonorrea en un 90% en el año 2030 (www.who.int).

La prevalencia estimada de clamidia, gonorrea, sífilis y tricomoniasis difirió ampliamente según las áreas geográficas. A continuación, se muestra la prevalencia estimada de estas ITS basada en datos recogidos por la OMS entre los años 2009 y 2016, estratificada por regiones y en hombres (Figura 4) y mujeres (Figura 5) con edades comprendidas entre los 15 y 49 años de edad (4).

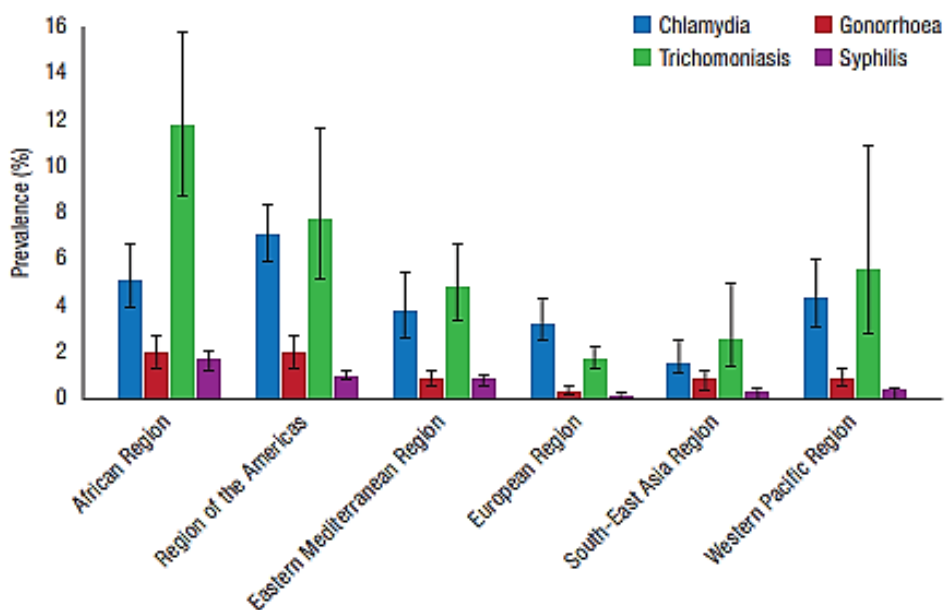


Figura 4. Prevalencia estimada en hombres de las ITS más frecuentes en el mundo (www.who.int).

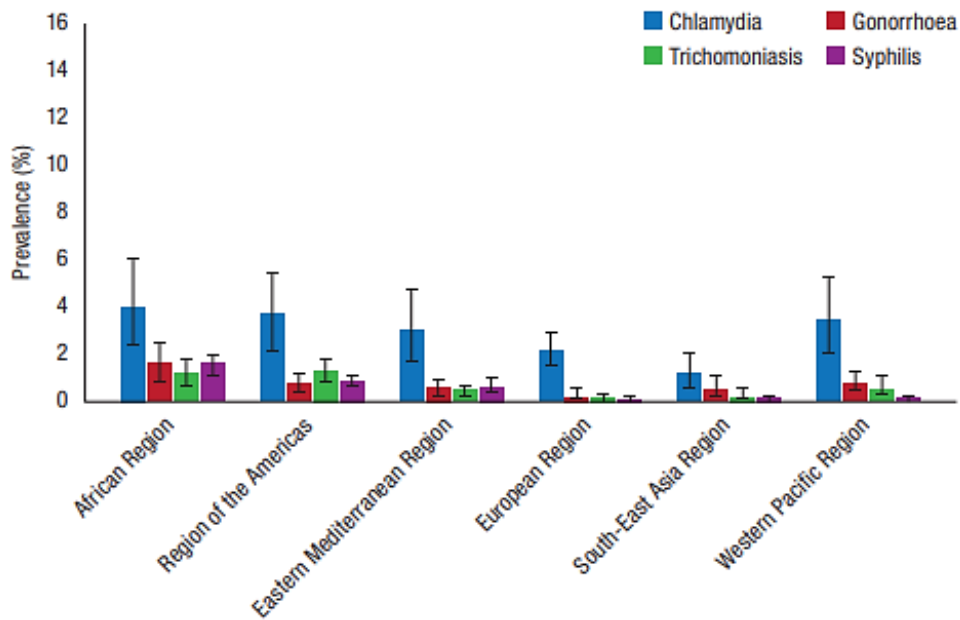


Figura 5. Prevalencia estimada en mujeres de las ITS más frecuentes en el mundo (www.who.int).

En el caso de la gonorrea, la prevalencia global estimada en el año 2012 fue de 0,8% (0,6 – 1,0%), fluctuando ampliamente de unas regiones a otras (de 0,3% a 1,7%) (3).

1.2.2. Europa

Según los datos informados por el “*European Centre for Disease Prevention and Control*”, en el año 2017 se notificaron 89.239 casos nuevos de infección por *Neisseria gonorrhoeae* en los 27 países participantes de la Unión Europea (66). Este dato supone un incremento de más del 50% en los casos de gonorrea notificados en contraste con los 47.387 casos declarados en su mismo informe del año 2012 (67).

El mayor número de resultados positivos (49.156) se obtuvo en el Reino Unido (55%) representando de forma global una tasa de 74,7 casos por cada 100.000 habitantes, seguido de Irlanda (46,9), Dinamarca (33,3), Islandia (29,3), Noruega (26,6) y Suecia (25,2).

Las tasas más bajas ($\leq 1/100.000$ habitantes) se registraron en Chipre (0,2), Polonia (0,4), Croacia (0,7) y Bulgaria (0,9). En España, dicha tasa de incidencia en el año 2017 fue de 17,6 casos nuevos de gonorrea por cada 100.000 habitantes, produciéndose un incremento de esta cifra durante cada año de estudio.

En la Tabla 3 se detallan los casos de gonorrea notificados durante los años 2013 a 2017 en los 27 países europeos participantes.

Country	2013		2014		2015		2016		2017		
	Confirmed cases	Rate	Confirmed cases	Rate	Confirmed cases	Rate	Confirmed cases	Rate	Confirmed cases	Rate	Reported cases
Austria	1 148	-
Belgium	1 011	-	1 119	-	1 368	-	1 997	-	2 271	-	2 271
Bulgaria	96	1.3	170	2.3	119	1.7	115	1.6	67	0.9	67
Croatia	14	0.3	22	0.5	18	0.4	12	0.3	30	0.7	32
Cyprus	2	0.2	4	0.5	1	0.1	1	0.1	2	0.2	2
Czech Republic	1 407	13.4	1 394	13.3	1 459	13.8	1 444	13.7	1 377	13.0	1 377
Denmark	816	14.6	1 140	20.3	2 787	49.2	2 007	35.2	1 916	33.3	1 916
Estonia	133	10.1	139	10.6	118	9.0	96	7.3	56	4.3	56
Finland	267	4.9	286	5.2	281	5.1	416	7.6	598	10.9	598
France	4 884	-	5 211	-	6 228	-	7 849	-	9 177	-	9 177
Germany
Greece	219	2.0	245	2.2	237	2.2	202	1.9	.	.	.
Hungary	1 526	-	1 620	16.4	1 246	12.6	1 176	12.0	1 030	10.5	1 030
Iceland	19	5.9	38	11.7	45	13.7	95	28.6	99	29.3	99
Ireland	1 274	27.6	1 314	28.3	1 281	27.4	1 954	41.3	2 245	46.9	2 245
Italy	537	0.9	635	1.0	649	1.1	760	1.3	850	1.4	851
Latvia	554	27.4	367	18.3	288	14.5	177	9.0	173	8.9	173
Liechtenstein
Lithuania	190	6.4	165	5.6	194	6.6	119	4.1	70	2.5	70
Luxembourg	4	0.7	6	1.1	14	2.5	9	1.6	12	2.0	12
Malta	62	14.7	51	11.9	66	15.0	76	16.9	104	22.6	104
Netherlands	4 171	-	4 632	-	5 420	-	6 129	-	6 794	-	6 794
Norway	506	10.0	682	13.4	851	16.5	1 096	21.0	1 399	26.6	1 399
Poland	549	1.4	495	1.3	500	1.3	437	1.2	138	0.4	321
Portugal	105	1.0	188	1.8	277	2.7	338	3.3	391	3.8	590
Romania	340	1.7	178	0.9	90	0.5	114	0.6	77	0.4	77
Slovakia	378	7.0	426	7.9	341	6.3	278	5.1	379	7.0	379
Slovenia	62	3.0	61	3.0	73	3.5	81	3.9	113	5.5	113
Spain	3 315	7.1	4 562	9.8	5 006	10.8	6 816	14.7	8 200	17.6	8 200
Sweden	1 110	11.6	1 346	14.0	1 671	17.1	1 783	18.1	2 515	25.2	2 515
United Kingdom	34 286	53.7	40 575	63.1	45 342	69.9	40 499	61.9	49 156	74.7	49 156
EU/EEA	58 985	14.5	67 071	17.0	75 970	19.1	76 076	18.2	89 239	22.2	89624

Tabla 3. Número de casos confirmados y ratio por cada 100.000 habitantes registrados en el conjunto de países europeos. Periodo 2013 – 2017 (www.ecdc.europa.eu).

A continuación, se muestra en la Figura 6 las distintas tasas de incidencia por cada 100.000 habitantes obtenidas en estos países europeos durante el año 2017.

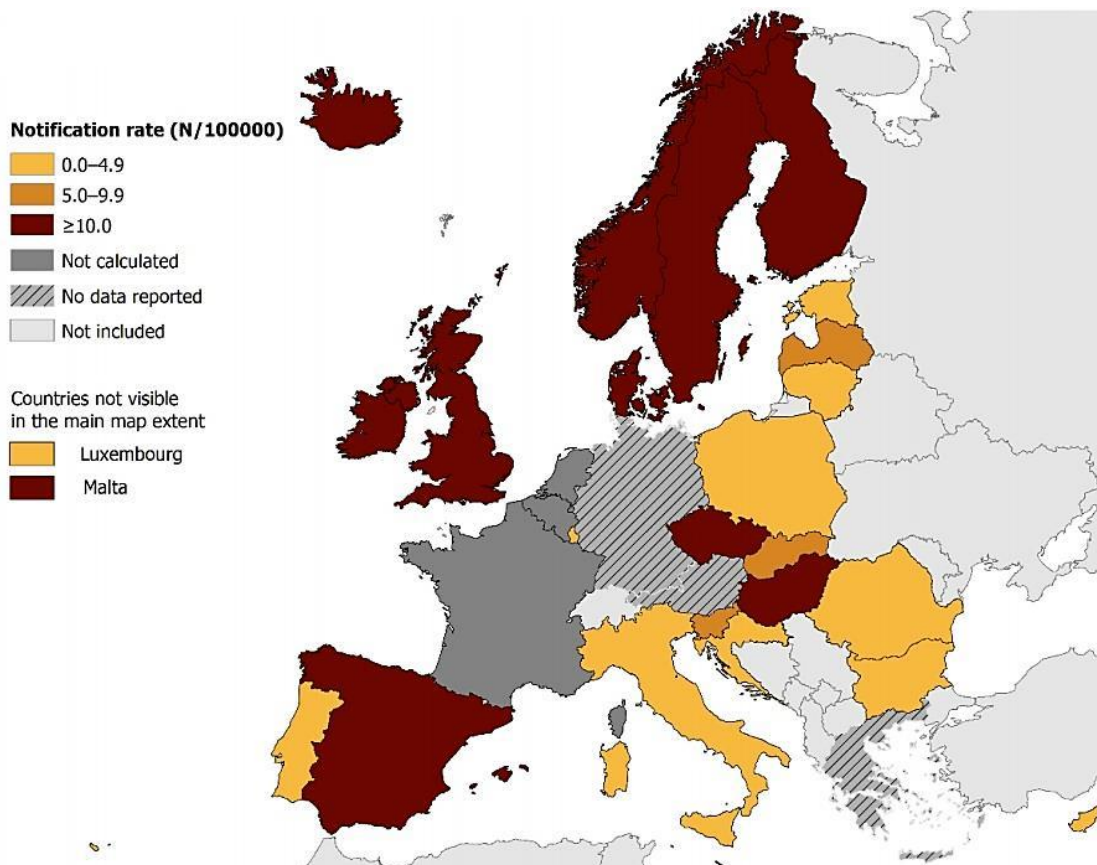


Figura 6. Número de casos de gonorrea detectados en Europa por cada 100.000 habitantes, año 2017 (www.ecdc.europa.eu).

Tal y como se extrae de los datos mostrados en la Tabla 2, el número de casos confirmados de gonorrea y el ratio de infecciones por cada 100.000 habitantes, ha aumentado progresivamente cada año. De esta manera, en Europa en el año 2013 se confirmaron 58.985 casos de gonorrea, correspondiendo a una tasa de infección de 14,5 personas cada 100.000 habitantes, mientras que en el año 2017 se confirmaron 89.239 casos, suponiendo una tasa de 22,2 personas por cada 100.000 habitantes. Dichas cifras suponen un aumento del 17% respecto al dato obtenido en el año 2016. Como se ha comentado, España también presenta una tendencia ascendente, pasando de 3.315 infecciones y un ratio de 7,1 por cada 100.000 habitantes en el año 2013, a 8.200 infecciones y una tasa de 17,6 por cada 100.000 habitantes en el año 2017.

La Figura 6 muestra la tasa de infección gonocócica en el año 2017 en diferentes países europeos participantes en el estudio europeo para la vigilancia de la susceptibilidad del gonococo, denominado Euro-GASP. Como puede apreciarse, España posee uno de los mayores ratios de infección, siendo este superior a 10 personas por

cada 100.000 habitantes, junto con otros países como Inglaterra, Irlanda, Dinamarca, Islandia, Noruega, y Suecia. Estos datos contrastan con los ratios más bajos (<1 infectado por cada 100.000 habitantes) encontrados en Bulgaria, Croacia, Chipre, Polonia y Rumania.

Así mismo, se observaron grandes diferencias en el número de infecciones reportadas en el año 2017 entre ambos sexos (Figura 7). En el caso de pacientes de sexo masculino el ratio de infección fue de 35 casos por cada 100.000 hombres (61.390 casos), mientras que en pacientes de sexo femenino fue de 11 casos por cada 100.000 mujeres (19.320 casos).

A partir de este dato se calculó el promedio en la relación de casos de infección gonocócica entre ambos sexos, resultando este de 3,2 hombres positivos por cada mujer infectada (Figura 7). Dicho resultado fue muy superior en países como Polonia (14:1), Croacia (14:1) y Rumanía (12:1). Las menores diferencias en la razón de hombres y mujeres con gonorrea se obtuvo en Letonia (1,7:1), Dinamarca (1.6:1) y Estonia (0,6:1). Este dato no estuvo disponible en el caso concreto de España.

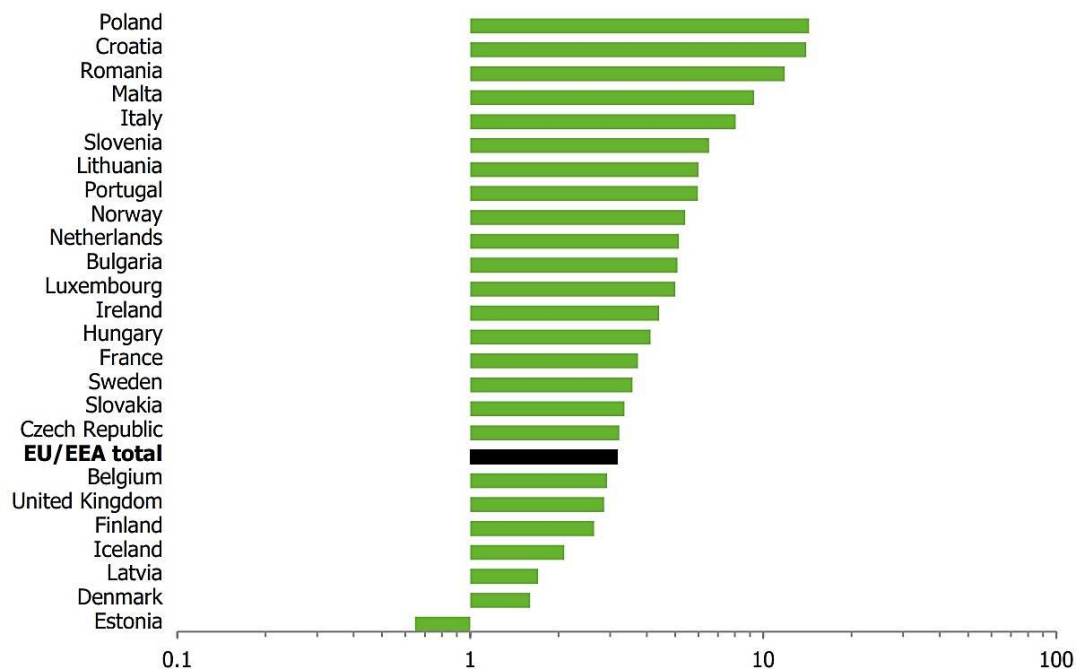


Figura 7. Ratio hombres -mujeres con infección gonocócica por países, año 2017 (www.ecdc.europa.eu).

El aumento de casos de gonorrea desde el año 2008 hasta el 2017, diferenciados por sexo, se muestra en la Figura 8. Entre los años 2015 y 2016 se observa una disminución de los casos informados en varones, no obstante, a partir del año 2016 este dato vuelve a repuntar. Se advierte, en global, el claro aumento de la incidencia de dicha infección en el periodo mostrado.

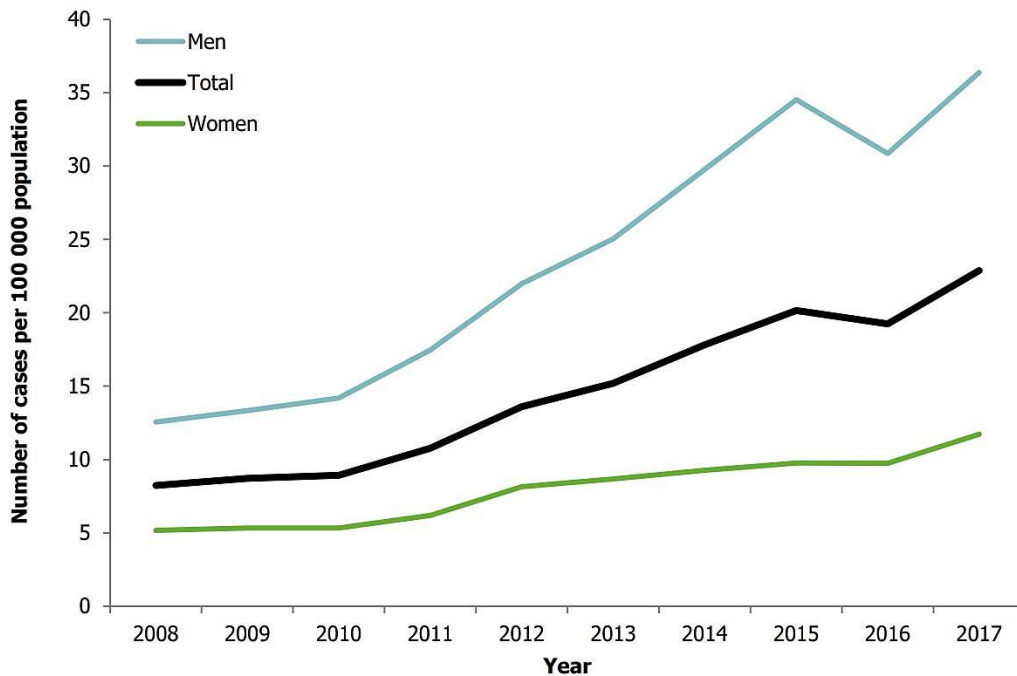


Figura 8. Evolución de la tasa de infección en Europa por cada 100.000 habitantes, periodo 2008 – 2017 (www.ecdc.europa.eu).

Respecto a la edad de aparición de la gonorrea, este informe concluye que el grupo con edades comprendidas entre 25 y 34 años fue el mayoritario, representando el 37% del total de casos informados, seguido del grupo de entre 17 y 24 años, el cual supuso un 36%. A partir de los 35 años se observa una disminución en el número de infecciones reduciéndose más en población mayor de 45 años. No obstante, el grupo etario con inferior casos de gonorrea fue el de menores de 15 años.

Al analizar la tasa de incidencia por sexo y edad (Figura 9), se aprecia que el mayor porcentaje de mujeres infectadas con gonococo se sitúa en el grupo con edades comprendidas entre los 20 y 24 años, mostrando cifras similares la mujeres con edades

entre 15 y 19 años, pero registrándose en este último grupo tasas de infección más elevadas que en hombres.

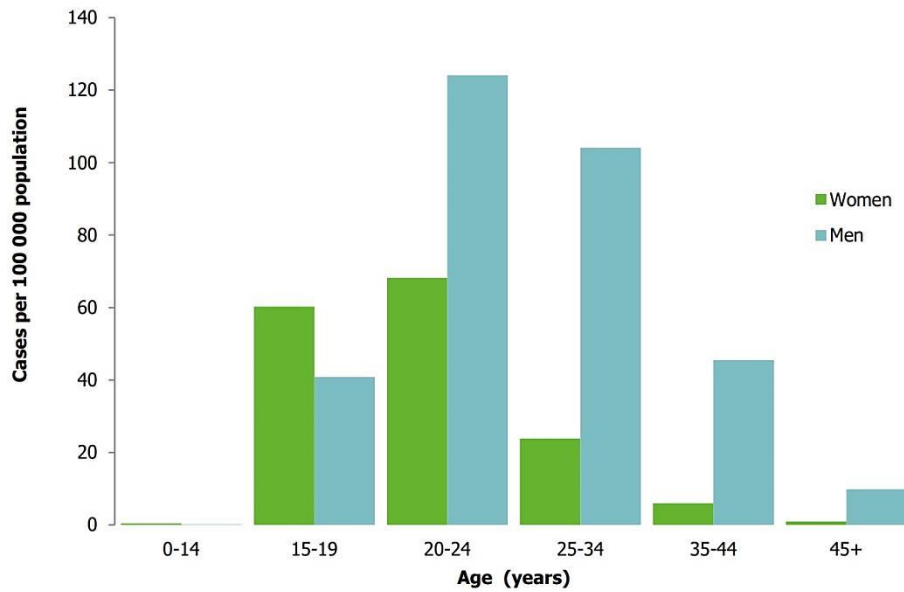


Figura 9. Casos por cada 100.000 habitantes por grupo de edad y sexo (www.ecdc.europa.eu).

Respecto a la orientación sexual de los pacientes, en el año 2017 la información sobre la categoría de transmisión estuvo disponible en 17 países. El mayor grupo fue el constituido por hombres que practican sexo con hombres (HSH) suponiendo el 47% de pacientes infectados, seguido del de mujeres heterosexuales (22%) y hombres heterosexuales (22%). En el 9% de los casos no se dispuso de esta información (Figura 10).

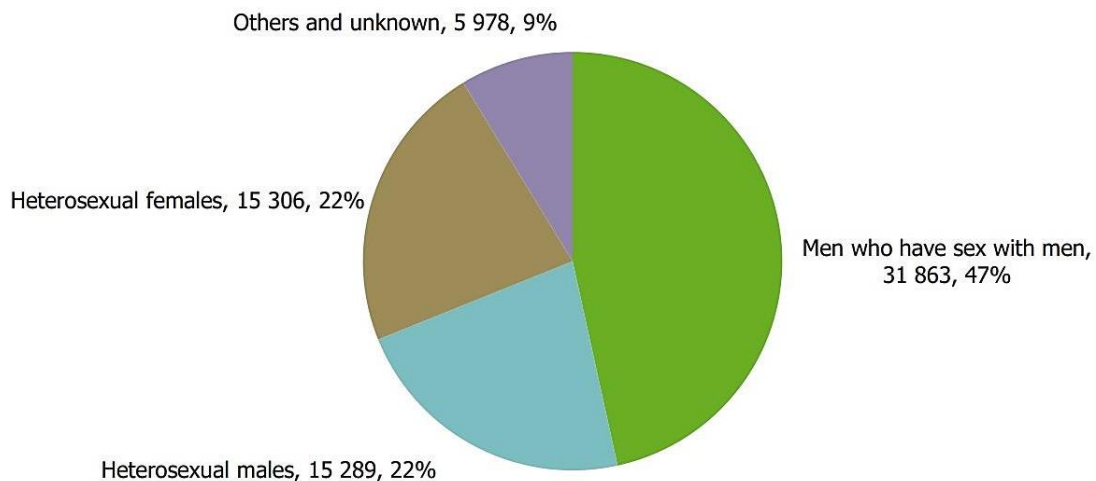


Figura 10. Porcentaje de casos por género y categoría de transmisión (www.ecdc.europa.eu),

1.2.3. España

Según datos recogidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España (RENAVE), en el 2018 se declararon 11.044 casos nuevos de infección gonocócica, lo que representa una incidencia de 24,2 casos por cada 100.000 habitantes (68). Ello supone un aumento respecto al dato del año 2017 (8.722 casos, 18,74 infecciones por 100.000 habitantes) (69) y a los reportados por el ECDC (8.200 casos, 17,6 infecciones por cada 100.000 habitantes) en nuestro país ese mismo año (66).

Tal y como se puede apreciar en la Figura 11, desde el año 2001 se comprueba la tendencia ascendente de la infección gonocócica. En el primer periodo (1995-2001), la tendencia fue descendente con porcentaje anual de cambio del -26,9% (IC95%: -29,8; -23,9). A partir de ese año, la tendencia es creciente: en el segundo periodo (2001-2013) el porcentaje anual de cambio fue del 11,6% (IC95%: 9,5; 13,8) y entre 2013 y 2018 esta aumento se agudizó resultando del 27,3% (IC95%: 23,5; 31,2).

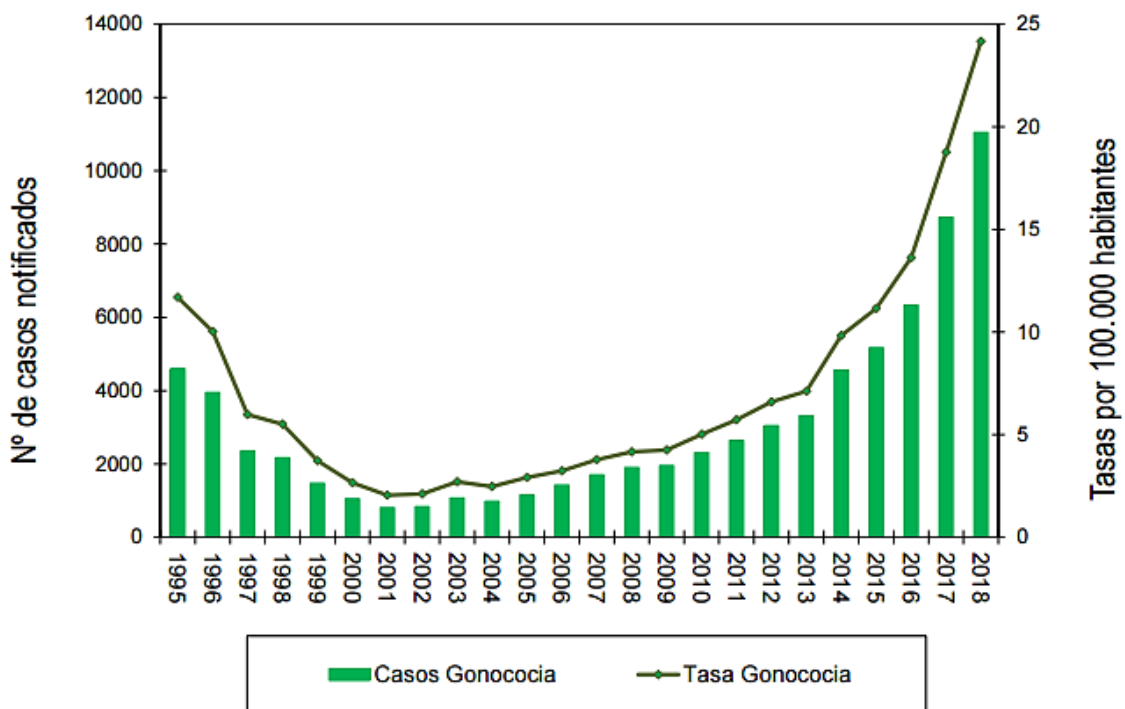


Figura 11. Número de casos notificados de gonococia y tasa de infección por cada 100.000 habitantes en España durante el período 1995 – 2018. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (68).

El 82,7% (9.135 casos) fueron varones y la razón hombre-mujer resultó de 4,8. La mediana de edad al diagnóstico fue de 30 años con un rango intercuartílico (RIC) de 24 a 38 años, siendo las mujeres (promedio 27 años, RIC: 21 – 36 años) más jóvenes que los hombres (promedio 30 años, RIC: 25 – 38 años). La distribución de los casos por edad y sexo se muestra en la Tabla 4.

Grupos de edad	Sexo		Total
	Hombre N (%)	Mujer N (%)	
<15 años	5 (0,1)	16 (0,8)	21 (0,2)
15-19 años	456 (5,0)	282 (14,8)	738 (6,7)
20-24 años	1.739 (19,0)	487 (25,5)	2.226 (20,2)
25-34 años	3.672 (40,2)	583 (30,6)	4.255 (38,6)
35-44 años	2.177 (23,8)	318 (16,7)	2.495 (22,6)
45 o más años	1.080 (11,8)	222 (11,6)	1.302 (11,8)
TOTAL	9.129 (100)	1.908 (100)	11.037 (100)

Tabla 4. Distribución por edad y sexo de la población española infectada de gonococo en el año 2018. No se incluyó 1 caso sin información sobre sexo ni 6 casos en los que la edad fue desconocida. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (68).

Al clasificar los casos por edad y sexo, en España en el año 2018 la tasa de incidencia de la infección gonocócica en hombres fue superior a la observada en mujeres en todos los grupos de edad, tal y como se observa en la Figura 12.

El mayor número de casos positivos en ambos sexos se registraron entre los 20 y 24 años, hallándose en este grupo una tasa de incidencia de gonorrea de 152,66 casos por cada 100.000 hombres y de 44,61 casos por cada 100.000 mujeres.

El segundo grupo más frecuentemente afecto difirió en función del sexo, siendo el constituido por pacientes varones el de edades comprendidas entre 25 y 34 años (140,03 casos por cada 100.000 hombres) y en el caso de las mujeres aquel con edades de entre 15 y 19 años (28,80 casos por cada 100.000 mujeres).

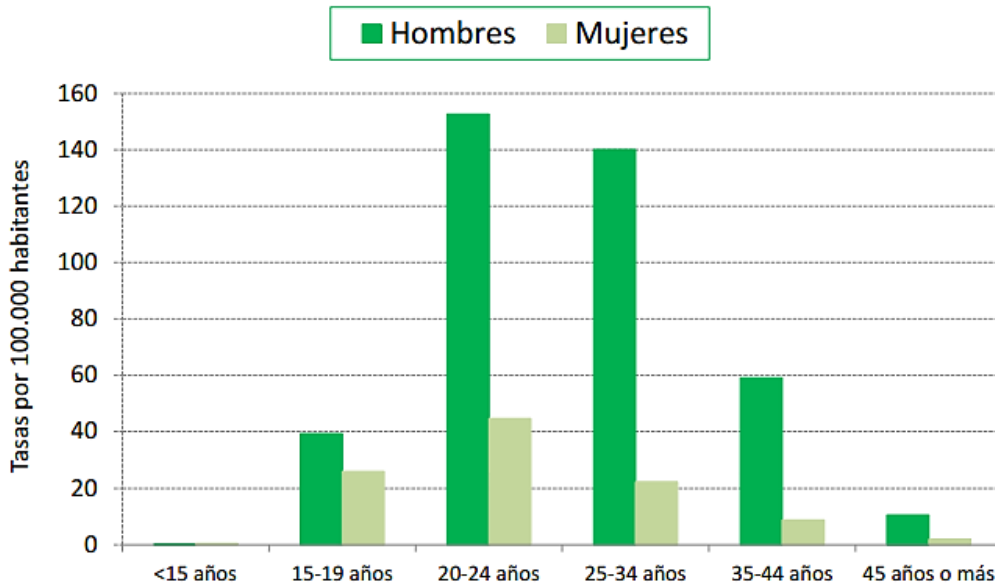


Figura 12. Distribución de los casos de gonorrea en España en el año 2018 por grupos de edad y sexo. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (68).

En el año 2018, se constataron importantes diferencias en la incidencia de la infección gonocócica entre las distintas comunidades autónomas, con un rango comprendido entre 2,36 y 61,21 casos por cada 100.000 habitantes. Las tasas más elevadas se registraron en Cataluña (61,21), Baleares (40,96) y Madrid (39,73), y las más bajas se notificaron en Melilla (2,36), Ceuta (3,53), Murcia (3,99), Castilla y León (4,44) y Extremadura (5,62). La Comunidad Valenciana presentó una alta incidencia, resultando esta superior a los 18,67 casos por cada 100.000 habitantes (Figura 13).

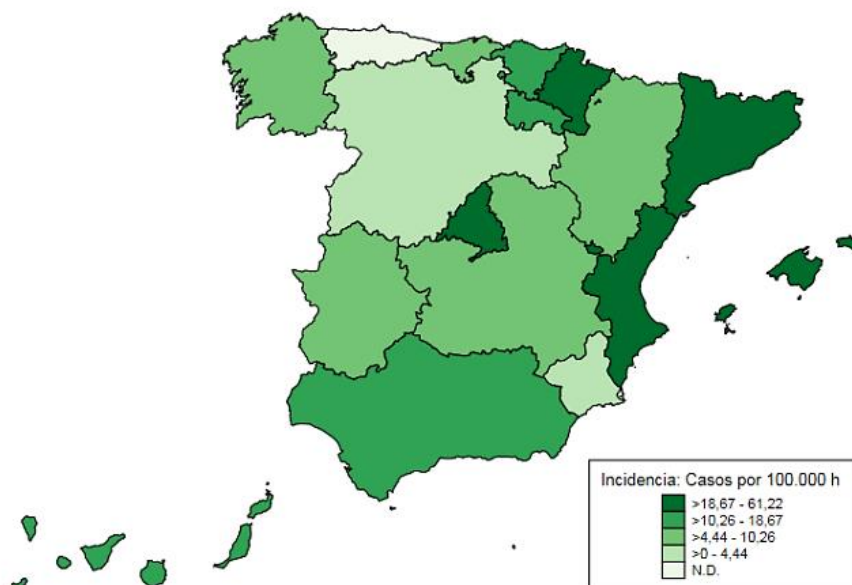


Figura 13. Incidencia de la infección gonocócica en España por Comunidades Autónomas durante el año 2018. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (68).

1.3. TRATAMIENTO Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

1.3.1. Tratamiento actual de la infección gonocócica

Un régimen antibiótico eficaz, precoz y accesible en el tratamiento de la gonococia es esencial para evitar las complicaciones y secuelas que pueden desarrollarse, así como para romper la cadena de transmisión y reducir el período en el que el gonococo posee una gran capacidad de transmisión entre las parejas sexuales y al recién nacido en mujeres gestantes. Todo ello posee un beneficio tanto clínico como en el ámbito de la salud pública, hecho que justifica el inicio del tratamiento empírico ante el diagnóstico de uretritis gonocócica, basado en la sintomatología y los resultados del laboratorio. Dicho tratamiento debería ser efectivo frente al gonococo y la clamidia, constituyendo ambos los principales agentes causales de uretritis.

En cuanto a la pauta inicial recomendada, la sucesiva aparición de resistencias antibióticas ha obligado a realizar modificaciones frecuentes de las guías terapéuticas a nivel mundial. La susceptibilidad reducida de *Neisseria gonorrhoeae* a penicilina y el desarrollo de resistencias a otros grupos de antibióticos, como sulfonamidas, tetraciclinas y fluorquinolonas, imposibilita su uso en el régimen inicial de la infección gonocócica.

Durante un largo período de tiempo, las cefalosporinas de tercera generación (C3G) se han considerado el tratamiento de elección en los casos de infección por *Neisseria gonorrhoeae*. No obstante, el continuo aumento de aislados con alta resistencia tanto cefixima como a ceftriaxona ha desaconsejado el uso en monoterapia de las mismas. En los últimos años se han notificado en todo el mundo fracasos terapéuticos relacionados con dichas C3G en el tratamiento de la gonorrea (70)(71)(13)(72). De la misma manera, numerosas publicaciones de diferentes países han descrito fallos en el tratamiento de la gonorrea de origen faríngeo con ceftriaxona, C3G de administración intramuscular (73)(74)(75).

Actualmente, también se desaconseja el uso de azitromicina en monoterapia, debido al constante aumento de cepas con baja sensibilidad a dicho macrólido (76)(77)(78). Por un lado, dosis de 1 g pueden ser insuficientes para eliminar la infección gonocócica, mientras que dosis de 2 g, además de tener una peor tolerancia gastrointestinal, podrían ser inefectivas frente a aquellas cepas de gonococo con alta resistencia a azitromicina. En adición, existen datos que indican que el uso de azitromicina puede inducir y propagar resistencia a *Treponema pallidum* y *Mycoplasma genitalium* (43).

Todo ello ha desembocado en una revisión de las guías internacionales para el tratamiento y manejo de la enfermedad. De esta manera, el clásico tratamiento en monoterapia con una cefalosporina de tercera generación (como cefixima o ceftriaxona) ha sido relegado a un tratamiento combinado que incluye además azitromicina. Así pues, desde el año 2011 la mayoría de las guías recomiendan una terapia dual con estas dos familias de antibióticos, las cuales exhiben un mecanismo de acción diferente consiguiendo de esta manera aumentar la eficacia del tratamiento.

Aunque las pautas varían ligeramente entre diferentes organismos y sociedades científicas tanto nacionales como internacionales, se establece para el tratamiento de la gonorrea no complicada el uso de ceftriaxona intramuscular junto a azitromicina oral, ambas en dosis única como terapia empírica de elección. Se prefiere el uso de ceftriaxona a cefixima, debido a que esta última C3G de administración oral presenta mayor facilidad en la generación de resistencias, tal y como se ha notificado en diversos estudios en los últimos años (79)(80).

La dosificación de dichos antimicrobianos puede variar en función de la epidemiología de las resistencias antibióticas observadas en el entorno y de la tolerancia gastrointestinal a la azitromicina. Así, el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomienda dosis menores de C3G, debido a que la sensibilidad de las mismas en Estados Unidos es mayor que la observada tanto en Europa como en España (81)(82)(83). La pauta inicial aconsejada por este organismo es ceftriaxona

intramuscular (250 mg) y azitromicina oral (1 g) para el tratamiento de la gonorrea no complicada (84).

La OMS, en sus recomendaciones establecidas en el año 2016, propone el mismo tratamiento para la gonorrea genital o rectal no complicada que el CDC (5) de la misma manera que la guía Canadiense en su actualización del año 2018 (85).

En cambio, en el régimen planteado en la guías europeas se recomienda una dosis superior de ceftriaxona (500 mg) junto con una dosis también superior de azitromicina (2 g) (13). La guía británica del año 2011 recomienda, sin embargo, la asociación de 500 mg de ceftriaxona más 1 g de azitromicina (14).

La finalidad del tratamiento dual para combatir la infección gonocócica es, por tanto, evitar la selección de cepas con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas. Esto se debe a que el gonococo, al igual que otras bacterias, presenta dificultad para desarrollar resistencias a dos clases diferentes de antimicrobianos. De esta manera se crea una barrera farmacológica que evita la disminución de la susceptibilidad a uno de los componentes del tratamiento combinado (43).

La OMS y el resto de sociedades científicas detallan sus recomendaciones en el tratamiento que proponen atendiendo a las características específicas de la infección causada por *N. gonorrhoeae*, como es el caso de pacientes coinfectados con el VIH, poblaciones de alto riesgo como trabajadores sexuales, hombres que tienen sexo con hombres (HSH), personas transgénero y mujeres embarazadas. También se proporcionan recomendaciones para la profilaxis y tratamiento de la oftalmia neonatal causada por *N. gonorrhoeae* (5).

1.3.2. Evolución del tratamiento de la gonorrea a lo largo de la historia

Desde que a principios del siglo XX se introdujera el uso de los antimicrobianos para el tratamiento de la gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae* ha ido desarrollando resistencia a todos los antibióticos utilizados a lo largo de la historia (86).

La disminución gradual de la sensibilidad antibiótica del gonococo es resultado del efecto aditivo de múltiples mutaciones cromosómicas desarrolladas a lo largo de estos años.

Dichos sistemas actúan en la modificación o destrucción de la molécula antimicrobiana bien mediante procesos enzimáticos, alterando la diana terapéutica, disminuyendo la penetración del antibiótico en el interior de la célula o aumentando la expulsión de este hacia el exterior de la misma.

En la Figura 14, se resume la evolución en los regímenes instaurados para el tratamiento de la infección gonocócica desde el año 1936, así como la evolución de las resistencias generadas por *N. gonorrhoeae* frente a cada uno de ellos, incluyendo aquellos determinantes genéticos que propiciaron esta disminución de sensibilidad (86).

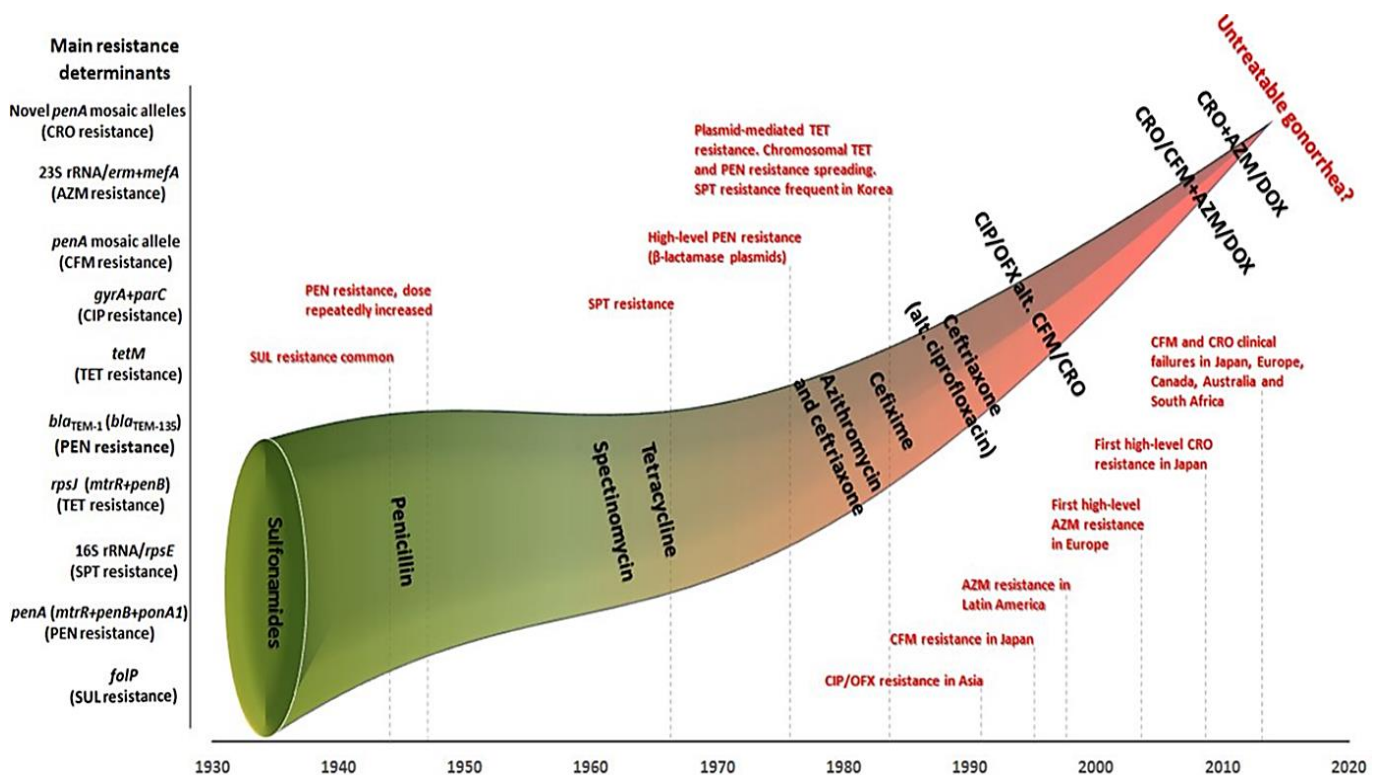


Figura 14. Cronología del desarrollo de resistencia a antibióticos. Desde el inicio del tratamiento antibiótico de la gonorrea con sulfonamidas en la década de 1930, *N. gonorrhoeae* ha adquirido determinantes de resistencia genética frente a todos los antimicrobianos que se han utilizado como tratamiento de primera línea (86).

Además, y como después se desarrollará, el gonococo ha demostrado una gran capacidad de transferencia horizontal del material genético. Este hecho es especialmente relevante en el caso de la infección gonocócica faríngea, ya que especies saprófitas de *Neisseria* presentes en la orofaringe pueden actuar como fuente de resistencias debido a la adquisición del gonococo de genes que codifican para estos mecanismos (87).

Como se observa en la Figura 14, las sulfonamidas fueron los primeros antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la gonorrea. En concreto, la sulfanilamida fue la más empleada, resultando efectiva en el 80% de los casos y utilizándose la sulfapiridina en los pacientes en los que esta no fue efectiva. Más tarde se comenzó a utilizar el sulfatiazol, el cual presentaba la misma efectividad y menos reacciones adversas. No obstante, a finales de los años 40, el 90% de los aislados de *N. gonorrhoeae* exhibían resistencia in vitro a este grupo de antibióticos. Aun así, el sulfametoxazol combinado con trimetoprim se siguió utilizando en países con pocos recursos.

En 1943, la penicilina reemplazó el uso de las sulfonamidas como tratamiento de primera línea para la gonorrea. Dicho compuesto, descubierto accidentalmente por Alexander Fleming en 1928 resultó, en aquel entonces, útil en el tratamiento de la uretritis gonocócica, ya que con dosis de 45 mg se conseguían porcentajes de curación superiores al 95%. Sin embargo, con el paso del tiempo las CMI para este antibiótico fueron aumentando debido al acúmulo de determinantes genéticos de resistencia, obligando a aumentar progresivamente las dosis requeridas. A pesar de que en 1946 se comenzaron a documentar cada vez más casos de resistencia a este fármaco, este agente fue utilizado durante décadas. En 1976 se detectaron cepas productoras de β -lactamasas plasmídicas en todo el mundo, aunque no fue hasta el descubrimiento de los mecanismos de resistencia cromosómicos a la penicilina cuando esta se dejó de utilizar como tratamiento de primera línea. En la actualidad, las cepas resistentes a la penicilina tanto mediante mecanismos plasmídicos como cromosómicos son frecuentes a nivel global, imposibilitando su uso en todo el mundo.

En un inicio, la tetraciclina se utilizó fundamentalmente en aquellos pacientes alérgicos a la penicilina. De la misma manera que sucedió anteriormente, las CMI fueron aumentando paulatinamente como consecuencia de la existencia cada vez más frecuente de mecanismos cromosómicos de resistencia. La detección a mediados de los años 80 de cepas con el plásmido *tetM*, que origina una resistencia de alto nivel a la misma, conllevó la eliminación de este fármaco de las guías de tratamiento de los Estados Unidos así como en otros países.

La espectinomicina, aminociclitol administrado por vía intramuscular en dosis de 2 g, se comenzó a utilizar a principio de los años 60 como un antimicrobiano específico en el tratamiento de la gonorrea, principalmente tras la aparición de las resistencias plasmídicas a la penicilina. Sin embargo, a partir de 1980 se empezaron a detectar casos de resistencia a este compuesto en todo el mundo, dejándose por tanto de utilizar como tratamiento empírico de primera línea. Actualmente, casi el 100% de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* son sensibles a dicho agente. No obstante, este antimicrobiano no es eficaz para el tratamiento de la gonorrea faríngea y, además, no está disponible en la mayoría de países.

En lo que respecta a las quinolonas, en concreto al ciprofloxacino, este fue ampliamente utilizado en el tratamiento de la gonorrea a partir de los años 80. Inicialmente se empleó a dosis bajas de aproximadamente 250 mg, pero a principios de los años 90 se comenzaron a documentar fracasos terapéuticos. Por este motivo, se incrementaron estas dosis hasta los 500 mg, desarrollando el gonococo de nuevo y de forma rápida resistencia a este agente. Estas cepas resistentes a ciprofloxacino aparecieron inicialmente en países asiáticos y se diseminaron en poco tiempo a nivel mundial, precipitando su abandono como tratamiento de primera línea a mediados de los años 90. En el año 2007, las fluorquinolonas se eliminaron finalmente tanto de las guías de tratamiento del CDC como de las europeas. En la actualidad, existen numerosas cepas a nivel mundial con alto nivel de resistencia a las quinolonas, por lo que no pueden ser usadas en el tratamiento inicial de la gonococia sin un antibiograma previo que confirme la sensibilidad a las mismas.

En lo que se refiere a los macrólidos, los datos clínicos e in vitro revelaron que la eritromicina no era lo suficientemente efectiva para el tratamiento del gonococo. La azitromicina, por el contrario, demostró poseer una actividad superior contra dicho patógeno. A pesar de ello, a finales de los años 90 se comenzaron a informar casos tanto de cepas con sensibilidad intermedia como resistentes en Sudamérica, donde ya se empleaba ampliamente dicho antimicrobiano para el tratamiento de las ITS. La resistencia a este agente comenzó a diseminarse rápidamente y aparecieron aislados con alto nivel de resistencia (CMI 256 mg/L) en países como Escocia (88), Inglaterra (89), Italia (90), Estados Unidos (91) y Suecia (92). Hoy en día, se desaconseja el tratamiento de la gonorrea con azitromicina en monoterapia, utilizándose esta de forma combinada con las C3G en la actual terapia dual recomendada.

Las cefalosporinas empleadas para el tratamiento de la gonorrea son las de tercera generación (C3G), ceftriaxona intramuscular y cefixima oral. No obstante, las cefalosporinas orales tales como cefditoreno, cefuroxima, cefpodoxima y ceftibuteno se han utilizado en áreas geográficas en las que la cefixima no está disponible. Concretamente en Japón, en la década de los 90, estaban disponibles diversas cefalosporinas orales, las cuales presentan una clara ventaja frente a las cefalosporinas administradas por vía parenteral. No obstante, la dosificación empleada resultó ser subóptima, utilizando en el caso de la cefixima dosis de 300 mg en lugar de los 400 mg recomendados en las diferentes guías. Esta infradosificación propició la disminución de la susceptibilidad de la misma hasta en un 30% (80)(79). Durante las últimas dos décadas, la sensibilidad de las cefalosporinas de espectro extendido (ESC) ha ido disminuyendo (13)(70)(71) documentándose fracasos terapéuticos en todo el mundo (93)(94)(95)(73)(72).

Ante la amenaza de que *Neisseria gonorrhoeae* desarrolle de nuevo resistencia a la última opción de la que disponemos, se decidió establecer la actual terapia dual para el tratamiento empírico de la gonorrea. Es por ello que, las guías de las principales asociaciones científicas recomiendan en la actualidad asociar ceftriaxona intramuscular a dosis de 250 mg (84)(85) o 500 mg (14) junto con azitromicina oral a dosis de 1 g (84)(85) (14) o 2 g (13).

1.3.3. Mecanismos de resistencia antibiótica

El agente causal de la gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae*, es capaz de desarrollar resistencia a antibióticos de diferentes familias mediante todos los mecanismos fisiológicos conocidos.

En primer lugar, posee la capacidad de modificar o destruir la molécula antimicrobiana a través de procesos enzimáticos. También puede disminuir su afinidad por estas sustancias, modificando la diana terapéutica de las mismas. Además, es capaz de disminuir la entrada del antibiótico al interior de la célula o expulsar el mismo hacia el exterior. En la Figura 15 se muestran los principales mecanismos de resistencia descubiertos en el gonococo (86).

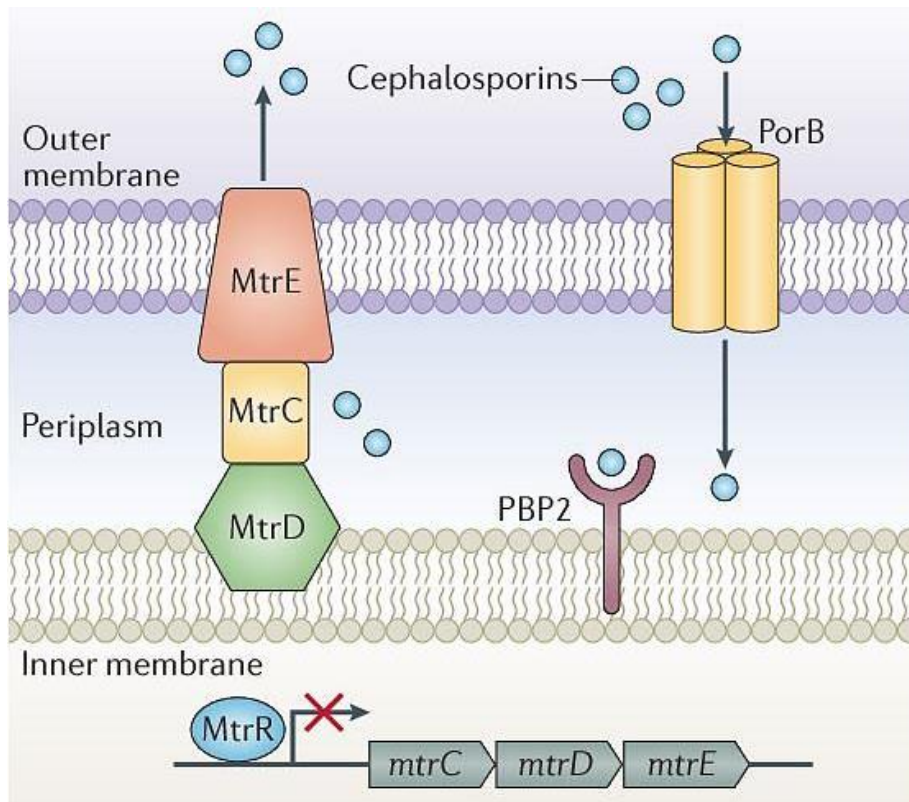


Figura 15. Resumen de los mecanismos de resistencia antibiótica presentes en *Neisseria gonorrhoeae*. La proteína de unión a la penicilina 2 (PBP2) codificada por el gen *penA*, es una transpeptidasa periplásmica y el principal objetivo de las cefalosporinas. Mutaciones en mosaico del gen *penA* confieren resistencia a las mismas. La bomba de eflujo MtrC–MtrD–MtrE y su represor MtrR contribuyen a la resistencia del gonococo a través del eflujo de diferentes antimicrobianos. La proteína principal de la membrana externa, la porina PorB, codificada por el gen *porB*, es un determinante de resistencia que requiere de la mutación conjunta de MtrR (86).

Aunque la inmensa mayoría de mecanismos de resistencia que posee *N. gonorrhoeae* son cromosómicos, presenta también otros de origen plasmídico, los cuales están codificados por los genes *bla_{TEM}* y *tetM*. Estos determinantes por sí mismos pueden dar lugar a altos niveles de resistencia tanto in vitro como in vivo. No obstante, en otras ocasiones, es necesario un acúmulo de diferentes mecanismos para que el fenotipo de resistencia tenga significado clínico.

Como se ha comentado anteriormente, el gonococo es capaz de adquirir material genético externo a través de sistemas de transferencia horizontal relacionados con neisserias saprófitas de la faringe, las cuales puede actuar como reservorio de genes de resistencia (87), proceso mostrado en la Figura 16.

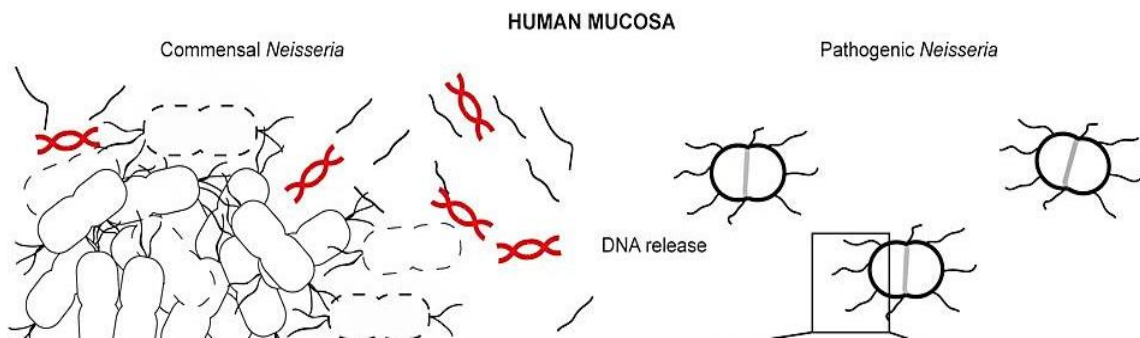


Figura 16. Transferencia horizontal de genes entre especies comensales y patógenas de *Neisseria*. Donación de DNA por parte de las bacterias comensales por autólisis y captación mediante pilis de las bacterias patogénicas (87).

Esto se debe a que, en la gonorrea faríngea que resulta asintomática en la mayoría de los pacientes, *N. gonorrhoeae* puede convivir con neisserias comensales durante largos períodos de tiempo, incorporando y expresando material genético de estas mediante un proceso denominado transformación. En este momento, estos genes también tienen la capacidad de transmitirse entre las diferentes cepas de gonococo tanto por procesos de transformación como de conjugación.

En el caso de *Neisseria gonorrhoeae*, la mayor parte de los mecanismos de resistencia no provocan una disminución del rendimiento biológico de la bacteria

probablemente debido a mutaciones compensatorias, generando por tanto cepas multirresistentes incluso en ausencia de presión antibiótica.

A continuación, se describen los diferentes mecanismos que el gonococo ha diseñado para evadir los efectos de los distintos antibióticos utilizados a lo largo de los años para el tratamiento de la infección que este microorganismo produce.

Sulfonamidas: su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de ácido fólico mediante el bloqueo del enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS). En este caso, la mutación del gen *folP*, el cual codifica para la DHPS, disminuye la afinidad entre las sulfonamidas y su diana terapéutica.

Penicilina: los antibióticos β -lactámicos bloquean la síntesis de peptidoglucano, constituyente fundamental de la pared bacteriana, mediante la unión del anillo β -lactámico e inhibición de las *Penicilin Binding Proteins* (PBPs).

Durante los años en los que dicho β -lactámico ha sido empleado, el gonococo ha generado resistencia al mismo tras acumular mutaciones cromosómicas en diferentes genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular (*penA* y *ponA1*), o con estructuras que afectan a la concentración periplasmática del fármaco (*penB*, *penC* y *mtrR*) (96).

Los genes *ponA* y *penA* codifican para las PBP1 y PBP2, respectivamente, cuyas alteraciones afectan principalmente a la actividad de las penicilinas, aunque también se han relacionado modificaciones en la PBP2, como genes en mosaico, con resistencia a las cefalosporinas orales y disminución de la sensibilidad a la ceftriaxona. El acúmulo de entre 5 y 9 mutaciones en el gen *penA* disminuye la sensibilidad a la penicilina entre 6 y 8 veces. Estas mutaciones de *penA* se deben a la adquisición, mediante procesos de transformación, de secuencias procedentes de neisserias comensales que poseen PBP2 modificadas. Modificaciones en *ponA* disminuyen la acilación, entre 3 y 4 veces, de la PBP1, alterando así la diana y reduciendo su efectividad.

El sistema *multiple transferable resistance* (*mtr*) codifica proteínas implicadas en diferentes bombas de expulsión como la MtrC-D-E, cuya hiperexpresión favorece la

resistencia a penicilina, macrólidos, tetraciclina y quinolonas (97) y puede estar también implicada en la disminución de sensibilidad a cefalosporinas.

Mutaciones en el gen *porB*, conocidas como *penB*, conllevan alteraciones en la porina porB1B que también causa resistencia a familias de antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas, así como una disminución en la sensibilidad a las quinolonas (98). Posteriores estudios han demostrado que esta resistencia se produce solo cuando existe una sobreexpresión de la bomba de eflujo MtrC-MtrD-MtrE, funcionando como un posible efecto sinérgico (99). Por su parte, *pilQ* es un importante componente de la membrana externa del gonococo relacionado en la formación de los pilis tipo IV. Mutaciones en *pilQ* (conocidas también como *pilQ2* o *penC*) originan resistencia a la penicilina al incapacitar la entrada de dicho fármaco al interior del gonococo (100).

Además de los mecanismos cromosómicos descritos, el aumento de las CMI a la penicilina (CMI 128 mg/L) se desencadena por la producción de una β -lactamasa plasmídica (*bla*) de tipo TEM (*bla-TEM*), aislados denominados *penicillinase-producing N. gonorrhoeae* (PPNG). Estas cepas poseen enzimas que hidrolizan dicho anillo β -lactámico e inactivan el antibiótico, provocando resistencias de alto nivel. Las cepas PPNG fueron descritas en los años 70 (101), siendo dichos plásmidos similares genéticamente pero presentando pequeñas diferencias de tamaño relacionadas con distintas inserciones y deleciones. Estos plásmidos se nombran en función del área geográfica donde se descubrieron (102).

Tetraciclinas: estos antimicrobianos impiden la síntesis proteica bacteriana a través de la inhibición del proceso de traducción, concretamente bloqueando la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma mediante su unión a la fracción 30S del ribosoma.

En este caso, existe una resistencia plasmídica de alto nivel mediada por plásmidos (CMI 24 – 32 mg/L) a través de la modificación de la proteína tetM (103). Esta proteína, que posee similitud con el factor de elongación G (EF-G) involucrado en la traducción proteica, se une a la subunidad 30S del ribosoma desplazando al antimicrobiano. Además, tetM posee actividad GTPasa.

La resistencia cromosómica a este antimicrobiano se debe a mutaciones que modifican la estructura de la proteína ribosomal (alelo *rpsJ*), la cual actúa conjuntamente con otros determinantes que aumenten la expulsión (*mtrR*) y disminuyen la penetración (*penB*) de la tetraciclina.

Espectinomicina: se trata de un antibiótico bacteriostático que se une a la subunidad 30S del ribosoma, específicamente al RNAr 16S, e inhibe la traducción proteica.

En el caso del gonococo, la resistencia de alto nivel a la espectinomicina (CMI >1024 mg/L) se debe al cambio en la región de unión del RNAr 16S, concretamente a una delección Val25 y una mutación K26E en la fracción 30S ribosomal.

Quinolonas: alteran la actividad de la DNA girasa y topoisomerasa IV, siendo ambas topoisomerasas esenciales para la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA. Su mecanismo de acción se basa en la formación de un complejo compuesto por el fármaco-enzima-DNA que impide la rotura de la doble hélice del DNA en los procesos anteriormente mencionados (104). Dicha DNA girasa está formada por dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB. En el caso concreto del gonococo, la resistencia a estos antibióticos se debe a mutaciones en el gen *gyrA*.

La topoisomerasa IV es un tetrámero formado por dos subunidades ParC y dos ParE. Este enzima también se puede inhibir por acción de las quinolonas, aunque la concentración de antibiótico requerida es superior a la necesaria para inhibir la DNA girasa. Si las mutaciones se producen tan solo en *gyrA*, puede conllevar resistencia de bajo nivel o intermedio, pero para desarrollar resistencia de alto nivel son necesarias mutaciones concomitantes en *parC*.

Macrólidos: son agentes bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S del ribosoma. Diferentes mecanismos se han descrito en la disminución del efecto de la azitromicina, como es el caso de la bomba de eflujo Mtr-C-D-E (105) tratada anteriormente. Mutaciones en la proteína L4 ribosomal, cuyo cambio afecta a la conformación del RNA 23S, permiten un aumento de las CMI del

gonococo a dicho fármaco (105)(106). En la actualidad se han descubierto alteraciones directas en el RNA 23S del gonococo que afectan también a su susceptibilidad (78)(107).

Cefalosporinas: las cefalosporinas de espectro extendido (ESC), consideradas hasta el año 2011 como el tratamiento de primera línea en la infección gonocócica en la mayoría de países, fundamentan su acción en la inactivación de la PBP2, constituyendo esta su principal diana (70). Alteraciones en *penB*, *mtrR*, y *penC*, que favorecen el incremento de la expulsión de estos fármacos o la disminución de la penetración de las cefalosporinas al interior de la célula, junto con mutaciones en el gen *penA*, el cual codifica para dicha PBP2, parecen constituir los mecanismos de resistencia a estos agentes (86)(108).

Entre todos ellos, el principal determinante de resistencia del gonococo a las cefalosporinas son las alteraciones específicas en el gen *penA* que afectan a la PBP2, el objetivo fundamental de las cefalosporinas. En este sentido, se han descrito el gen *penA* varias mutaciones en mosaico que presentan entre 60 y 70 cambios de aminoácidos. Se cree que estas alteraciones se produjeron por transformación y recombinación con otros genes *penA* procedentes de neisserias comensales de la orofaringe, como *Neisseria perflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria cinerea* y *Neisseria flavescens*. Esta adquisición de alelos en mosaico incrementan las CMI de la cefixima en mayor medida que las de la ceftriaxona. En cepas resistentes a cefixima con el alelo *penA* en mosaico, se han detectado tres alteraciones aminoacídicas específicas (G545S, I312M y V316T). Algunos cambios puntuales en la PBP2, como G542S, P551S y P551L, también se han asociado de forma estadística con CMI elevadas a ceftriaxona.

En lo que respecta a las primeras cepas con resistencia de alto nivel a las cefalosporinas, inicialmente se aisló un aislado en Japón (93) que presentó el alelo *penA* en mosaico, el cual mostró diferencias al compararse con el alelo X, alelo encontrado en diversas cepas resistentes a cefixima que se relacionaron con casos de fallos en el tratamiento.

Las cepas resistentes aisladas en Francia (94) y España (109) contienen el alelo en mosaico XXXIV con una alteración adicional A501P. Esta mutación se ha demostrado que cambia la estructura secundaria de la PBP2 e impide la unión de la ceftriaxona y la cefixima a la PBP2.

Aunque el principal mecanismo de resistencia son las alteraciones en la diana terapéutica de estos fármacos, el aumento de la expulsión y la disminución de la penetración de las cefalosporinas a través de los determinantes *mtrR* y *penB*, respectivamente, aumentan las CMI tanto de ceftriaxona como de cefixima, resultando el efecto superior en el caso de la ceftriaxona. Por otro lado, mutaciones en *ponA* y *pilQ*, determinantes de resistencia a la penicilina, parecen no afectar en las CMI de las cefalosporinas.

Como se ha detallado, existen mecanismos que pueden afectar a las CMI de varias familias de antibióticos, independientemente de su mecanismo de acción, y que se engloban dentro de los sistemas de expulsión o de los sistemas que impiden la entrada del fármaco.

En el gonococo se han identificado 4 sistemas de expulsión denominados MtrC-D-E, MacAB, NorM y FarAB, que pertenecen a las familias RND (*resistance nodulation-cell division*), ABC (*ATP-binding cassette*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) y MF (*major facilitator*), respectivamente. La bomba MtrC-D-E, una de las más estudiadas, puede expulsar diferentes antimicrobianos hidrofóbicos, como son los macrólidos, β -lactámicos, ciprofloxacino y tetraciclina. Las cepas de gonococo con resistencia intermedia a diferentes moléculas hidrofóbicas suelen presentar mutaciones en el dominio de unión al DNA del gen *mtrR*. La bomba NorM exporta fluorquinolonas y la MacAB macrólidos.

En lo referente a la penetración de los antimicrobianos al interior de la célula, las cepas de gonococo que expresan porB1B son más sensibles a la penicilina y tetraciclina, mientras que cambios en los aminoácidos de esta porina disminuyen la sensibilidad del gonococo a penicilina, tetraciclina y cefalosporinas. La penicilina y la ceftriaxona se ven más afectadas que la cefixima, lo cual sugiere que la cefixima no

difunde al espacio periplásmico a través de la porina porB1B, o que la difusión no se ve afectada por mutaciones en *penB*. Aun así, este determinante de resistencia necesita la acción sinérgica de otros mecanismos para expresar fenotípicamente el aumento de las CMI.

En general, las cepas bacterianas que presentan resistencias antimicrobianas tienen una ventaja tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que perviven en presencia del antibiótico al que son resistentes. No obstante, en ausencia del antibiótico, el rendimiento biológico de estas cepas acostumbra a ser inferior que el de las cepas sensibles. Aun así, hay mutaciones estabilizadoras o compensatorias que restablecen dicho *fitness* o rendimiento biológico manteniendo la resistencia antimicrobiana.

Concretamente, en el gonococo, los mecanismos de resistencia no parecen provocar una disminución del rendimiento biológico de la bacteria, hecho que se evidencia al seguir detectándose cepas multirresistentes incluso en ausencia de presión antibiótica.

1.3.4. Sistemas de vigilancia de las resistencias

Ante el alarmante incremento de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* multirresistentes, la OMS ha recomendado a todos los Estados Miembros fortalecer la vigilancia, implementar día a día la capacidad de detección de los nuevos casos desde el laboratorio, proporcionar el tratamiento más adecuado de forma individualizada e identificar las poblaciones de alto riesgo. Además, insiste en que la prevención y el buen manejo de la infección constituyen una medida esencial para mitigar la resistencia a los antimicrobianos.

En este sentido, la vigilancia epidemiológica constituye un componente clave en las estrategias internacionales de prevención y control de resistencias a antimicrobianos. Así pues, existen diversas organizaciones con programas de vigilancia que realizan dicha función.

En primer lugar, el programa mundial de vigilancia de antimicrobianos para la gonorrea dependiente de la OMS (GASP-WHO) se organiza mediante una red global de laboratorios de referencia que colaboran entre sí. Esta organización fue creada en 1990 con el objeto de vigilar a nivel mundial las cepas MDR de *N. gonorrhoeae*.

Dada la magnitud del problema y las diferencias en cuanto al perfil de sensibilidad antibiótica de las cepas encontradas en cada país, existe una gran cantidad de programas de vigilancia nacionales que recogen datos y elaboran informes de forma periódica, entre los que destacan el programa Europeo de vigilancia antimicrobiana del gonococo (Euro-GASP) (81), el programa americano (GISP) que actúa en conjunción con el CDC (110), el programa canadiense (Canadian GASP) (111), el programa argentino (GASSP-AR) (112), el programa de Reino Unido (GRASP) (113) y el programa australiano (AGSP) (114).

Con el fin de que la información obtenida sea intercomparable, es necesario que estén estandarizados todos los aspectos relevantes referentes a la correcta obtención de los datos, como es el caso de la recolección y transporte de muestras, cultivo, preservación de cepas, metodología realizada en el estudio de la sensibilidad antibiótica o de caracterización molecular de los aislados. Todo ello es controlado mediante un sistema de calidad desarrollado a través del programa mundial de vigilancia de antimicrobianos para la gonorrea dependiente de la OMS (GASP-WHO)(115).

1.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Tanto las características fenotípicas como genotípicas de los aislados de *Neisseria gonorrhoeae* varían de forma constante en todo el mundo. Por tanto, la tipificación fidedigna de estas cepas es esencial para entender su relación con los distintos perfiles de susceptibilidad antibiótica, los grupos poblacionales asociados, así como sus mecanismos de diseminación.

La aparición de cepas de gonococo multirresistentes en múltiples lugares ha obligado a introducir, en los programas de control nacionales e internacionales, métodos de caracterización molecular. Esta información obtenida es imprescindible a la hora de comprender la epidemiología y la dinámica poblacional. Para el estudio de la genética poblacional reviste especial importancia en el entendimiento de la historia evolutiva del microorganismo.

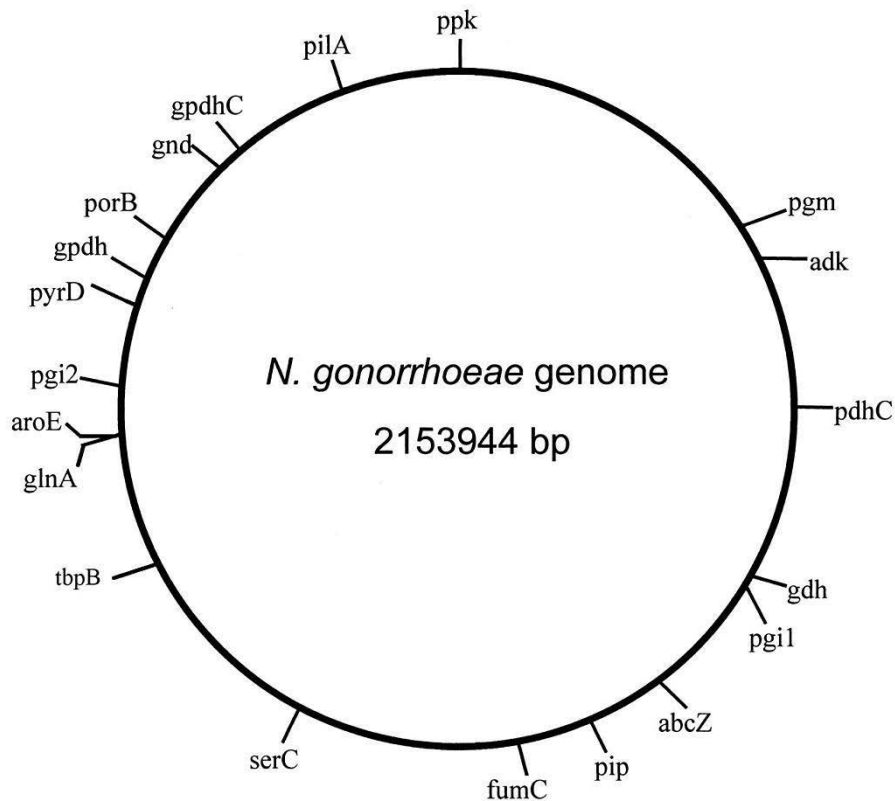


Figura 17. Genoma circular de *Neisseria gonorrhoeae*. Cepa FA1090 compuesta por 2.153.944 pares de bases (116).

Actualmente, y aunque existen varios métodos para llevar a cabo dicho cometido, destacan el *Multilocus sequence typing* (MLST) y el *N. gonorrhoeae multiantigen sequence typing* (NG-MAST), siendo este último el más utilizado y, por tanto, el que mayor posibilidad de intercomparación de resultados permite entre cepas de diferentes áreas geográficas.

1.4.1. Caracterización del gen *porB*

Esta técnica se realiza mediante el análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos de este gen, el cual presenta los alelos *porB1A* y *porB1B* que codifican para las porinas del gonococo *porB1A* y *porB1B* respectivamente (117). Esta última porina se considera clave en la adhesión del gonococo al epitelio del hospedador y por tanto está implicada en la patogenicidad del aislado.

Dicha técnica posee un elevado poder discriminatorio y presenta los datos en un formato comparable con los resultados obtenidos en la serotipificación (118). Aun así, la secuenciación completa del gen *porB* es un proceso laborioso y la mayor parte de las mutaciones de este gen se pueden detectar secuenciando fragmentos internos altamente variables, los cuales proveen de información suficiente para clasificar y discriminar entre diferentes cepas. Esta última posibilidad de análisis molecular corresponde técnica NG-MAST.

1.4.2. NG-MAST (*N. gonorrhoeae multiantigen sequence typing*)

Actualmente, se considera el método más útil para la caracterización molecular de *N. gonorrhoeae* (37). Esta técnica se basa en la secuenciación de fragmentos internos de los genes hipervariables *porB* y *tbpB*, los cuales codifican para antígenos de superficie y que están bajo selección positiva. Existe una base de datos on-line (www.ng-mast.net) la cual permite realizar un análisis comparativo con los aislamientos obtenidos en diferentes regiones del mundo. Además, es una

herramienta eficiente para estimar la variabilidad genética de una población determinada y detectar redes de transmisión (119). En adición, varios estudios han permitido establecer asociaciones entre secuenciotipos (STs) obtenidos mediante NG-MAST y determinados patrones de resistencia antibiótica (120)(121).

Dicho método, aunque generalmente se lleva a cabo a partir del DNA extraído de forma directa del cultivo en el que el gonococo se encuentra aislado, puede realizarse con éxito a partir de muestras que no han sido sembradas previamente como especímenes clínicos (122) o incluso piezas de ropa (123). Algunos estudios demuestran de que se trata de un método útil en muestras urinarias, de cérvix o vagina, aunque en el caso de muestras faríngeas pueden presentarse reacciones cruzadas debido a la presencia de neisserias saprófitas de la orofaríngea (118).

1.4.3. MLST (*Multilocus sequence typing*)

Se trata de otra herramienta de caracterización molecular del gonococo, cuyo fundamento es el opuesto al de la técnica de NG-MAST. Dicha técnica está basada en el análisis de genes altamente conservados del gonococo. Estos se caracterizan por la lenta acumulación de mutaciones y reflejan la evolución natural de la población microbiana. La base de datos pública de MLST (<http://pubmlst.org/neisseria>) permite comparar las poblaciones de gonococo a nivel mundial.

Con frecuencia, los programas de vigilancia de *N. gonorrhoeae* dependen de los métodos utilizados para la identificación y tipificación molecular de los aislados clínicos. No obstante, y aunque los estudios acerca de estos métodos de caracterización concluyen que la técnica de NG-MAST es la más idónea, existen discrepancias en su uso y falta de experiencia en su aplicación.

Estas discrepancias conllevan que, a día de hoy, no esté establecido un método único que utilizado por toda la sociedad científica permita identificar diferentes cepas

relacionadas entre sí. No obstante, existen varios estudios que determinan el poder discriminatorio de cada una de estas técnicas.

Ilina *et al.* (118) evaluaron los diferentes métodos para la tipificación del gonococo, incluyendo las técnicas anteriormente mencionadas (porB, NG-MAST, MLST) y otros como la serotipificación con aislados de *N. gonorrhoeae* obtenidos en diferentes regiones de Rusia geográficamente no relacionadas.

Entre sus hallazgos destaca que el poder discriminatorio de la serotipificación tradicional fue de 0,82, resultado inferior al 0,90 establecido como valor deseable para poder considerar fiable una técnica de caracterización de las cepas (124).

Por el contrario, los métodos basados en el estudio de los ácidos nucleicos demostraron un poder discriminatorio muy superior. El tipaje de los genes utilizado por NG-MAST obtuvo un resultado superior al 0,95, valor recomendado por la “*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*” (ESCMID) para los métodos de caracterización molecular (125). En cuanto a la técnica MLST, el poder discriminatorio obtenido fue de 0,91 y por tanto inferior al obtenido con el método del NG-MAST.

Este grupo concluye que los métodos basados en la caracterización de los ácidos nucleicos son los más adecuados. Concretamente, el NG-MAST se considera el más útil para la monitorización, a corto plazo, de los patrones de transmisión y es el más apropiado para la investigación de brotes surgidos a nivel local.

En otro estudio, Bilek *et al.* (119) analizaron la utilidad de NG-MAST como herramienta para el estudio de contactos. Sus resultados afirman que dicho método es el más adecuado, comparado con la tipificación del gen Opa, ya que presenta un porcentaje de concordancia superior, la técnica es más robusta y fácil de realizar y los resultados obtenidos son más precisos y no presentan ambigüedad.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El aumento constante de los casos de infección gonocócica así como la capacidad innata de *Neisseria gonorrhoeae* para evadir la acción de todos los antibióticos empleados en su tratamiento convierten, al agente causal de la gonorrea, en una amenaza para la salud pública a nivel mundial. Por estas razones, la adecuada detección, estudio de la sensibilidad antibiótica, caracterización molecular de los aislados y análisis de las características demográficas de los pacientes afectos, constituyen etapas clave para el entendimiento de su evolución y elaboración de programas de vigilancia y control epidemiológico eficaces.

2.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

- Monitorizar las resistencias frente a 7 antibióticos en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* recogidas en el área geográfica de la Comunidad Valenciana durante el periodo 2013 - 2018 y englobadas en el proyecto GONOVig, así como estudiar la información demográfica de los pacientes.
- Tipificar molecularmente los aislados analizados durante el proyecto GONOVig mediante la técnica NG-MAST y clasificar los mismos en los diferentes secuenciotipos (STs) y genogrupos (G) atendiendo a las secuencias de sus alelos porB y tbpB.
- Determinar el patrón de susceptibilidad antibiótica frente a 9 antibióticos en todos los aislados de gonococo reportados a la Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA) durante el periodo 2013 – 2019, así como el estudiar los datos demográficos de los pacientes y las técnicas diagnósticas empleadas en los casos positivos.
- Estimar la tasa de incidencia de la infección gonocócica en la Comunidad Valenciana y en las provincias de Valencia, Alicante y Castellón, así como su evolución durante los años 2013 – 2019 a partir de las cepas obtenidas de RedMIVA.

2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Comparar los resultados de sensibilidad antimicrobiana estudiados en las cepas de gonococo recogidas durante el proyecto GONOVig con los datos antibióticos obtenidos de RedMIVA correspondientes al periodo 2013 – 2018, todos ellos pertenecientes al área geográfica de la Comunidad Valenciana.
- Establecer relaciones entre el patrón de resistencia antimicrobiana y los secuenciotipos y genogrupos obtenidos en la caracterización molecular de las cepas estudiadas en el proyecto GONOVig.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO Y POBLACIÓN

La Comunidad Valenciana es una comunidad autónoma española constituida en el año 1982 que comprende las provincias de Valencia, Alicante y Castellón. Se sitúa entre el este y sureste de la Península Ibérica, en el litoral del mar Mediterráneo. Posee una extensión de 23.255 Km², suponiendo la octava de las diecisiete comunidades autónomas españolas en superficie y representando el 4,6% de toda la extensión nacional (126).

Está conformada por un total de 33 comarcas y 542 municipios, 266 de los cuales corresponden a la provincia de Valencia, 141 a la de Alicante y 135 a la de Castellón (126). En su territorio, con capital en Valencia, habitan actualmente 5.003.769 personas (127), lo que representa un 11% de la población de España y la convierte en la cuarta región del país por número de habitantes. Su población se encuentra desigualmente distribuida, estando más concentrada en la franja costera, y presenta una densidad media de 215 habitantes/Km² (128).

Respecto a la edad de la población en el año 2019, el 15,8% correspondió a menores de 16 años, el 14,1% poseyó una edad comprendida entre los 16 y 29 años, el 50,8% entre los 30 y los 64 años y el 19,2% de los residentes resultó mayor de 64 años (128).

En cuanto a la distribución de dicha población por provincias, la mayor concentración demográfica de la Comunidad Valenciana se situó en la provincia de Valencia, alcanzando los 2.565.124 habitantes, lo que supone aproximadamente el 51% de la población de toda la comunidad. En segundo lugar, se situó la provincia de Alicante con 1.858.683 residentes, constituyendo el 37% de la población aquí incluida. En último lugar se encuentra la provincia de Castellón, con 579.962 habitantes, constituyendo el 12% del conjunto de habitantes de la Comunidad Valenciana (128).

Actualmente, la Comunidad Valenciana está repartida en veinticuatro departamentos de salud (DS), numerados del 1 al 24 (Resolución de 10 de marzo de 2010, DOGV núm. 6289 de 15 de junio), con una población media de unos 223.000

habitantes por departamento y 241 zonas básicas de salud (129). Estos departamentos de salud están distribuidos geográficamente de la siguiente forma (Figura 18):

□ La provincia de Castellón se divide en tres departamentos correspondientes a:

- Hospital de Vinaroz (Departamento 1).
- Hospital General de Castellón (Departamento 2).
- Hospital de La Plana (Departamento 3).

□ La provincia de Valencia está distribuida en once departamentos:

- Hospital de Sagunto (Departamento 4).
- Hospital Clínico – la Malvarrosa (Departamento 5).
- Hospital Arnau de Vilanova – Liria (Departamento 6).
- Hospital La Fe (Departamento 7).
- Hospital de Requena (Departamento 8).
- Hospital General (Departamento 9).
- Hospital Doctor Peset (Departamento 10).
- Hospital Universitario de La Ribera (Departamento 11).
- Hospital de Gandía (Departamento 12).
- Hospitales Játiva - Onteniente (Departamento 14).
- Hospital de Manises (Departamento 24).

□ La provincia de Alicante se divide en diez departamentos:

- Hospital de Denia (Departamento 13).
- Hospital de Alcoy (Departamento 15).
- Hospital Marina Baixa de Villajoyosa (Departamento 16).
- Hospital de Sant Joan (Departamento 17).
- Hospital de Elda (Departamento 18).
- Hospital General de Alicante (Departamento 19).
- Hospital General de Elche (Departamento 20).

- Hospital Vega Baja de Orihuela (Departamento 21).
- Hospital de Torrevieja (Departamento 22).
- Hospital Elche - Crevillente (Departamento 23).



Figura 18. Mapa sanitario de la Comunidad Valenciana. Fuente: Conselleria de Sanitat Universal y Salud Pública (disponible en <http://www.san.gva.es/web/comunicacion/organizacion-territorial>).

A continuación, en la Tabla 5 se muestra el número de habitantes pertenecientes a cada uno de los 24 DS en el año 2018, datos obtenidos de la Generalitat Valenciana de Salud (129).

Hospital (Departamento Salud)	Población año 2018
Hospital de Vinaroz (1)	90.675
Hospital General de Castellón (2)	281.200
Hospital de La Plana (3)	186.572
Hospital de Sagunto (4)	151.274
Hospital Clínico – la Malvarrosa (5)	344.538
Hospital Arnau de Vilanova – Liria (6)	316.981
Hospital La Fe (7)	285.066
Hospital de Requena (8)	51.746
Consortio Hospital General (9)	360.488
Hospital Doctor Peset (10)	278.345
Hospital Universitario de La Ribera (11)	258.394
Hospital de Gandía (12)	176.957
Hospital de Denia (13)	168.808
Hospitales Játiva - Onteniente (14)	194.740
Hospital de Alcoy (15)	136.788
Hospital Marina Baixa, Villajoyosa (16)	181.908
Hospital Sant Joan (17)	220.965
Hospital de Elda (18)	189.573
Hospital General de Alicante (19)	274.122
Hospital General de Elche (20)	166.692
Hospital Vega Baja, Orihuela (21)	167.546
Hospital de Torrevieja (22)	182.739
Hospital de Manises (24).	205.202
Hospital Elche - Crevillente (23)	155.311

Tabla 5. Número total de habitantes en los 24 departamentos de salud de la Conselleria de Sanitat durante el año 2018. Fuente: Conselleria de Sanitat Universal y Salud Pública.

3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO - PROYECTO GONOVIG

El proyecto GONOVig se plantea como un estudio prospectivo y multicéntrico para la vigilancia de las resistencias antibióticas de *Neisseria gonorrhoeae* en aislados circulantes en la Comunidad Valenciana durante el año 2013. No obstante, tras los datos obtenidos, se decide continuar con la recogida de cepas hasta la finalización del año 2018, con el propósito de estudiar la evolución de la sensibilidad antibiótica así como llevar a cabo la caracterización molecular de las mismas, objetivos fundamentales de la presente Tesis.

Para conseguir dicha meta, se estableció durante todo el proyecto un circuito que requirió la colaboración de los Servicios de Microbiología y Parasitología de diferentes hospitales enmarcados en la Comunidad Valenciana, los cuales estuvieron distribuidos en las 3 provincias que la componen.

Se consideró caso a cualquier aislamiento bacteriano de *Neisseria gonorrhoeae* obtenido a partir del cultivo de muestras biológicas de pacientes distintos. Dichas muestras pudieron provenir de cualquier localización anatómica, ya sea uretral, cervical, anorectal, faríngea u otras.

Asimismo, se recogieron los datos demográficos y clínicos referentes a los pacientes, los métodos diagnósticos y de estudio de la sensibilidad utilizados, así como los resultados microbiológicos de los hospitales de los que provinieron dichos aislados.

3.3. SOLICITUD DE CEPAS

Cada centro participante se comprometió a la recogida y posterior envío de las cepas bacterianas al Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario de La Ribera (Alzira, Valencia), el cual actuó como centro de referencia.

Para poder participar en dicho proyecto, se consideró necesario aportar un mínimo de 3 aislados con presencia del microorganismo a estudio. No se incluyeron en el estudio muestras duplicadas de un mismo paciente tomadas durante un mismo episodio.

Finalmente y tras el periodo de análisis, se recogieron 230 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* provenientes de 13 hospitales representativos de la Comunidad Valenciana. Estos centros, clasificados en orden decreciente según el número de cepas aportadas, fueron los siguientes:

- Hospital Universitario de La Ribera (Valencia).
- Hospital Clínico (Valencia).
- Hospital Marina Baixa, Villajoyosa (Alicante).
- Hospital General (Castellón).
- Hospital de Manises (Valencia).
- Hospital Comarcal de Vinaroz (Castellón).
- Hospital General (Valencia).
- Hospital de Denia (Alicante).
- Hospital Arnau de Vilanova - Liria (Valencia).
- Hospital de Sagunto (Valencia).
- Hospital Vega Baja, Orihuela (Alicante).
- Hospital Lluís Alcanyís, Játiva (Valencia).
- Hospital de La Plana (Castellón).

3.4. CENTROS PARTICIPANTES

El proceso referente a la toma de muestra, transporte y conservación de la misma, fue especialmente importante al tratarse de *Neisseria gonorrhoeae*, microorganismo lábil y sensible a las circunstancias ambientales. Tal y como se ha tratado en la parte introductoria, las condiciones como la temperatura, luz ultravioleta, humedad y desecación dañan de manera importante al agente etiológico de la gonorrea.

Esto hecho afecta fundamentalmente a la viabilidad del aislado y, por tanto, a su crecimiento en los medios adecuados. Es por ello que se prestó especial atención al cuidado de estos requerimientos específicos para garantizar la posterior supervivencia de las cepas.

3.4.1. Toma de muestra

Las muestras clínicas recogidas y empleadas en el cultivo fueron el exudado uretral en el varón y el endocervical en la mujer. No obstante, también entraron a estudio exudados faríngeos y muestras anales.

A continuación, se detalla el proceso para la correcta recogida de la muestra en función de su localización anatómica.

- Muestras endocervicales: antes de obtener la muestra, se debe utilizar una esponja o torunda para eliminar todas las secreciones exocervicales. Posteriormente, se inserta una torunda de 1 a 2 cm en el canal endocervical, rotándose contra la pared del mismo 2 o más veces durante un periodo de entre 10 - 30 segundos. Para recoger adecuadamente estas muestras, es importante que la torunda se retire sin tocar la superficie vaginal y se introduzca, acto seguido, en un medio de transporte etiquetado con los datos del paciente.

- Muestras uretrales: preferiblemente se debe obtener la muestra antes de orinar o dos horas después de la última micción. Se debe insertar la torunda en la uretra de 2 a 4 cm y rotarse un mínimo de 2 ocasiones.
- Muestras anales: se insertará la torunda pasando el esfínter anal, girándola de lado a lado y dejándola de 10 a 30 segundos antes de extraerla. Si esta se contamina con heces, se descartará y repetirá la toma con otra torunda.
- Muestras faríngeas y de zonas estériles seguirán las normas de recogida, transporte y procesamiento general de muestras tomadas en el laboratorio de microbiología.

3.4.2. Procesado de la muestra

En primer lugar, los centros participantes procesaron las muestras obtenidas en sus respectivos servicios clínicos, identificando y aislando el gonococo para posteriormente realizar los estudios de sensibilidad antibiótica pertinentes.

Para este fin, se utilizaron métodos convencionales como son la tinción de Gram, prueba de la citocromo-oxidasa, producción de catalasa y perfil bioquímico. Algunos centros llevaron a cabo este proceso mediante la técnica espectrométrica MALDI-TOF.

Una vez identificado el microorganismo como *Neisseria gonorrhoeae*, se procedió a su siembra en medios convencionales y selectivos, así como a la realización del estudio de sensibilidad antibiótica frente a los diferentes antimicrobianos.

3.4.3. Transporte de la muestra

Tras llevar a cabo el procesado, identificación y estudio de sensibilidad de la cepa, cada centro participante contactó con el hospital de referencia mediante vía electrónica o telefónica. Dicho contacto se realizó directamente con el doctorando o con el personal facultativo del laboratorio de microbiología del Hospital Universitario de La Ribera incluido en el grupo de investigadores del proyecto GONOVig. De esta manera, se acordó el horario de entrega y se aseguraron las condiciones necesarias de transporte para la correcta recepción de las cepas.

Con el fin de obtener el máximo rendimiento de cada muestra y asegurar la viabilidad del aislado, cada centro participante incluyó en el envío:

- El hisopo original, a partir de la cual se obtuvo la muestra.
- La placa de agar chocolate, convenientemente sellada, en la que se aisló el microorganismo. También se envió el cultivo en agar selectivo, en caso de disponerse.
- Un nuevo hisopo, recogiendo colonias de la placa primaria.

Para este último cometido, se acordó utilizar escobillones flocados en medio de transporte líquido tipo Stuart-Amies con carbón activado. Dichos escobillones contienen cortas fibras dispuestas de forma perpendicular que permiten la adecuada conservación del patógeno. Además, estas estructuras garantizan una absorción máxima de la muestra así como una buena elución en el medio líquido de transporte, con un nivel de recuperación del gonococo a temperatura ambiente del 100% a las 12 horas y de más del 90% tras 24 horas (130).

Dichos escobillones con medio de transporte se mantuvieron refrigerados a 4°C hasta el momento del envío, temperatura a la cual se ha demostrado que la supervivencia del gonococo es muy superior (130). Los medios de siembra, sin embargo, se conservaron a temperaturas de entre 35 y 37°C, y en un ambiente del 5% de CO₂ recomendado por las diferentes sociedades científicas.

3.4.4. Envío de la muestra y documentación identificativa

El envío de la cepa, tras realizarse el contacto entre el centro participante y el centro de referencia, se llevó a cabo a temperatura ambiente y en el menor tiempo posible para garantizar la viabilidad del microorganismo. En este sentido cabe resaltar que el intervalo transcurrido desde el momento en que se realizó la identificación de *N. gonorrhoeae* hasta la recepción del aislado en el centro de referencia siempre se llevó a cabo en un periodo inferior a 48 horas. No entraron a estudio muestras que por motivos laborales u organizativos no cumplieran con dichas premisas.

A continuación, en la Figura 19 se muestra un esquema del flujo de trabajo coordinado entre los diferentes centros participantes del proyecto GONOVig y el centro que actuó de referencia, indicando las acciones realizadas en cada uno de ellos, así como los medios y condiciones requeridas para el correcto transporte de la muestra.

La Figura 20 muestra el anexo que requirió ser debidamente cumplimentado y adjuntado para cada una de las muestras enviadas. La información solicitada recoge los datos personales del propio paciente como son el número de historia clínica, iniciales de su nombre y apellidos, edad, sexo y número de identificación del laboratorio de origen. Estas referencias impidieron conocer al paciente en circunstancias ajenas al ámbito hospitalario y se mantuvieron en la más estricta confidencialidad.

Por otro lado, también se requirió información relativa al hospital de procedencia así como al tipo de muestra obtenida. Finalmente, se precisaron los datos relativos al lugar geográfico de adquisición de la infección, marcas comerciales utilizadas en la identificación del microorganismo y técnicas empleadas para la obtención de la sensibilidad antibiótica, así como los resultados de la misma.

Todas estas referencias fueron recogidas en una base de datos para la posterior explotación de las mismas, junto con el resto de variables relacionadas con la

sensibilidad y las características moleculares de la cepa desarrolladas principalmente en el Hospital Universitario de La Ribera, centro coordinador del proyecto GONOVig.

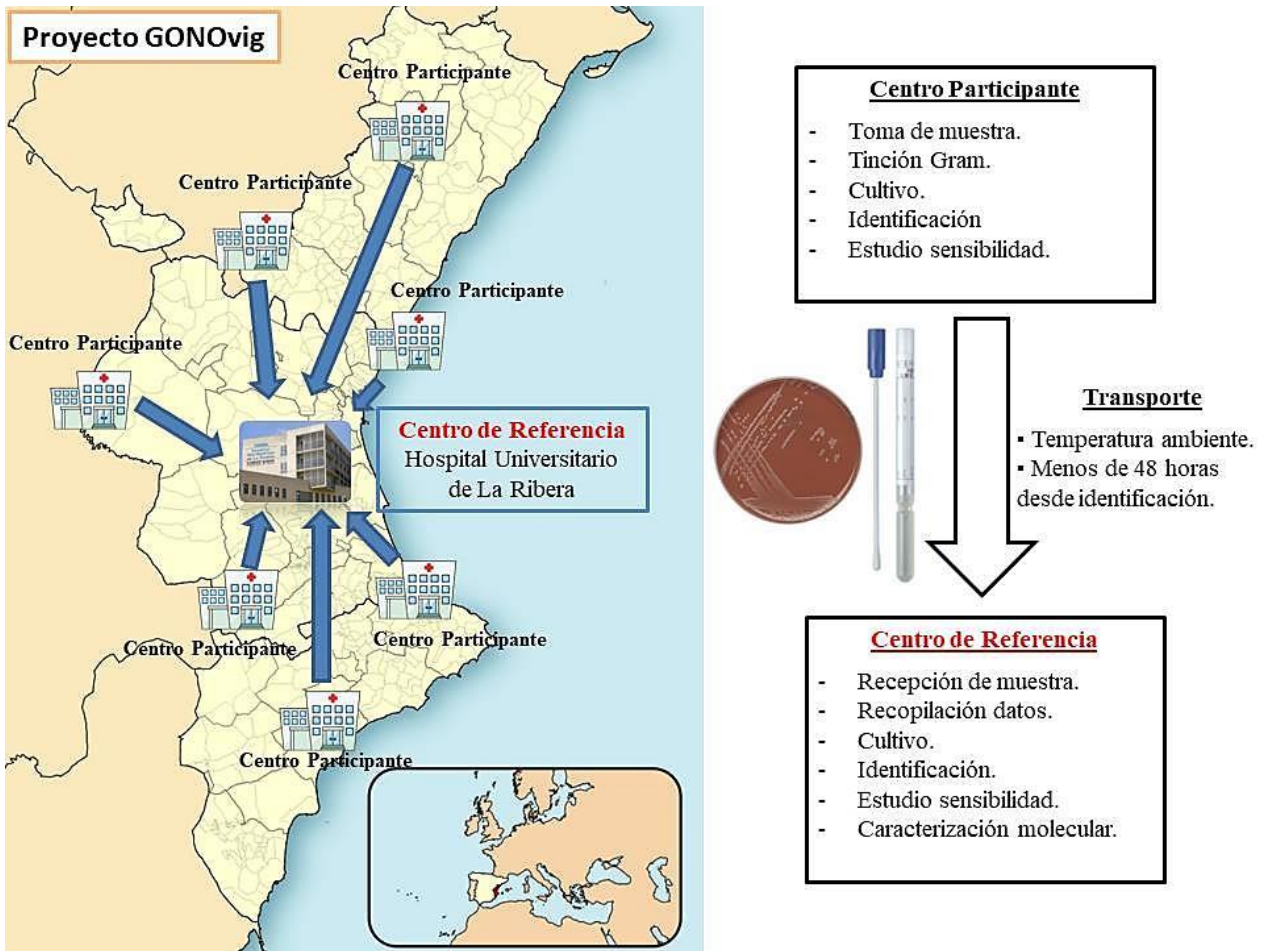


Figura 19. Flujo de envío de las cepas estudiadas en el Proyecto GONOVig desde cada centro participante al centro de referencia, así como las acciones realizadas en cada uno de ellos.

ANEXO HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

- **Datos relacionados con el paciente:**
 - Número de registro del laboratorio de origen:
 - Número de historia del paciente (para evitar duplicados):
 - Iniciales del paciente (p.e. José Pérez García = J-PG):
 - Sexo (M = masculino; F = femenino): Edad (en años):

- **Datos relacionados con el Centro y la muestra:**
 - Centro (Hospital) de procedencia:
 - Tipo de muestra (uretral, cervical, vaginal, faríngea, anal, otros):

- **Datos relacionados con la cepa bacteriana de *N. gonorrhoeae*:**
 - Lugar de adquisición de la infección (Com. Valenciana, otros [especificar]):
 - Método o marca de identificación (Vitek, Api NH, MicroScan, etc):
 - Método utilizado para el antibiograma (disco-placa, microdilución, E-test, etc):
 - Marca (Sensititre, Microscan, Wider, etc):
 - Resultados del antibiograma:

Antibiótico Testado - Método	Resultado cuantitativo (Diámetro del halo, CMI)	Resultado cualitativo (Sensible, Resistente)

Figura 20. Anexo con datos identificativos del paciente, centro participante, técnicas y resultados obtenidos de las mismas, cumplimentado para cada aislado a estudio.

3.5. CENTRO DE REFERENCIA

Tras la recepción de la cepa en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Ribera, se procedió a su reprocesamiento como si se tratase de una muestra del propio hospital.

El desarrollo de los pasos que a continuación se describen, se realizaron con cada aislado incluido en este estudio con el objetivo de asegurar la veracidad y comparabilidad de los resultados obtenidos en su posterior análisis.

3.5.1. Recogida de datos

Simultáneamente, se complementó la base datos (Excel, Microsoft) con la información demográfica del paciente y los datos anteriormente expuestos en el anexo mostrado en la Figura 20. Ante la falta de cualquier información aquí contenida se contactó con el laboratorio de origen para completar la totalidad de los campos.

Dicha base de datos tuvo varias funciones; recoger los datos referentes a cada muestra, clasificar a los pacientes y evitar duplicidades en el posterior estudio de los resultados. En dicha base de datos se incluyó la siguiente información:

- Datos del paciente: SIP, NHC, iniciales del nombre y apellidos, edad y sexo.
- Datos del centro participante: hospital y fecha de recogida del aislado, métodos utilizados en el estudio de la sensibilidad así como resultados de los mismos.
- Resultados de sensibilidad antibiótica obtenidos en el centro de referencia a partir de la concentración mínima inhibitoria (CMI) hallada para cada uno de los 7 antibióticos testados, clasificación de la cepa según criterios CLSI y EUCAST, producción de β -lactamasa.
- Resultados del estudio molecular de cada aislado mediante la técnica NG-MAST, número de alelo porB y *tbpB* así como secuenciotipo obtenido.

3.5.2. Cultivo

El cultivo del gonococo se realizó en dos medios distintos y de forma paralela tal y como indican las guías científicas (50):

- En un medio no selectivo, en concreto en agar chocolate enriquecido con un suplemento de vitaminas, aminoácidos y otros factores nutritivos.
- En un medio selectivo, como es el agar Thayer-Martin, el cual posee antimicrobianos que impiden el crecimiento de organismos Gram positivos, determinados Gram negativos y hongos, restringiendo por tanto el crecimiento a las especies del género *Neisseria*.

Ambas placas se incubaron a una temperatura de 37°C y con una atmósfera del 5% de CO₂. Se revisó el crecimiento del microorganismo cada 24 horas, durante al menos 72 horas (131).

3.5.3. Identificación

La identificación incorrecta del gonococo, bien por omisión de su presencia como por confusión con otros microorganismos, puede acarrear graves consecuencias para el paciente.

Por este motivo, existen tres niveles para filiar correctamente a dicho patógeno, basados en hallazgos clínicos y resultados obtenidos en el laboratorio, que permiten la correcta identificación *N. gonorrhoeae* en muestras clínicas (132).

Identificación sugestiva

Es la que se lleva a cabo por parte de los clínicos de forma previa a la toma de la muestra. La observación del exudado purulento cervical o uretral tras la examinación física del paciente, así como la exposición de riesgo del mismo a una persona infectada

con gonococo conforma la base de la misma. No se desarrollará por tratarse de un proceso externo al laboratorio.

Identificación presuntiva

Tras la siembra y una vez completado el periodo de incubación y crecimiento, se desarrolló dicha identificación presuntiva en el centro de referencia de la siguiente manera.

Se efectuó, en primer lugar, una observación visual de la morfología de las colonias. Las colonias características del gonococo presentan pequeño tamaño, ligera elevación, aspecto brillante y color grisáceo. Cabe señalar que el tamaño y apariencia de las colonias dependerá de las horas de incubación del aislado, hecho por el cual se realizó una inspección visual del cultivo al menos cada 24 horas. A partir de las 48 horas, estas colonias presentan una coloración marrón debida a la autólisis de las células.

Una de las particularidades propias de *N. gonorrhoeae* es que se trata de un patógeno altamente pleomórfico, por lo que con frecuencia aparecen colonias con morfología diferente provenientes de la misma cepa. La presencia de β -lactamasa de origen plasmídico también afecta al color de dichas colonias (133), tal y como se muestra en la Figura 21.

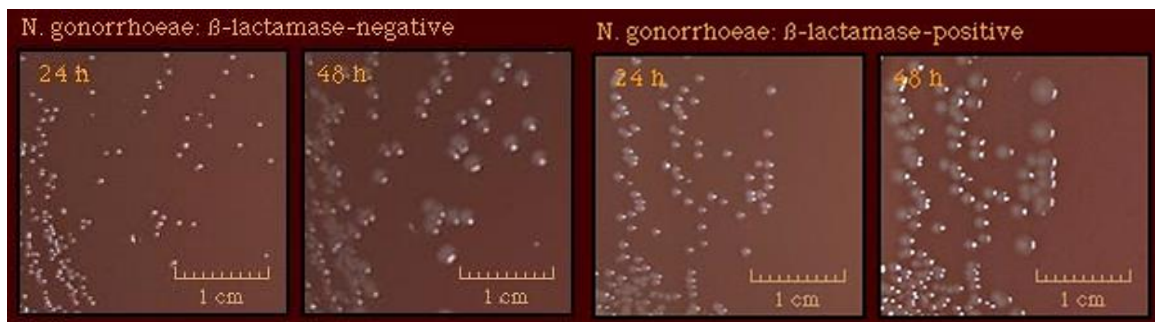


Figura 21. Características morfológicas de las colonias de *N. gonorrhoeae* tras 24 y 48 horas de crecimiento, en colonias con resultado negativo y positivo para la prueba de la β -lactamasa. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponible en <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm>.

En este punto, se llevó a cabo la confirmación mediante el resultado positivo en las pruebas de la Citocromo-C-oxidasa (Pathotec, Thermo Scientific, EEUU) y de la catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%) (24).

En el caso de muestras obtenidas en el Hospital Universitario de La Ribera, centro de referencia, además de los pasos previamente descritos se realizó la tinción de Gram para la visualización de los diplococos Gram negativos dispuestos en grano de café y situados habitualmente en el interior de células polimorfonucleadas (134).

Identificación definitiva

El proceso identificativo concluyó mediante el uso de técnicas fundamentadas en el estudio de los patrones de utilización de carbohidratos. Para ello, se empleó el sistema Vitek-2 (bioMérieux, España), el cual utiliza tarjetas *Neisseria-Haemophilus* NH (bioMérieux, España) de 64 pocillos.

El método se basa en tecnología colorimétrica e incluye 30 pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo; 11 pruebas de glucosidasa y peptidasa, 10 pruebas de acidificación, 5 de alcalinización y 4 misceláneas (135).

Este proceso de identificación bioquímica se desarrolló de la siguiente manera:

- Cada aislado, se resuspendió en solución salina al 0,5%, y se preparó una disolución bacteriana de turbidez 3 McFarland mediante el sistema VITEK 2 DensiCheck (bioMérieux, España). El período de tiempo desde la preparación del inóculo hasta la carga de la tarjeta fue inferior a 30 minutos.
- La tarjeta fue colocada en la bandeja del sistema VITEK 2 y se procesó automáticamente en una cámara de vacío, incubándose a 35,5 °C.
- En este momento, el sistema realizó la lectura de los 64 pocillos de forma intermitente cada 15 minutos y durante 6 horas. En función de los resultados obtenidos y mediante el algoritmo presente en la base de datos del equipo

VITEK 2, este emitió un resultado definitivo asociando el porcentaje de éxito obtenido durante el proceso identificativo (136).

Finalmente, el crecimiento y aislamiento del gonococo en medios selectivos como Thayer-Martin junto con el aspecto de las colonias presentes y los resultados bioquímicos, confirmaron dicha identificación definitiva corroborando que el microorganismo aislado se trataba de *N. gonorrhoeae*.

3.5.4. Estudio de sensibilidad antibiótica

El estudio de susceptibilidad antibiótica se realizó mediante el método fenotípico de difusión en agar, haciendo uso de tiras de E-test y siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (63).

Dichas tiras de E-test presentan un gradiente estable de 15 diluciones seriadas del fármaco a estudio. A partir del halo de inhibición bacteriana que producen se obtiene la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), siendo esta la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento del microorganismo tras su incubación (137).

Preparación del inóculo

Se utilizó el método de suspensión directa de colonias. Se realizó un subcultivo en agar chocolate y se incubó durante un periodo de 18 a 24 horas.

Pasado este tiempo, se tomaron de 2 a 3 colonias con un asa estéril y se resuspendieron en solución salina hasta conseguir una disolución con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland, indicada en los protocolos como la adecuada para la realización de la determinación de la susceptibilidad antibiótica (138). Esta suspensión contuvo, aproximadamente, entre 1 y 2×10^8 UFC / mL.

Inoculación de placas

A continuación, se sumergió una torunda estéril en dicha disolución, haciéndose rodar firmemente varias veces contra la pared interna superior del tubo. De este modo se evitó el exceso de inóculo dispensado en la placa de cultivo.

Seguidamente y con dicha torunda, se inocularon las placas de agar chocolate enriquecido con PolyVitex (bioMérieux, España), nutriente adecuado para la siembra de microorganismos de crecimiento dificultoso (139).

La inoculación de la placa se llevó a cabo asegurándose de que se realizaba en su totalidad, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consiguió deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme.

Se volvió a colocar la tapa de la placa y se mantuvo a temperatura ambiente durante un periodo de 15 minutos, con el fin de permitir que la humedad de la superficie se absorbiese.

Dispensación de las tiras

En primer lugar, se comprobó que la superficie del agar estuviese completamente seca. A continuación, se aplicaron las tiras de E-test (bioMérieux, España) (Liofilchem, Italia) mediante el uso de pinzas estériles. En este punto se prestó atención en los siguientes aspectos;

- La escala de CMI se orientó hacia arriba, con la concentración máxima cercana al extremo de la placa.
- Se comprobó que la tira contactase completamente con la superficie del agar. En caso necesario, se eliminaron las gotas de aire que pudiesen encontrarse por debajo de la tira presionándola ligeramente con las pinzas.
- Tras la colocación de las tiras, no se movieron con el objeto de no comprometer la correcta difusión del antibiótico.

Se estudiaron 7 antibióticos diferentes frente al conjunto de cepas de *Neisseria gonorrhoeae*. Para ello, se prepararon 4 placas de agar chocolate siguiendo el procedimiento anterior y se testó en cada una de ellas dos antimicrobianos diferentes.

Antibiótico	Rango Concentración (mg/L)
Azitromicina	0,016 - 256
Espectinomicina	0,064 - 1024
Cefixima	0,016 - 256
Ceftriaxona	0,002 - 256
Ciprofloxacino	0,002 - 32
Penicilina	0,002 - 32
Tetraciclina	0,016 - 256

Tabla 6. Antibióticos testados frente a *Neisseria gonorrhoeae* y rangos de concentraciones presentes en la tiras de E-test.

Incubación

Una vez dispensadas las tiras, se invirtieron e incubaron las placas durante 24 horas, a 37°C en atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono al 5%.

Lectura de los resultados

Transcurridas 24 horas, se realizó la lectura e interpretación de los antibiogramas. Así pues, se procedió a leer la CMI en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test (134).

Este proceso de lectura e interpretación de los resultados fue siempre realizado de forma independiente por al menos dos facultativos del Servicio de Microbiología y Parasitología, repitiendo dicho procedimiento en caso de obtener resultados discordantes.

Se tuvieron las siguientes consideraciones en el momento de la lectura:

- Cuando el crecimiento tuvo lugar a lo largo de toda la tira y no se observó la formación de la elipse de inhibición, la CMI se informó como superior al valor máximo de la escala de lectura.
- Por el contrario, cuando la elipse de inhibición se situó por debajo de la tira, se informó como inferior al valor mínimo de la escala de lectura.
- Cuando la CMI coincidió entre dos marcas de la tira, se informó el resultado correspondiente al valor superior.
- Si se observaron intersecciones diferentes del crecimiento bacteriano en ambas partes de la tira, se informó el valor de CMI más alto.
- En la lectura de la CMI de los antibióticos de tipo bacteriostático, se calculó el 80% del valor del punto de corte.

Control de Calidad

Para el control de calidad se empleó, con cada lote nuevo de antimicrobianos, la cepa *Neisseria gonorrhoeae* 49226 ATCC (*American Type Culture Collection*). No se validó ningún resultado de sensibilidad hasta comprobar que las CMI de los antibióticos utilizados se encontrasen dentro de los rangos de normalidad establecidos por CLSI mostrados en la Tabla 7 (63).

Antibiótico	Rango Concentración (mg/L)
Azitromicina	0,125 – 0,5
Espectinomicina	8,0 – 32,0
Cefixima	0,004 – 0,03
Ceftriaxona	0,004 – 0,015
Ciprofloxacino	0,001 – 0,008
Penicilina	0,25 – 1,0
Tetraciclina	0,25 – 1,0

Tabla 7. Antibióticos testados y rangos de CMI establecidos para el control de calidad realizado mediante la cepa *Neisseria gonorrhoeae* 49226 ATCC (140).

Interpretación de los resultados de CMI

El análisis de los resultados de CMI constituye un paso fundamental en el estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Dicho estudio se realizó atendiendo a valores establecidos en el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (63) así como a los puntos de corte considerados por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (64), con el propósito de comparar ambas clasificaciones y evaluar las diferencias interpretativas que se originan.

Estos comités determinan los puntos de corte normalizados basados en propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y de eficacia clínica, para definir el éxito o fracaso terapéutico de las diferentes especies bacterianas a cada antimicrobiano. De esta manera, la interpretación de los resultados obtenidos para los antibióticos espectinomina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino, penicilina y tetraciclina, permitió clasificar a cada aislado en categorías clínicas. Estas categorías fueron sensible, intermedio o resistente en el caso de CLSI, y sensible o resistente en el caso de EUCAST.

En la Tabla 8, se representan los puntos de los corte clínicos establecidos en las guías actualizadas de EUCAST (v10.0) (64) y CLSI (*M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th edition*) (63) a los antibióticos testados en nuestro estudio, así como la categoría clínica asociada a cada valor de CMI obtenido.

Antibiótico	CLSI (2020) (63)			EUCAST (2020) (64)	
	Sensible (mg/L)	Intermedio (mg/L)	Resistente (mg/L)	Sensible (mg/L)	Resistente (mg/L)
Espectinomicina	≤32	64	≥128	≤64	>64
Cefixima	≤0,25	-	-	≤0,125	>0,125
Ceftriaxona	≤0,25	-	-	≤0,125	>0,125
Ciprofloxacino	≤0,06	0,12 – 0,5	≥1	≤0,03	>0,06
Penicilina	≤0,06	0,12 - 1	≥2	≤0,06	>1
Tetraciclina	≤0,25	0,5 - 1	≥2	≤0,5	>1

Tabla 8. Puntos de corte de los diferentes antimicrobianos y clasificación de los aislados de *Neisseria gonorrhoeae* en función de su CMI, atendiendo criterios CLSI y EUCAST.

En el caso concreto de la azitromicina, las últimas guías tanto de CLSI como de EUCAST no disponen de puntos de corte clínicos, sino que establecen un punto de corte epidemiológico (*epidemiological cutoff value* o ECV). Dicho ECV es utilizado para determinar la presencia y evolución de cepas no salvajes (63)(64).

Aquellas cepas con una CMI inferior a 1 mg/L son consideradas salvajes o sin mecanismos de resistencia (*wild-type* o WT) mientras que aquellas con una CMI superior a dicho ECV se consideran no salvajes o que han adquirido mecanismos de resistencia mutacional (*non-wild-type* o NWT) (141).

Estudios recientes demuestran que dicho macrólido bacteriostático, cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la síntesis proteica bacteriana, puede exhibir altas CMIs frente al gonococo cuando este presenta mutaciones en los genes que codifican el RNAr 23S. Este cambio se relaciona con una menor sensibilidad y conlleva fracasos terapéuticos en el tratamiento en monoterapia con azitromicina.

Por esta razón, tanto CLSI como EUCAST recomiendan en el tratamiento empírico de la gonorrea utilizar este agente siempre en combinación con una cefalosporina de tercera generación (C3G).

CMI₅₀ y CMI₉₀

Adicionalmente, se calculó la CMI₅₀ y la CMI₉₀ de los antimicrobianos utilizados en la terapia empírica actualmente recomendada. Estos parámetros, reflejan la concentración mínima del antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano en un 50% y 90% de las cepas, y se consideran un buen indicador de la evolución de la sensibilidad antibiótica de un determinado antimicrobiano durante el paso de los años.

La deducción de estos valores para la azitromicina, cefixima y ceftriaxona, se realizó para cada uno de los dos periodos de estudio anteriormente citados.

Producción de β -lactamasas

Se llevó a cabo la prueba cromogénica de la nitrocefina, con el objetivo de detectar aquellas cepas con resistencia plasmídica a los antibióticos β -lactámicos, cepas denominadas PPNG (*penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae*).

Para este propósito, se utilizaron discos impregnados en nitrocefina (BD BBL™ Cefinase paper disc). Dicha sustancia es hidrolizada por las enzimas de tipo β -lactamasa presentes en ciertos aislados del gonococo.

Con un asa se colocaron colonias tomadas del cultivo primario sobre este disco situado sobre la superficie de un portaobjetos. En caso tratarse de una cepa PPNG, se originó una reacción y se produjo el cambio de color del disco de amarillo a rojo oscuro, permitiendo su detección a los pocos segundos.

3.5.5. Tipificación molecular

Para el tipado de los gonococos a estudio, se empleó el *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST), método molecular más utilizado para la caracterización de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (118). Esta técnica permite identificar grupos de individuos vinculados a un mismo aislado así como llevar a cabo asociaciones epidemiológicas (37). En adición, es posible establecer relaciones entre las características moleculares de cada aislado y su patrón de sensibilidad antibiótica.

Este sistema de genotipado está basado en la secuenciación de los genes *porB* y *tbpB* del gonococo, los cuales presentan gran variabilidad y codifican para dos proteínas que, si se ven modificadas, puedan tener implicación sobre los distintos mecanismos de resistencia antibiótica exhibidos por *Neisseria gonorrhoeae*. Por tanto, la secuenciación de fragmentos internos de estos dos genes altamente polimórficos constituye una forma muy precisa de tipificar los aislados de dicho patógeno.

Estos dos genes y las proteínas de membrana expresadas se describen a continuación:

- Gen *porB*, el cual codifica para la proteoporina B (porB) que forma parte de un canal transmembrana del gonococo, permitiendo la entrada y salida de los diferentes fármacos.
- Gen *tbpB*, el cual codifica para la subunidad β de la transferrina (tbpB), componente expuesto en la membrana externa de dicha proteína, cuya función es unirse a la transferrina humana y obtener hierro, mineral imprescindible para la supervivencia del gonococo.

Una vez analizadas las secuencias *porB* y *tbpB* de cada cepa, estas se introdujeron en la base de datos de NG-MAST (142) obteniéndose un número concreto para cada uno de dichos alelos. La combinación de ambos alelos asignó a cada aislado un determinado secuenciotipo (ST).

A día de hoy, se han descrito más de 12.340 alelos *porB* y 3.080 alelos *tbpB*, conformando aproximadamente un total de 20.117 secuenciotipos existentes en la base de datos de NG-MAST. No obstante, y debido a la continua evolución del gonococo y los cambios que se producen en las secuencias de estos genes, aparecen de forma constante nuevos ST que deben ser introducidos en dicho sistema.

Recuperación de las cepas

Los aislados de *Neisseria gonorrhoeae* obtenidos del cultivo primario se resuspendieron en caldo glicerol y se mantuvieron almacenados en congelación a temperaturas de -80°C. Tras su descongelación, se sembraron en agar chocolate (bioMérieux, España) manteniéndose a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂ durante un periodo de 24 a 48 horas.

Extracción de DNA

A continuación y una vez crecido el microorganismo, se tomaron entre 5 y 10 colonias y se procedió a extraer el DNA utilizando el kit QIAamp DNA mini (Qiagen, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Condiciones de la PCR y amplificación de DNA

El proceso de amplificación se llevó a cabo en las instalaciones de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO).

El termociclador utilizado fue el Mastercycler (Eppendorf, Alemania), los reactivos necesarios para dicha PCR fueron suministrados por Biotools (B&M Labs, España) y los primers se obtuvieron de Metabion (Martinsried, Alemania).

Las condiciones utilizadas para la amplificación de ambas secuencias alélicas se desarrollaron siguiendo las pautas establecidas por Martin *et al.* (37), artículo de referencia para la técnica de NG-MAST. Las temperaturas y tiempos requeridos en la amplificación de los genes *porB* (Tabla 9) y *tbpB* (Tabla 10) se resumen a continuación.

Desnaturalización	95°C	4 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 segundos	25 ciclos
Hibridación	58°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	1 ciclo
Mantenimiento	4°C	-	

Tabla 9. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen *porB* (37).

Desnaturalización	95°C	4 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 segundos	25 ciclos
Hibridación	69°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión	72°C	10 minutos	1 ciclo
Mantenimiento	4°C	-	

Tabla 10. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen *tbpB* (37).

Secuenciación de DNA

Los fragmentos de DNA amplificados fueron secuenciados mediante el método de Sanger. Dicho proceso de secuenciación se llevó a cabo en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia (SCSIE - UV) (143).

Edición de secuencias

Característicamente, la secuencia *porB* posee una longitud de 490 pares de bases (pb), empezando por la secuencia altamente conservada TTGAA.

La secuencia *tbpB* posee una longitud de 390 pb, comenzando por la secuencia altamente conservada CGTCTGAA.

Atendiendo a estas premisas, posteriormente las secuencias obtenidas se alinearon y se editaron con el software ChromasPro versión 2.0, tanto en la dirección hacia delante (*forward*) como hacia detrás (*reverse*), ajustándose estas a la longitud correcta.

Estudio de los *secuenciotypes* (STs)

Finalmente, utilizando la página web de NG-MAST (<http://www.ng-mast.net/>), se introdujeron las secuencias de cada cepa, obteniéndose un número de alelo para cada alelo. La combinación de ambos alelos asignó a cada aislado un *secuenciotipo* (ST) determinado.

Aquellos alelos o combinación de los mismos no presentes en dicha base de datos se clasificaron como nuevos *secuenciotipos*.

Estudio de los *genogrupos*

A su vez, estos STs pueden englobarse en asociaciones mayores denominadas *genogrupos* (G). Estas agrupaciones vienen definidas por un ST principal que dará nombre a dicho grupo. Los STs se clasifican en un mismo *genogrupo* cuando varios *secuenciotipos* presentan, respecto al ST característico, un alelo idéntico y el otro con una similitud en su secuencia superior al 99%, siendo esta ≤ 5 pb en el caso del alelo *porB* y ≤ 4 pb en el alelo *tbpB*, tal y como describen Chisholm *et al.* (144).

Para ello, se alinearon las secuencias a comparar de los STs que presentaron alto grado de similitud y, mediante el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) *software*, se determinó cuáles de ellos cumplían los requisitos anteriormente expuestos para formar parte del mismo *genogrupo*.

3.6. RED DE VIGILANCIA MICROBIOLÓGICA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (RedMIVA)

La Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA) es un sistema de información de la Consejería de Sanidad de Valencia orientado a la vigilancia y la investigación de poblaciones bacterianas que requieren un estrecho control (145).

Su función principal se basa en recoger diariamente todos los resultados obtenidos de los servicios y unidades de microbiología de los centros sanitarios ubicados en el marco de la Comunidad Valenciana, almacenarlos y analizarlos en un sistema centralizado para posteriormente difundir la información generada y así poder ser estudiada.

Otro de los objetivos fundamentales de la presente Tesis fue analizar la casuística de dicha infección en nuestra comunidad, así como sus patrones de sensibilidad. Debido a que la gonorrea es una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) se realizó la consulta de todos los datos existentes en referencia a los casos reportados de infección gonocócica durante los años 2013 – 2019.

Estos datos incluyeron la sensibilidad antibiótica obtenida frente a los siete agentes testados en el proyecto GONOVig, así como otros antimicrobianos en estudio considerados como un posible tratamiento futuro de la gonorrea resistente a otros agentes, destacando en este aspecto la fosfomicina y la gentamicina. De la misma manera, se obtuvieron los datos demográficos como sexo, edad, y municipio de cada paciente, así como las técnicas empleadas en el diagnóstico.

Tras analizar dicha información, se realizó la comparación de todos estos resultados con los obtenidos durante el proyecto GONOVig además de estudiar los datos relativos al año 2019, con el propósito de evaluar la tendencia en el patrón de susceptibilidad antibiótica que siguió el gonococo durante este último periodo.

Por otro lado, se calculó la incidencia de la gonococia en la Comunidad Valenciana durante el intervalo 2013 – 2019, atendiendo al número total de casos positivos aquí reportados y a la población censada en dicha comunidad por cada uno de estos años. Dichos resultados permitieron estudiar la tendencia que sigue la incidencia de esta ITS en nuestra comunidad.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados descriptivos de las variables cuantitativas se representan como media y desviación estándar (DE), incluyéndose en algunos casos el rango (mínimo – máximo). Con el fin de verificar la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se consideró el resultado estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95% (IC 95%) siempre que el *P*-valor de la prueba estudiada fuese inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Para establecer relaciones entre variables cualitativas como la sensibilidad antibiótica (sensible, intermedia o resistente) y las características moleculares de las cepas (secuenciotipos) se realizaron tablas de contingencia y se llevó a cabo la prueba exacta de Fisher.

Se analizó también la relación entre variables cuantitativas como la edad, y variables cualitativas como los secuenciotipos u hospital de procedencia. Para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el valor medio de la variable cuantitativa edad y los diferentes grupos de ST mayoritarios se llevó a cabo el test de independencia de Kruskal Wallis.

Los cálculos estadísticos se desarrollaron con la ayuda del programa SPSS Software (IBM, Armonk, Estados Unidos).

3.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Al tratarse de un estudio descriptivo, se recopiló la información clínica de los pacientes así como los resultados microbiológicos y moleculares de las cepas anteriormente descritos, sin que esto supusiera una intervención sobre el propio paciente.

Toda la información seleccionada se ha tratado de forma estrictamente confidencial, utilizándose única y exclusivamente en el ámbito sanitario y de la investigación.

El comité ético del Hospital Universitario de La Ribera, tras evaluar todos los aspectos éticos del proyecto GONOVig, otorgó permiso a los investigadores de dicho proyecto para poder acceder a las historias clínicas de los pacientes incluidos, así como al posterior estudio y análisis de los datos que se exponen en la presente Tesis.

4. RESULTADOS

4.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Al tratarse de un estudio multicéntrico, se recibieron cepas de *N. gonorrhoeae* de 13 hospitales distintos, situados en tres provincias diferentes y representativos del mapa sanitario de la Comunidad Valenciana.

Atendiendo al origen de las muestras enviadas por cada centro colaborador, estas se clasificaron por provincias y se calculó el porcentaje de cepas que aportó cada uno de ellos, así como el total por provincia (Tabla 11).

Hospital	Cepas Recibidas	Total cepas (%)
La Ribera	70	30,4
Clínico	57	24,8
Manises	11	4,8
General	9	3,9
Arnau de Vilanova	8	3,5
Sagunto	6	2,6
Lluís Alcanyís	3	1,3
Total Valencia	164	71,3
Villajoyosa	22	9,7
Denia	8	3,5
Vega Baja	3	1,3
Total Alicante	33	14,3
General	21	9,3
Vinaroz	9	3,9
La Plana	3	1,3
Total Castellón	33	14,3
Total GONOVig	230	100

Tabla 11. Cepas aportadas por cada centro participante del proyecto GONOVig.

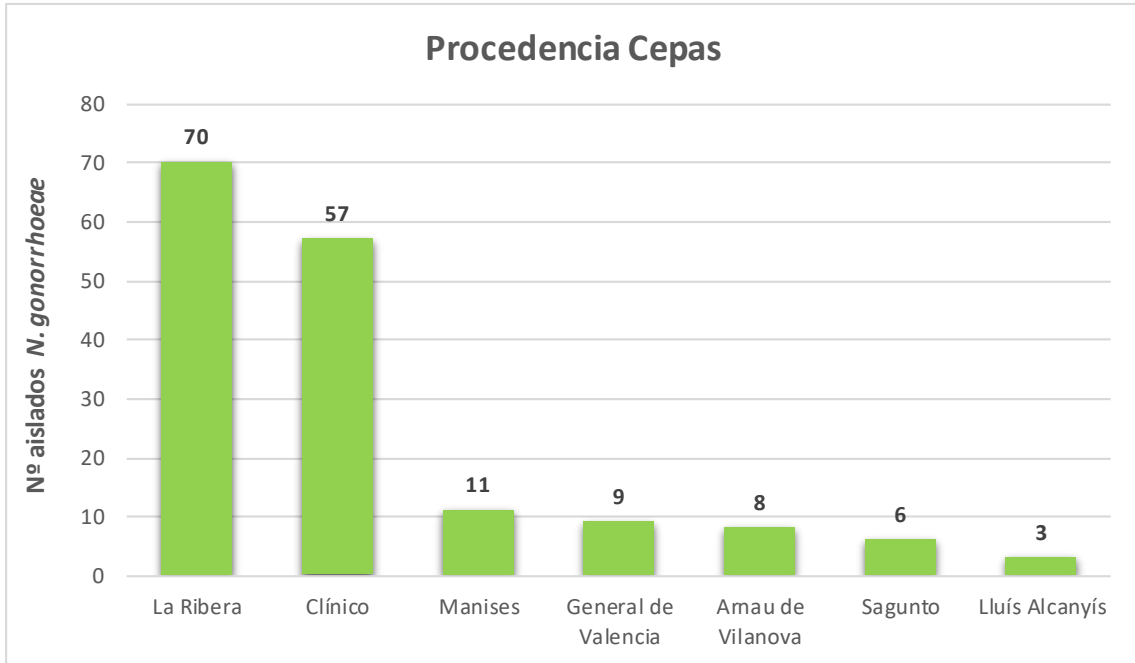


Figura 22. Distribución de los aislados analizados obtenidos en los hospitales de la provincia de Valencia.

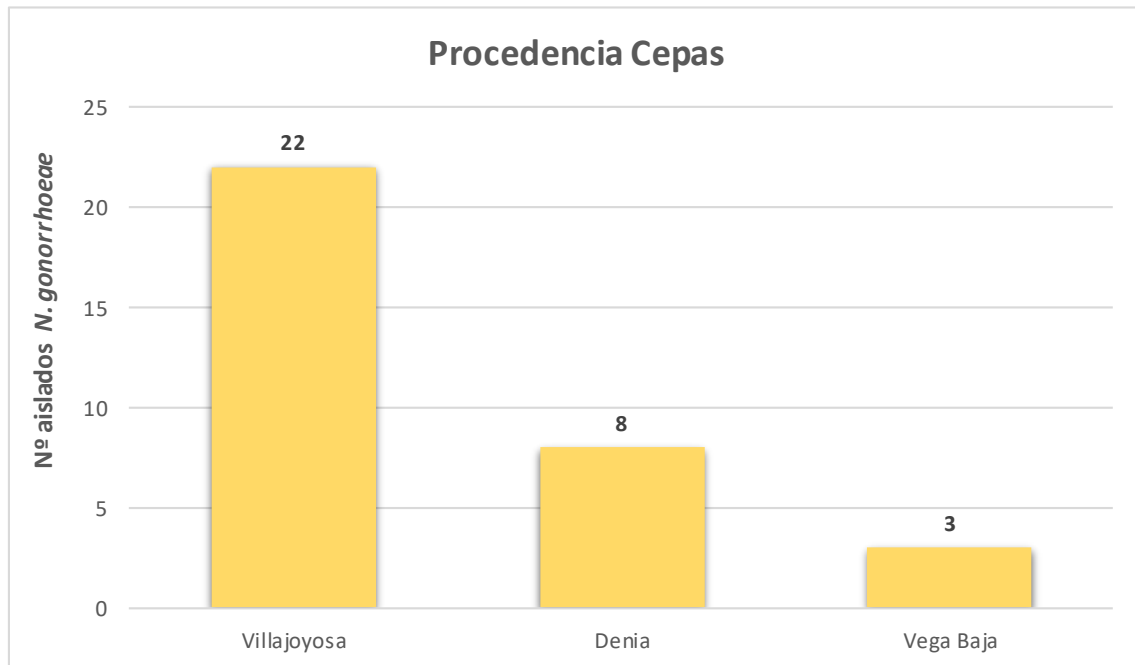


Figura 23. Distribución de los aislados analizados obtenidos en los hospitales de la provincia de Alicante.

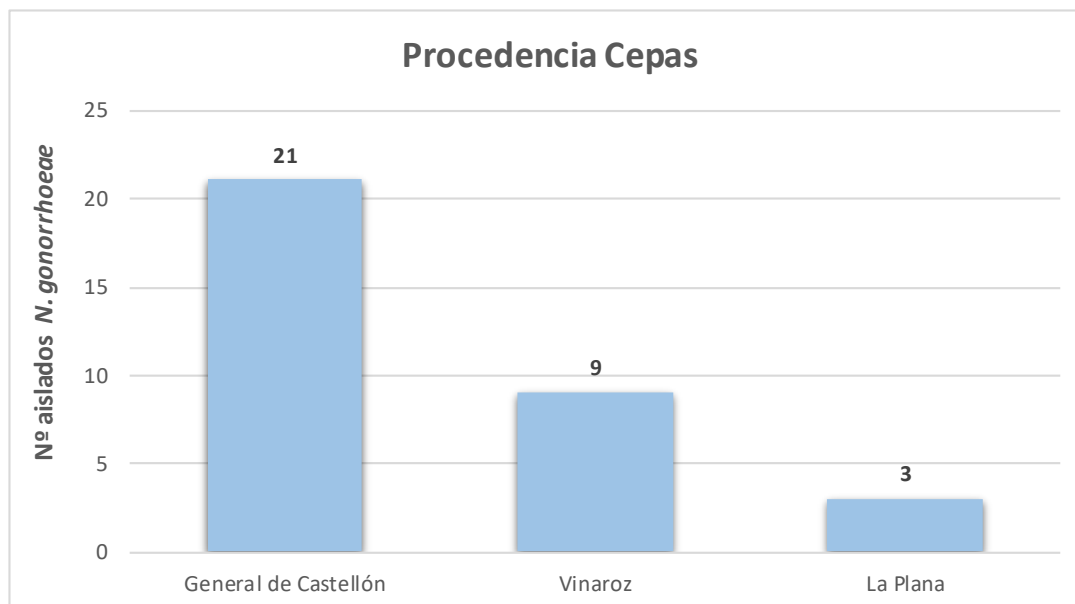


Figura 24. Distribución de los aislados analizados obtenidos en los hospitales de la provincia de Castellón.

En cuanto al análisis de las cepas detallado por provincias, el 71,3% pertenecieron a la provincia de Valencia, en la que participaron 7 centros hospitalarios diferentes. El Hospital Universitario de La Ribera (HULR), centro coordinador del proyecto GONOVig, aportó 70 cepas conformando el centro más participativo de esta provincia (42,7%) así como de todo el estudio (30,4%). Asimismo, el Hospital Clínico Universitario de Valencia proporcionó 57 cepas, constituyendo el 24,8% del total de cepas estudiadas (Figura 22).

El 14,3% del total de cepas analizadas provinieron de la provincia de Alicante, participando, en este caso, 3 centros hospitalarios. El Hospital de Villajoyosa (22 cepas, 9,6% del total) fue el que más aislados proporcionó al estudio en dicha provincia (Figura 23).

Finalmente, en la provincia de Castellón se analizaron el 14,3% de cepas restantes recibidas de 3 hospitales distintos. Del Hospital General de Castellón se recibieron un total de 21 aislados (9,1% del total), siendo este el centro más participativo de esta provincia (Figura 24).

4.2. PERIODO DE ESTUDIO

El proyecto GONOVig se planteó, inicialmente, como un estudio multicéntrico para la vigilancia de la sensibilidad antibiótica de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* circulantes en la Comunidad Valenciana durante el año 2013. No obstante, y tras los resultados obtenidos, se propuso continuar con el estudio y con la recogida de muestras hasta finalizar el año 2018. De esta manera, se pudo realizar un seguimiento en la evolución de dicho microorganismo, investigando los patrones de sensibilidad antibiótica y estudiando sus características moleculares. Finalmente, las 230 cepas de gonococo analizadas fueron obtenidas durante el periodo de tiempo comprendido entre los años 2013 y 2018.

Debido a la diferencia existente en el número de aislados entre ambas etapas del proyecto, se decidió dividir el total de cepas en dos periodos de estudio. El primero de ellos correspondió a la fase inicial llevada a cabo el año 2013, en la que se recogieron 90 cepas (39,1% del total), mientras que el segundo correspondió al periodo comprendido entre los años 2014 y 2018, en el que se obtuvieron 140 aislados (60,9% del total) tal y como se describe en la Figura 25.

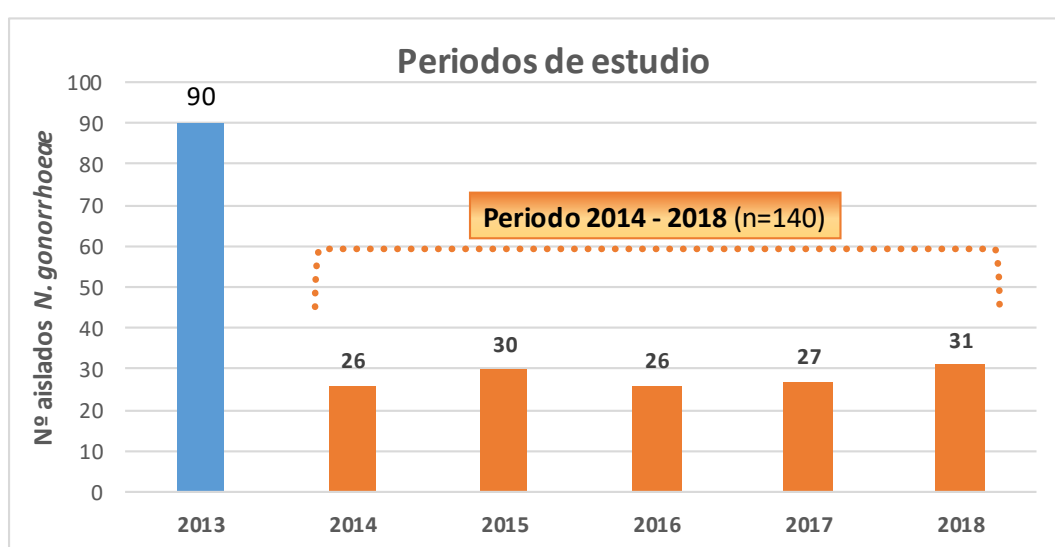


Figura 25. Distribución por años de los aislados recogidos durante los dos periodos de estudio. El primer periodo, representado de color azul, corresponde al año 2013. El segundo periodo, de color naranja, engloba los años 2014, 2015, 2016, 2017 y 2018.

4.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Finalmente, se estudiaron 230 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* procedentes de 227 pacientes distintos. Sobre este total, 216 provinieron de hombres (93,9%) mediante toma del exudado uretral y 11 de mujeres (6,1%), mediante toma vaginal-cervical (Figura 26). No se contabilizaron en el análisis poblacional las cepas pertenecientes al mismo paciente.



Figura 26. Sexo de los pacientes.

En nuestra experiencia, la infección resultó ser mucho más prevalente en pacientes de sexo masculino, obteniéndose una ratio de 19 hombres por cada mujer infectada.

La edad media de la población estudiada fue de 30,7 años ($\pm 9,4$ años) con un rango comprendido entre los 17 y los 79 años. Atendiendo a la edad de los pacientes, estos se clasificaron en cinco grupos y se separaron por sexo tal y como se muestra en la Figura 27.

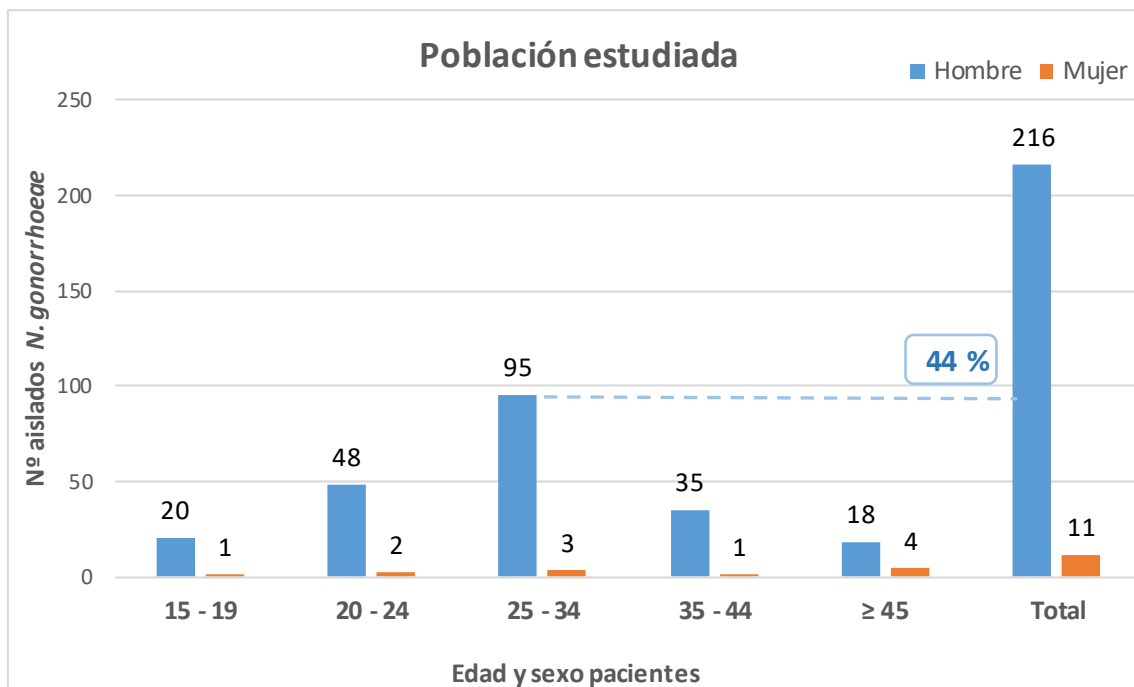


Figura 27. Distribución de la población estudiada por rangos de edad y sexo.

La mayor prevalencia de gonorrea se presentó en el grupo etario comprendido entre los 25 y los 34 años de edad. En concreto, aquí se incluyeron 98 aislados de *Neisseria gonorrhoeae* que supusieron el 43,2% del total de cepas estudiadas. De ellas, 95 cepas fueron aisladas de pacientes varones (44% del total de aislados en varones) y 3 cepas se obtuvieron en mujeres (27,3 % del total de aislados en mujeres).

El segundo grupo más numeroso fue el de pacientes con edades de entre 20 y 24 años, en el cual se recogieron 50 aislados (21,7%), seguido de aquellos que presentaron edades de entre 35 y 44 años (36 aislados, 15,9%) y 45 años o más (22 aislados, 9,7%). El grupo que presentó la tasa de infección más baja fue el de menor edad, de 15 a 19 años, con 21 aislados (9,2%). No se obtuvo ninguna muestra de pacientes con edad inferior a 15 años.

La menor diferencia entre sexos fue observada en la agrupación de adultos con edad igual o superior a 45 años. Aquí, el número de casos registrados de varones fue el más bajo (18 aislados, 8,3%) y el de mujeres el más numeroso (4 aislados, 36,4%). Este grupo, por tanto, mostró el ratio de infección entre mujeres y hombres más bajo, siendo la proporción de 4,5 hombres afectados por cada mujer infectada.

4.4. SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Con el propósito de monitorizar la sensibilidad antibiótica de *Neisseria gonorrhoeae*, se testaron los aislados obtenidos frente a siete antimicrobianos diferentes. Estos fueron azitromicina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino, tetraciclina, espectinomicina y penicilina. Adicionalmente, se realizó la prueba de la cefinasa para caracterizar aquellas cepas productoras de penicilinas (PPNG). A continuación, se detallan los resultados obtenidos.

4.4.1. Azitromicina

Las últimas guías de CLSI y EUCAST para el tratamiento de la gonorrea ya no establecen, para dicho macrólido, los clásicos puntos de corte clínicos que catalogan la cepa como sensible, intermedia o resistente. Esto se debe a que en el tratamiento empírico actual de la gonorrea la azitromicina debe asociarse a una cefalosporina de tercera generación (C3G).

En el caso concreto de la azitromicina, ambas sociedades establecen el *epidemiological cutoff value* o punto de corte epidemiológico (ECV) en 1 mg/L. De esta manera, los aislados de *Neisseria gonorrhoeae* con CMI a azitromicina ≤ 1 mg/L se consideran de fenotipo salvaje (*wild-type*) y, por tanto, sin mecanismos de resistencia.

Por el contrario, aquellas cepas de gonococo con CMI a azitromicina >1 mg/L se clasifican como fenotipo no salvaje (*non-wild-type*), pudiendo presentar mecanismos de resistencia mutacional. En la Figura 28, se representa la frecuencia de las diferentes CMI de azitromicina observadas frente a 201 cepas de gonococo.

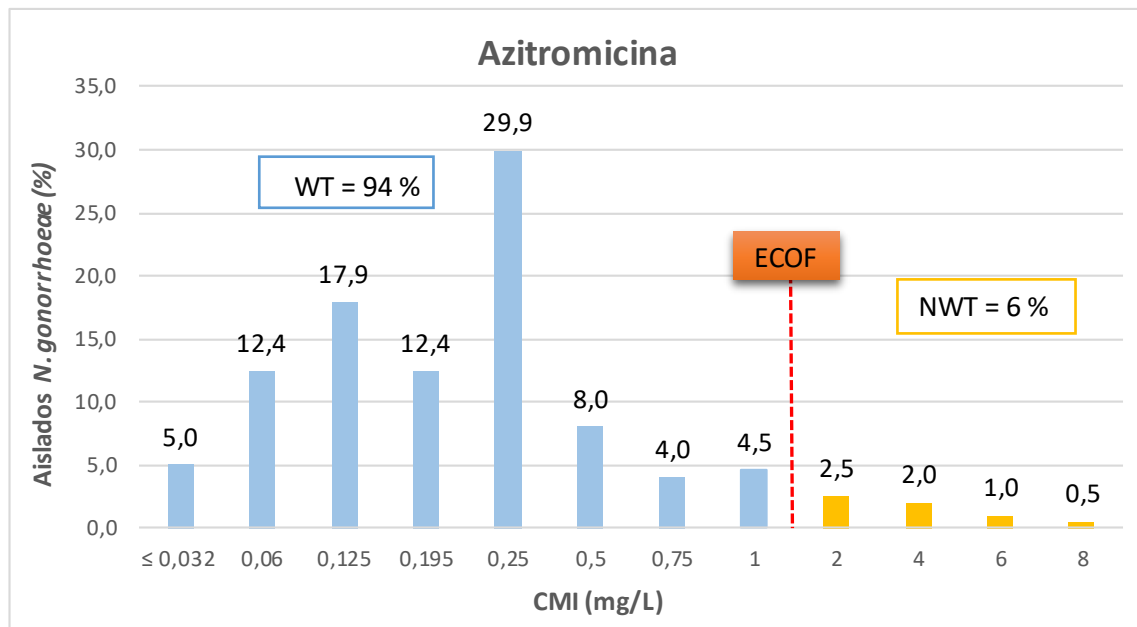


Figura 28. Distribución de las CMI observadas frente a azitromicina. Tanto CLSI como EUCAST establecen, para dicho antimicrobiano, un punto de corte epidemiológico (ECV) de 1 mg/L, clasificando los aislados en salvajes (WT) y no salvajes (NWT).

En primer lugar, el 29,9% de los aislados obtuvo una CMI igual a 0,25 mg/L, siendo esta por tanto la CMI más frecuente de todo el estudio. Por el contrario, la CMI de 8 mg/L resultó la de menor frecuencia (0,5%), constituyendo esta CMI en nuestra experiencia la más elevada. No se encontraron cepas de gonococo con alta resistencia a la azitromicina (CMI ≥ 256 mg/L).

Atendiendo al punto de corte epidemiológico (ECV) establecido, el 94% de las cepas estudiadas presentaron una CMI igual o inferior a 1 mg/L, por lo que se clasificaron como de fenotipo salvaje (WT). En contraposición, el 6 % de los aislados presentaron una CMI a azitromicina superior a 1 mg/L, por lo que se consideraron como fenotipo no salvaje (*non-wild-type*) y con posibilidad de poseer mecanismos de resistencia. Se encontraron 12 aislados *non-wild-type* sobre el total de cepas analizadas en el proyecto GONOVig. En la Figura 29 se muestra una de estas cepas.

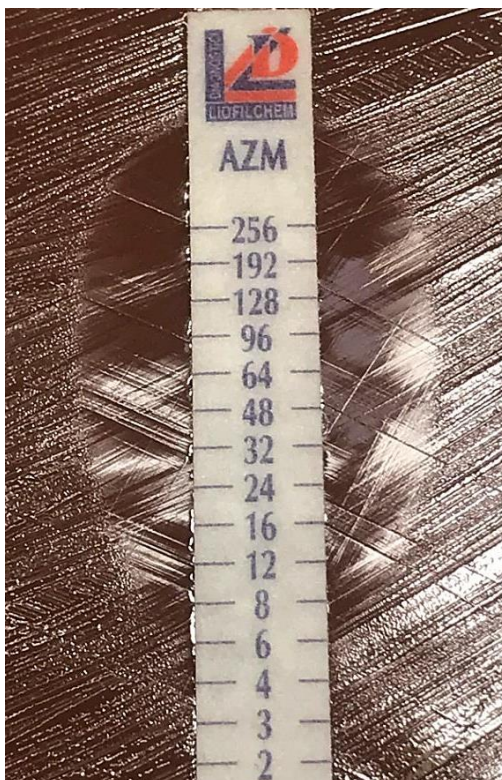


Figura 29. Cepa *non-wild-type* (CMI de 6 mg/L).

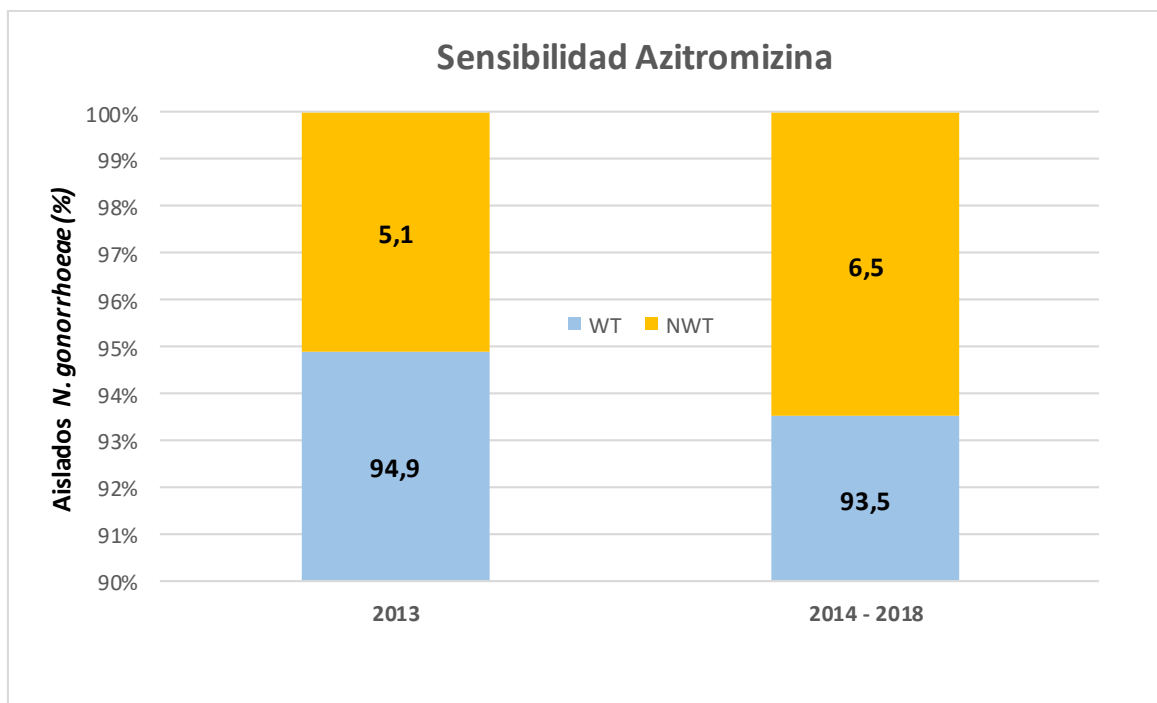


Figura 30. Porcentaje de aislados salvajes (WT) y no salvajes (NWT) frente a azitromicina obtenido en cada periodo de estudio.

En la Figura 30 se describe el porcentaje de cepas *wild-type* y *non-wild-type* observado en el periodo 2013 y en el periodo 2014 - 2018. Se evidencia un aumento de cepas resistentes a azitromicina (aislados con CMI >1 mg/L) entre el primer periodo (5,1%, 4 cepas) y el segundo (6,5%, 8 cepas). De estas 8 cepas NWT encontradas en el segundo periodo, 4 de ellas fueron aisladas en el año 2018.

Respecto al cálculo de la CMI₅₀ y CMI₉₀ de cada periodo se extrajeron los siguientes resultados (Figura 31). Tanto la CMI₅₀ como la CMI₉₀ experimentaron un aumento durante los seis años de estudio. Así pues, la CMI₅₀ incrementó de 0,19 mg/L en el periodo 2013 a 0,25 mg/L en el periodo 2014 – 2018. La CMI₉₀ aumentó de 0,75 mg/L en el primer periodo de estudio a 1 mg/L en el segundo.

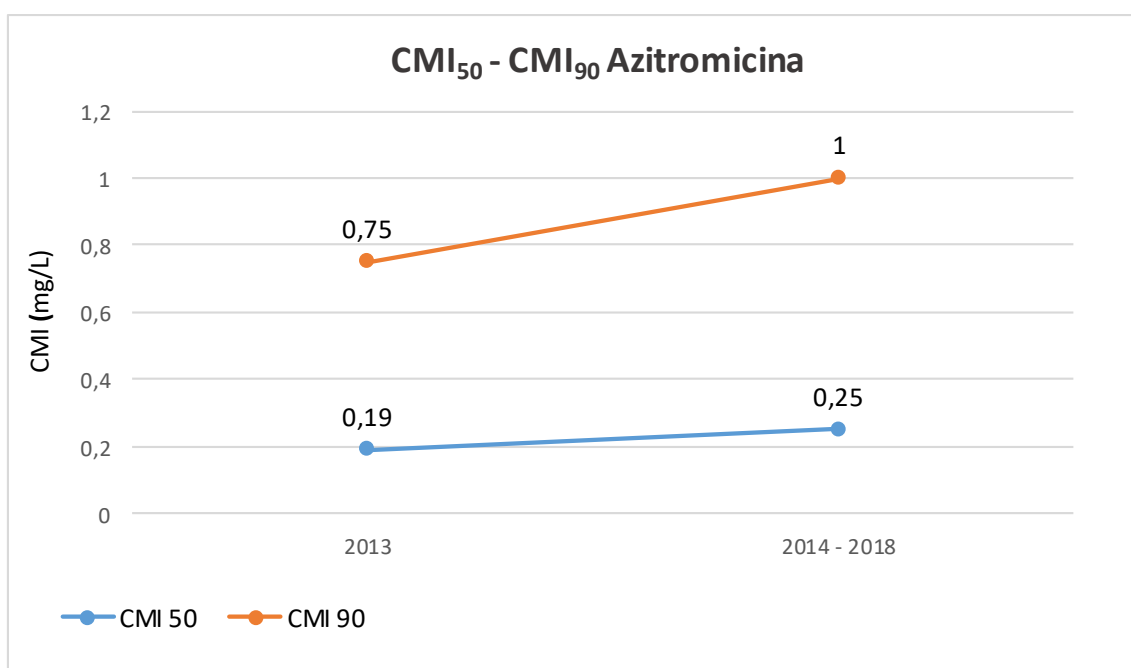


Figura 31. Evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ de azitromicina durante ambos periodos de estudio.

Como conclusión, tanto el porcentaje de cepas resistentes a dicho macrólido como los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron en aumento durante los años 2013 – 2018 mostrando, las cepas estudiadas, una disminución de la sensibilidad a azitromicina.

4.4.2. Cefixima

A continuación se representan las CMI obtenidas en 205 aislados de gonococo frente a cefixima, separadas a su vez en ambos periodos de estudio. De la misma manera, se indican los puntos de corte establecidos por EUCAST y CLSI que clasifican a los aislados como sensibles o resistentes (Figura 32).

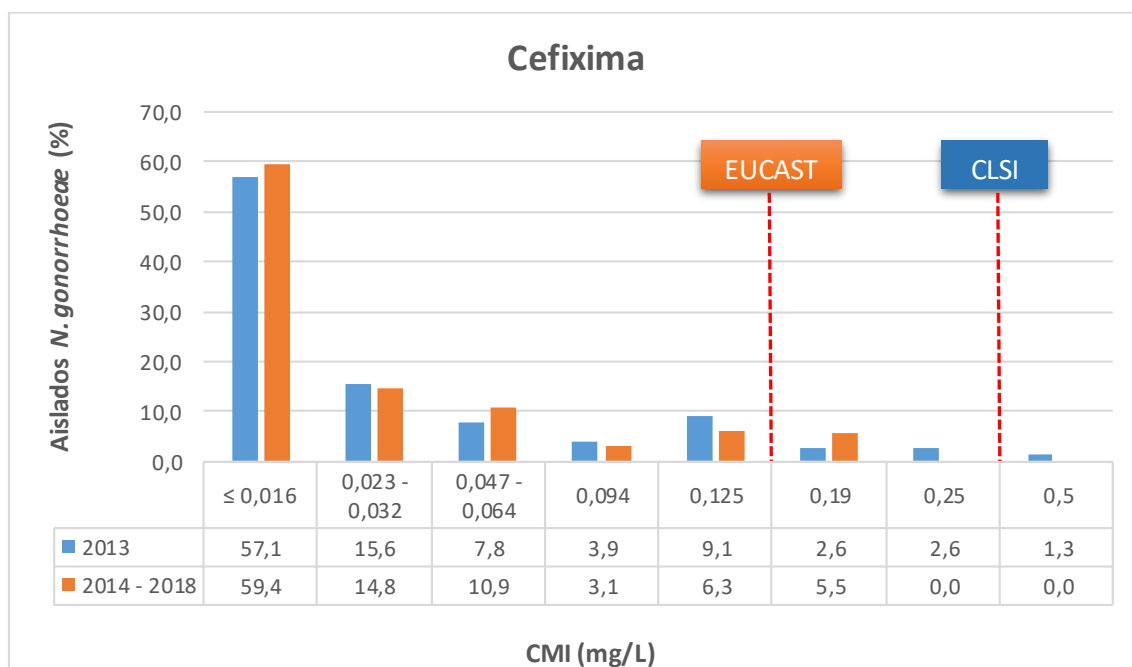


Figura 32. Distribución de las CMI obtenidas frente a cefixima durante los dos periodos de estudio.

Como puede apreciarse, aunque la distribución de dichas CMI durante los dos periodos de estudio son similares, estas muestran algunas diferencias. En ambos casos, la CMI predominante fue $\leq 0,016$ mg/L, representando el 57,1% del total de los aislados en el periodo 2013, aumentando ligeramente hasta el 59,4% en el periodo 2014 – 2018.

En el extremo opuesto, se advierte que las cepas con CMI elevada frente a cefixima son las menos frecuentes. En este caso, se produce una disminución de las mismas entre el primer y el segundo periodo, no observándose durante el periodo 2014 - 2018 cepas con $CMI \geq 0,25$ mg/L.

Debido a que los puntos de corte clínico fijados por ambas sociedades científicas para la cefixima son diferentes, en algunos aislados se origina una discrepancia en el momento de su clasificación como sensibles o resistentes. Así pues, EUCAST establece como sensibles aquellas cepas con un punto de corte $\leq 0,125$ mg/L mientras que CLSI lo establece en $\leq 0,25$ mg/L. Por ello, la estratificación de las mismas difiere tanto entre los dos periodos de estudio (Figura 33) como en cómputo global (Figura 35).

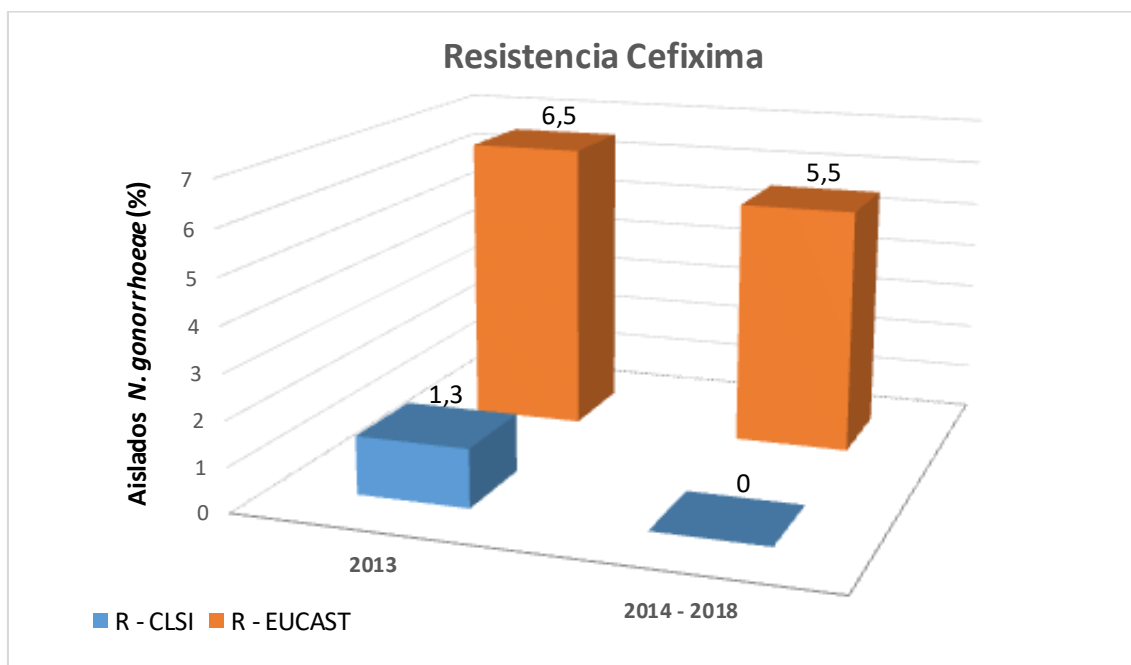


Figura 33. Porcentaje de aislados resistentes frente a cefixima durante los dos periodos de estudio, según criterios CLSI y EUCAST.

Tal y como se muestra en la Figura 33, durante el periodo 2013 el 1,3% de las cepas (1 aislado) presentó resistencia según criterios CLSI, mientras que el 6,5% de las cepas (5 aislados) fueron resistentes siguiendo criterios EUCAST.

Durante el periodo 2014 – 2018 ninguna cepa presentó resistencia atendiendo criterios CLSI, mientras que el 5,5 % de las cepas (7 aislados) fueron resistentes siguiendo criterios EUCAST. Cabe resaltar que dichos aislados resistentes a cefixima encontrados durante el segundo periodo se obtuvieron en los años 2014 (2 aislados), 2015 (3 aislados) y 2017 (2 aislados).

En la Figura 34 se muestra el aislado que presentó la mayor CMI a dicha C3G oral durante todo el estudio, el cual fue recogido el año 2013.



Figura 34. Cepa resistente a cefixima (CMI de 0,5 mg/L).

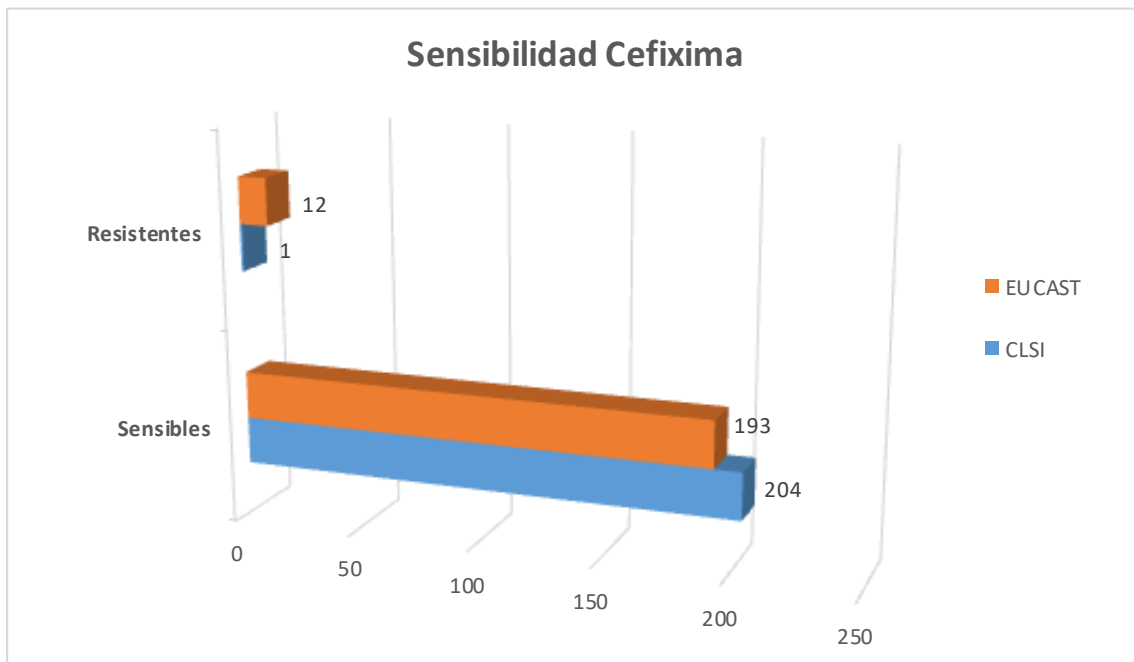


Figura 35. Número total de aislados sensibles y resistentes frente a cefixima durante todo el estudio, según criterios CLSI y EUCAST.

Tal y como se muestra en la Figura 35, al analizar los seis años de estudio se encontró 1 aislado resistente (0,5%) según criterios CLSI, y 12 aislados resistentes a cefixima (5,9%) siguiendo criterios EUCAST.

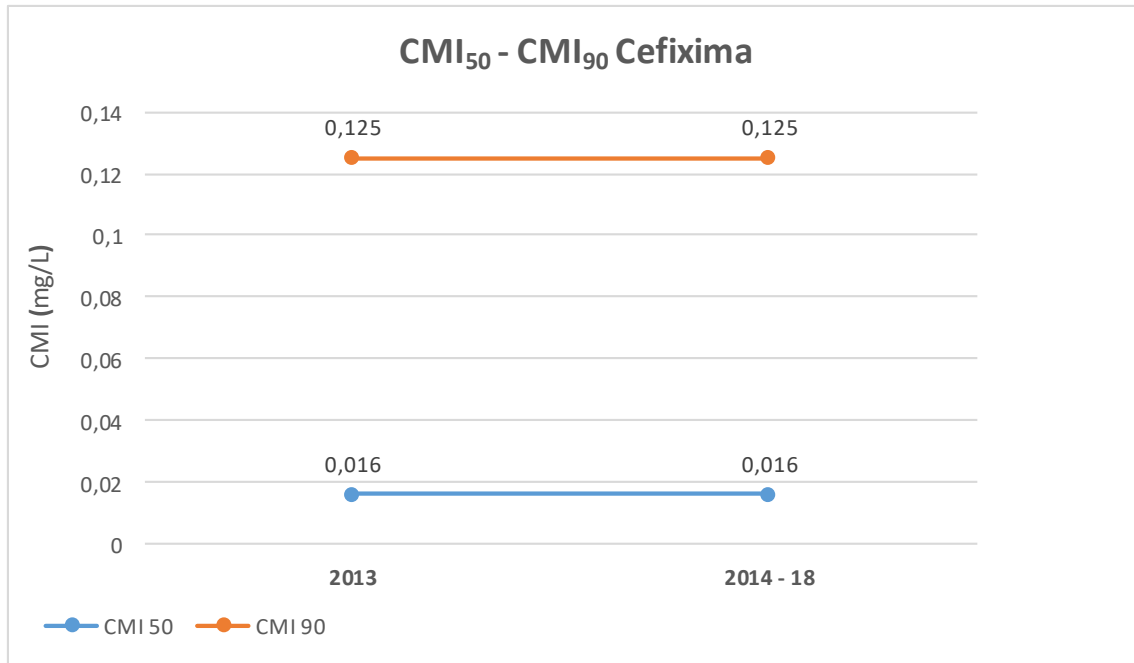


Figura 36. Evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ de cefixima durante los dos periodos de estudio.

Tanto la CMI₉₀ (0,125 mg/L) como la CMI₅₀ (0,016 mg/L) calculadas para cefixima, se mantuvieron constantes durante todo el periodo de estudio (Figura 36).

Estos datos demuestran una disminución del porcentaje de cepas resistentes a cefixima entre ambos periodos de estudio y una disminución de las cepas que mostraron altas CMI a dicha C3G. Por su parte, el cálculo de la CMI₅₀ y la CMI₉₀ permaneció invariable entre ambos periodos.

4.4.3. Ceftriaxona

Respecto a la ceftriaxona, C3G de administración parenteral, la distribución de las CMI observadas en las 205 muestras estudiadas fue la siguiente (Figura 37).

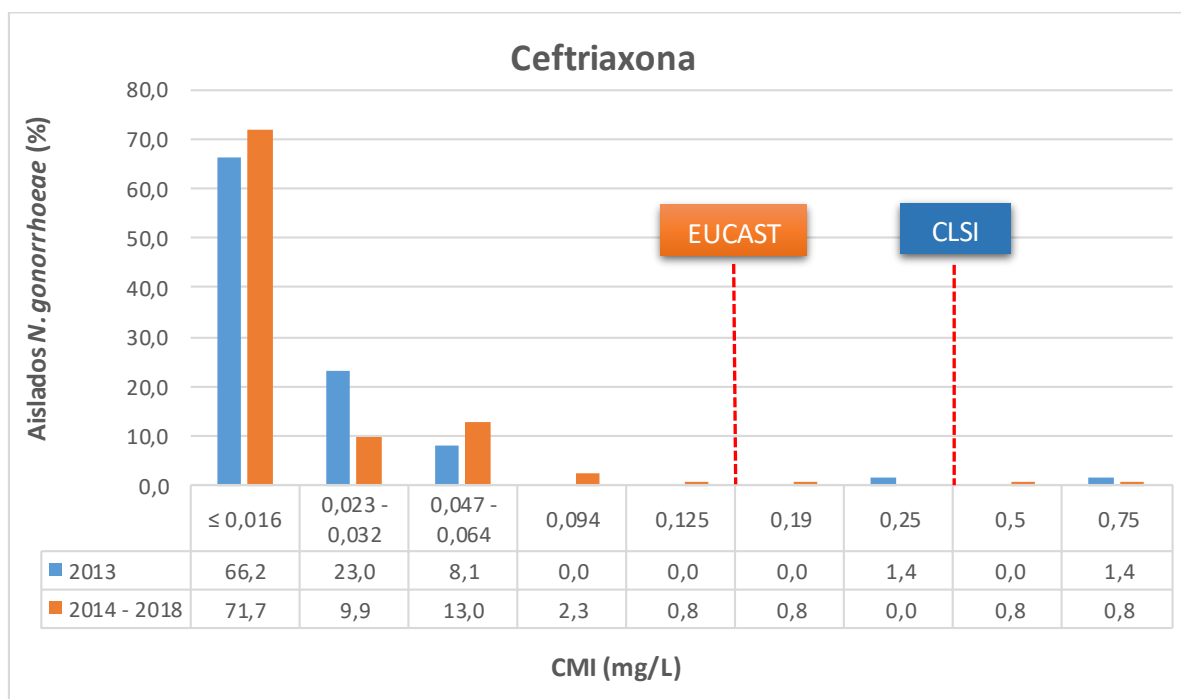


Figura 37. Distribución de las CMI obtenidas frente a ceftriaxona durante los dos periodos de estudio.

De la misma manera que ocurría con cefixima, el patrón de sensibilidad antibiótica del total de cepas analizadas resultó similar en ambos periodos. El 66,2% (periodo 2013) y el 71,7% de los aislados (periodo 2014 – 2018) presentaron una alta sensibilidad a dicha C3G (CMI ≤0,016 mg/L).

Respecto al porcentaje de cepas con CMI elevadas frente a ceftriaxona, estas fueron menores que las observadas para la cefixima apreciándose también una ligera disminución de las mismas a lo largo del estudio.

Se registraron, durante los 6 años de estudio, 27 cepas (13,2%) con CMI >0,032 y ≤0,125, consideradas como aislados con sensibilidad disminuida a la ceftriaxona.

En este caso, y debido a la discrepancia en los *breakpoints* establecidos, se produjeron pequeñas diferencias en la clasificación en función de los criterios atendidos. No obstante, estas fueron menos significativas en comparación a las observadas en la cefixima (Figura 38).

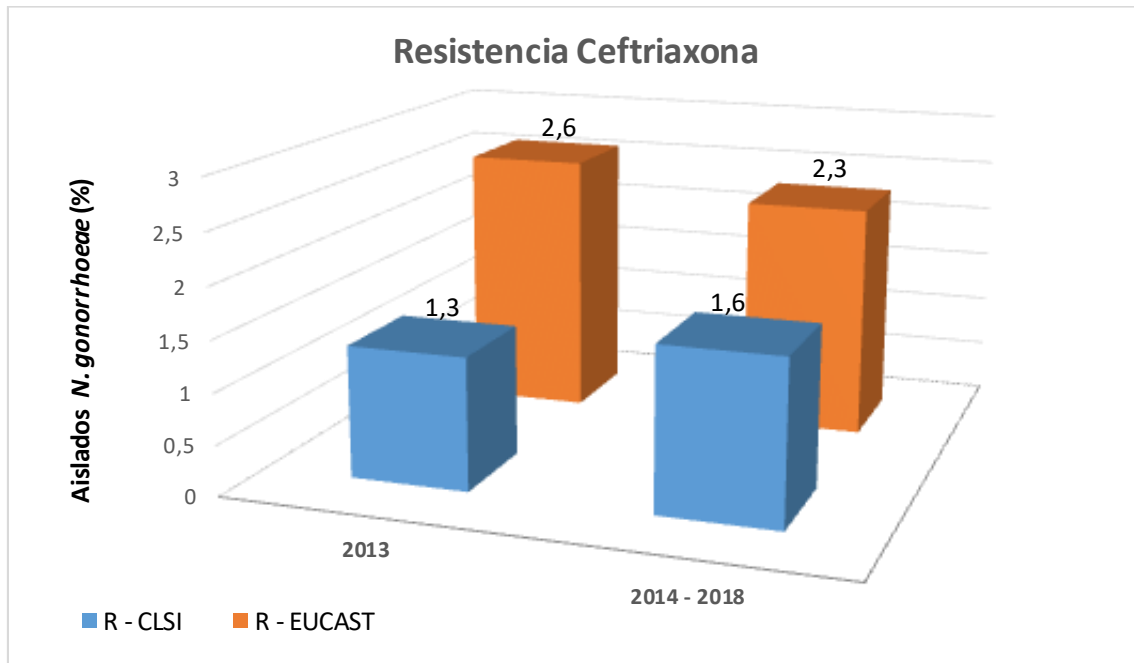


Figura 38. Porcentaje de aislados sensibles y resistentes frente a ceftriaxona durante los dos periodos de estudio, según criterios CLSI y EUCAST.

Durante el periodo 2013, el 1,3% de las cepas (1 aislado) presentó resistencia según criterios CLSI, mientras que el 2,6% de las cepas (2 aislados) fueron resistentes siguiendo criterios EUCAST.

Durante el periodo 2014 – 2018, el 1,6% de los aislados (2 cepas) presentaron resistencia según criterios CLSI, mientras que el 2,3% de los aislados (3 cepas) fueron resistentes siguiendo criterios EUCAST. Estos resultados reflejan que la resistencia mostrada a ceftriaxona fue similar en ambos periodos de estudio.

En la Figura 39 se muestra una de las dos cepas que presentaron la CMI más elevada observada frente a ceftriaxona (CMI de 0,75 mg/L). La primera de ellas se obtuvo en el año 2013, y la segunda fue recogida en el año 2017.



Figura 39. Cepa resistente a ceftriaxona (CMI de 0,75 mg/L).

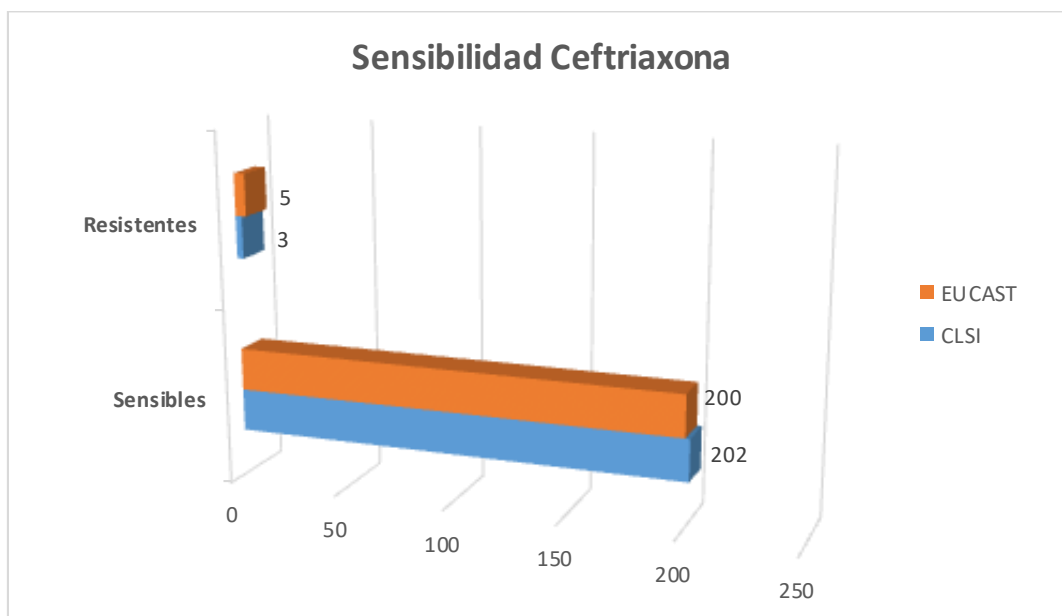


Figura 40. Número total de aislados sensibles y resistentes frente a ceftriaxona durante todo el periodo de estudio, según criterios CLSI y EUCAST.

A lo largo del estudio se encontraron 3 aislados resistentes (1,5%) según criterios CLSI y 5 cepas resistentes (2,4%) siguiendo criterios EUCAST a dicha C3G, sobre un total de 205 cepas analizadas (Figura 40).

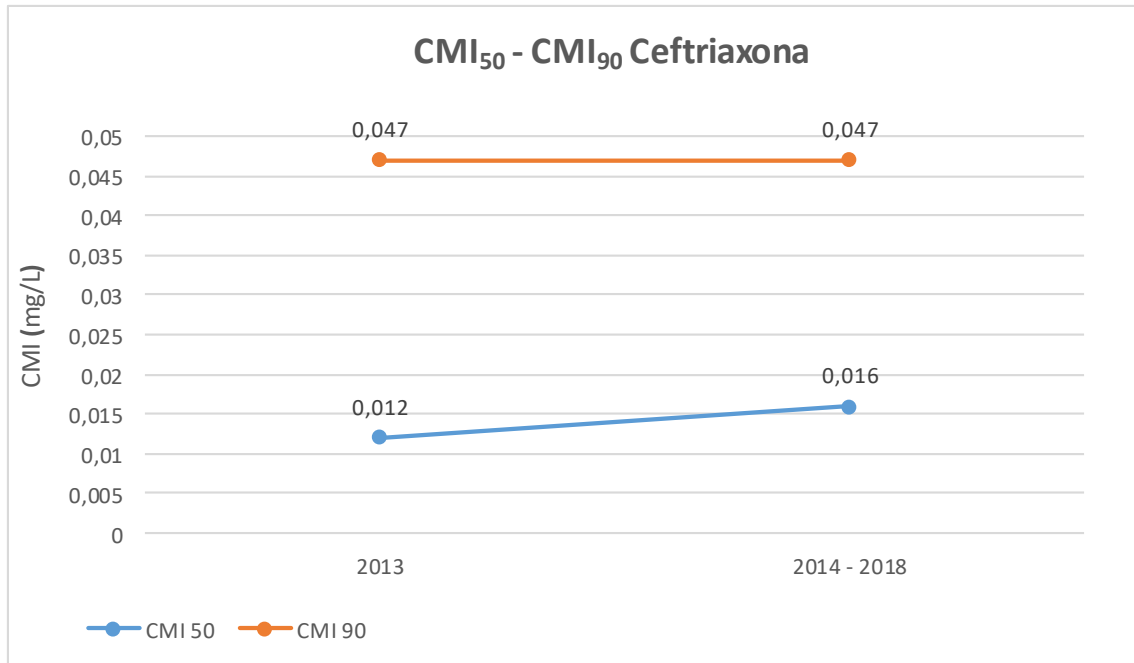


Figura 41. Evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ de ceftriaxona durante los dos periodos de estudio.

Tal y como se observa en la Figura 41, la CMI₉₀ de ceftriaxona se mantuvo constante durante todo el estudio (0,047 mg/L) mientras que la CMI₅₀ aumentó ligeramente, pasando de 0,012 mg/L a 0,016 mg/L.

Los resultados obtenidos tanto en el porcentaje de cepas resistentes como en los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ entre los dos periodos de estudio, demuestran que los niveles de resistencia a ceftriaxona son bajos y se han mantenido estables durante los seis años de estudio.

4.4.4. Ciprofloxacino

En la Figura 42 se representan las CMI observadas frente a ciprofloxacino tras el análisis de 204 cepas.

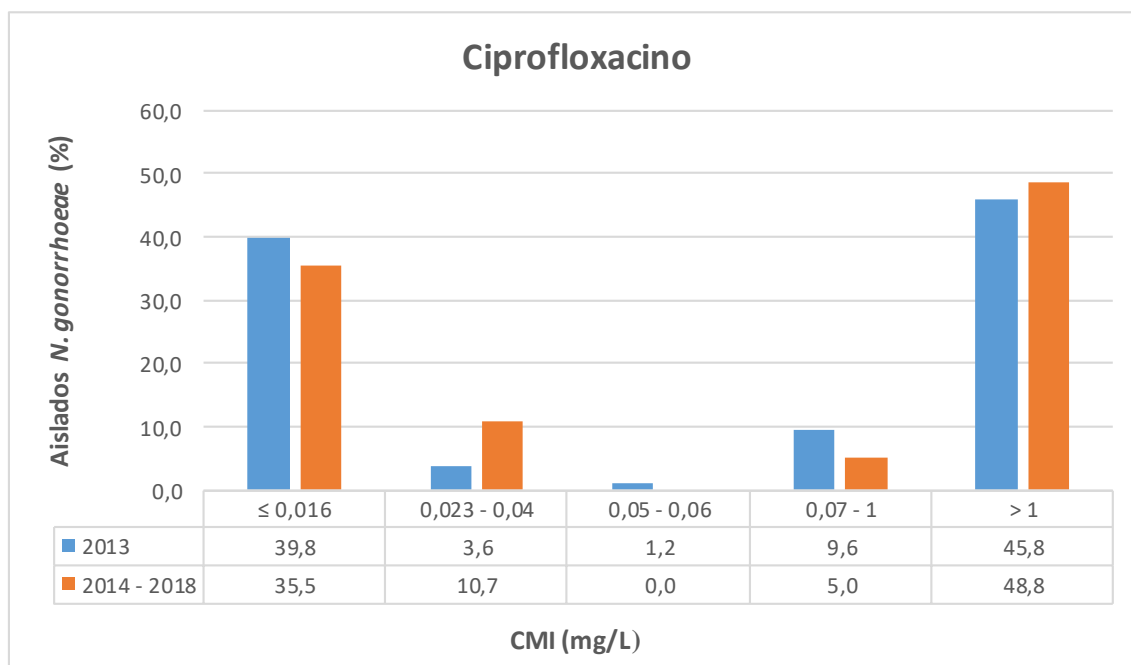


Figura 42. Distribución de las CMI obtenidas frente a ciprofloxacino durante los dos periodos de estudio.

Como se aprecia en la Figura 42, ambos periodos de estudio presentaron un perfil similar. Las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* mostraron frente a dicha quinolona dos grandes poblaciones claramente diferenciadas; una de alta sensibilidad (CMI ≤0,016 mg/L) y otra de alta resistencia (CMI >1 mg/L).

Durante el periodo 2014 – 2018 se observó un sutil aumento de los aislados con CMI elevadas, en detrimento de aquellas cepas con CMI inferiores.

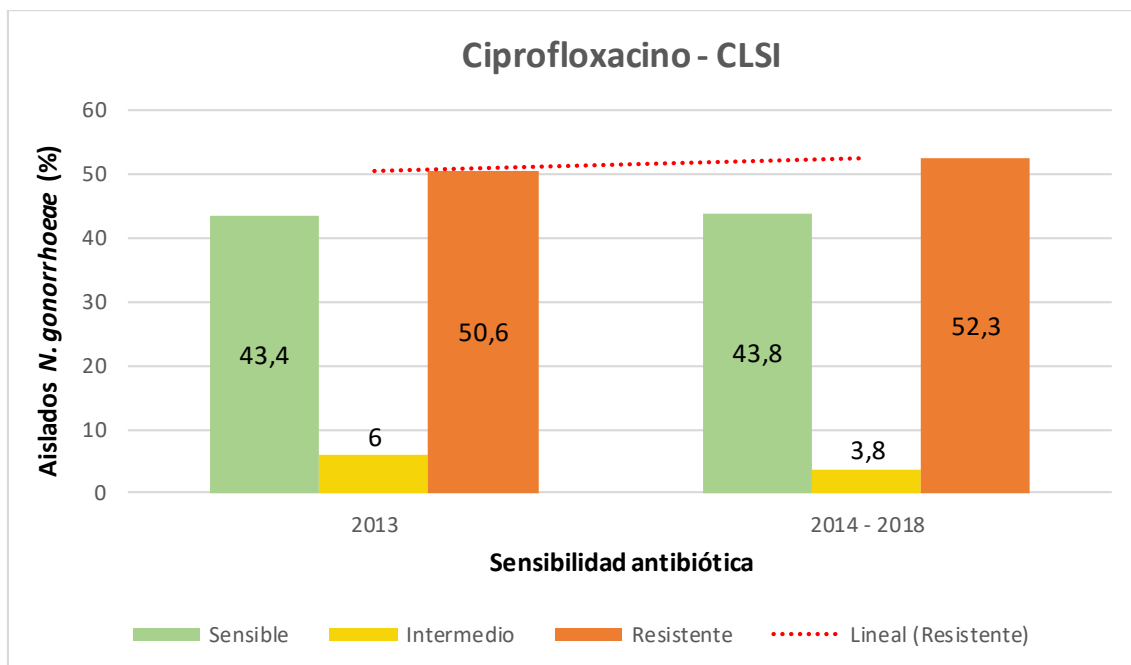


Figura 43. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a ciprofloxacino entre los dos periodos de estudio, según criterios CLSI.

En la Figura 43, se representa el porcentaje de cepas sensibles, intermedias y resistentes a ciprofloxacino según criterios CLSI durante ambos periodos de estudio. Estos porcentajes resultaron similares, manteniéndose casi constante la tasa de resistencia desde el periodo 2013 (50,6%) al periodo 2014 – 2018 (52,3%).

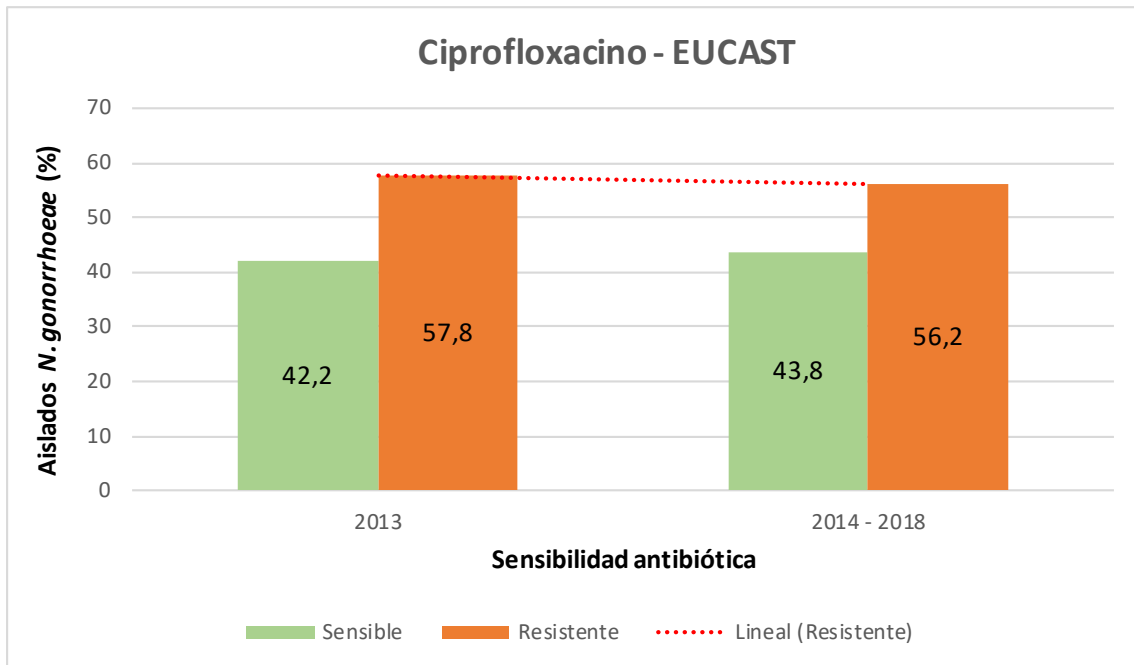


Figura 44. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a ciprofloxacino entre los dos periodos de estudio, según criterios EUCAST.

En la Figura 44, se representa el porcentaje de cepas sensibles y resistentes a ciprofloxacino según criterios EUCAST para ambos periodos de estudio, observándose un porcentaje de resistencia a dicho antimicrobiano muy similar entre ellos.

De forma global, los resultados expuestos demuestran que la sensibilidad del ciprofloxacino se ha mantenido relativamente constante, presentado en ambos casos un porcentaje de cepas resistentes superior al 50% sobre el total de aislados estudiados.

4.4.5. Espectinomicina

A continuación se muestra la distribución de las CMI para espectinomicina (Figura 45).

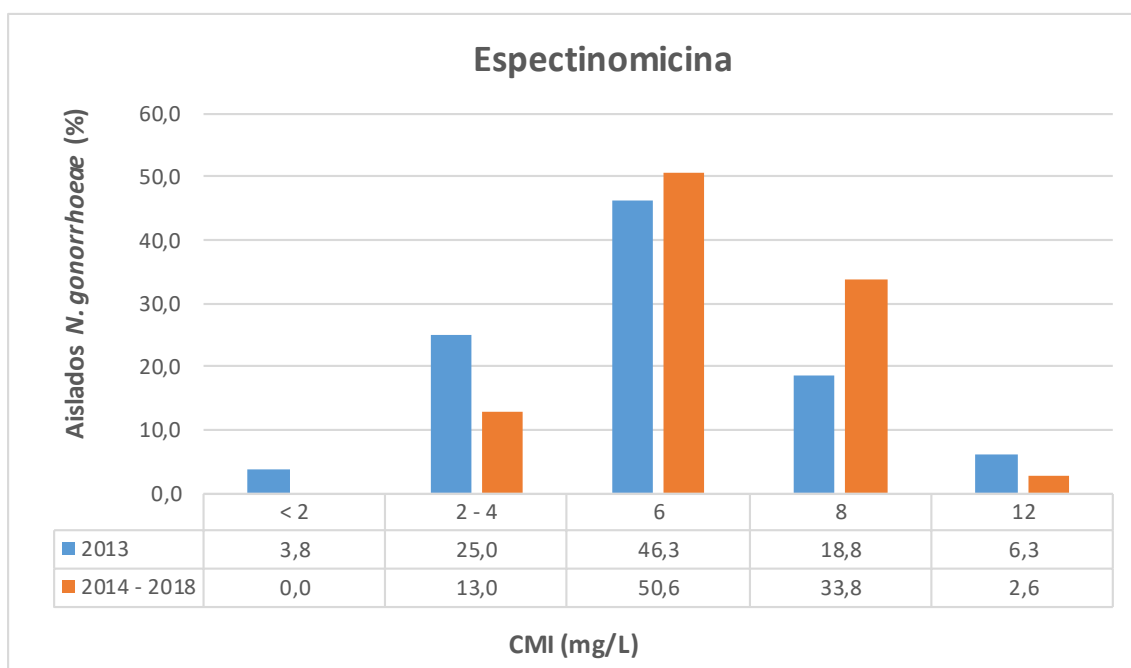


Figura 45. Distribución de las CMI obtenidas frente a espectinomicina durante los dos periodos de estudio.

Ninguna de las 166 cepas testadas frente a espectinomicina mostró resistencia a dicho aminoglucósido, siendo el punto de corte establecido para CLSI (CMI >128 mg/L) más elevado que el considerado por EUCAST (CMI >64 mg/L).

La CMI más prevalente fue de 6 mg/L, aumentado levemente la proporción de aislados aquí incluidos entre el periodo 2013 (46,3%) y el 2014 - 2018 (50,6%). De la misma manera, se incrementaron las cepas con CMI de 8 mg/L del primer periodo (18,8%) al segundo (33,8%).

4.4.6. Tetraciclina

Respecto a la tetraciclina, y tras analizar 165 aislados, la distribución de CMI observada fue la siguiente (Figura 46).

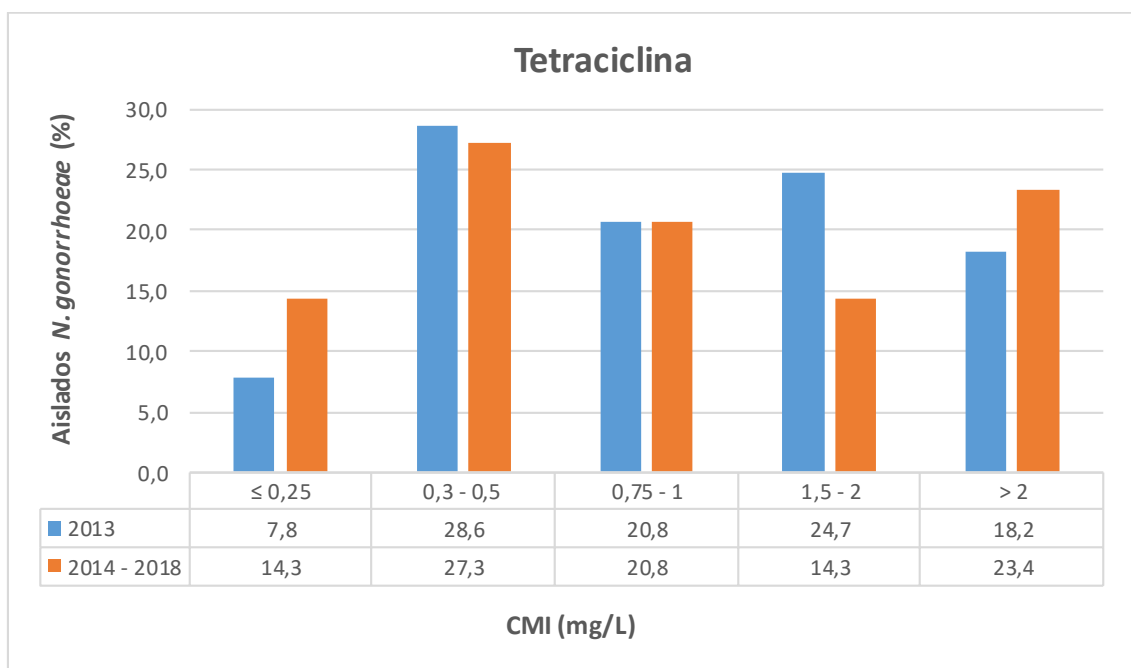


Figura 46. Distribución de las CMI obtenidas frente a tetraciclina durante los dos periodos de estudio.

La CMI más frecuentemente encontrada fue la comprendida entre 0,3 y 0,5 mg/L, tanto en el periodo 2013 (28,6%) como durante el 2014 – 2018 (27,3%). No se observaron grandes cambios en la distribución del resto de CMIs.

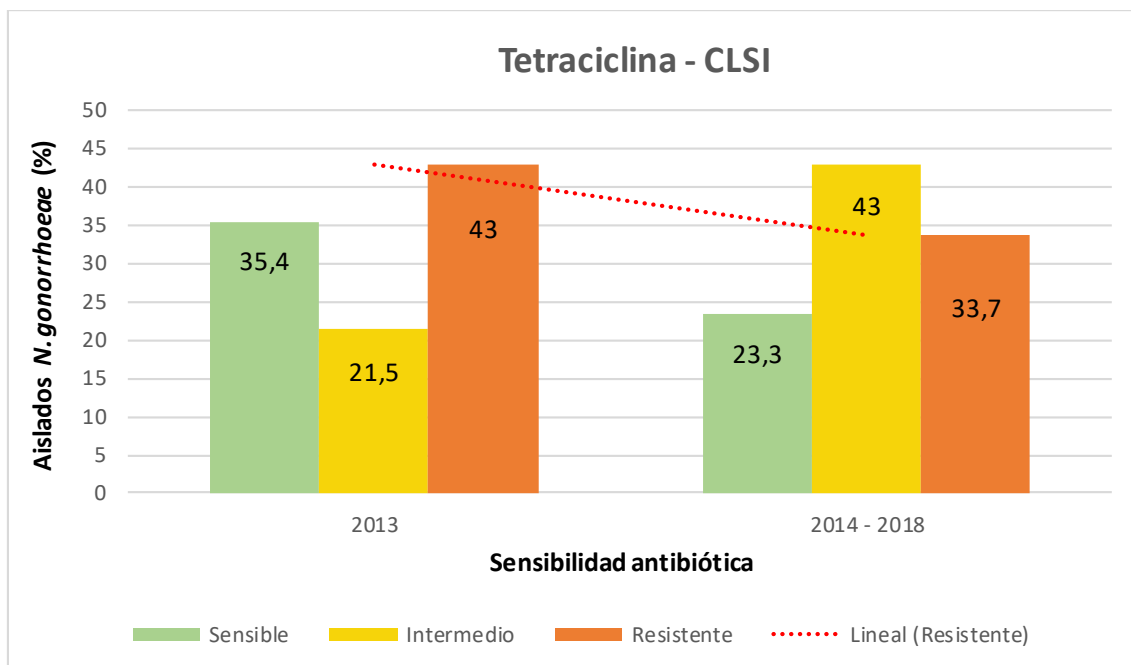


Figura 47. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a tetraciclina entre los dos periodos de estudio, según criterios CLSI.

Aplicando criterios CLSI, se percibió una reducción de las cepas resistentes a tetraciclina (≥ 2 mg/L), pasando del 43% observado en el primer periodo al 33,7% observado en el periodo 2014 - 2018.

No obstante, las cepas de sensibilidad intermedia aumentaron considerablemente (del 21,5% al 43%) y los aislados sensibles disminuyeron (del 35,4% al 23,3%) entre ambos periodos, tal y como se puede observar en la Figura 47.

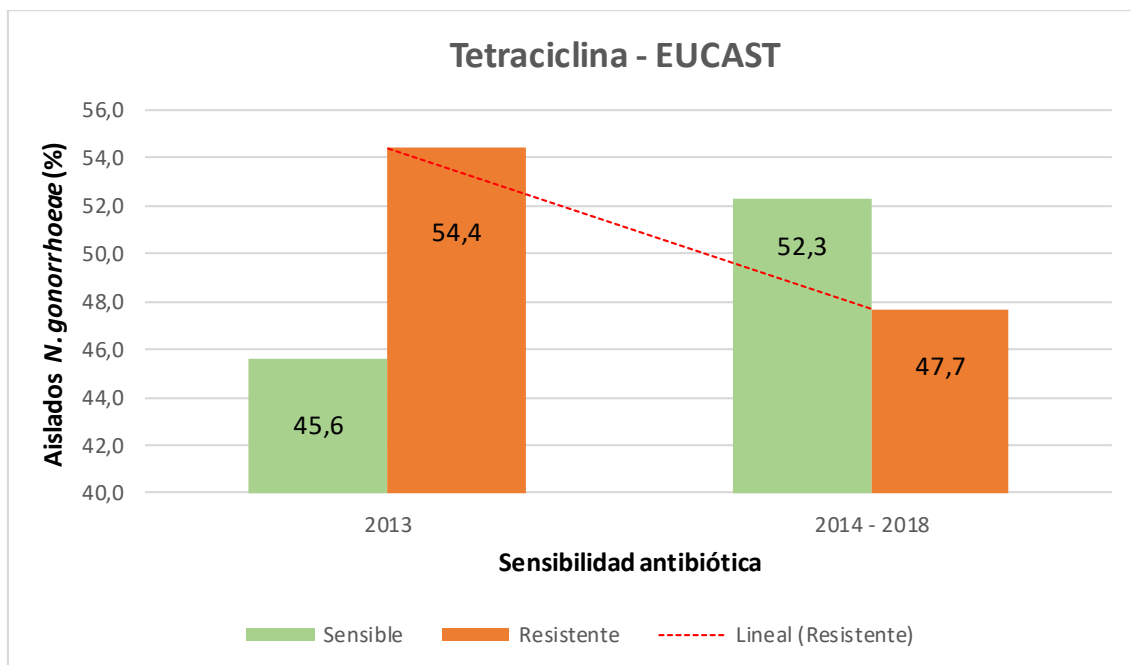


Figura 48. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a tetraciclina entre los dos periodos de estudio, según criterios EUCAST.

En el caso de EUCAST, se establece un único punto de corte (>1 mg/L) a partir del cual se consideran las cepas como resistentes. Durante el primer periodo, el 54,4% de las cepas fueron clasificadas en resistentes. Sin embargo, en el segundo periodo dicha tasa de resistencia disminuyó hasta el 47,7%.

Como conclusión, e independientemente de los criterios de clasificación utilizados, la tasa de resistencia a tetraciclina continúa siendo alta a pesar de experimentar, en nuestro estudio, una pequeña reducción en el porcentaje de cepas resistentes a la misma entre el periodo 2013 y el comprendido entre los años 2014 - 2018.

4.4.7. Penicilina

A continuación, se representan las CMI observadas tras evaluar 205 cepas frente a penicilina (Figura 49).

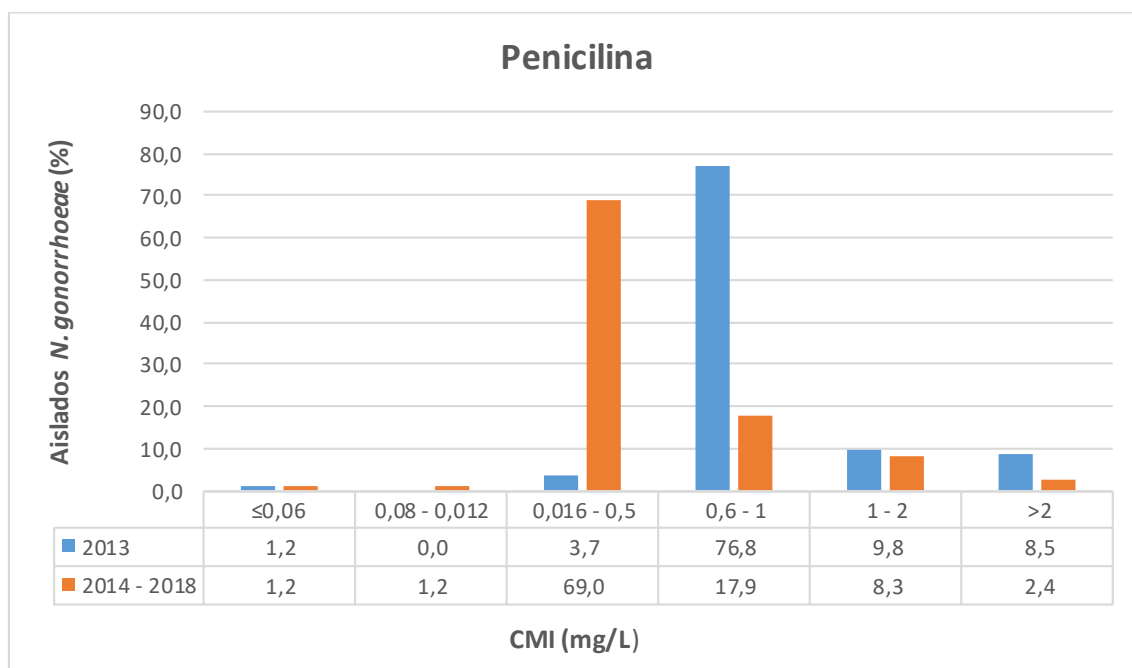


Figura 49. Distribución de las CMI obtenidas frente a penicilina durante los dos periodos de estudio.

Durante el año 2013, la CMI más frecuente estuvo comprendida entre 0,6 y 1 mg/L (76,8% de los aislados). No obstante, en el segundo periodo, el mayor porcentaje de cepas (69%) presentó una CMI inferior, comprendida entre 0,016 y 0,5 mg/L. Las cepas con CMI más elevada a dicho β -lactámico (>2 mg/L) también disminuyeron, pasando del 8,5 % al 2,4%.

Al analizar la evolución de las cepas testadas frente a la penicilina se observa que, tanto atendiendo a criterios CLSI (Figura 50) como EUCAST (Figura 51) y durante todo el estudio, la gran mayoría de los aislados se englobaron en la categoría de sensibilidad intermedia (aproximadamente el 80% del total de las cepas). Entre ambos periodos se observa, no obstante, una ligera disminución de las cepas resistentes y un aumento de las sensibles.

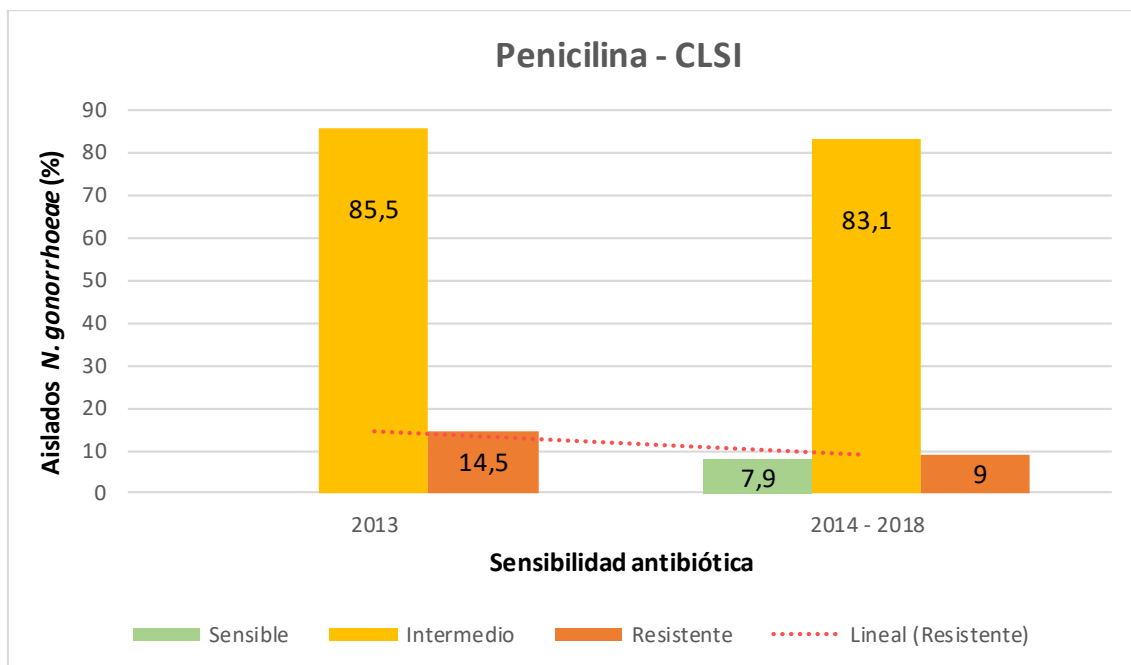


Figura 50. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a penicilina entre los dos periodos de estudio, según criterios CLSI.

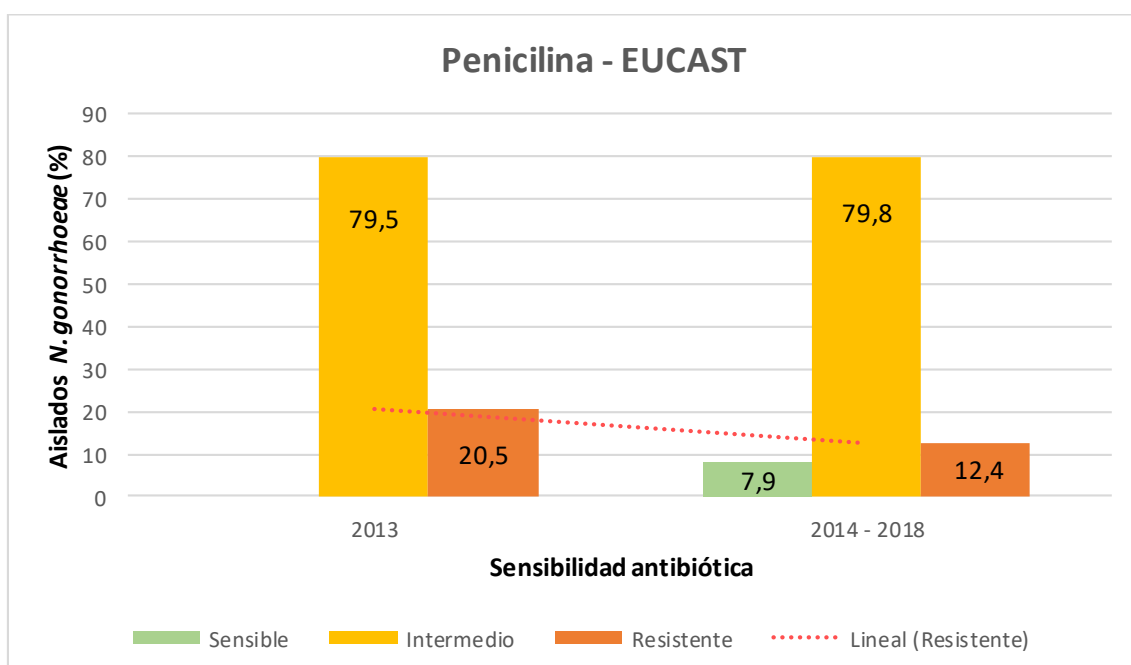


Figura 51. Evolución de la sensibilidad antibiótica frente a penicilina entre los dos periodos de estudio, según criterios EUCAST.

4.4.8. Producción de β -lactamasa

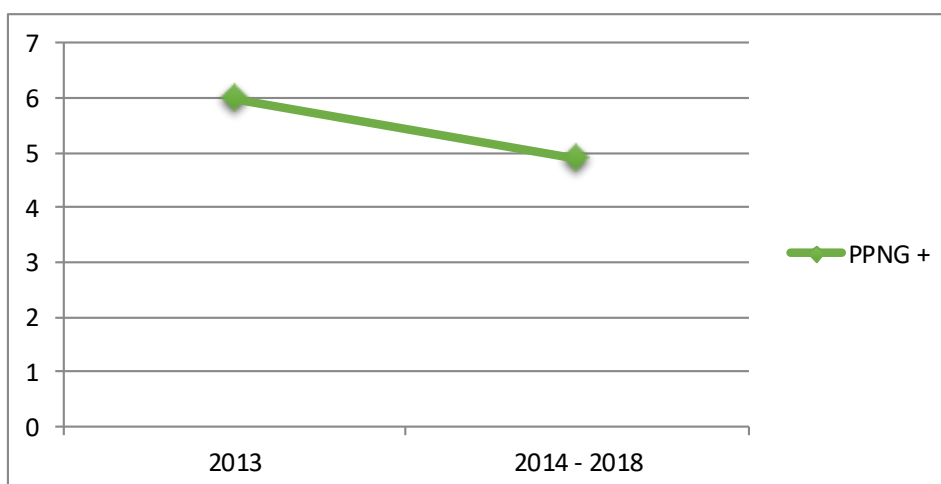


Figura 52. Porcentaje de cepas productoras de β -lactamasa.

En nuestra experiencia, el porcentaje medio de cepas con resistencia a la penicilina mediada por β -lactamasa (PPNG) presentando resistencia plasmídica a la misma, fue del 5,6%. Al comparar ambos periodos, la proporción de PPNG disminuyó del 6% observado en el año 2013 al 4,9% registrado en los años 2014 – 2018.

4.4.9. Multirresistencia

Finalmente, se estudió el porcentaje de cepas resistentes a las siguientes combinaciones de antimicrobianos. Se compararon dichas tasas de multirresistencia atendiendo a los puntos de corte establecidos por ambas sociedades científicas (Figura 53).

No se encontraron, durante los seis años del proyecto GONOVig, aislados resistentes a azitromicina y cefalosporinas de tercera generación (C3G) de forma simultánea.

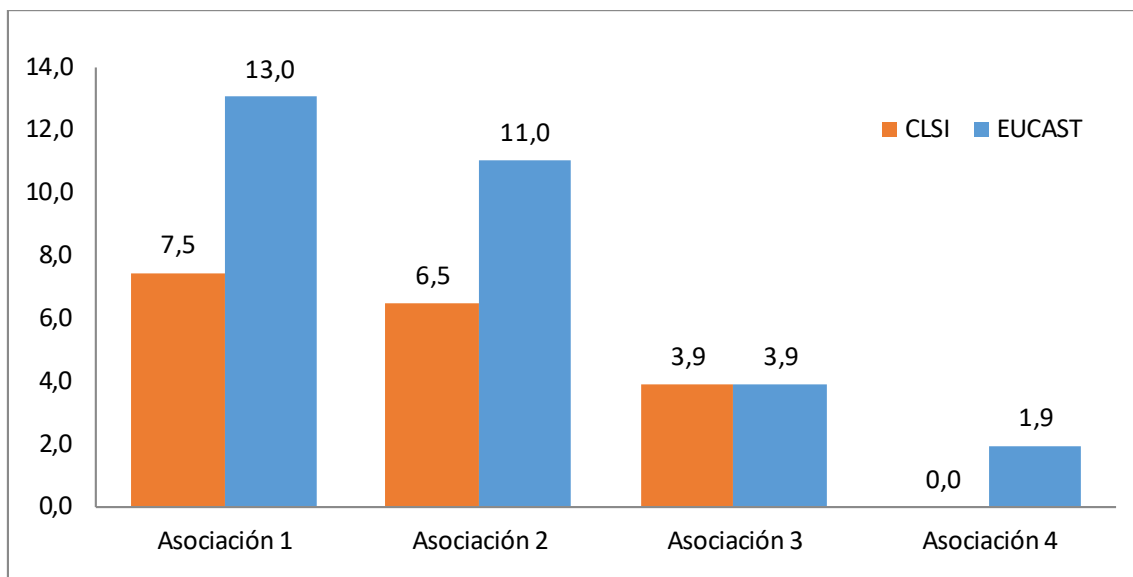


Figura 53. Tasa de resistencia combinada observada a diferentes asociaciones de antimicrobianos, atendiendo criterios CLSI y EUCAST. Los fármacos asociados en cada caso se describen a continuación.

Del total de cepas analizadas, la resistencia combinada a ciprofloxacino y penicilina (asociación 1) fue la más frecuente. De esta manera, el 7,5% (12 cepas) y el 13% de los aislados (21 cepas), mostraron resistencia a ambos antimicrobianos siguiendo criterios CLSI y EUCAST, respectivamente.

Al estudiar las cepas resistentes a ciprofloxacino, penicilina y tetraciclina (asociación 2) se observó que el 6,5% (10 cepas) y 11,5% de los aislados (17 cepas) mostraron resistencia a los tres fármacos, según criterios CLSI y EUCAST.

La tasa de resistencia simultánea observada frente a ciprofloxacino, tetraciclina y azitromicina (asociación 3) fue del 3,9% (6 cepas) tanto según CLSI como EUCAST.

Respecto a la resistencia de las C3G, tan solo se encontró en una cepa (1,9%) con resistencia a ciprofloxacino, penicilina, tetraciclina y cefixima (asociación 4) siguiendo criterios EUCAST. Sin embargo, no se encontraron aislados con resistencia múltiple a la combinación anterior atendiendo criterios CLSI. Cabe señalar que no se registraron cepas multirresistentes a ceftriaxona, pero si un aislado que resultó, según criterios EUCAST, resistente a cefixima (CMI de 0,5 mg/L) y a ceftriaxona (CMI de 0,25 mg/L), el cual fue recogido en el año 2013.

4.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Se realizó la tipificación molecular mediante la técnica NG-MAST de 175 aislados obtenidos durante los años 2013 - 2018 englobados en el proyecto GONOVig. Del total de cepas caracterizadas molecularmente, 77 aislados pertenecieron al periodo 2013 (44%) y 98 aislados al periodo 2014 – 2018 (56%).

4.5.1. Secuenciotipos y genogrupos encontrados

Se identificaron, haciendo uso de la base de datos de la plataforma online dispuesta para ello (www.ng-mast.net), un total de 86 Secuenciotipos (STs) diferentes. Del conjunto de cepas caracterizadas, 9 aislados no pudieron ser clasificados debido a presentar secuencias nuevas o combinaciones alélicas no incluidas en el sistema.

A continuación, en la Tabla 12 se muestran los 86 secuenciotipos encontrados, entre los cuales se incluyeron 73 alelos porB y 36 alelos tbpB distintos.

Del total de secuenciotipos estudiados, 51 de ellos (59,3%) fueron encontrados en tan solo 1 aislado, 20 STs (23,3%) se observaron en 2 aislados, 9 Secuenciotipos (10,5%) fueron encontrados en entre 3 y 4 aislados, y 6 STs (7%) estuvieron presentes en 6 o más aislados.

ST	nº cepas	% cepas	Alelo porB	Alelo tbpB
2	1	0,6	2	16
21	4	2,3	14	33
51	1	0,6	39	27
225	2	1,1	4	4
292	3	1,7	28	4
387	4	2,3	266	118
437	4	2,3	14	4
645	1	0,6	435	188
995	1	0,6	28	29
996	1	0,6	61	189
1034	1	0,6	430	33
1407	2	1,1	908	110
1945	1	0,6	1228	118
2318	2	1,1	1053	4
2400	8	4,6	1489	563
2487	1	0,6	1534	241
2992	13	7,4	1808	29
3128	1	0,6	1900	110
3149	2	1,1	1903	110
3378	12	6,9	2043	110
4120	2	1,1	2513	110
4186	1	0,6	2569	241
4244	1	0,6	1808	893
4809	4	2,3	2888	367
4936	1	0,6	2992	110
4995	2	1,1	3031	33
5004	2	1,1	30	263
5118	4	2,3	3040	32
5119	3	1,7	3104	29
5230	1	0,6	3163	29
5364	1	0,6	19	1133
5441	6	3,4	30	18
5445	1	0,6	1582	33
5476	2	1,1	1808	35
5526	1	0,6	3336	137
5585	1	0,6	3382	10
5619	1	0,6	3409	110
5624	2	1,1	90	953
5743	1	0,6	433	118
5793	2	1,1	55	39
6765	1	0,6	2078	29

6902	1	0,6	3740	137
7072	1	0,6	4259	10
7574	1	0,6	908	563
7636	2	1,1	4592	29
8016	2	1,1	28	137
8241	1	0,6	4953	29
8329	2	1,1	4989	33
8419	1	0,6	28	563
8517	3	1,7	1142	1531
8718	1	0,6	5162	39
8921	1	0,6	5270	110
9184	2	1,1	5475	563
10688	1	0,6	6253	137
11461	1	0,6	6720	188
11521	1	0,6	6747	1149
11547	4	2,3	6766	10
11744	2	1,1	55	263
11800	1	0,6	6912	563
12001	2	1,1	1142	563
12547	1	0,6	5136	186
12792	1	0,6	7448	4
13123	1	0,6	7628	110
13252	2	1,1	7448	4
13288	12	6,9	4991	10
13470	1	0,6	511	263
13476	2	2,5	90	188
13489	1	0,6	279	18
13780	1	0,6	7954	563
13784	1	0,6	3642	18
14084	1	0,6	8108	2391
14497	2	1,1	4018	33
15589	1	0,6	7738	1971
15708	1	0,6	9183	241
16020	1	0,6	9344	186
17670	1	0,6	5860	137
20113	1	0,6	3957	60
Nuevos	9	5,7	-	-
Total	175	100,0	73	36

Tabla 12. Secuenciotipos y número de aislados en los que fueron identificados, frecuencia y alelos que los componen.

En la Tabla 13 se muestran los secuenciotipos más prevalentes en nuestra experiencia, su frecuencia, alelos que los conforman y años en que fueron detectados.

ST	Aislados (n) - %	Alelo porB	Alelo tbpB	Años
2992	(13) – 7,4%	1808	29	2013 - 2014, 2018
3378	(12) – 6,9%	2043	110	2013 - 2014
13288	(12) – 6,9%	4991	10	2013 - 2014
2400	(8) - 4,6%	1489	563	2013 - 2014, 2016
5441	(6) – 3,4 %	30	18	2015 - 2016, 2018

Tabla 13. Secuenciotipos más frecuentes encontrados en el proyecto GONOVig.

El ST2992 fue el más prevalente en nuestro análisis, detectándose en 13 aislados y suponiendo un 7,4% del total de las cepas estudiadas. Estas cepas fueron recogidas mayoritariamente en el año 2013, además del año 2014 y 2018.

Tanto el ST3378 como el ST13288 estuvieron presentes en 12 cepas, suponiendo en ambos casos el 6,9% del total de los aislados. Las cepas englobadas en ambos STs se tomaron en los años 2013 y 2014.

Por su parte, el ST2400 fue hallado en 8 aislados (4,6%) obtenidos principalmente en el año 2013, además de en los años 2014 y 2016.

Finalmente, el ST5441 se determinó en 6 aislados (3,4%). Estas cepas, sin embargo, pertenecieron a los años 2015, 2016 y 2018 de nuestro estudio.

A su vez, estos STs pueden englobarse en asociaciones mayores denominadas genogrupos. Ello es posible cuando varios secuenciotipos presentan un alelo idéntico y el otro posee una similitud en su secuencia superior al 99% (144). Dichos genogrupos se nombran usando la letra G seguida del número del ST predominante en cada grupo. El G1407, cuyo secuenciotipo predominante es el ST1407, resultó mayoritario en nuestra experiencia (13,1%), seguido del G2992 (10,3%), G2400 (6,3%) y G387 (3,4%).

En la Tabla 14 se describen los cuatro genogrupos principales observados durante el estudio. Para cada uno de ellos, se muestra el ST representante y el número de cepas encontradas, los alelos porB y tbpB que lo conforman, los STs encontrados en nuestro análisis con los que comparten alelos y aquellos que además presentan una homología del 99% en su otro alelo, incluyéndose de esta manera dentro de dicho genogrupo.

Genogrupo N (%)	ST predominante (n)	Alelo porB / STs con idéntico porB	Alelo tbpB / STs con idéntico tbpB
G1407 23 (13,1%)	<u>1407</u> (2)	908 / 7574	110 / <u>3128</u> , <u>3149</u> , <u>3378</u> , <u>4120</u> , <u>4936</u> , <u>5619</u> , <u>8921</u> , <u>13123</u> , Nuevo ST
G2992 18 (10,3%)	<u>2992</u> (13)	1808 / 5476, 4244	29 / 995, <u>5119</u> , 5230, 6765, <u>7636</u> , 8241, Nuevo ST
G2400 11 (6,3%)	<u>2400</u> (8)	1489 / -	563 / 7574, 8419, <u>9184</u> , <u>11800</u> , 12001, 13780, Nuevo ST
G387 6 (3,4%)	<u>387</u> (4)	266 / -	118 / <u>1945</u> , <u>5743</u>

Tabla 14. Genogrupos principales encontrados durante el estudio. Se subrayan aquellos secuenciotipos que, respecto al ST principal, presentan un alelo idéntico y el otro posee una homología $\geq 99\%$, por lo que son clasificados dentro del mismo genogrupo.

Finalmente se estudiaron, del total de 175 aislados de *Neisseria gonorrhoeae* tipificados, 9 cepas cuyas secuencias alélicas no pudieron ser clasificadas mediante la base de datos del NG-MAST.

En tres de ellas, la combinación de ambos alelos no resultó en ningún ST registrado. En seis ocasiones, el alelo porB presentó una ligera diferencia (del 1 al 8%) respecto la secuencia de bases de un alelo porB determinado, no teniendo por tanto un secuenciotipo asignado (Tabla 15).

Alelo porB – (coincidencia %)	Alelo tbpB	Sexo	Edad	Hospital
3336 - (99)	137	M	21	Clínico
3957 - (100)	60	M	47	Clínico
5136 - (100)	6	M	28	Ribera
9776 - (92)*	18	M	36	Ribera
9400 - (99)	26	M	18	Clínico
4508 - (99)	563	M	20	Ribera
8506 - (99)	110	M	31	Clínico
4952 - (100)	29	M	26	Ribera

Tabla 15. Resultados obtenidos de la caracterización molecular de las cepas no clasificables según la base de datos de NG-MAST, así como sexo, edad y hospital de procedencia de los pacientes. *Dos cepas compartieron la misma secuencia alélica ausente en el sistema de clasificación.

Cinco de estos aislados se obtuvieron en el Hospital Universitario de La Ribera, dos de los cuales mostraron la misma secuencia, mientras que los cuatro restantes se recogieron en el Hospital Clínico de Valencia. Todas estas cepas se aislaron durante el segundo periodo de estudio, provinieron de pacientes de sexo masculino y con edades comprendidas entre los 18 y los 47 años, con un promedio de 29 años de edad.

4.5.2. Relación entre sensibilidad antibiótica y características demográficas de los secuenciotipos más prevalentes

A continuación, en la Tabla 16 se estudia la relación entre las cepas pertenecientes a los 5 STs más frecuentes en nuestro entorno, la susceptibilidad antibiótica mostrada, así como el sexo y edad del paciente, hospital y año de recogida.

Se han excluido los resultados de espectinomicina y cepas PPNG, puesto que todas las cepas aquí incluidas resultaron sensibles y negativas a dichas determinaciones, respectivamente. Se han remarcado las cepas resistentes según criterios EUCAST, sombreándose de color amarillo aquellas en las que se observó resistencia a los agentes utilizados en el tratamiento empírico actual.

ST	AZM	CFM	CRO	CIP	TE	P	Edad	Sexo	Hospital	Año
2992	WT	S	S	S	S	I	24	M	Vinaroz	2013
2992	WT	S	S	S	S	I	25	M	Vinaroz	2013
2992	WT	S	S	S	S	I	31	M	Ribera	2013
2992	WT	S	S	S	R	I	25	M	Ribera	2013
2992	WT	S	S	S	R	I	46	M	Clínico	2013
2992	WT	S	S	S	S	I	32	M	Clínico	2013
2992	WT	S	S	S	S	I	40	M	Clínico	2013
2992	WT	S	R	S	S	I	31	M	Clínico	2013
2992	WT	S	S	S	R	I	24	M	Clínico	2013
2992	WT	S	S	S	R	I	32	M	Clínico	2013
2992	WT	S	S	S	R	I	24	M	Clínico	2013
2992	WT	S	S	S	S	I	33	M	Ribera	2014
2992	WT	S	S	S	S	I	25	M	Clínico	2018
3378	WT	S	S	R	R	I	27	F	General (V)	2013
3378*	-	-	-	-	-	-	43	M	Sagunto	2013
3378	WT	S	S	R	S	I	39	M	General (C)	2013
3378	WT	S	S	R	R	I	31	M	General (C)	2013
3378	WT	S	S	R	S	I	27	M	Manises	2013
3378	WT	S	S	R	S	I	37	M	Manises	2013
3378	WT	S	S	R	R	I	31	M	De la Plana	2013
3378	WT	S	S	R	S	I	34	M	Sagunto	2013
3378	WT	S	S	R	S	I	35	M	Clínico	2013
3378	WT	R	S	R	R	R	29	M	Ribera	2014
3378	WT	S	S	R	R	I	17	M	Ribera	2014
3378	NWT	S	S	R	R	I	24	M	General (C)	2014
13288	WT	S	S	R	S	I	43	M	General (V)	2013
13288	WT	S	S	R	S	I	26	M	Ribera	2013
13288	WT	R	S	R	S	I	30	M	Manises	2013
13288	WT	R	S	R	S	I	36	M	Manises	2013
13288	WT	S	S	R	S	I	33	M	Clínico	2013
13288	WT	S	S	R	S	I	25	M	Clínico	2013
13288	WT	S	S	R	S	I	18	M	Clínico	2013

13288	WT	R	S	R	R	I	40	M	Clínico	2013
13288	WT	S	S	R	S	I	29	M	Clínico	2014
13288	WT	S	S	R	R	I	38	F	Clínico	2014
13288	WT	S	S	R	R	I	32	M	Clínico	2014
13288	WT	S	S	R	R	I	29	M	Clínico	2014
2400*	-	-	-	-	-	-	37	M	Ribera	2013
2400	WT	S	S	R	R	I	20	M	General (V)	2013
2400	WT	S	S	R	R	I	29	M	Manises	2013
2400	WT	S	S	R	R	I	26	M	Manises	2013
2400	WT	S	S	R	R	I	21	M	Manises	2013
2400	WT	S	S	R	R	I	25	M	Clínico	2013
2400	WT	S	S	R	R	I	30	M	Clínico	2014
2400	WT	S	S	R	S	S	17	M	Vilanova	2016
5441	WT	S	S	S	S	I	21	M	Ribera	2015
5441	WT	S	S	S	S	I	19	M	Ribera	2015
5441	WT	S	S	S	S	I	29	M	Ribera	2015
5441	WT	S	S	S	S	I	22	M	Ribera	2016
5441	WT	S	S	S	S	S	28	M	Vilanova	2016
5441	NWT	S	S	S	S	I	29	F	Clínico	2018

Tabla 16. Sensibilidad frente a azitromicina (AZM), cefixima (CFM), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TE), penicilina (P), sexo masculino (M) o femenino (F), hospital y año de recogida de aquellos aislados pertenecientes a los secuenciotipos más frecuentes en nuestro estudio. *Dos cepas, una con ST3378 y otra con ST2400, resultaron no viables por lo que no se pudo estudiar su perfil antibiótico.

Del total de cepas mostradas en la Tabla anterior, 7 de ellas (14,3%) fueron resistentes a alguno de los agentes empleados en el régimen inicial de la gonorrea, predominando la resistencia a cefixima (4 aislados, 8,2% del total), seguida de azitromicina (2 aislados, 4,1% del total) y ceftriaxona (1 aislado, 2% del total). Ninguna cepa presentó resistencia simultánea a cefalosporinas y azitromicina.

Respecto al resto de antimicrobianos, 30 aislados fueron resistentes a ciprofloxacino (61,2%), 21 a tetraciclina (42,8%) y 47 presentaron sensibilidad intermedia o resistencia a penicilina (95,9%).

Al analizar secuenciotipos concretos destacó que, de las 12 cepas pertenecientes al ST13288, 3 fueron resistentes a cefixima siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p = 0,032$) y todas ellas fueron resistentes a ciprofloxacino ($p < 0,01$). La totalidad de estos aislados se recogieron en 4 hospitales distintos situados en la provincia de Valencia y durante los primeros años de estudio.

En nuestra área, el ST2992 fue el secuenciotipo mayoritario, ST que presentó una cepa resistente a ceftriaxona. Estos 13 aislados pertenecieron mayoritariamente a muestras tomadas en la provincia de Valencia, aunque dos de ellas provinieron de la provincia de Castellón. Destaca que 11 de estas cepas se recogieron en el año 2013.

Entre las 12 cepas encontradas englobadas en el ST3378, secuenciotipo incluido dentro del genogrupo G1407, se observó 1 aislado resistente a cefixima y 1 aislado con CMI > 1 mg/L frente aazitromicina. Todas las cepas fueron resistentes a ciprofloxacino ($p = 0,02$). Cabe resaltar la diversidad en su origen, puesto que dichas cepas fueron aisladas en 6 hospitales diferentes situados en las provincias de Valencia y Castellón.

Respecto al ST2400, dicho secuenciotipo estuvo relacionado con resistencia a ciprofloxacino ($p = 0,017$) y tetraciclina ($p = 0,048$). También destacó que la edad media de los 8 pacientes que presentaron cepas con este ST fue de 24 años ($p = 0,033$), inferior al promedio del total de cepas estudiadas. Se obtuvieron en 4 hospitales de la provincia de Valencia y principalmente durante el año 2013.

Finalmente, entre las 6 cepas pertenecientes al ST5441 se encontró una clasificada como *non-wild-type* frente aazitromicina tomada de un paciente de sexo femenino. Los 5 aislados se recogieron durante el segundo periodo de estudio y todos ellos en la provincia de Valencia. La cepa resistente a aazitromicina en particular, se obtuvo en el año 2018.

La edad media de estos 51 pacientes fue de 29,4 años, 48 fueron hombres (94,1%) y 3 mujeres (5,9%). Sobre el total de cepas pertenecientes a estos STs, 34 se recogieron en el año 2013 (66,7%), 9 en el 2014 (17,6%), 3 en el 2015 (5,9%), 3 en el 2016 (5,9%) y 2 en el 2018 (3,9%). Respecto a su origen, 45 aislados procedieron de hospitales situados en Valencia (88,2%) y 6 cepas de centros ubicados en la provincia de Castellón (11,8%).

4.5.3. Relación entre características moleculares y cepas resistentes

A continuación, se describen los secuenciotipos de aquellas cepas resistentes a cada uno de los 7 antibióticos testados, encontradas al atender criterios EUCAST.

4.5.3.1. Azitromicina

Tras el análisis molecular de los aislados resistentes frente a azitromicina (CMI >1 mg/L) se encontraron los siguientes resultados (Figura 54).

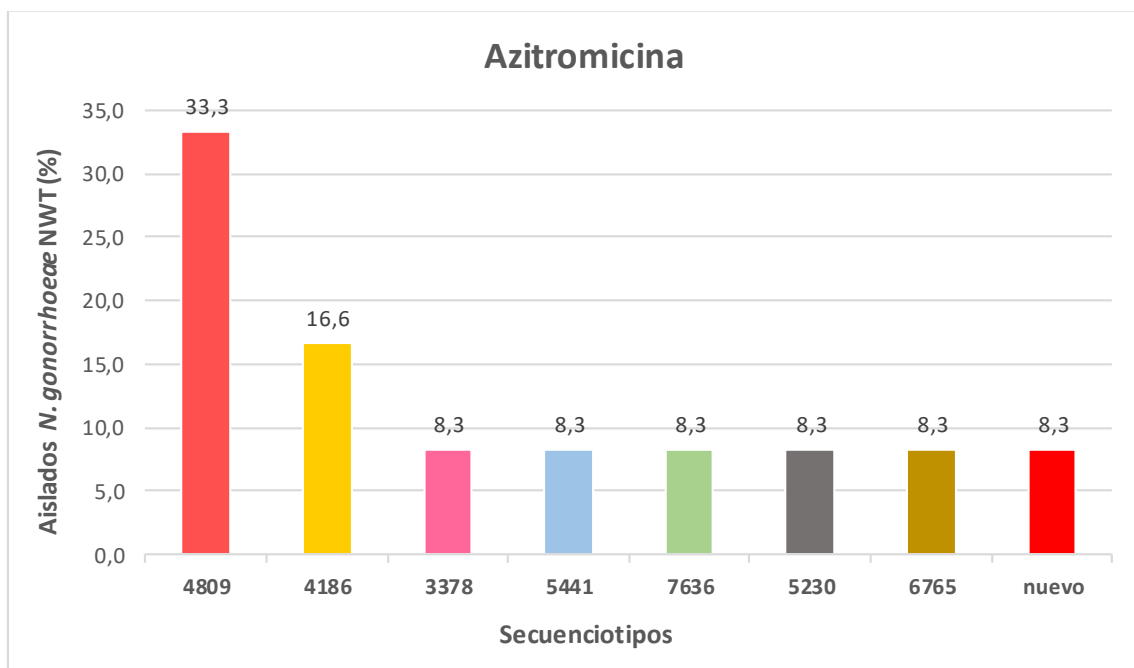


Figura 54. Distribución de secuenciotipos observados en cepas *non-wild-type* (NWT) frente a la azitromicina (CMI >1mg/L).

De las 12 cepas NWT estudiadas, 4 de ellas (33,3 %) pertenecieron al ST4809. Dichos aislados tuvieron CMIs superiores a 3 mg/L frente a dicho macrólido, y mostraron además resistencia a tetraciclina, ciprofloxacino y penicilina.

En 2 cepas se obtuvo el ST4186 (16,6%) y en una cepa el ST3378 (8,3%), el cual fue uno de los más prevalentes en nuestro estudio tal y como se ha indicado

anteriormente. Dichos aislados también presentaron resistencia combinada a tetraciclina, ciprofloxacino y penicilina.

El ST5441, quinto secuenciotipo más prevalente en nuestra experiencia, fue hallado en un aislado.

También se encontró una cepa cuya combinación del alelo porB (4952) y tbpB (29) no resultó en ningún ST existente en la base de datos, clasificándose por tanto como un nuevo secuenciotipo.

4.5.3.2. Cefixima

A continuación, se muestran los STs observados en aquellas cepas con CMI >0,125 mg/L frente a cefixima (Figura 55).

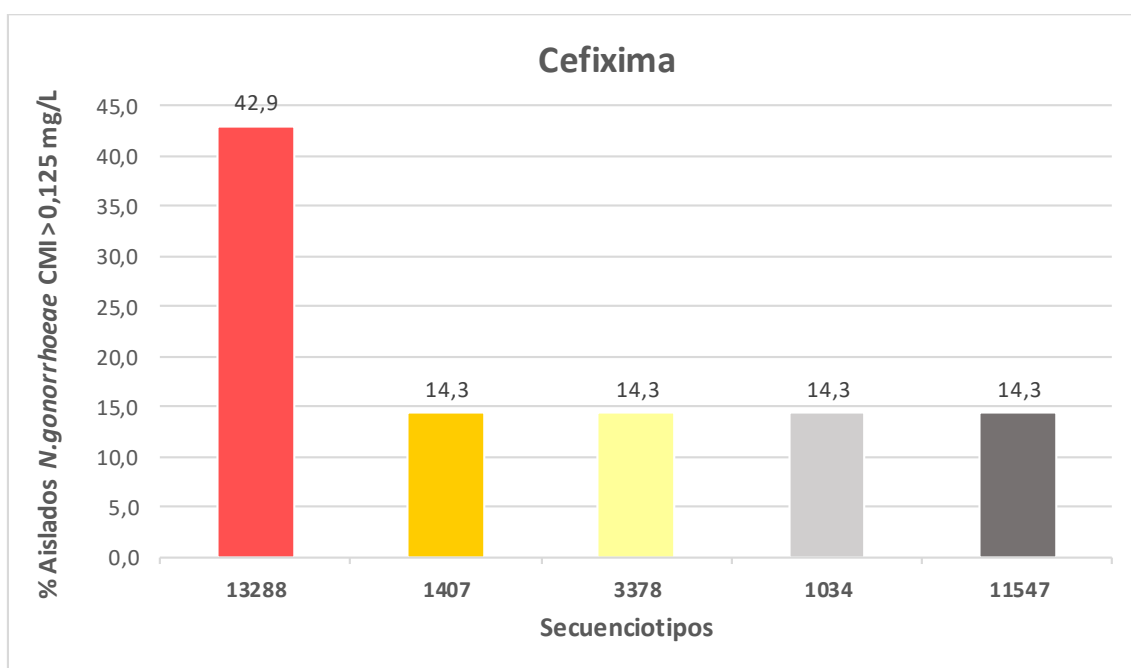


Figura 55. Distribución de los secuenciotipos observados en cepas con resistencia frente a cefixima.

En el caso de esta C3G, se tipificaron 7 cepas clasificadas como resistentes según criterios EUCAST (CMI >0,125 mg/L). Entre dichos aislados destacaron 3 incluidos en el ST13288, constituyendo estos el 42,9% de todos los aislados resistentes a esta C3G. Dicha asociación resultó estadísticamente significativa ($p = 0,032$).

También se identificaron 2 cepas pertenecientes al ST1407 y ST3378, ambas dos estrechamente relacionadas por sus características moleculares y clasificadas dentro del genogrupo G1407.

Finalmente, se encontró una cepa con ST1034 y otra con ST11547.

Por otro lado, y al analizar los alelos que componen las cepas anteriormente detalladas, se apreció cierta similitud en el alelo *tbpB* presente en los aislados estudiados con resistencia a esta cefalosporina oral. Dicha secuencia alélica codifica para la transferrina tipo B implicada en el metabolismo del hierro, oligoelemento esencial para la supervivencia del gonococo (Figura 56).

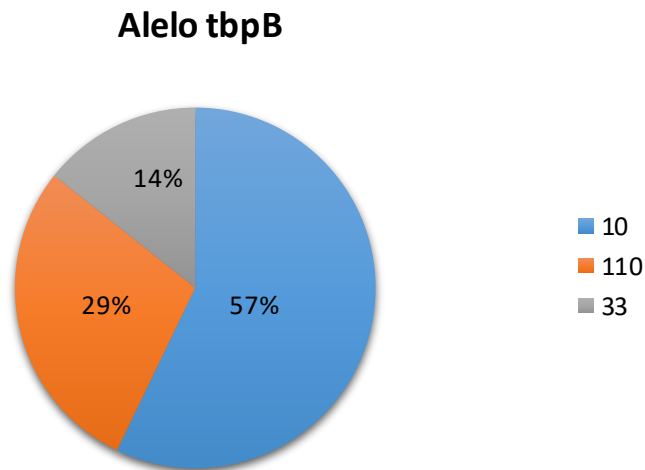


Figura 56. Distribución de los alelos *tbpB* observados en cepas con resistencia frente a cefixima.

De esta manera, se encontraron tan solo 3 alelos *tbpB* distintos en las 7 cepas anteriormente tipificadas. Destacó el alelo 10, el cual estuvo presente en el 57% de los aislados, seguido del 110 (29%) y del 33 (14%).

4.5.3.3. Ceftriaxona

En la siguiente figura se detallan los secuenciotipos encontrados en aquellos aislados con una CMI >0,125 mg/L frente a ceftriaxona (Figura 57).

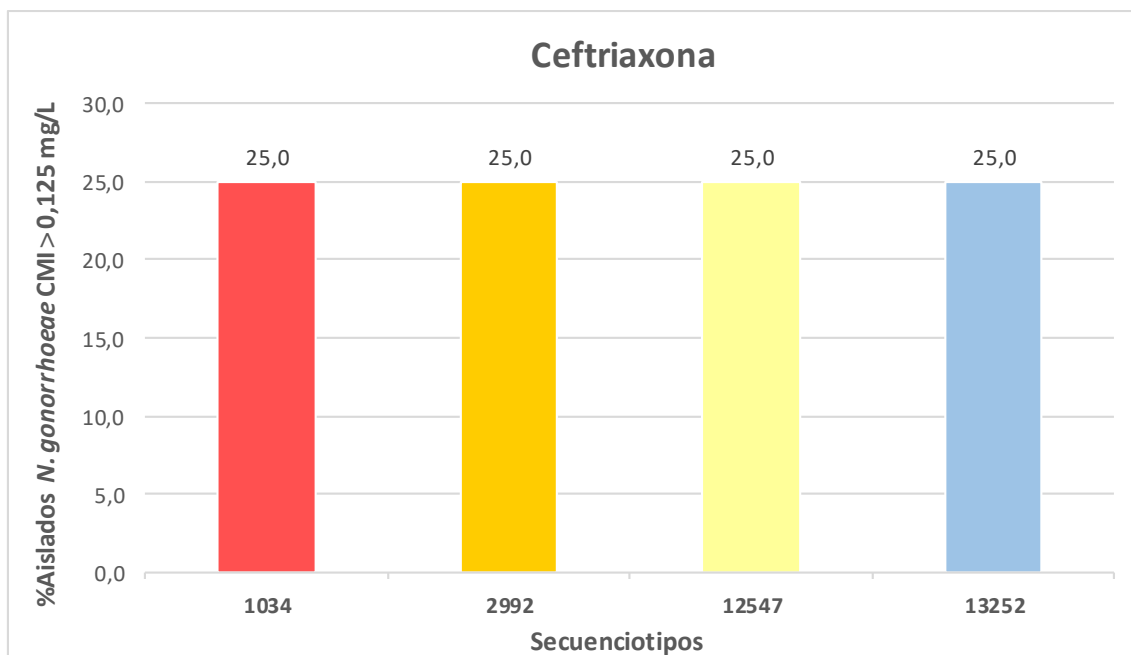


Figura 57. Distribución de los secuenciotipos observados en cepas con resistencia frente a ceftriaxona.

En este caso, se estudiaron 4 cepas con resistencia a ceftriaxona según criterios EUCAST, no obteniéndose ningún ST idéntico.

Se encontró una cepa con ST2992, perteneciente al genogrupo G2992, secuenciotipo más frecuente y segundo genogrupo más prevalente en nuestra experiencia.

Por otro lado, se observó una cepa con ST1034, aislado que resultó simultáneamente resistente a cefixima.

Las dos cepas restantes se tipificaron con el ST12547 y el ST13252.

4.5.3.4. Ciprofloxacino

Se tipificaron 82 aislados que presentaron resistencia a este antibiótico (CMI >0,06 mg/L). Debido a la alta prevalencia de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a esta quinolona, se obtuvieron un total de 57 secuenciotipos diferentes. A continuación, en la Figura 58, se han representado aquellos STs mayoritarios presentes en 4 o más aislados.

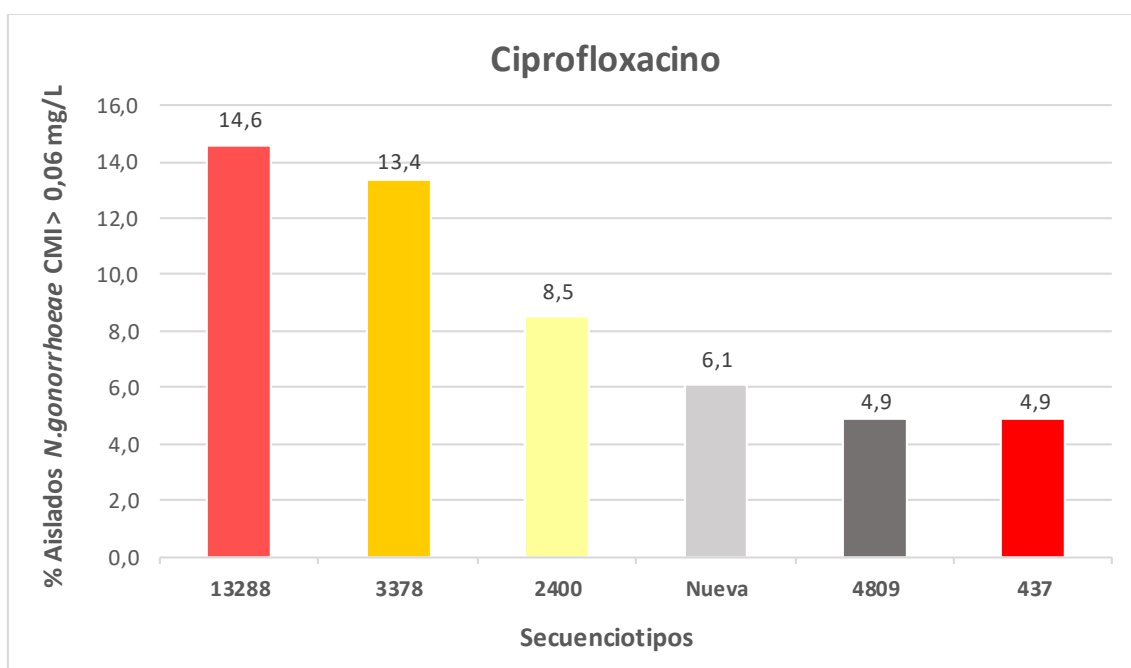


Figura 58. Distribución de los secuenciotipos más frecuentemente observados en cepas con resistencia a ciprofloxacino.

En la Figura 58 se representan los secuenciotipos que engloban 34 cepas resistentes a dicha quinolona. El más frecuente fue el ST13288 ($p < 0,01$) que supuso el 14,6% de los casos, seguido del ST3378 ($p = 0,02$) encontrado en el 13,4% de estos aislados y del ST2400 ($p = 0,017$) obtenido en el 8,5% de los aislados.

Además, se encontraron 5 cepas nuevas (6,1%) no clasificables en la base de datos, 4 aislados (4,9%) pertenecientes al ST4809 y también relacionado con altas CMIs frente a azitromicina, y 4 cepas (4,9%) identificadas con el ST437.

4.5.3.5. Tetraciclina

Se caracterizaron 58 aislados resistentes frente a tetraciclina (CMI >1 mg/L). Entre estas cepas se obtuvieron 31 secuenciotipos diferentes, mostrándose los más frecuentes ($n \geq 4$ aislados) en la Figura 59.

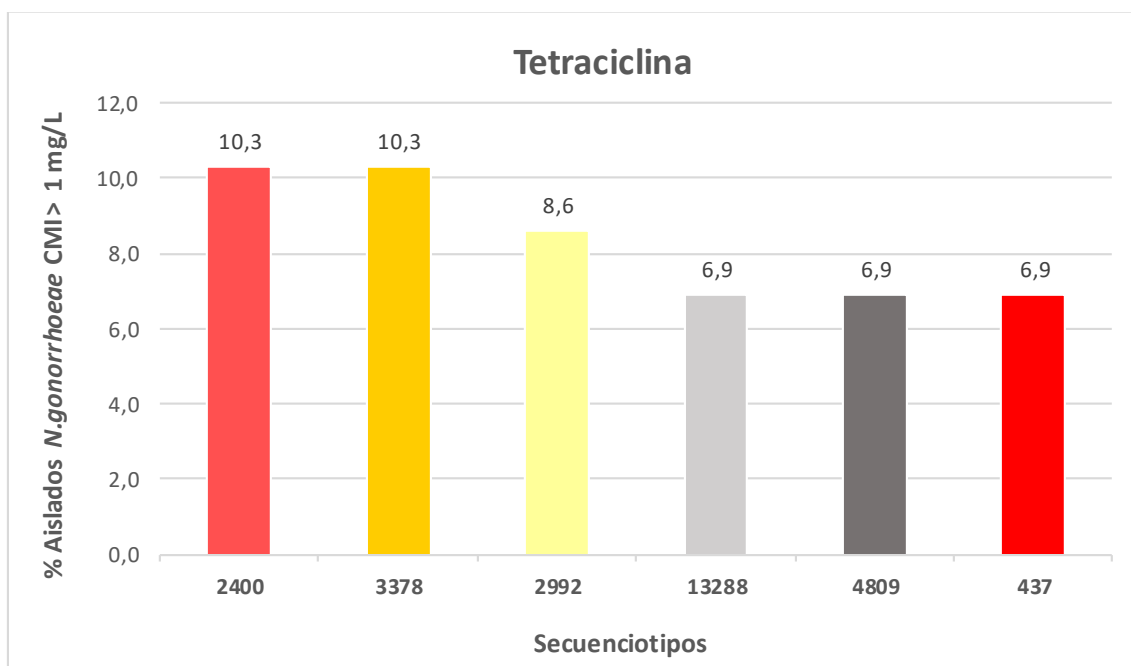


Figura 59. Distribución de los secuenciotipos más frecuentemente observados en cepas con resistencia a tetraciclina.

Destacan el ST2400 ($p = 0,048$) y el ST3378 como los más abundantes (10,3% en ambos ST), seguidos del ST2992 (8,6%), ST13288, ST4809 y ST437 (6,9% cada uno de ellos).

Todos ellos, a excepción del ST2992, también resultaron ser secuenciotipos altamente relacionados con resistencia a ciprofloxacino. Este hecho condiciona que muchas cepas de gonococo analizadas durante nuestro estudio compartiesen resistencia a estos dos antimicrobianos.

4.5.3.6. Penicilina

Se tipificaron un total de 122 aislados de *Neisseria gonorrhoeae* con sensibilidad intermedia o resistente a la penicilina. En este caso, se obtuvieron 55 secuenciotipos diferentes, mostrándose en la Figura 60 aquellos STs que contuvieron 6 o más aislados.

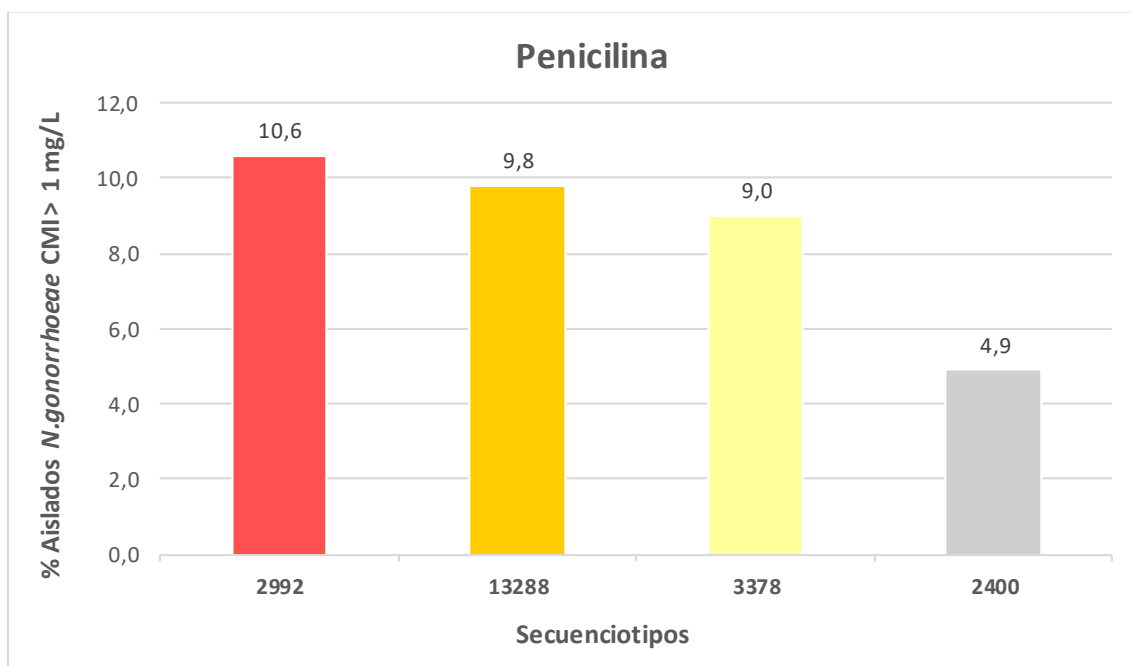


Figura 60. Distribución de los secuenciotipos más frecuentemente observados en cepas con resistencia o sensibilidad intermedia a penicilina.

En la Figura 60 se muestran los ST de cepas intermedias o resistentes a penicilina. El primer lugar destaca el ST2992, que estuvo presente en 13 de estos aislados y supuso el 10,6% sobre el total de cepas aquí clasificadas.

Le siguieron el ST13288 (9,8%), el ST3378 (9%) y el ST2400 (4,9%).

Nuevamente, la gran mayoría de los secuenciotipos más abundantes en nuestra experiencia mostraron resistencia frente a penicilina, hecho que explica la baja sensibilidad actual de las cepas circulantes de gonococo a la penicilina.

4.5.3.7. Cepas PPNG

Por otro lado, se tipificaron 8 cepas con resistencia a la penicilina y prueba positiva de la β -lactamasa. El resultado de la caracterización molecular de estas cepas PPNG se muestra en la Tabla 17.

ST	porB	tbpB
5624*	90	953
6902	3740	137
8329	4989	33
8718	5162	39
12792	7448	4
13476	90	188
14048	8108	2391

Tabla 17. Secuenciotipos encontrados en cepas con resistencia plasmídica a la penicilina (PPNG). * El ST5624 se encontró en dos aislados productores de β -lactamasa.

A excepción del ST5624, secuenciotipo encontrado en 2 aislados con resultado positivo para la prueba de la cefinasa, el resto de cepas aquí incluidas presentaron características moleculares diferentes.

4.5.3.8. Nuevos Secuenciotipos.

A continuación, se muestra en la Figura 61 la sensibilidad observada en los 9 secuenciotipos no identificados en la base de datos de NG-MAST.

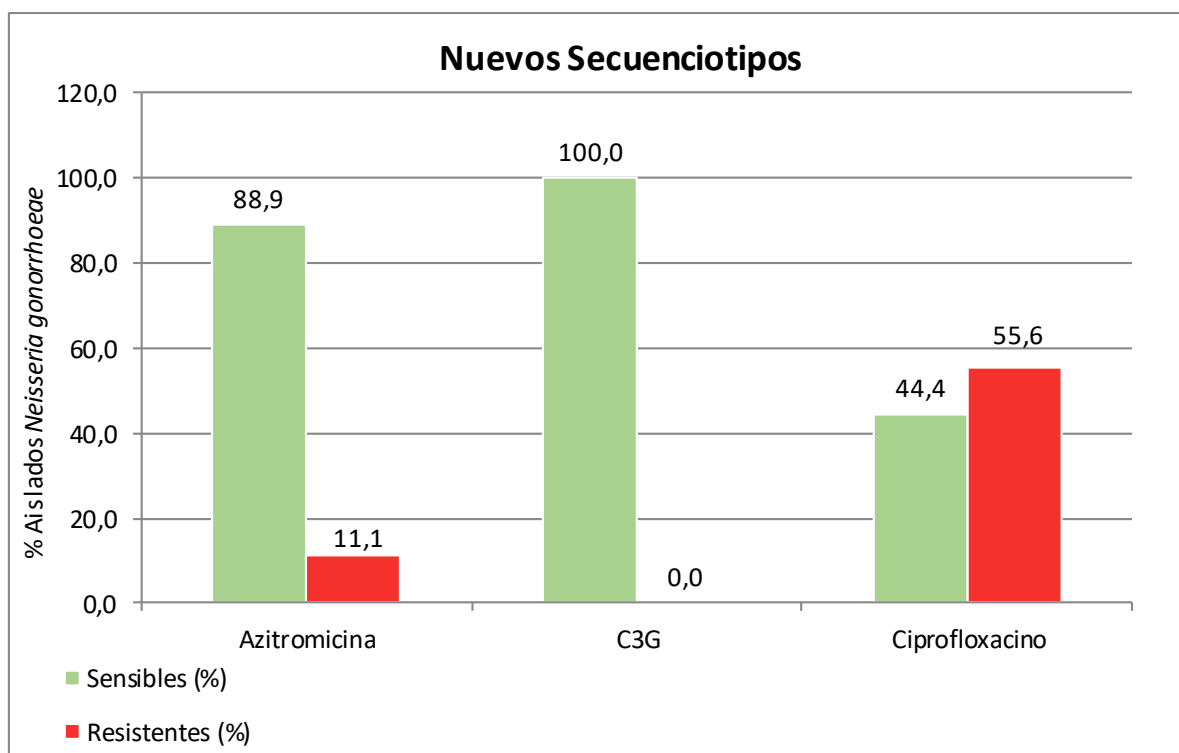


Figura 61. Sensibilidad antimicrobiana de los nuevos secuenciotipos analizados.

Se encontró 1 nuevo secuenciotipo (11,1%) con una CMI frente a azitromicina de 3 mg/L y, por tanto, clasificado como *non-wild-type*. Ninguno de estos aislados sin embargo fue resistente a cefixima o a ceftriaxona.

Se obtuvieron 5 aislados (55,6%) que presentaron resistencia a ciprofloxacino. Todas las cepas fueron negativas a la prueba de la β -lactamasa.

4.6. RED DE VIGILANCIA MICROBIOLÓGICA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

Otro objetivo de la presente Tesis fue el análisis de la información recabada por la Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA) de todos aquellos pacientes con sospecha de resultar positivos para *N. gonorrhoeae*, datos recogidos entre los años 2013 y 2019 en dicha comunidad.

Se analizó la procedencia de las muestras, la información demográfica de los pacientes, los distintos tipos de especímenes y técnicas diagnósticas empleadas, los resultados de sensibilidad obtenidos frente a todos los antibióticos testados durante el proyecto GONOVig, así como las CMI de gentamicina y fosfomicina, y se extrajeron las siguientes conclusiones.

4.6.1. Procedencia de las muestras

Las 103.926 muestras analizadas provinieron de 75.294 pacientes distintos. Estas muestras fueron tomadas en la Comunidad Valenciana durante el periodo 2013 - 2019, y procedieron de centros sanitarios de diferentes niveles ubicados en las provincias de Valencia, Alicante y Castellón.

Además de en las correspondientes capitales de provincia, se analizaron cepas originarias de 244 municipios valencianos, 120 municipios alicantinos y 86 municipios castellanenses, estableciéndose un retrato completo de la situación actual de la gonorrea en dicha comunidad.

Del conjunto de muestras investigadas, se obtuvieron 4.887 resultados positivos para *N. gonorrhoeae* (4,7% sobre el total), de los cuales 2.636 se produjeron en la provincia de Valencia (53,9%), 1.188 en Alicante (24,3%) y 345 en Castellón (7,1%). En 718 casos (14,7%) se desconoció el lugar de origen (Figura 62).

Procedencia aislados

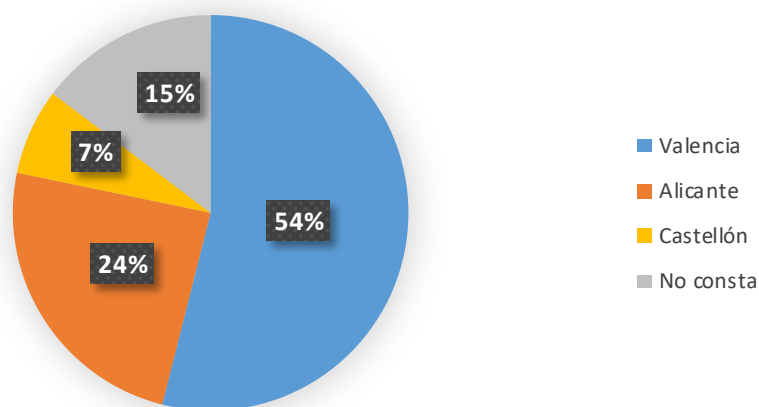


Figura 62. Procedencia de las muestras estudiadas de RedMIVA con resultado positivo para gonococo y analizadas durante el periodo 2013 - 2019.

4.6.2. Población de estudio

El sexo de los pacientes con resultado positivo para *Neisseria gonorrhoeae* resultó muy desigual, tal y como se muestra en la Figura 63, siendo muy superior el porcentaje de gonococia en pacientes varones.

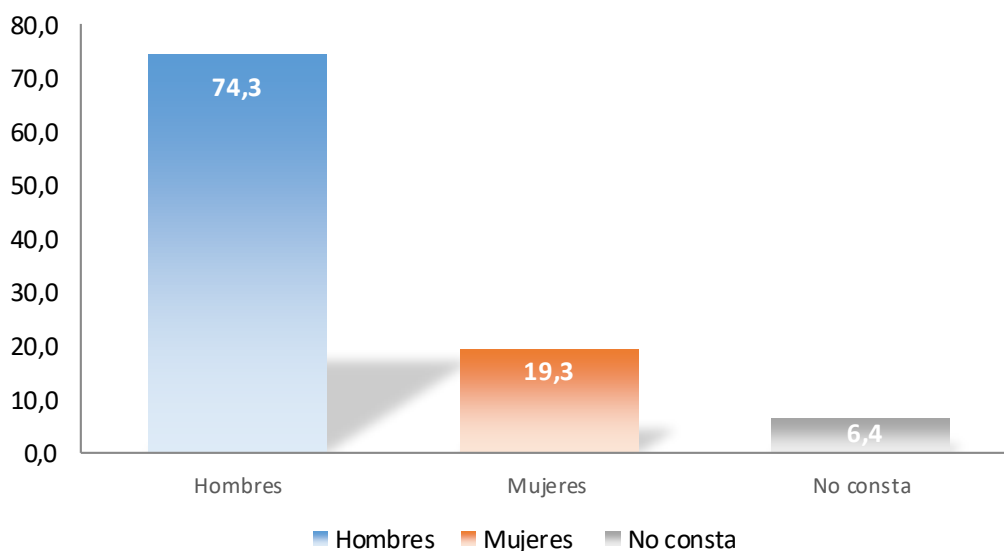


Figura 63. Distribución de pacientes con gonorrea por sexo.

El 74,3% de los pacientes (3.633 casos positivos) fueron hombres y el 19,3% mujeres (941 casos positivos), mientras que en el 6,4% de las ocasiones (313 casos positivos) no se obtuvo este dato.

En 4.816 aislados positivos se dispuso de la edad de los pacientes con infección por *Neisseria gonorrhoeae*, constatándose los siguientes datos en relación al sexo (Tabla 18).

Sexo	Edad Media	SD	Rango	N
Hombres	31,2	10,1	0 - 84	3583
Mujeres	31,9	13,1	0 - 86	932
No consta	31,8	10,2	0 - 68	301
TOTAL	31,4	10,8	0 - 86	4816

Tabla 18. Edad media, desviación estándar (SD), rango de edades y total de pacientes analizados en función del sexo, así como en conjunto.

La edad media global de los pacientes con aislados positivos fue de 31,4 años ($\pm 10,8$ años) con un rango de edades comprendidas entre los 0 y los 86 años.

Aunque dicha edad promedio fue muy similar en todos los grupos analizados, resultó ligeramente superior en mujeres (31,9 años) respecto a la de los hombres (31,2 años).

En referencia a las muestras analizadas, se estudiaron más de 10 tipos distintos de especímenes con resultado positivo para *N. gonorrhoeae*. La proporción de cada una de ellas se resume en la Figura 64.

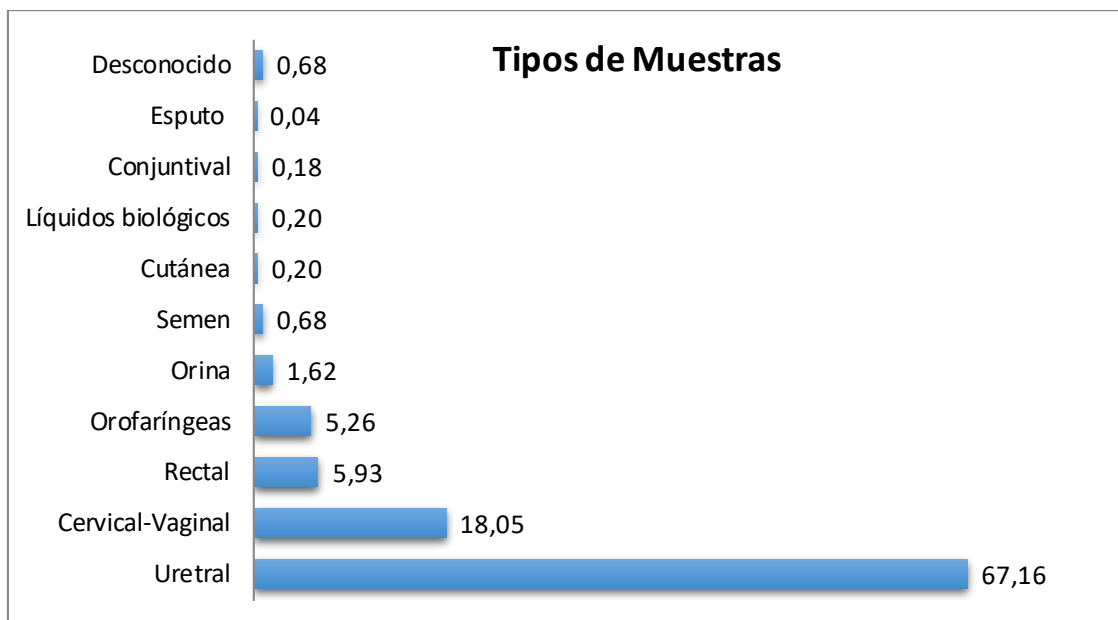


Figura 64. Tipos de muestras y porcentaje de las mismas con resultado positivo para *N. gonorrhoeae*.

La muestra más habitual fue la uretral (67,2%) seguida de la cervical-vaginal (18%). También resultaron positivas muestras rectales (5,9%), procedentes de la orofaringe (5,3%), de orina (1,6%) y de semen (0,7%), cutáneas (0,2%), diversos líquidos biológicos (0,2%) y conjuntivales entre otras.

4.6.3. Pruebas diagnósticas, evolución de resultados positivos e incidencia de la gonorrea en la Comunidad Valenciana

Las técnicas empleadas para la identificación de pacientes con gonorrea se englobaron en dos grandes grupos: el cultivo tradicional, y la detección del material genético del microorganismo, bien mediante PCR tradicional o empleando la variante *Real Time* PCR (RT-PCR).

En la Figura 65 se representa el número total de resultados positivos obtenidos mediante estas técnicas por cada año de estudio.

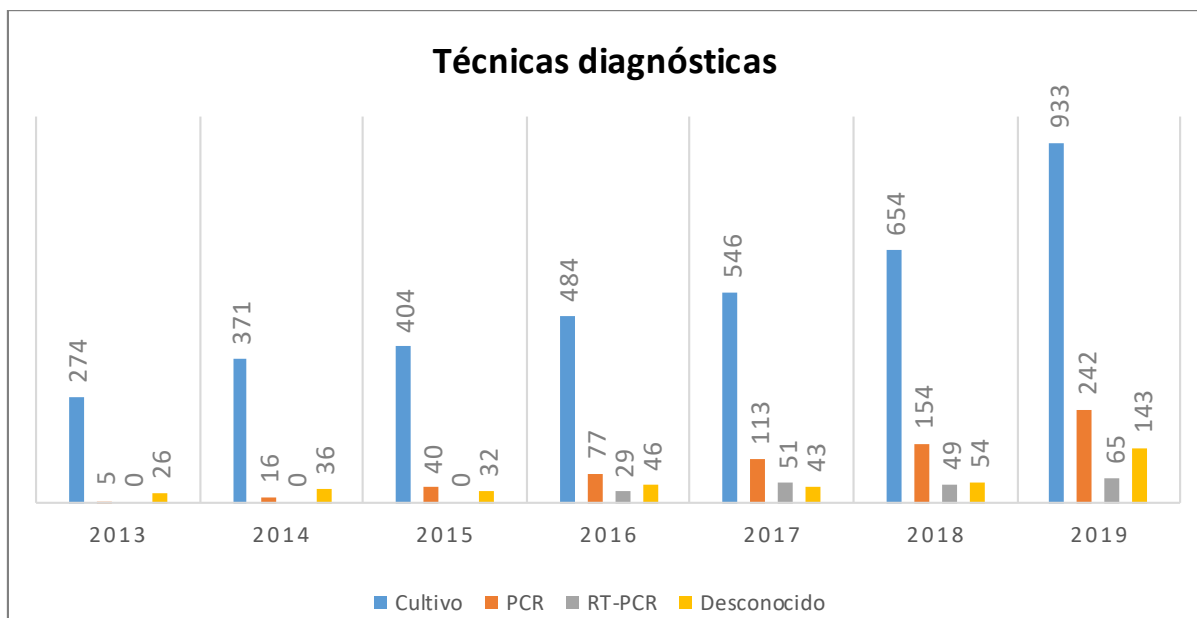


Figura 65. Casos positivos y pruebas diagnósticas utilizadas durante los años 2013 - 2019.

En primer lugar, se observa que el cultivo constituye la prueba más utilizada con este fin durante todos los años de estudio, identificando durante el periodo 2013 – 2019 en conjunto 3.666 casos de gonorrea (75% del total) mediante este método.

Cabe señalar que, en el año 2019, en 619 casos con resultado positivo (44,8% del total anual) los datos analizados registraron, para un mismo paciente y en la misma fecha, un resultado positivo mediante la técnica de cultivo y de PCR. En el año 2018 esto sucedió en 410 casos, suponiendo un porcentaje similar al anterior (45% del total).

Por otro lado, las técnicas moleculares basadas en la detección del material genético del gonococo experimentaron un notable aumento. En el año 2013 tan solo se diagnosticaron 5 casos mediante PCR, sin embargo en el año 2019 se obtuvieron 242 casos positivos de gonorrea. Utilizando la técnica PCR, se identificó durante todo el periodo de estudio un total de 647 casos (13,2% del total). Por su parte, la RT-PCR comenzó a utilizarse con posterioridad a partir del 2016, detectándose 29 casos este mismo año y 194 casos (4% del total) durante todo el estudio.

Finalmente, se detectaron otros 380 casos (7,8% del total) durante dicho periodo mediante técnicas moleculares en las que se desconoció el método concreto utilizado.

En la Figura 66 se desglosa, por año de estudio, el total de 4.887 casos de infección gonocócica detectados en el periodo 2013 - 2019. La tendencia de la línea ascendente trazada refleja el incremento constante de los mismos en la Comunidad Valenciana durante cada uno de los años de estudio anteriormente citados.

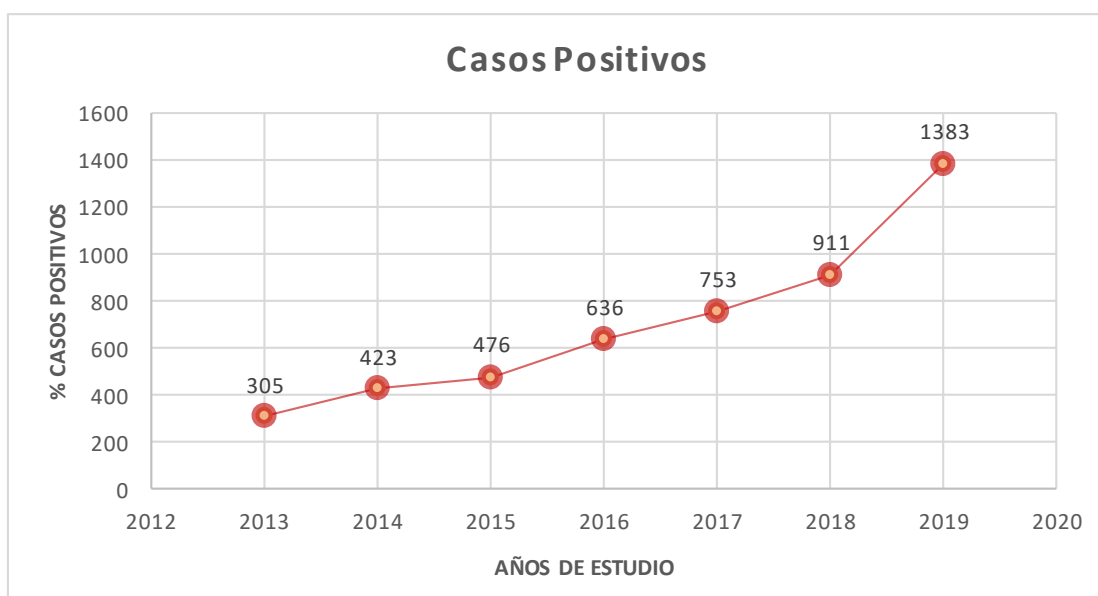


Figura 66. Evolución de los casos positivos de gonorrea detectados en la Comunidad Valenciana.

Así pues, se obtuvieron 305 casos positivos (6,2% del total) durante el año 2013, 423 casos (8,6%) en el 2014, 476 casos (9,7%) en el año 2015, 636 infecciones (13%) en el 2016, 753 nuevos casos (15,4%) en el 2017, 911 resultados positivos (18,6%) en el 2018 y 1.383 nuevos casos (28,3%) durante el pasado año 2019.

Atendiendo al número de resultados positivos así como a la población censada en la Comunidad Valenciana, se obtuvo la incidencia de la infección gonocócica expresada como tasa de pacientes infectados por cada 100.000 habitantes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19 y Figura 67.

Año	Positivos	Población	Incidencia estimada
2013	305	5.113.815	5,96
2014	423	5.004.844	8,45
2015	476	4.980.689	9,56
2016	636	4.959.968	12,82
2017	753	4.941.509	15,24
2018	911	4.963.703	18,35
2019	1.383	5.003.769	27,64

Tabla 19. Número de casos positivos, población y tasa de incidencia estimada por cada 100.000 habitantes y por año de estudio en el conjunto de la Comunidad Valenciana.

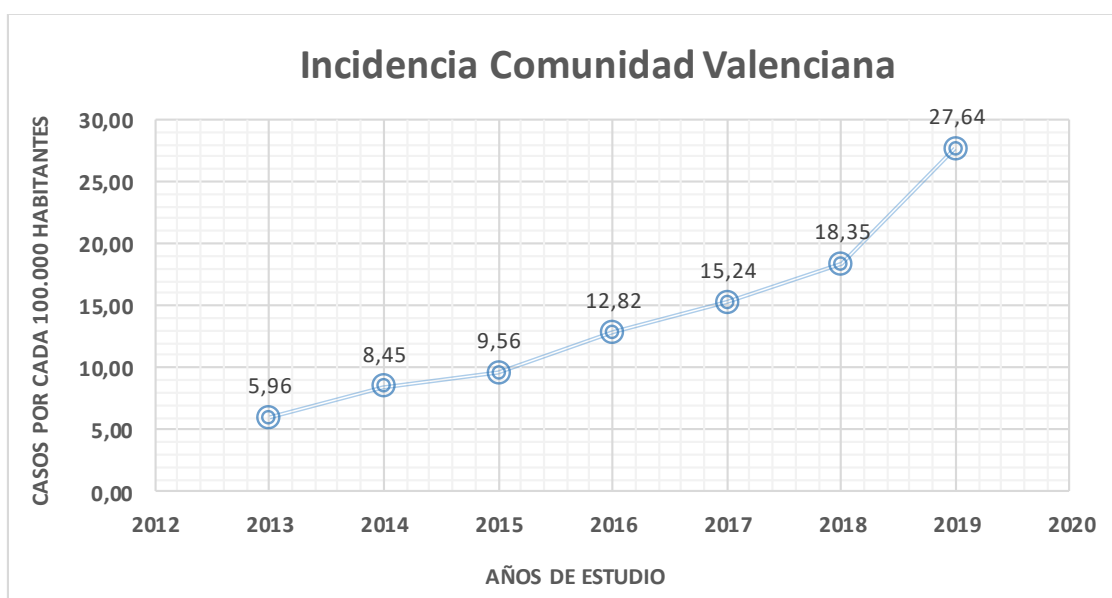


Figura 67. Evolución de la incidencia de la infección gonocócica en la Comunidad Valenciana durante el periodo 2013 – 2019.

Dicha tasa de incidencia ha seguido una tendencia ascendente paralela al aumento de los casos de gonorrea detectados durante los 7 años analizados. Así pues, la tasa en el año 2013 fue de 5,96 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que en el año 2019 esta cifra ascendió a 27,64 casos por cada 100.000 habitantes. El mayor incremento se observó en el último año de estudio.

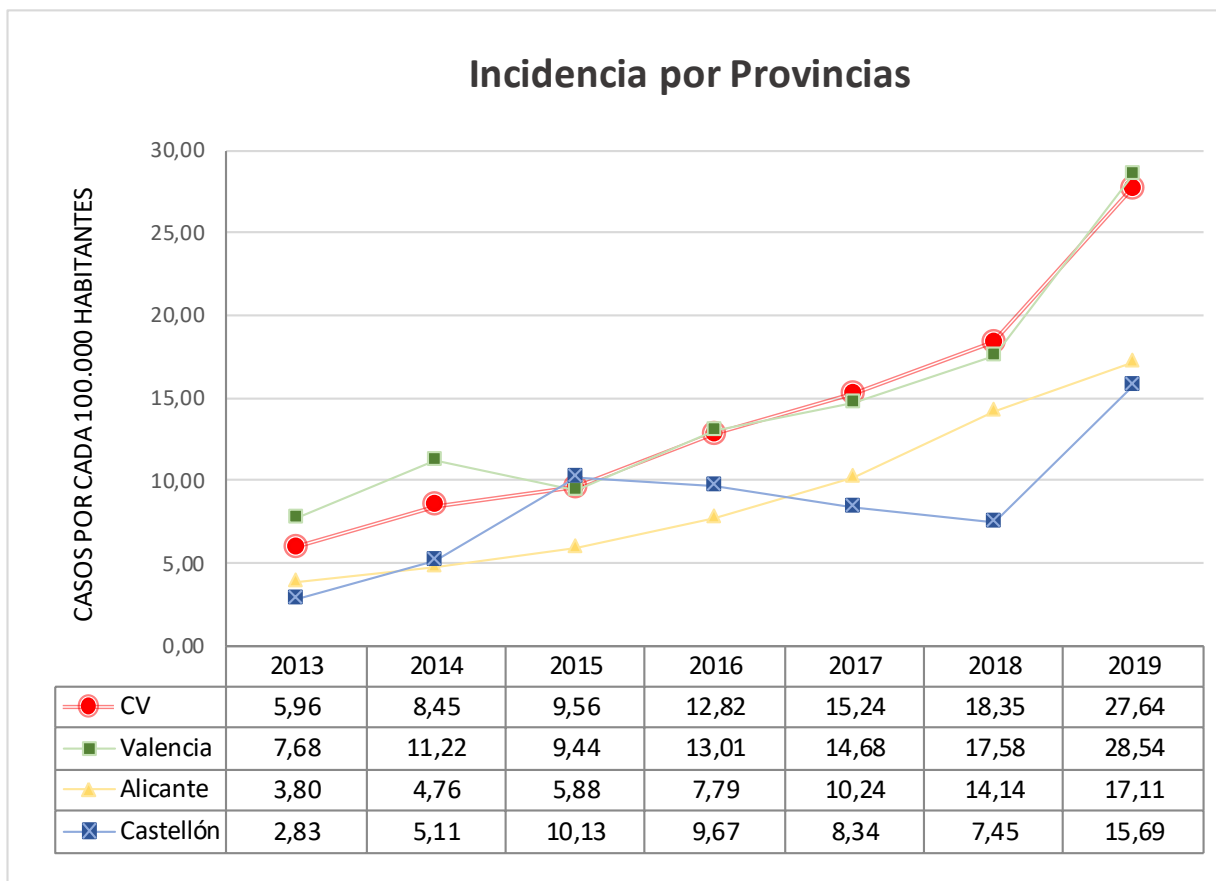


Figura 68. Evolución de la incidencia de la infección gonocócica desglosada por provincias durante el periodo 2013 – 2019. De color rojo se muestran el conjunto de datos obtenidos en la Comunidad Valenciana (CV).

Al analizar la incidencia de gonorrea por provincias durante todo el periodo de estudio se observó en las 3 provincias una clara tendencia creciente. En todas ellas, el incremento más notable se produjo en el año 2019.

La provincia de Valencia fue la que presentó una mayor tasa de infección por cada 100.000 habitantes, con un perfil muy similar al obtenido en el conjunto de la Comunidad Valenciana.

La provincia de Alicante mostró una incidencia menor, aunque con un perfil ascendente y unos resultados que incrementaron cada año de estudio.

La provincia de Castellón exhibió un patrón distinto al resto, con un incremento de la incidencia hasta el año 2015, una estabilización e incluso disminución durante los siguientes cuatro años, y un repunte en el año 2019 igual al ocurrido en los casos anteriores.

4.6.4. Sensibilidad antibiótica

La evolución en la susceptibilidad de los antimicrobianos estudiados se describe a continuación.

4.6.4.1. Azitromicina

Se analizó el periodo 2014 – 2019 debido a la falta de datos del año 2013. Tras el análisis de 1.268 muestras testadas frente a este macrólido, se encontraron un total de 121 cepas con una CMI superior a 1 mg/L. Este dato supone una resistencia media a azitromicina durante todo el periodo de estudio del 9,5%.

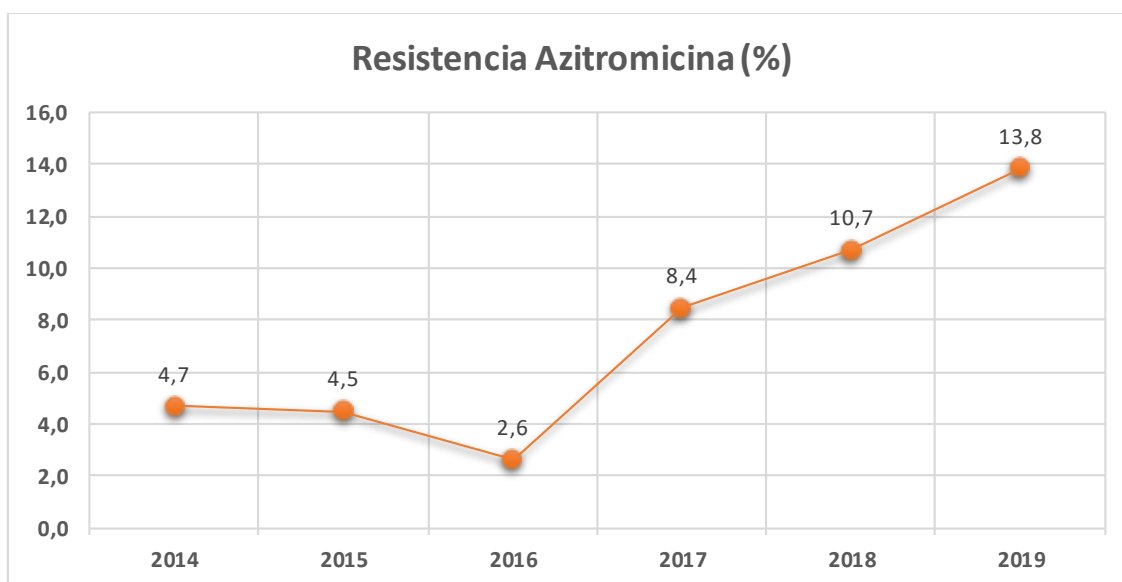


Figura 69. Evolución de la resistencia a azitromicina durante los años 2014 – 2019.

Al analizar la variación de los aislados resistentes por año (Figura 69) se observa en el transcurso de los años 2014 – 2016 que la tasa de resistencia se mantuvo relativamente estable. No obstante, a partir de este momento y durante el periodo 2017 – 2019, se detecta un claro aumento de las cepas resistentes a dicho agente y clasificadas por tanto como *non-wild-type*.

Se estudiaron 10 cepas de gonococo con alta resistencia a azitromicina (CMI ≥ 256 mg/L) obtenidas durante los años 2016 (2 aislados), 2017 (2 aislados), 2018 (1 aislado) y 2019 (5 aislados), provenientes todas ellas de pacientes varones.

Respecto al origen de estas muestras, 8 fueron uretrales, 1 faríngea y 1 anal. El 80% de estas cepas se obtuvo en la provincia de Valencia y el 20% restante en la provincia de Alicante.

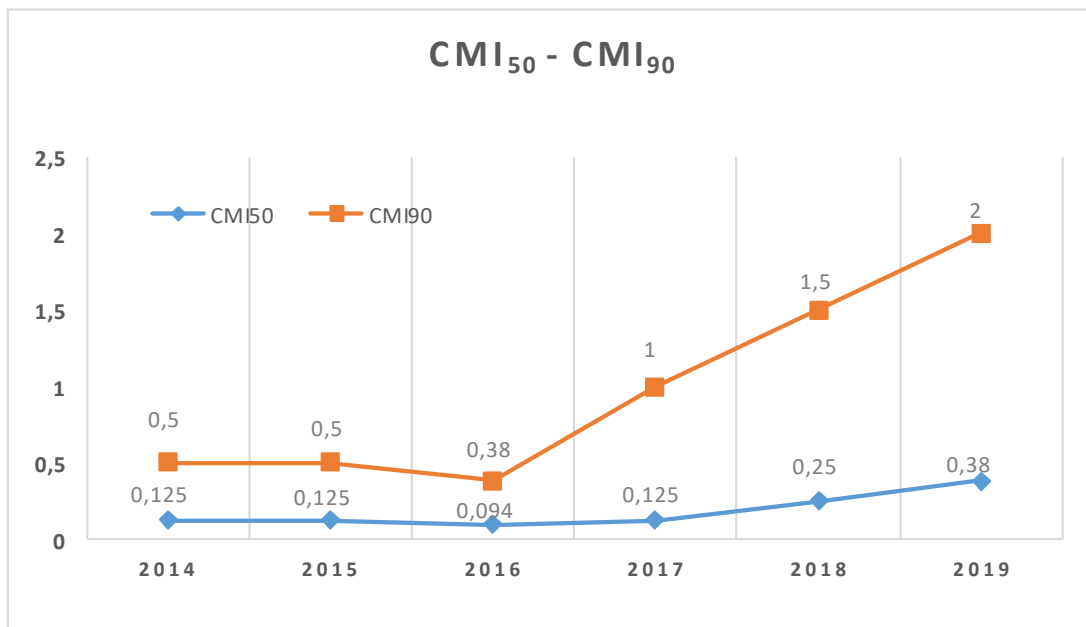


Figura 70. Evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ (mg/L) de azitromicina durante los años 2014 – 2019.

Durante los años 2014 – 2016 tanto la CMI₅₀ como la CMI₉₀ de azitromicina se mantuvieron estables. No obstante, a partir del año 2017 se aprecia un alarmante incremento de ambas resultando, a nivel global durante los siete años de estudio, en una CMI₅₀ de 0,25 mg/L y una CMI₉₀ de 1,5 mg/L.

4.6.4.2. Cefixima

En este caso, se analizó la susceptibilidad de cefixima frente a 988 muestras recogidas durante el periodo 2015 - 2019, obteniéndose los siguientes porcentajes de resistencia durante dichos años de estudio (Figura 71).

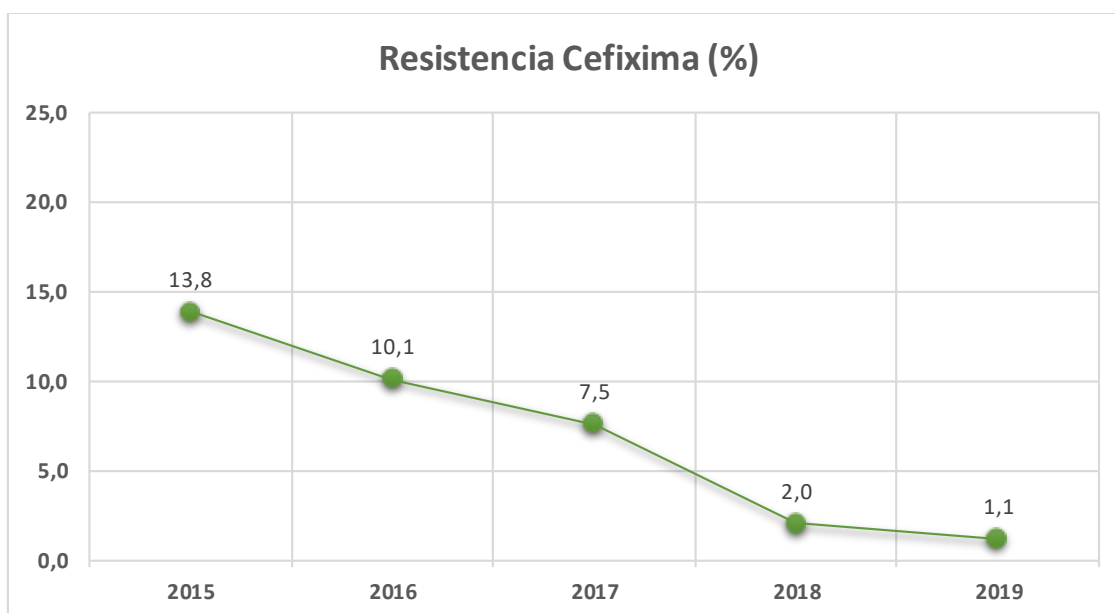


Figura 71. Evolución de la resistencia a cefixima durante los años 2015 – 2019.

Durante este periodo, se encontraron en total 51 aislados resistentes a dicha C3G oral, estableciéndose un porcentaje de resistencia promedio del 5,2%.

Desde el año 2015, en el que se detectaron las mayores tasas de resistencia a esta C3G oral, se ha constatado una disminución progresiva de las cepas de gonococo resistentes a cefixima.

Así pues, en el año 2015 se detectaron 13 cepas (13,8%) con una CMI superior a 0,125 mg/L sobre un total de 94 muestras con resultados frente a esta cefalosporina. Sin embargo, durante el pasado año 2019 tan solo se observaron 4 cepas resistentes (1,1%) de 356 muestras analizadas.

Se identificaron 3 aislados con alta resistencia a la cefixima (CMI ≥ 2 mg/L). El primero de ellos presentó una CMI de 2 mg/L y también fue resistente a ceftriaxona. Los dos restantes exhibieron un valor de CMI de 4 mg/L, fueron recogidos en varones mediante toma uretral y resultaron resistentes a ceftriaxona, tetraciclina y ciprofloxacino.

Uno de ellos, obtenido en el año 2019, resultó ser resistente simultáneamente a dicha C3G y a azitromicina, mostrando en adición alta resistencia a la misma (CMI >256 mg/L).

La evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ encontradas en estos años se muestran en la siguiente Figura 72.

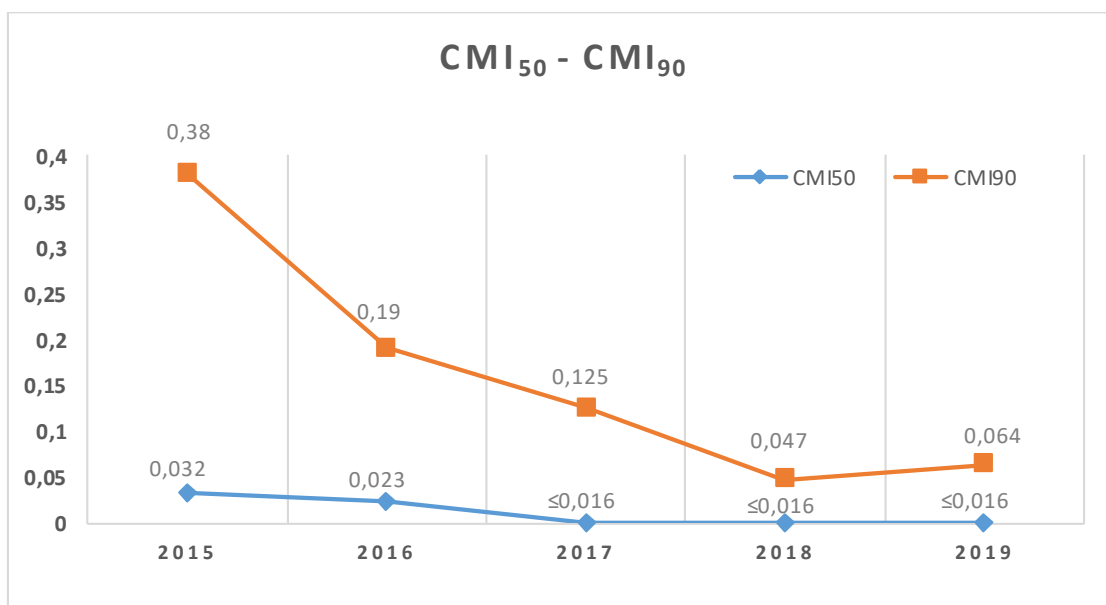


Figura 72. Evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ (mg/L) de cefixima durante los años 2015 – 2019.

Como se puede apreciar, la CMI₅₀ y especialmente la CMI₉₀ experimentaron una notable reducción desde el año 2015. La CMI₅₀ permaneció estable en valores mínimos desde el año 2017 ($\leq 0,016$ mg/L).

En conjunto, en valor de CMI₅₀ promedio durante todo el periodo fue de $\leq 0,016$ mg/L y el valor de CMI₉₀ fue de 0,125 mg/L.

4.6.4.3. Ceftriaxona

Los datos de resistencia registrados para ceftriaxona durante los años 2015 – 2019 tras el análisis de 1.465 resultados se muestran a continuación (Figura 73).

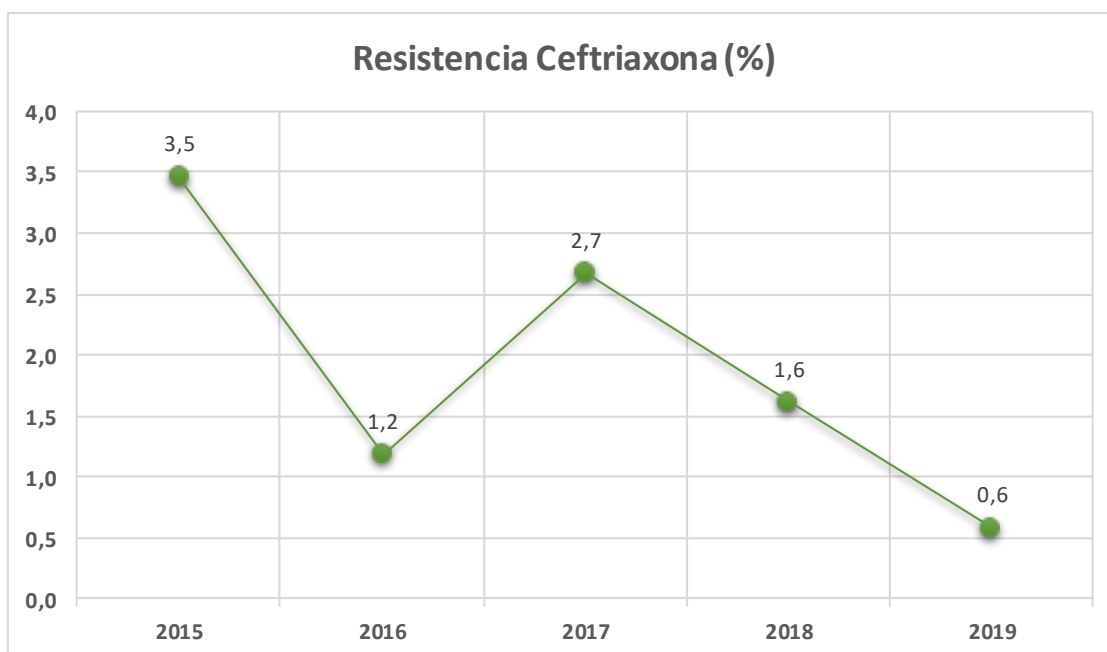


Figura 73. Evolución de la resistencia a ceftriaxona durante los años 2015 – 2019.

En el caso de esta C3G, la tasa de resistencia experimentó una reducción continua desde el año 2015, con un porcentaje de resistencia del 3,5% (6 cepas resistentes de 173 analizadas) hasta el año 2019 con una tasa de resistencia del 0,6% (3 cepas resistentes de 508 analizadas), presentando un pequeño repunte en el año 2017 (2,7%). En conjunto, se encontraron 23 cepas resistentes a ceftriaxona que resultaron en una tasa de resistencia media global del 1,6%.

Se identificaron 2 cepas con alta resistencia a la ceftriaxona (CMI ≥ 2 mg/L). La primera se aisló en una muestra uretral tomada el año 2015, la cual fue resistente también a cefixima (CMI 0,25 mg/L), tetraciclina (CMI 3 mg/L) y ciprofloxacino (CMI 32 mg/L). El segundo caso se aisló en una muestra orofaríngea en el año 2017 y presentó una CMI de 3 mg/L.

Por otro lado, el 14,2% de las cepas estudiadas (208 aislados) presentaron sensibilidad disminuida (CMI $>0,032$ y $\leq 0,125$ mg/L) a dicha cefalosporina.

La evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ encontradas para la ceftriaxona durante estos años se muestra a continuación en la Figura 74.

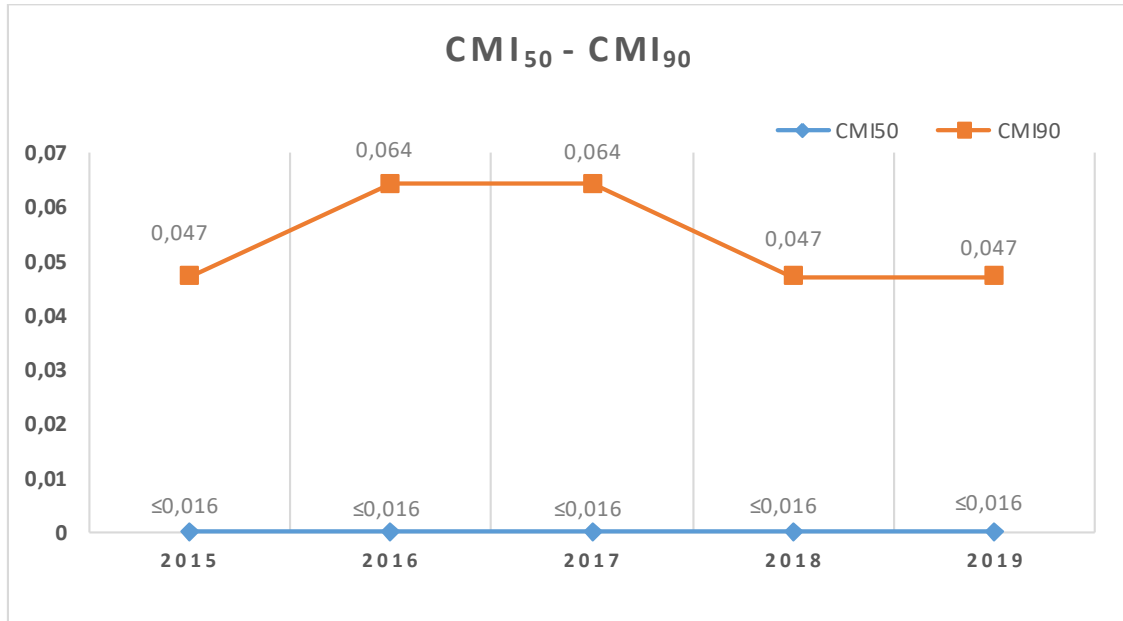


Figura 74. Evolución de la CMI₅₀ y CMI₉₀ (mg/L) de ceftriaxona durante los años 2015 – 2019.

La CMI₅₀ ($\leq 0,016$ mg/L) permaneció estable durante el análisis, y la CMI₉₀ experimentó un ligero repunte durante los años 2016 y 2017. En cómputo global y durante este periodo 2015 - 2019, la CMI₅₀ fue $\leq 0,016$ mg/L y la CMI₉₀ media resultó en 0,047 mg/L.

4.6.4.4. Ciprofloxacino

Tras el análisis de 1.415 resultados frente a ciprofloxacino, en la Figura 75 se muestran las tasas de resistencia registradas a esta quinolona durante los siete años de estudio.

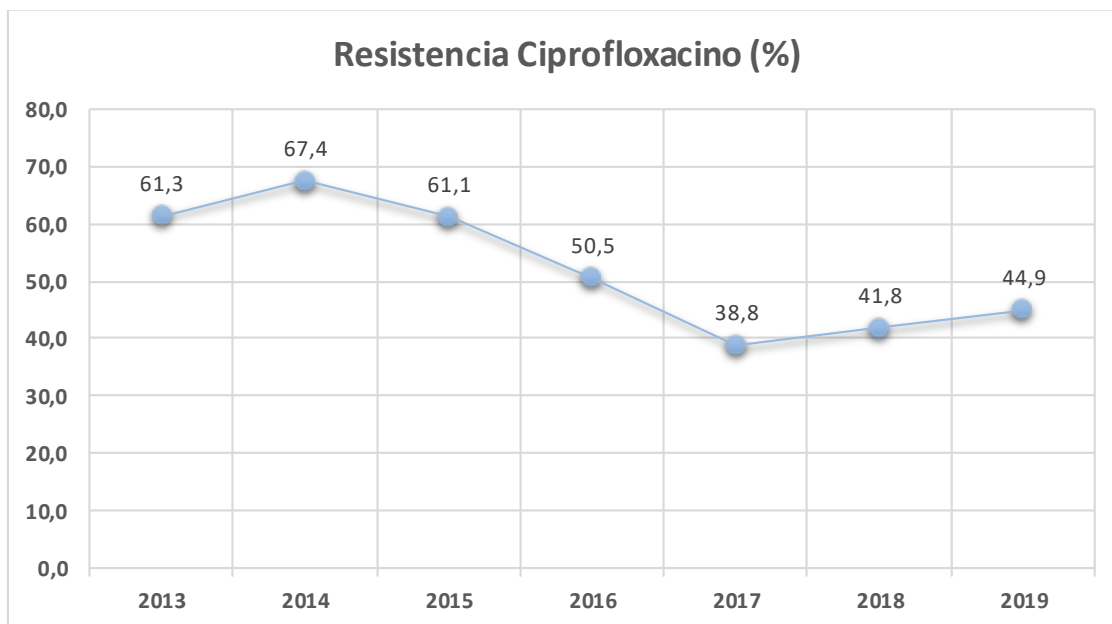


Figura 75. Evolución de la resistencia a ciprofloxacino durante los años 2013 – 2019.

Como puede observarse, la tasa de resistencia a ciprofloxacino se ha mantenido relativamente estable. Este porcentaje resultó superior al 50% de las cepas analizadas durante el periodo 2013 – 2016, momento a partir del cual se produjo una disminución de las mismas suponiendo una tasa de resistencia menor durante los años 2017 – 2019.

En este periodo de tiempo se encontraron un total de 699 cepas con una CMI superior a 0,06 mg/L frente a ciprofloxacino, dato que supuso una tasa media de resistencia a dicha quinolona del 49,4%.

4.6.4.5. Espectinomicina

Todas las cepas fueron sensibles a dicho aminoglicósido. En la Figura 76, se representa las diferentes CMI obtenidas frente a dicho agente.

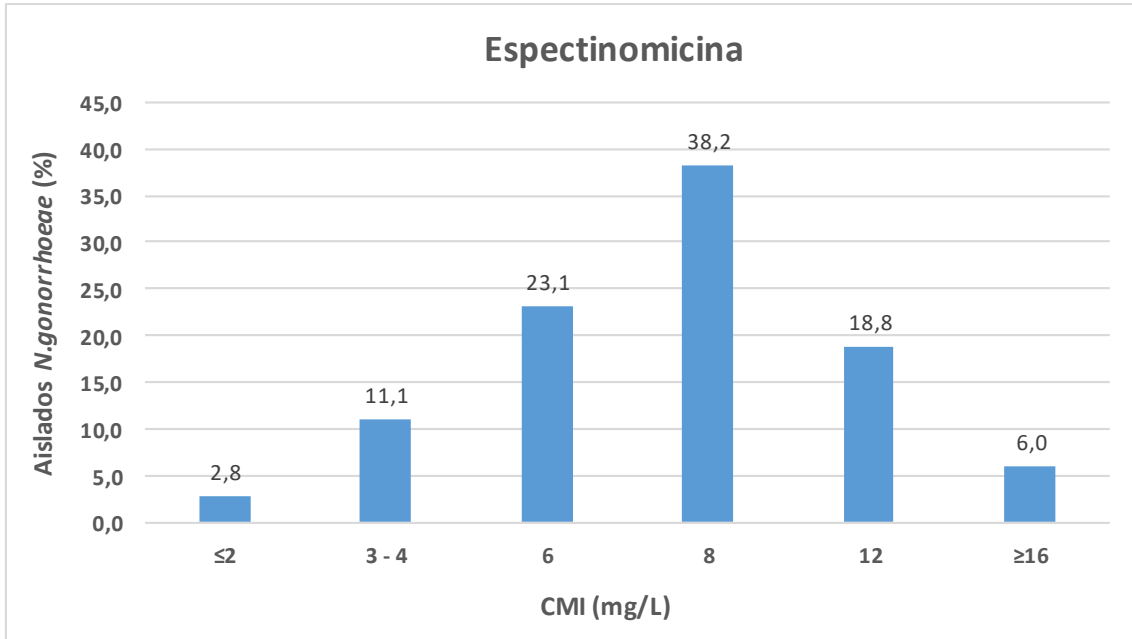


Figura 76. Distribución de las CMI obtenidas en 398 cepas de gonococo frente a espectinomicina.

En 152 aislados se obtuvo una CMI de 8 mg/L (38,2%), constituyendo esta la concentración mínima inhibitoria más frecuentemente observada.

No se detectó ninguna cepa resistente a espectinomicina (CMI >64 mg/L), siendo la CMI más elevada identificada de 24 mg/L y obtenida en 3 aislados (0,75%).

4.6.4.6. Tetraciclina

A continuación, en la Figura 77 se muestra la resistencia observada a tetraciclina sobre 714 cepas.

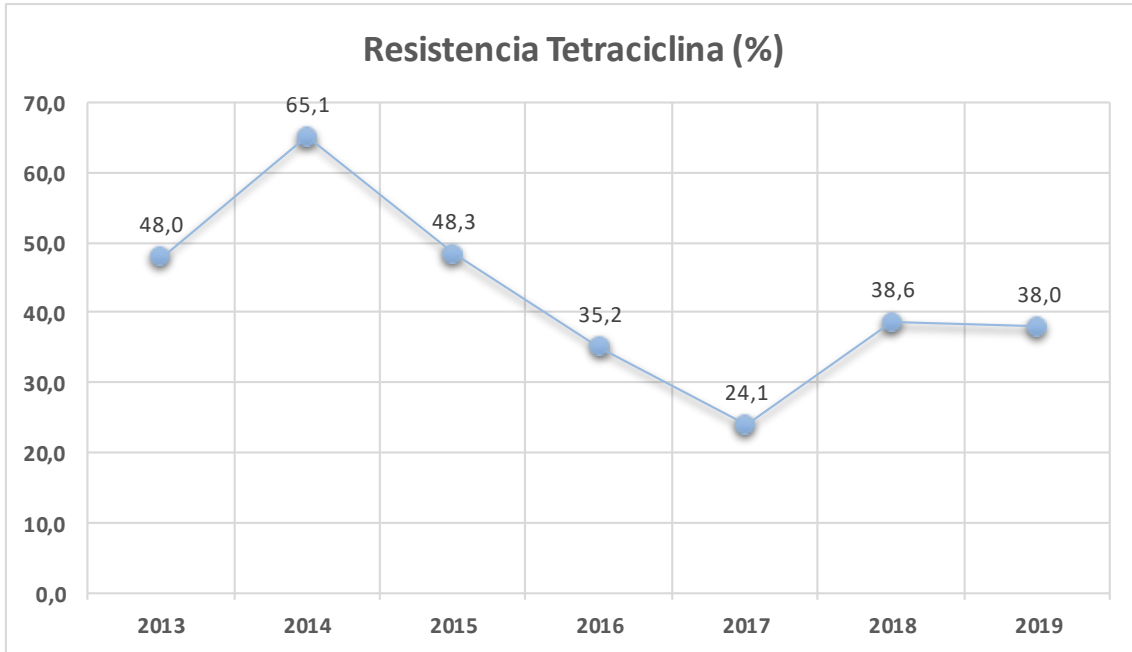


Figura 77. Evolución de la resistencia a tetraciclina durante los años 2013 – 2019.

Como se puede observar, y de forma similar a lo ocurrido en el caso del ciprofloxacino, los niveles de resistencia a tetraciclina fueron superiores durante el periodo 2013 – 2015, produciéndose un pico en el año 2014. Por el contrario, en los años posteriores este porcentaje disminuyó, manteniéndose estable y cercano al 38% durante los años 2018 y 2019.

En total, se identificaron 279 cepas resistentes lo que conllevó una tasa media de resistencia a tetraciclina del 39,1%.

4.6.4.7. Penicilina

Se analizó la susceptibilidad a dicho β -lactámico frente a 1.904 cepas, y se obtuvieron los siguientes porcentajes de resistencia durante todo el periodo de estudio (Figura 78).

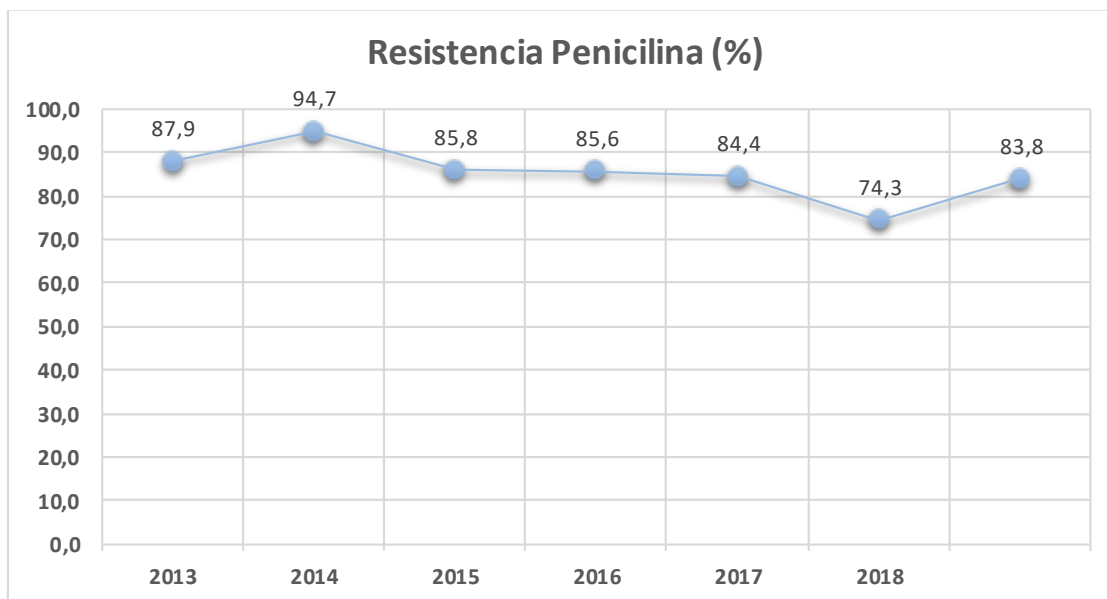


Figura 78. Evolución de las cepas resistentes e intermedias frente a penicilina durante los años 2013 – 2019.

Tal y como se observa en la Figura 78, los porcentajes de cepas clasificadas como resistentes o intermedias frente a penicilina (CMI $>0,06$ mg/L) resultaron muy elevados, cercanos al 80% y constantes durante los 7 años de estudio.

En cómputo global, se detectaron 1.600 cepas clasificadas como de sensibilidad intermedia o resistentes a este β -lactámico, porcentaje que supuso el 84% del total de aislados estudiados.

4.6.4.8. Gentamicina

Debido a que no existen puntos de corte clínico para este aminoglucósido, se realizó una clasificación de las 197 cepas de *N. gonorrhoeae* testadas frente a gentamicina atendiendo a las diferentes CMI obtenidas (Figura 79).

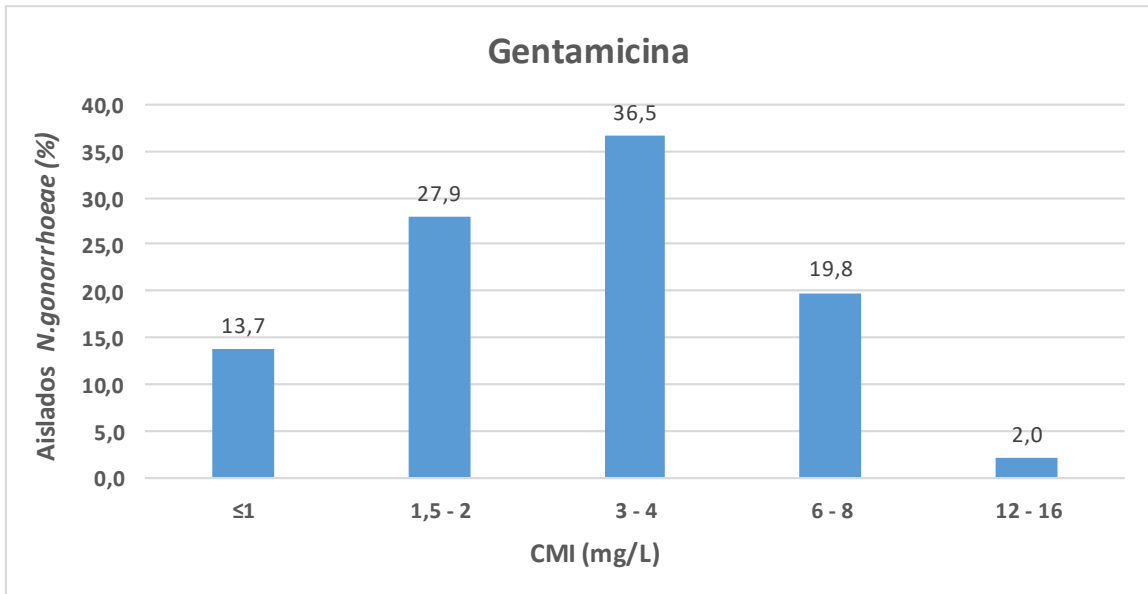


Figura 79. Distribución de las CMI obtenidas en 197 cepas de gonococo frente a gentamicina.

La CMI mayoritaria fue la comprendida entre 3 y 4 mg/L (36,5%) y la minoritaria la comprendida entre 12 y 16 mg/L (2%). No se encontró ningún aislado con CMI >16 mg/L.

4.6.4.9. Fosfomicina

De forma similar a lo ocurrido con la gentamicina, no existen *breakpoints* establecidos para fosfomicina. A continuación, se describe la distribución de CMI observadas en 170 aislados de *N. gonorrhoeae* frente a fosfomicina (Figura 80).

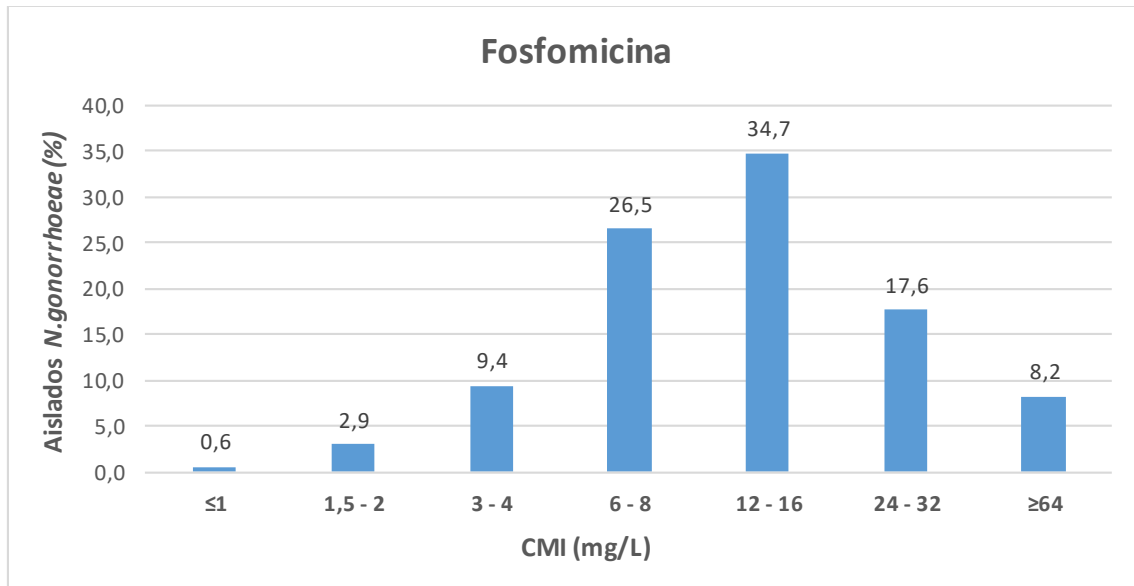


Figura 80. Distribución de las CMI obtenidas en 170 cepas de gonococo frente a fosfomicina.

Las CMI comprendidas entre 12 y 16 mg/L fueron las más frecuentemente encontradas (34,7%) en contraste con aquellas que presentaron una CMI ≤ 1 mg/L (0,6%). Se observaron 9 aislados (5,3%) con CMI > 256 mg/L.

En adición, se calculó el valor de CMI₅₀ y CMI₉₀, resultando en 12 mg/L y 32 mg/L respectivamente.

4.6.4.10. Multirresistencia

Se estudió el porcentaje de cepas resistentes a distintas combinaciones de antimicrobianos. Se analizaron dichas tasas de multirresistencia atendiendo a los puntos de corte establecidos por EUCAST.

Del total de cepas procedentes de RedMIVA, la resistencia combinada a ciprofloxacino y penicilina resultó la más frecuente. De esta manera, el 8,7% (119 cepas) de los aislados, mostraron resistencia a ambos antimicrobianos.

Al estudiar las cepas resistentes a ciprofloxacino, penicilina y tetraciclina se observó que el 5,7% (36 cepas) de los aislados resultaron resistentes a estos tres fármacos.

La tasa de resistencia simultánea a ciprofloxacino, tetraciclina y azitromicina fue del 1,4% (5 cepas).

Respecto a la resistencia a las C3G, se encontraron 2 cepas con resistencia a ciprofloxacino, penicilina, tetraciclina y cefixima, y otras 2 cepas con resistencia a ciprofloxacino, penicilina, tetraciclina y ceftriaxona.

Finalmente, se identificaron 2 cepas resistentes simultáneamente a azitromicina y cefixima, y 1 un aislado resistente a azitromicina y a ceftriaxona.

5. DISCUSIÓN

5.1. NEISSERIA GONORRHOEAE, UNA SUPERBACTERIA EN CONSTANTE TRANSFORMACIÓN

El agente causal de la gonorrea, en su continua evolución, se ha convertido en una superbacteria insensible a todos los antibióticos utilizados a lo largo de la historia que, a día de hoy, sigue progresando para mostrar resistencia al último régimen establecido para su tratamiento. La infección gonocócica es un problema de salud pública cada vez más preocupante, por su alarmante incremento en las dos últimas décadas y por las causas que subyacen a ese aumento.

La extraordinaria capacidad innata del gonococo para desarrollar y conservar mecanismos de resistencia antibiótica, explicada por el propio proceso natural de supervivencia, ha sido acelerada por el consumo exagerado e inadecuado de antibióticos tanto en seres humanos como en animales destinados a la ganadería. En este último caso, los antimicrobianos usados a dosis bajas y constantes tienen por objetivo que el ganado pueda resistir las duras condiciones de vida a las que es sometido, promocionando en este entorno su crecimiento. Esta presión antibiótica mantenida conlleva un aumento de las bacterias multirresistentes presentes en estos animales que, posteriormente, son transmitidas a humanos (146)(147).

En la medicina actual, procedimientos habituales como son las operaciones invasivas, la administración de tratamientos antineoplásicos o el trasplante de órganos no podrían llevarse a cabo sin la ayuda de los agentes antimicrobianos. El incontrolable aumento de las resistencias antibióticas lleva asociado un incremento de los fracasos terapéuticos acontecidos en multitud de ámbitos médicos. El *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) estipuló que la disminución de la susceptibilidad bacteriana a los regímenes actuales causó, tan solo en el año 2018, aproximadamente 33.000 muertes en países de la Unión Europea (148), cifra que aumenta hasta las 700.000 a nivel mundial. Mirando al futuro, la OMS pronostica 10 millones de fallecimientos anuales en el año 2050 relacionados con el aumento de las bacterias superresistentes (149). Este dato supone más muertes de las que actualmente se producen por enfermedades como el cáncer.

El desarrollo de fármacos antibióticos, sin embargo, se ha ralentizado en contraste al ritmo cada vez mayor de generación de resistencias bacterianas. Desde el año 2017, apenas 8 nuevas moléculas han sido aprobadas con este fin y, la inmensa mayoría, no presentan grandes ventajas clínicas respecto a los fármacos ya disponibles. El enorme coste económico, tiempo y recursos que ello conlleva y la poca rentabilidad financiera que supone para las empresas farmacéuticas el desarrollo de estos agentes usados durante cortos periodos de tiempo, ha propiciado cambios en algunos gobiernos y en los modelos que rigen este mercado, proporcionando mayores beneficios para aquellas empresas que apuesten por el desarrollo de los mismos (150).

Las razones anteriormente citadas junto con la falta de programas de vigilancia antibiótica y la lenta actualización de los regímenes empíricos utilizados en distintas localizaciones geográficas, nos acercan a una era postantibiótica en la que se producirá inexorablemente un agravamiento del problema actual. En el caso concreto de la gonorrea, y como se discutirá a continuación, corremos el serio peligro de que finalmente se convierta en una enfermedad intratable.

En este sentido, el arsenal terapéutico del que disponemos para el tratamiento de la infección gonocócica es cada vez más limitado, amenazando los tratamientos actualmente establecidos y exigiendo un esfuerzo constante en la búsqueda de nuevos agentes y combinaciones eficaces contra el gonococo. Actualmente, tan solo 3 nuevos antibióticos se encuentran en diferentes fases de estudio como posibles fármacos útiles frente a este patógeno (150).

Así mismo, *Neisseria gonorrhoeae* posee un papel coadyuvante en la transmisión de otras enfermedades, como es el caso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (151)(152). Tras la aparición de la epidemia del VIH en los años 90, la implantación de medidas preventivas eficaces propició una disminución en el número de casos confirmados. En los últimos años, sin embargo, estamos asistiendo de nuevo a un aumento de estas infecciones probablemente debido a una relajación de dichas medidas (153). La mejora de la esperanza de vida, la disminución de pacientes con deterioro físico y la normalización de la infección por VIH, han contribuido a la pérdida del miedo en las relaciones sexuales sin protección.

Nuevos casos de infección urogenital y anorectal ocasionados por *Neisseria meningitidis* y transmitidos por vía sexual se están relacionando con posteriores infecciones diseminadas causadas por cepas altamente virulentas en hombres que practican sexo con hombres (HSH) (154). La similitud entre el meningococo y el gonococo hace posible que este hecho pueda acentuarse en un futuro.

Por otro lado, la incidencia de la gonorrea continúa en aumento. Según datos informados por el ECDC, en el año 2017 se confirmaron 89.239 casos nuevos de infección por *Neisseria gonorrhoeae* en Europa (66). Este dato supone un incremento superior al 50% en contraste con los 47.387 casos declarados en su mismo informe del año 2012. En España, Según la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y el Instituto Carlos III, los casos de gonococia desde el año 2001 hasta la actualidad se han multiplicado por diez (69).

Recientes estudios informan de que las infecciones por las cepas más resistentes de gonococo se asocian a varones heterosexuales, de edad avanzada, con ITS recurrentes y comportamientos sexuales de riesgo, estos últimos probablemente como indicadores de tratamientos antimicrobianos previos que podrían haber generado el desarrollo de resistencias (155). El uso recreativo de drogas como γ -hidroxibutirato, γ -butirolactona, mefedrona o metanfetaminas entre otras durante el coito, fenómeno conocido como “chemsex”, constituyen prácticas sexuales de alto riesgo que facilitan peligrosamente la diseminación de las ITS. La profilaxis farmacológica preexposición para el VIH ha disminuido la transmisión de dicho virus, pero también la percepción del riesgo de contagio con otras ITS al abandonar el uso del preservativo. Todos estos hechos refuerzan, aún más si cabe, la necesidad de tratar las enfermedades infecciosas en general, y la infección gonocócica en particular, de una forma temprana y correcta.

La OMS considera que un tratamiento empírico adecuado ha de ser eficaz en, al menos, el 95% de las infecciones causadas por un determinado microorganismo (156)(157). No obstante, la dificultad para conseguir dicha tasa de curación en el caso de la infección originada por *Neisseria gonorrhoeae* conllevó que instituciones como el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de los Estados Unidos estableciese en

el año 2007 un porcentaje de éxito mínimo del 90% en aquellos regímenes alternativos para el tratamiento de la gonorrea (158).

Por todo ello y con el objetivo de mantener actualizadas las guías de tratamiento y detectar de forma temprana la aparición de cepas multirresistentes, es imprescindible monitorizar de forma constante la sensibilidad antibiótica del gonococo a nivel local, nacional e internacional. Para lograr esta meta, el primer paso es conseguir realizar un adecuado diagnóstico de la infección gonocócica (13)(59).

El problema radica en el hecho de que la infección causada por *N. gonorrhoeae* puede cursar asintomática en algunas personas, circunstancia que favorece su diseminación. Además, en aquellos pacientes con síntomas, estos pueden resultar de carácter inespecífico pasando en ocasiones desapercibidos. Por consiguiente, el papel del laboratorio es crucial en la confirmación del diagnóstico, investigación de los contactos relacionados y obtención de resultados que permitan establecer el tratamiento más adecuado de forma particular en cada caso.

Dicho diagnóstico debe ser llevado a cabo mediante la detección del gonococo o de su material genético en muestras genitales o extragenitales. La observación directa del microorganismo es posible a través de su examinación bajo el microscopio o de la siembra en los medios de cultivo adecuados. Por otro lado, el descubrimiento de su presencia a partir de la identificación del material genético se realiza mediante técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos (TAAN).

En el primer caso, el agente causal de la gonorrea puede ser reconocido tras la observación de diplococos Gram negativos generalmente presentes en el interior de leucocitos polimorfonucleares. Dicho método es barato, proporciona resultados rápidos y es una técnica con alta sensibilidad y especificidad cuando se lleva a cabo en muestras de pacientes varones sintomáticos que presenten descarga uretral. Sin embargo, los métodos microscópicos no están recomendados como método único en el diagnóstico de la gonorrea cervical, faríngea o rectal. Tampoco en aquellos pacientes con sospecha de gonorrea pero que no presenten síntomas, puesto que la sensibilidad es baja y la ausencia del patógeno en la muestra estudiada no excluye la infección. En

adición, y como ocurre con las técnicas microscópicas, el resultado obtenido puede variar en función de la experiencia del observador. Dicho método no permite obtener información acerca de la susceptibilidad antibiótica del aislado.

La siembra o cultivo del gonococo constituye el *gold standard* tradicionalmente utilizado. Esta técnica ofrece una elevada sensibilidad y especificidad, permitiendo realizar el diagnóstico definitivo mediante el aislamiento y la identificación del microorganismo a un bajo coste. Cabe resaltar que es el único método que posibilita el desarrollo del estudio completo de sensibilidad antibiótica. Es adecuado para muestras endocervicales, uretrales, rectales, faríngeas y conjuntivales. Además, es la técnica recomendada en el caso de infección persistente o sospecha de fracaso terapéutico. Por contra, se trata de un proceso relativamente lento y, para obtener valores de sensibilidad y especificidad elevados, es requisito *sine qua non* optimizar las condiciones de toma de muestra, transporte y almacenamiento de la misma. Este hecho radica en la extrema labilidad del gonococo frente a ciertas condiciones ambientales. La metodología de obtención y conservación de la muestra junto con su siembra en los medios adecuados son, por tanto, decisivas.

En la actualidad, el uso de las TAAN se ha intensificado sustituyendo en algunos laboratorios a los métodos de cultivo clásicos. Presentan la ventaja de detectar gonococos que ya no son viables, por lo que las condiciones anteriormente citadas referentes a la recogida, transporte y almacenamiento de muestra no son limitantes. Además, su sensibilidad diagnóstica es superior, particularmente en infecciones de origen faríngeo o rectal. Actualmente son las técnicas recomendadas para la detección de las infecciones urogenitales en varones y mujeres con y sin síntomas, ya que se ha demostrado que son coste-eficaces. Su alta sensibilidad ha permitido el uso de muestras menos invasivas, como la orina de primera micción en varones y el frotis vaginal en mujeres (132). Asimismo, son métodos rápidos y con alta capacidad de automatización. No obstante, presentan como principal inconveniente el hecho de no permitir el estudio de sensibilidad antibiótica. Por otro lado, el tiempo adecuado para repetir el examen tras recibir el paciente tratamiento y así comprobar su curación continúa, a día de hoy, siendo indeterminado. Por este motivo, no es una técnica

aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) como test de curación, aunque se puede utilizar teniendo siempre en cuenta que existe la posibilidad de detectar DNA residual de la primoinfección (43). De esta manera, en el caso de la infección gonocócica se recomienda esperar un mínimo de dos semanas desde la finalización del tratamiento hasta la comprobación mediante TAAN (132)(14). También cabe tener en cuenta que existen múltiples ensayos comerciales que presentan desiguales porcentajes de sensibilidad y, sobre todo, de especificidad en la detección de *N. gonorrhoeae*, condicionada por las diferentes especies comensales del género *Neisseria* presentes en la faringe, recto y tracto urogenital. Dichas neisserias no patógenas poseen homología genética con *N. gonorrhoeae*, generando en ocasiones reacciones cruzadas y ocasionando, por tanto, resultados falsamente positivos. Esta especificidad subóptima de las TAAN para la detección del gonococo acarrea un inadecuado valor predictivo positivo (VPP) en poblaciones con baja prevalencia de infección gonocócica (13)(59)(60)(159)(160)(161). No obstante, cuando se utilizan las TAAN, el estudio de sensibilidad antibiótica mediante técnicas de cultivo continúa siendo imprescindible en aquellos pacientes en los que se produzca fracaso terapéutico tras la administración del régimen empírico inicial establecido.

Por otro lado, actualmente se está trabajando en nuevos dispositivos *Point of Care Testing* (POCT) de alta sensibilidad y especificidad, capaces de detectar los agentes etiológicos de las ITS bacterianas más prevalentes en pocos minutos. Estos dispositivos presentan la ventaja de no requerir personal especializado ni laboratorios de alta complejidad, por lo que pueden ser especialmente útiles ayudando a controlar la diseminación de la gonorrea en aquellos lugares con menores recursos así como en países en vías de desarrollo.

Recientemente, el *National Institutes of Health* (NIH) de los Estados Unidos ha galardonado a la empresa Visby Medical otorgándole 19 millones de dólares para el desarrollo del proyecto de innovación basado en un dispositivo POCT de un solo uso, capaz de detectar simultáneamente y con alta eficiencia la presencia de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Trichomonas vaginalis*. Este test rápido proporciona además el resultado de susceptibilidad antibiótica frente al

microorganismo detectado (162), permitiendo en este momento elegir el antimicrobiano más adecuado y tratar al paciente.

El desarrollo y aprobación definitiva de dicho dispositivo basado en tecnología PCR por parte de la FDA, supondrá un gran avance en el control de la diseminación de estas ITS tan frecuentes entre la población general, pero especialmente en aquellas áreas geográficas donde no se disponga de los medios técnicos para realizar el cultivo o las TAAN para la detección del gonococo. Dicha estrategia diagnóstica proporcionará otra medida de control de las temidas resistencias bacterianas, las cuales suponen una amenaza en la efectividad de los tratamientos actualmente disponibles.

Como conclusión, y con independencia de la técnica utilizada, sigue siendo necesario el establecimiento de puntos de corte clínicos para los diferentes agentes antimicrobianos utilizados frente al gonococo, pues solo de esta manera es posible conocer la susceptibilidad que presenta cada aislado particular. Estos *breakpoints*, además de ser imprescindibles para el tratamiento de los pacientes infectados con cepas resistentes a la pauta inicial, son necesarios para la posterior supervisión de las tasas de resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* así como su evolución en el tiempo en las diferentes áreas geográficas.

5.2. PROYECTO GONOVIG Y REDMIVA. POBLACIÓN Y PERIODO DE ESTUDIO. PROCEDENCIA, TIPOS DE MUESTRAS Y PRUEBAS DIAGNÓSTICAS UTILIZADAS. INCIDENCIA DE LA GONORREA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

Los resultados obtenidos en la presente Tesis pretenden conocer la tasa de sensibilidad antibiótica del gonococo frente a diferentes antimicrobianos, así como caracterizar molecularmente la cepas de *Neisseria gonorrhoeae* recogidas en la Comunidad Valenciana durante el proyecto GONOVig. Con este objetivo, y en el periodo de estudio comprendido entre los años 2013 - 2018, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario de La Ribera se analizaron todos los aislados de gonococo obtenidos así como los datos demográficos de los pacientes atendidos en el propio hospital y en los centros colaboradores en dicho proyecto. Finalmente, entre enero de 2013 y diciembre de 2018 se recogieron y estudiaron 230 cepas provenientes de 227 pacientes distintos. El 93,9% de dichos aislados se obtuvieron en muestras uretrales y el 6,1% en muestras cervico-vaginales.

La gonococia es una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en España, por lo que se exige su notificación en todas las comunidades a través del circuito establecido en cada territorio. En la Comunidad Valenciana, estos datos son recogidos por la Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA).

Con el propósito de obtener una fotografía más amplia de la situación actual del gonococo en esta comunidad y de forma paralela al análisis de las cepas recogidas durante el proyecto GONOVig, se correlacionaron todos los datos obtenidos de este sistema durante los años 2013 – 2019. De esta manera, y además de contrastar los resultados, se examinó la evolución de las tasas de susceptibilidad durante el año 2019, pudiendo anticipar la tendencia en los patrones de resistencia antibiótica que presenta *N. gonorrhoeae* a los diferentes antimicrobianos testados.

Tras estudiar 103.926 muestras de 75.294 pacientes distintos obtenidas de RedMIVA, se analizaron un total de 4.887 infecciones causadas por el gonococo. El

acrecentamiento de los resultados positivos fue constante durante todo el estudio, desde el año 2013 (305 casos) hasta el año 2019 (1.383 casos).

Respecto al tipo de muestra estudiada en los pacientes examinados de RedMIVA estas fueron, al igual que sucedió con las muestras del proyecto GONOVig, mayoritariamente uretrales (67,2%) y cervico-vaginales (18,2%). No obstante, también resultaron positivas muestras rectales (5,9%), faríngeas (5,2%), orinas (1,6%) y semen (0,7%), cutáneas (0,2%), líquidos biológicos (0,2%), conjuntivales (0,18%) y esputos (0,04%).

Del total de muestras positivas para *N. gonorrhoeae*, 3.666 (75%) fueron analizadas mediante técnicas de cultivo, constituyendo esta la técnica mayoritaria durante todo el estudio. Mediante métodos moleculares se identificaron 1.221 muestras (25%), de las cuales en 647 (13,2%) se utilizó la PCR, y en 194 (4%) la variante RT-PCR. En 380 casos (7,8%) no se dispuso de información específica relativa a la técnica molecular empleada.

En el año 2019, en el 44,7% de los casos diagnosticados de gonorrea presentaron, de forma paralela y en la misma fecha, resultados positivos para *N. gonorrhoeae* mediante técnicas de cultivo y PCR, dato similar al 45% observado en el año 2018. De esta manera y a la vista de estas cifras, se observa que el uso de los métodos de amplificación del DNA ha aumentado progresivamente en el diagnóstico de la infección gonocócica durante todo el periodo de estudio, porcentaje que podría ser incluso mayor en función de la técnica llevada a cabo inicialmente.

En referencia a la características demográficas de la población infectada por *Neisseria gonorrhoeae*, la edad media de los pacientes incluidos en el proyecto GONOVig fue de 30,7 años ($\pm 9,4$ años) y con un rango de edades comprendidas entre los 17 y los 79 años de edad, dato muy similar al informado en otros estudios nacionales (163)(164) y a la cifra notificada en España en el último informe anual del Centro Nacional de Epidemiología (68). La media de las edades pertenecientes a los pacientes estudiados de RedMIVA fue de 31,4 años ($\pm 10,8$ años), siendo en este caso el rango más amplio, de 0 a 86 años de edad.

En adición y con los datos obtenidos durante el proyecto GONOVig, se analizaron los diferentes grupos de edad categorizados, observando que el grupo etario más afectado fue el que comprendió edades de entre 25 – 34 años (98 aislados, 43,2% del total de cepas estudiadas). El segundo grupo más numeroso fue el que englobó edades de entre 20 – 24 años (50 aislados, 21,7% del total de cepas estudiadas).

Dichos porcentajes son concordantes con los reportados por *European Centre for Control and Prevention* (ECDC) en su último informe anual publicado en el año 2017 (66), en el que se destaca que el grupo con mayor número de casos fue el comprendido con edades entre 25 – 34 años (37%) seguido del grupo de pacientes con edades entre los 20 – 24 años (36%).

Este informe también concluye que se produjo una paulatina disminución de los pacientes con gonococia al aumentar la edad de los mismos, reduciéndose así en el grupo con edades de entre 35 – 44 años y siendo incluso menor en el de pacientes con edades iguales o superiores a 45 años, dato que también queda reflejado en nuestra experiencia (15,9% y 9,7% respectivamente). Así mismo, el grupo con menos casos de infección gonocócica fue el comprendido entre 19 – 24 años (9,2%), no encontrando en nuestro análisis ningún paciente de edad inferior.

En nuestro país, los datos informados en el año 2018 por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica registran un patrón de distribución de edades similar, siendo el grupo mayoritario el que presentó edades de entre 25 – 34 años (38,6%), seguido de aquellos pacientes con edades comprendidas entre los 35 – 44 años (22,6%) y del grupo etario de 20 - 24 años (20,2%) (68).

Respecto al sexo de los pacientes, el informe del ECDC recoge que todos los países europeos, exceptuando Estonia, muestran una mayor proporción de hombres respecto a mujeres infectadas por *Neisseria gonorrhoeae*. Así pues, y aunque no existen en este caso datos concretos para España, la relación de dicha ITS entre ambos sexos fue de media de una mujer infectada por cada 3,2 hombres infectados en el conjunto de países europeos. En el último informe llevado a cabo por RENAVE esta razón fue de 4,8.

Sin embargo, otros países europeos como Polonia y Croacia, presentaron una relación de un caso en pacientes de sexo femenino por cada 14 casos en pacientes varones. El ratio obtenido en el proyecto GONOVig fue incluso superior, encontrando una mujer infectada por cada 19 hombres.

En cuanto a la procedencia de las muestras y al tratarse de un estudio multicéntrico, estas se recibieron de 13 hospitales representativos de la Comunidad Valenciana, incluyendo el propio Hospital Universitario de La Ribera, el cual actuó como centro de referencia. De esta manera, en la provincia de Valencia participaron 7 hospitales que aportaron el 71,3% de las cepas, en la provincia de Alicante 3 hospitales que contribuyeron con el 14,3% de los aislados, y en la provincia de Castellón 3 hospitales que enviaron el 14,3% restante de cepas.

Los datos analizados de RedMIVA abarcaron todos los hospitales y municipios localizados en la Comunidad Valenciana en los que se detectaron casos de gonorrea, proviniendo las muestras de centros emplazados en la provincia de Valencia (53%), Alicante (24%) y Castellón (7%), siendo desconocida su procedencia en el 16% restante de los aislados.

Esta diversidad en el origen de las cepas estudiadas nos ha permitido conformar un retrato completo del escenario actual de las cepas circulantes en dicha comunidad, tanto para el conocimiento de la diversidad en la sensibilidad antibiótica de las cepas de gonococo aquí presentes como de la evolución de los porcentajes de resistencia a lo largo de los años de estudio.

Por último, se obtuvo la tasa de incidencia estimada en la Comunidad Valenciana, asociando los resultados positivos obtenidos a partir de la información de RedMIVA junto con los datos de población censada en la Comunidad Valenciana por año de estudio, estos últimos adquiridos del Instituto Nacional de Estadística (INE).

En nuestro análisis se advirtió un incremento considerable de la incidencia de la infección gonocócica durante los años 2013 – 2019. Así pues, esta resultó para el año 2013 de 5,96 personas cada 100.000 habitantes. La tasa obtenida para el año 2015 fue de 9,56 infecciones por cada 100.000 habitantes, cifra que continuó aumentando de

forma constante resultando de 12,82 (año 2016), 15,24 (año 2017), 18,35 (año 2018) y 27,64 (año 2019) por cada 100.000 habitantes.

Al analizar la incidencia de gonorrea por provincias durante todo el periodo de estudio se observó en las 3 provincias una clara tendencia creciente. La provincia de Valencia fue la que presentó una mayor tasa de infección por cada 100.000 habitantes, con una silueta muy similar a la obtenida en el conjunto de la Comunidad Valenciana, mientras que la provincia de Alicante mostró una incidencia menor, aunque con un perfil ascendente y unos resultados que se elevaron anualmente. La provincia de Castellón, sin embargo, exhibió un patrón distinto al resto. No obstante, en todas ellas el incremento más notable en la tasa de incidencia de la infección gonocócica se produjo durante el año 2019.

El Instituto Carlos III en su informe para la vigilancia epidemiológica de las ITS en España notificó, en el año 2015, un total de 5.170 resultados positivos (11,14 casos por cada 100.000 habitantes) y calculó una tasa de incidencia en la Comunidad Valenciana de 10,60 infecciones por cada 100.000 habitantes, constituyendo esta la cuarta comunidad autónoma con mayor incidencia de gonorrea tras Cataluña (24,28), Madrid (18,69) y Navarra (11,79) (165). En su mismo informe del año 2017 reportó 8.722 casos nuevos (18,74 casos por cada 100.000 habitantes), siendo las comunidades con mayor incidencia Cataluña (48,50), Baleares (41,79) y Madrid (28,48) (69). Estas cifras continuaron en ascenso y, en el informe referente al año 2018, se notificaron 11.044 casos nuevos de infección gonocócica (24,2 casos por cada 100.000 habitantes), registrando las tasas más elevadas en Cataluña (61,21), Baleares (40,96) y Madrid (39,73). La Comunidad Valenciana presentó en este último informe una elevada incidencia, siendo esta superior a los 18,67 casos por cada 100.000 habitantes (68).

Tanto en los datos reportados por el Ministerio de Sanidad como en los resultados obtenidos en la presente Tesis, se observa un claro aumento de la incidencia de la gonorrea en las distintas comunidades autónomas españolas, incluida nuestra comunidad. Particularmente y en referencia a la Comunidad Valenciana, el gran incremento de estas cifras, especialmente en los últimos años de estudio, puede responder a varias circunstancias.

En primer lugar, tal y como ha ocurrido desde el año 2001, ha existido un aumento de la incidencia característico y propio de la gonorrea, segunda ITS más frecuente del mundo y que ha descrito un patrón ascendente similar en diferentes zonas geográficas, el cual se ha acentuado desde el año 2013.

En segundo lugar, y atendiendo a los resultados de RedMIVA, durante los últimos años de estudio muchos casos positivos se detectaron utilizando conjuntamente técnicas moleculares y de siembra, dato que refuerza la tendencia al alza en el uso de las TAAN para el diagnóstico de la gonorrea. Cabe destacar que estas técnicas moleculares de alta sensibilidad actualmente se emplean no solo para el estudio de los casos con alta sospecha sino también en el cribado de población general y de riesgo. Esta implementación ha permitido detectar personas que anteriormente no se diagnosticaban debido a su condición de asintomáticas. Ello supone un gran avance, puesto que dichos pacientes poseen un fuerte papel diseminador del patógeno.

En tercer lugar, las técnicas multiplex consiguen codetectar al gonococo y simultáneamente a microorganismos causantes de otras ITS altamente prevalentes, como son las producidas por *Chlamydia trachomatis* o *Trichomonas vaginalis*. De este modo, en pacientes coinfectados con varios de estos patógenos, circunstancia que ocurre hasta en un tercio de población HSH que presenta alguna ITS, podemos ahora detectar ambas infecciones.

Estas particularidades en las técnicas de detección de *Neisseria gonorrhoeae* actualmente utilizadas han podido por tanto contribuir a incrementar una tasa de incidencia de gonorrea ya de por sí elevada y en continuo aumento durante las últimas dos décadas.

5.3. EVOLUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DEL GONOCOCO DESDE 1930

Como se ha comentado, el diagnóstico y tratamiento precoz de la gonococia es esencial para evitar las complicaciones y secuelas que pueden desarrollarse así como para romper la cadena de transmisión.

Sin embargo y debido a la extraordinaria capacidad de *Neisseria gonorrhoeae* para desarrollar resistencias, el tratamiento ha sufrido continuos cambios a lo largo de la historia. Tanto es así que, en los últimos 15 años, el régimen antimicrobiano recomendado se ha modificado hasta en 3 ocasiones (Figura 81).

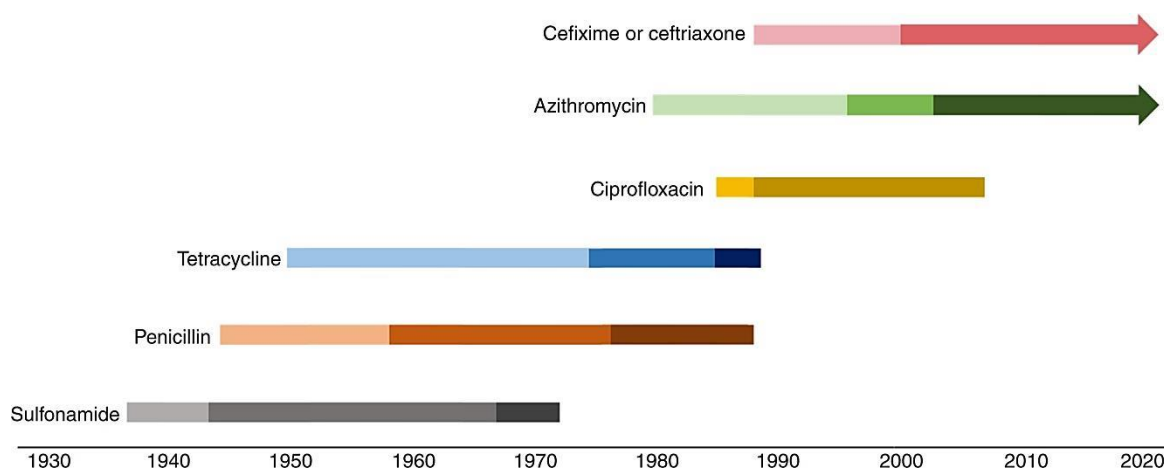


Figura 81. Evolución del tratamiento utilizado frente a *Neisseria gonorrhoeae*. Cada barra representa el periodo de tiempo en el que se utilizó dicho antimicrobiano y el oscurecimiento del color indica el momento en que comenzaron a detectarse resistencias al mismo (96).

En el año 1936, las sulfamidas constituyeron los primeros agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la gonorrea, aunque ya a principios de 1940 se describieron las primeras resistencias a las mismas. En este momento, se recomendó el tratamiento con penicilina y, unos años más tarde, se utilizó la tetraciclina. A partir del año 1960, se detectaron aislados resistentes a penicilina y, de nuevo, en la década de los 80 aparecieron resistencias a la tetraciclina, hecho que

desaconsejó el uso de estos antibióticos. Se comenzó entonces a emplear azitromicina en monoterapia así como ciprofloxacino con posterioridad, pero en el año 2007 ambos tratamientos dejaron de estar recomendados por igual motivo (166).

En este momento y hasta el año 2012, las guías de consenso europeas y americanas recomendaron el uso de cefalosporinas de tercera generación, cefixima o ceftriaxona en monoterapia, como tratamiento de primera elección.

En primer lugar se utilizó la cefixima, cefalosporina de administración oral. Sin embargo, su sensibilidad frente al gonococo disminuyó rápidamente especialmente en Japón, país en el que en el año 2000 ya se describieron tasas de resistencia hasta en el 30% de las cepas relacionadas con numerosos fracasos terapéuticos (80)(79)(167)(168). Por ello se recomendó el uso de ceftriaxona, pero el problema de las resistencias continuó y, en el año 2009, se caracterizó en el mismo lugar la primera cepa con resistencia a esta cefalosporina de administración intramuscular (93)(169). Posteriormente, se notificaron casos similares en países europeos como Francia y España (94)(109).

Con el paso de los años, estos fallos en el régimen establecido con C3G se fueron sucediendo tanto a nivel europeo (95)(72)(170) como mundial (29)(24)(30)(26)(171). Estos hechos obligaron a modificar nuevamente las pautas de tratamiento por parte de las autoridades internacionales.

Entre los años 2006 y 2010 y a causa de esta situación, el CDC indicó en sus guías el tratamiento con azitromicina en monoterapia (2 g) como alternativa en aquellos pacientes alérgicos a las cefalosporinas (158). Sin embargo, finalmente dicha pauta fue eliminada de sus recomendaciones al detectarse, de nuevo, fracasos terapéuticos incluso con esta dosificación (76)(172) debido a la cada vez más frecuente aparición de cepas de alta resistencia a dicho macrólido (88)(89)(173)(90)(91)(9)(10)(174). En adición, con frecuencia estas dosis superiores implicaron reacciones adversas gastrointestinales no bien toleradas en todos los pacientes.

En Japón, la rápida pérdida de sensibilidad de cefixima anteriormente descrita, motivó el cambio de este antimicrobiano a la categoría de alternativo y no como

fármaco de primera línea. En este país y a partir de este año, la ceftriaxona y la espectinomicina constituyeron las únicas opciones disponibles para el tratamiento de primera línea de la gonorrea (86).

Las pautas actualmente recomendadas por organismos y sociedades científicas nacionales e internacionales de referencia coinciden en utilizar la asociación de ceftriaxona y azitromicina como terapia inicial de elección en la infección gonocócica, a dosis que varían en función de la epidemiología de la resistencia antibiótica presente en el entorno geográfico y de la tolerancia gastrointestinal que presenten los pacientes a la azitromicina. El objetivo de asociar dos fármacos con diferente mecanismo de acción es el de preservar la efectividad del tratamiento empírico de la gonorrea con los antibióticos que actualmente disponemos, especialmente de las C3G, debido a la baja probabilidad de que un aislado consiga ser resistente a ambas familias de antimicrobianos.

El segundo punto clave de esta estrategia es incrementar la dosificación de los mismos para así asegurar el mantenimiento de un nivel plasmático elevado sostenido y garantizar su función bactericida (43). No obstante, y como se ha explicado, las dosis utilizadas de los mismos difieren en los distintos países y guías científicas.

En el caso del CDC, esta institución recomienda dosis más bajas de cefalosporinas dado que en Estados Unidos las CMI de estos β -lactámicos se encuentran en niveles más favorables que en Europa en general y en España en particular (81)(82)(83). Por tanto, la pauta inicial aconsejada por el CDC es ceftriaxona intramuscular (250 mg) más azitromicina oral (1 g) para el tratamiento de la gonorrea no complicada (84), mismo tratamiento recomendado por la OMS (5) y la sociedad Canadiense (85).

No obstante, en la guías europeas se establece una dosis superior tanto de ceftriaxona (500 mg) como de azitromicina (2 g) (13). La guía británica recomienda, sin embargo, la asociación de 500 mg de ceftriaxona más 1 g de azitromicina (14).

En el caso de Estados Unidos y siguiendo las premisas del CDC, en el año 2017 el 81% de los 555.608 casos de gonorrea (6) fueron tratados con dicho régimen dual, no registrándose ningún fallo al mismo (175).

Sin embargo, a principios del año 2018 se describió en Inglaterra el primer fracaso terapéutico asociado al tratamiento dual con ceftriaxona (CMI 0,5 mg/L) y azitromicina (CMI >256 mg/L), resultando esta cepa también resistente a tetraciclina (CMI 32 mg/L) y ciprofloxacino (CMI >32 mg/L). Dicho aislado de *N. gonorrhoeae* fue tomado en un varón heterosexual que había mantenido relaciones sexuales con una mujer tailandesa (176)(8)(17). Posteriormente, se informaron dos nuevos casos similares ocurridos en Australia en aislados obtenidos en un hombre que había mantenido relaciones sexuales con una mujer asiática (cepa A2735) y en una mujer que alegó no haber viajado fuera de dicho país (cepa A2543). Estos últimos aislados pertenecieron al ST16848 (15)(176).

Por otro lado, la localización de la infección también condiciona la sensibilidad antibiótica del gonococo. Así pues, las cepas faríngeas se han relacionado con una mayor frecuencia de fracasos con el tratamiento combinado (177)(178).

Estos sucesos demuestran que *Neisseria gonorrhoeae* continua desarrollando sistemas de resistencia que aseguren su supervivencia, comprometiendo de nuevo el tratamiento empírico actual utilizado para combatir la infección que dicho microorganismo produce. Es por ello que, si no establecemos medidas de vigilancia, control y prevención eficientes, la gonorrea podría convertirse en una ITS intratable en un futuro no muy lejano.

5.4. SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA ACTUAL DE NEISSERIA GONORRHOEAE EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

A continuación, se detallan los resultados recabados acerca de la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* testadas frente a azitromicina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino, espectinomicina, tetraciclina y penicilina,

recogidas en el área geográfica de la Comunidad Valenciana durante el periodo comprendido entre los años 2013 y 2018.

De la misma manera, se expresan los resultados de sensibilidad de estos mismos antibióticos junto con los datos obtenidos del análisis de otros dos agentes, gentamicina y fosfomicina, estudiados a partir de la información recopilada de RedMIVA durante el periodo 2013 – 2019.

Con el fin de encuadrar los datos recopilados en nuestra experiencia con los informados por el máximo organismo responsable del control de la sensibilidad del gonococo a nivel europeo, el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), se describen a continuación los resultados publicados en los últimos informes anuales realizados por el Euro-GASP entre los años 2013 y 2017.

En la siguiente Tabla, se muestra el número total de cepas tanto analizadas como reportadas por el conjunto de países europeos participantes en dicho proyecto, así como aquellas analizadas y reportadas en España y el porcentaje que suponen por año (Tabla 20).

Año	Total Cepas Europa		Total Cepas España		
	Analizadas	Reportadas	Analizadas	Reportadas	% Analizadas
2013 (179)	1.994	50.001	119	3.314	4
2014 (180)	2.151	63.957	151	4.562	3
2015 (181)	2.134	67.930	167	5.006	3
2016 (182)	2.660	74.584	365	6.816	5
2017 (81)	3.248	-*	421	-*	-*

Tabla 20. Número de cepas analizadas y reportadas al Euro-GASP durante los años 2013 – 2017 por los diferentes países europeos, y número de cepas analizadas y reportadas por España notificadas en estos informes. *Se desconoce el dato en el momento del análisis.

Como puede observarse, el número de cepas reportadas y analizadas en España y en Europa aumentaron cada año en consonancia con el progresivo incremento de la incidencia de la gonorrea. El porcentaje de cepas analizadas provenientes de España se mantuvo estable durante los años de estudio (3% - 5%).

A continuación, se informa acerca de la resistencia presentada a cefixima, azitromicina y ciprofloxacino, así como de las cepas PPNG obtenidas en España en los informes publicados por el Euro-GASP durante los años 2013 - 2017 (Tabla 21).

Año	Resistencia							
	Cefixima		Azitromicina		Ciprofloxacino		PPNG	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
2013 (179)	18	15,1	10	8,4	78	65,5	15	12,6
2014 (180)	0	0	10	6,6	102	67,5	28	18,5
2015 (181)	4	2,4	5	3,0	109	63,5	33	19,8
2016 (182)	6	1,6	15	4,1	210	57,5	59	16,2
2017 (81)	23*	5,5*	23*	5,5*	227*	53,9*	-	-

Tabla 21. Número y porcentaje de cepas resistentes a cefixima, azitromicina, ciprofloxacino y productoras de β -lactamasa (PPNG) provenientes de España notificadas en los informes presentados por el Euro-GASP durante los años 2013 - 2017. *Los datos del año 2017 hacen referencia a las tasas de resistencia acumuladas durante el periodo 2009 – 2017.

Tal y como se desprende de estos resultados, los porcentajes de cepas resistentes a cefixima y ciprofloxacino fueron superiores en el año 2013, cifra que disminuyó en los años sucesivos. Los datos de resistencia a azitromicina presentaron un valor mínimo en el año 2015 y, posteriormente, comenzaron a repuntar. Estos porcentajes de resistencia fueron calculados a partir del anterior punto de corte establecido para este macrólido (CMI $\geq 0,5$ mg/L). La cifra de cepas PPNG por su parte, se mantuvo relativamente estable.

5.4.1. Tratamiento empírico

Tiene como objetivo eliminar la infección y las complicaciones derivadas, así como reducir el período en el que el gonococo conserva su capacidad de transmisión tanto entre las parejas sexuales como al recién nacido en mujeres gestantes. Posee por tanto, un beneficio clínico y de salud pública, hecho que justifica su instauración inicial tras el diagnóstico de uretritis en hombres con alta sospecha de infección gonocócica (43).

5.4.1.1. Azitromicina

Pertenece a la familia de los macrólidos, la azitromicina es un antibiótico bacteriostático utilizado en el tratamiento de la gonococia desde el año 1980 (86). Dicho agente interactúa de forma reversible con el sitio P de la subunidad 50S ribosomal, impidiendo la translocación del acil-ARNt que transporta el aminoácido e inhibiendo de esta manera la síntesis proteica bacteriana (183).

La azitromicina es considerada la piedra angular en el tratamiento de las ITS, pues se emplea en las infecciones causadas por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium*, además de formar parte de la terapia dual frente a *Neisseria gonorrhoeae*. Todas estas ITS altamente prevalentes pueden coexistir en el mismo paciente y presentar, en ocasiones, sintomatología solapada.

Tras la toma de una sola dosis oral de azitromicina, esta pasa a sangre y rápidamente abandona la circulación para difundir hacia los tejidos, alcanzando altas concentraciones durante un tiempo prolongado en piel y mucosas, incluyendo los genitales. Además, dicho agente se considera seguro durante el embarazo y posee un coste adecuado (184).

En primer lugar, es necesario destacar la reciente modificación en la clasificación de los aislados de gonococo frente a la azitromicina. Con anterioridad, en las guías tanto de EUCAST como de CLSI se proponía un punto de corte de 0,5 mg/L a partir del cual las cepas se consideraban resistentes. No obstante, ambas sociedades científicas en sus últimas guías proponen actualmente un punto de corte epidemiológico (ECV) de 1 mg/L, por debajo del cual las cepas son consideradas salvajes o *wild-type*, mientras que se clasifican como no salvajes o *non-wild-type* si la CMI supera esta concentración.

Dicho ECV se estableció tras estudiar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (PK/PD) de la azitromicina, su eficacia clínica y la susceptibilidad in vitro asociada a determinantes genéticos (184). La denominación de cepas no salvajes (CMI >1 mg/L) surgió tras tipificar molecularmente los aislados con mayores CMI frente a dicho macrólido, en los que se observaron mutaciones en genes que codifican el

RNAr 23S de *Neisseria gonorrhoeae*. Estas alteraciones se han relacionado con fallos en el tratamiento en monoterapia con azitromicina, particularmente cuando los 4 alelos del gonococo están afectados. Los estudios de Morita-Ishihara *et al.* (76) así como de Gose *et al.* (185) descubrieron que cepas con las mutaciones C2611T y A2059G del RNAr 23S presentaron, respectivamente, CMI ≥ 4 mg/L y ≥ 16 mg/L, tal y como se muestra en la Figura 82.

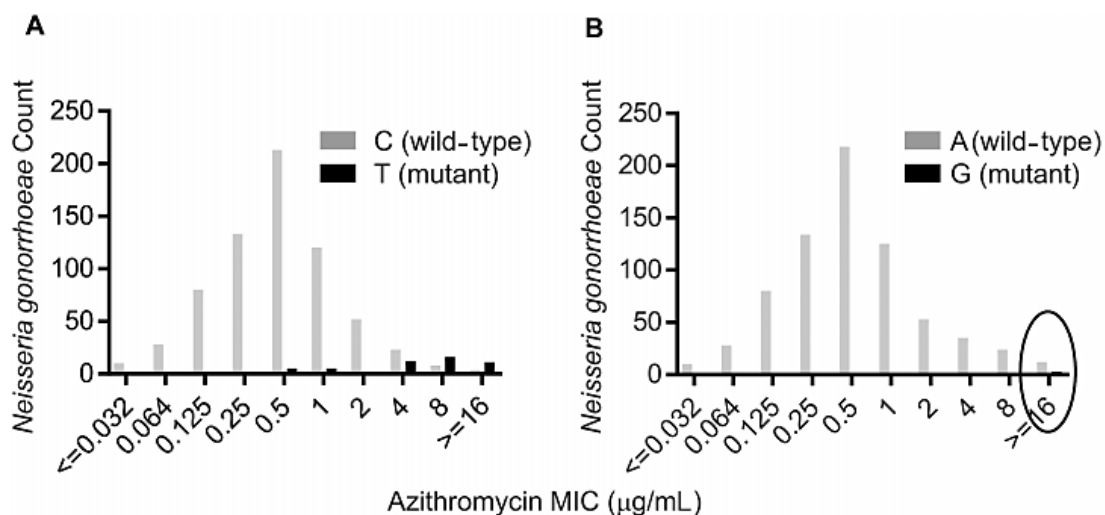


Figura 82. Distribución de las CMI obtenidas frente a azitromicina, distinguiendo a aquellas cepas salvajes (*wild-type*) o sin presencia de mutaciones, de las cepas no salvajes (*mutant*) que presentaron las mutaciones C2611T (A) y A2059G (B) del RNAr 23S (175).

De esta manera, aislados con mutaciones C2611T del RNAr presentaron una CMI ≥ 4 mg/L, mientras que cepas con la mutación A2059G conllevaron una CMI ≥ 16 mg/L. Otro estudio analizó 75 cepas recogidas en Europa resistentes a dicho macrólido (CMI 4 - 256 mg/L) concluyendo que, aquellos aislados con la mutación A2059G del RNAr 23S mostraron alta resistencia a dicho macrólido, mientras que aquellos con la variante C2611T presentaron una resistencia entre moderada y baja (186).

Como se ha comentado en la parte introductoria de esta tesis, en Estados Unidos el CDC colabora con el proyecto estadounidense para la vigilancia de la susceptibilidad in vitro de aislados de gonococo (GISP). Dicho programa, recopiló durante el periodo 2014 – 2016 una suma de 15.496 aislados de *Neisseria*

gonorrhoeae, a partir de los cuales llevó a cabo el cálculo del ECV utilizando diferentes métodos (175).

En la Figura 83, se muestra la frecuencia de las CMI obtenidas frente a dicho macrólido mediante el método de dilución en agar descrito por el CLSI (63) así como los resultados obtenidos en dicho análisis (141).

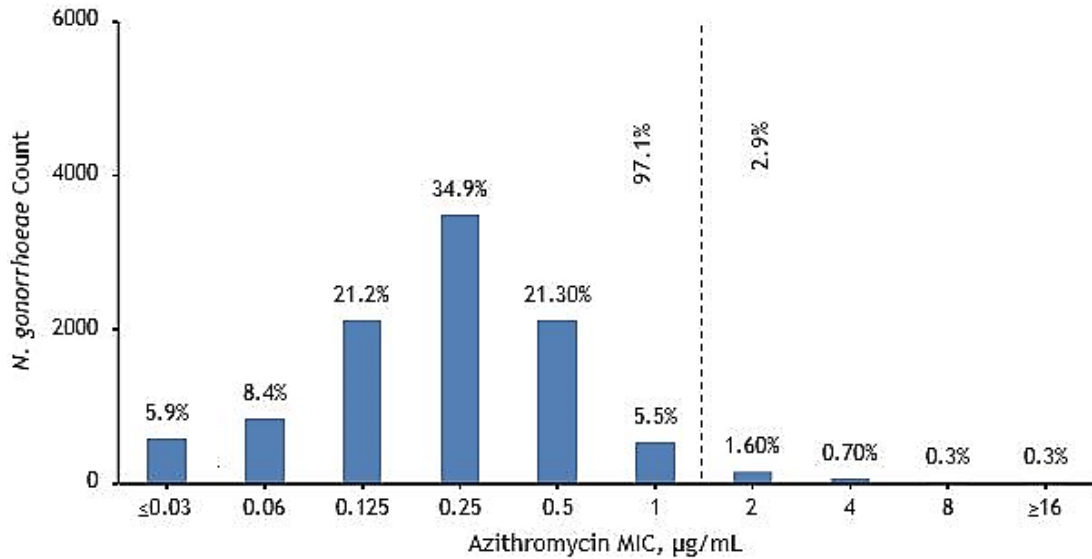


Figura 83. Distribución de las CMI de azitromicina obtenidas en los 15.496 aislados de gonococo estudiados por el GISP entre los años 2014 - 2016 (141).

La moda o CMI más frecuente fue de 0,25 mg/L (34,9% de los aislados), dato que no se modificó respecto a estudios anteriores y que coincide con el obtenido por el Euro-GASP en el informe de susceptibilidad europea del año 2017 (81). En la Figura 82 se aprecia que el 97,1% de los aislados presentaron una CMI de 1 mg/L o inferior (cepas *wild-type*), mientras que el 2,9% de los aislados obtuvieron una CMI superior (cepas *non-wild-type*).

En nuestra experiencia, la CMI más frecuentemente observada en las cepas recogidas durante el proyecto GONOVig fue de 0,25 mg/L (33,3% de las cepas), dato concordante con la moda obtenida en los estudios anteriormente citados. El porcentaje de cepas *wild-type* o con CMI <1 mg/L fue del 94%, mientras que el 6% de

los aislados (12 cepas) presentaron CMI's superiores y por tanto fueron clasificadas como *non-wild-type* o con mecanismos de resistencia adquiridos.

Al estudiar los datos de RedMIVA, se obtuvo un porcentaje de cepas *non-wild-type* del 3,5% durante los años 2014 – 2016, dato similar al 2,9% obtenido por el GISP en este mismo periodo. Esta tasa de resistencia se mantuvo constante, coincidiendo con la estabilización de las CMI de azitromicina en Europa (81). No obstante, a partir de este momento se constata un incremento de las cepas con CMI >1 mg/L tanto en el año 2017 (8,4%), como durante el 2018 (10,7%) y 2019 (13,8%), resultando en una tasa de resistencia media del 9,5% durante el periodo 2014 - 2019.

Un reciente estudio llevado a cabo en la ciudad de Valencia por Castaño *et al.* encontró, tras el análisis de 278 cepas de gonococo obtenidas entre los años 2013 – 2019, un porcentaje de resistencia a azitromicina del 9% (187). El análisis realizado en el sur de España reveló una tasa de resistencia a este macrólido del 9,7% (188).

Al atender a los datos presentados en el informe anual del Euro-GASP del año 2017, las cepas europeas mostraron una resistencia global a azitromicina de entre el 7 y el 8%, mientras que en el caso concreto de España, esta cifra fue del 5,5%. Estos datos sin embargo, fueron establecidos siguiendo los criterios anteriormente establecidos (CMI \geq 0,5 mg/L) (81).

Respecto a los estudios que analizaron cepas encontradas en nuestro país, Jacobsson *et al.* describieron aislados con CMI's elevadas a azitromicina recogidos en Europa entre los años 2009 y 2014 (186). La disminución de la susceptibilidad del gonococo a dicho macrólido ha sido registrada especialmente en el continente asiático, lugar en el que en comparación con Europa o Estados Unidos, se han detectado un elevado porcentaje de aislados con altas CMI. Así lo corrobora un estudio de reciente publicación en el que se describen 384 cepas recogidas en el este de China, de las cuales 124 (32,3%) fueron resistentes a azitromicina (CMI >1 mg/L), y 40 de ellas (10,4%) además presentaron alto nivel de resistencia (189).

Al calcular los resultados de CMI₅₀ y CMI₉₀, tanto el valor de CMI₅₀ (0,19 mg/L a 0,25 mg/L) como el de CMI₉₀ (0,75 mg/L a 1 mg/L) experimentaron un aumento entre

el primer y segundo periodo de estudio del proyecto GONOVig. El análisis de estos mismos parámetros con los datos de RedMIVA en aislados recogidos entre 2014 y 2019 resultaron, de media, en una CMI₅₀ de 0,25 mg/L y una CMI₉₀ de 1,5 mg/L. Este aumento del valor de CMI₉₀ se explica por el continuo incremento de las resistencias a este macrólido tal y como reflejó el porcentaje de cepas resistentes obtenido en el año 2019 (13,8%).

Como conclusión y aunque es necesario seguir estudiando más aislados, los datos de sensibilidad, CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos indican que las cepas con CMIs elevadas a azitromicina son cada vez más frecuentes y pueden amenazar el régimen empírico establecido. Por tanto y para garantizar la eficacia de las C3G y del tratamiento combinado, tanto CLSI (63) como EUCAST (64) fijan el ECV de azitromicina en 1 mg/L, siendo esta la CMI que marca el final de las cepas *wild-type*.

5.4.1.2. Cefalosporinas

Las cefalosporinas, al igual que otros antibióticos β -lactámicos, poseen actividad bactericida al inhibir la formación de los enlaces que conforman la pared celular del peptidoglicano bacteriano. Esta función la llevan a cabo mediante la unión del anillo β -lactámico a las PBP2 con función transpeptidasa.

El uso de las cefalosporinas de espectro extendido (ESC) para el tratamiento de la gonorrea se inició tras las altas resistencias mostradas por el gonococo a las quinolonas a partir del año 1990. En primer lugar, se recomendó la cefixima en dosis de 400 mg, siendo esta la única cefalosporina oral que cumplía con el criterio de ser eficaz en más del 95% de los casos. No obstante, rápidamente el gonococo empezó a desarrollar resistencia a la misma. Esto conllevó fallos en el tratamiento en primer lugar en Japón, y posteriormente, en todo el mundo (71)(170)(171).

Dicha resistencia está mediada por cambios en la principal diana de esta familia de fármacos, la PBP2, por la que estos agentes muestran una afinidad 10 veces superior que la exhibida por la PBP1 (108). Diversas mutaciones en mosaico descritas

en el gen *penA* son las responsables en el cambio de la PBP2 (70), aunque mejoras en las bombas de eflujo relacionadas con alteraciones en los loci *mtrR* y *penB* también se asocian con la disminución de la susceptibilidad a las mismas (190)(191).

Respecto a la **cefixima**, los resultados del programa europeo de vigilancia del gonococo (Euro-GASP) del año 2017 informaron que, de los 27 países de la Unión Europea participantes, 15 de ellos aportaron cepas con resistencia a esta C3G oral (81). Aunque este mismo estudio afirma que el porcentaje de resistencia ha permanecido estable desde el año 2014, situándose entre el 1,8% y el 2,1% de media, recalca que España es uno de los países que mayor tasas de resistencia presenta a la cefixima, resultando esta en un valor promedio del 5,5% obtenido durante el periodo 2009 - 2017 (Figura 84).

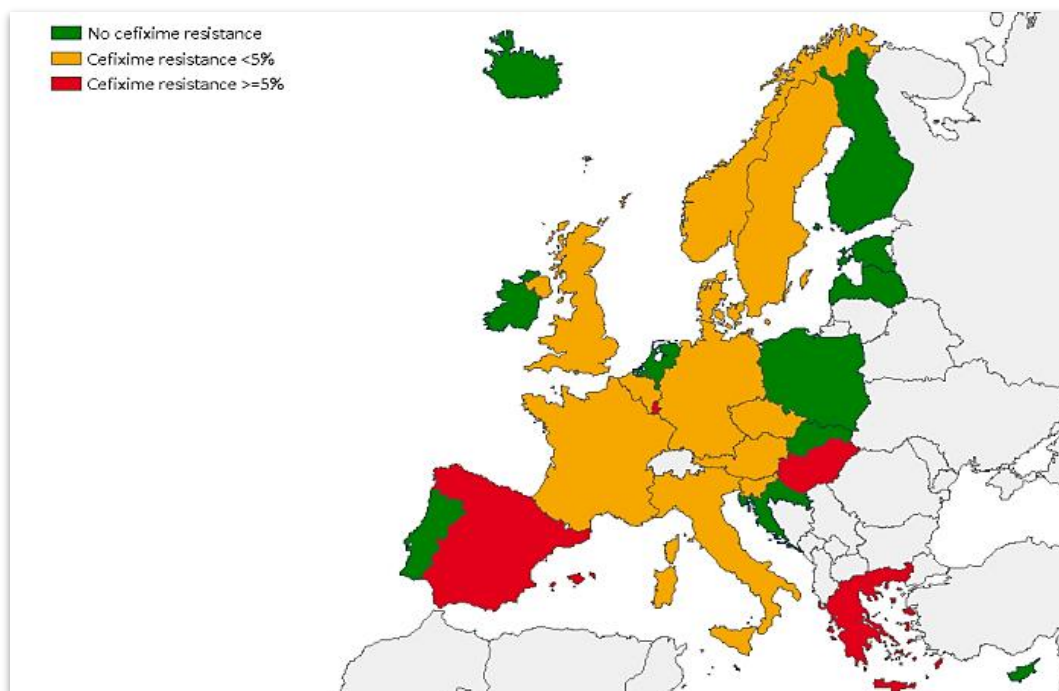


Figura 84. Países de la unión europea participantes en el estudio de la susceptibilidad antibiótica de *Neisseria gonorrhoeae* y porcentaje de resistencia observado frente a cefixima en el año 2017. España, Grecia y Luxemburgo están coloreados en rojo debido a que presentan una resistencia global a cefixima $\geq 5\%$ (www.ecdc.europa.eu).

Este mismo organismo reportó, en su informe del año 2012, una resistencia del 15,2% en nuestro país. Por consiguiente, y a pesar de que España sigue siendo uno de

los países con mayor porcentaje de resistencia a esta C3G, se ha experimentado una reducción notable de la misma en los últimos años (192).

La distribución de las CMI observadas en nuestro estudio a dicha cefalosporina se describen a continuación; las CMI más bajas ($\leq 0,016$ mg/L) fueron las más frecuentemente observadas, tanto durante el año 2013 (57,2%) como durante el periodo 2014 – 2018 (59,7%). En contraposición, las CMI elevadas ($\geq 0,125$ mg/L) fueron las menos abundantes, tanto en el primer periodo (6,3%) como en el segundo (5,6%).

Esta evolución es muy similar a la presentada en el informe anual del ECDC del año 2017 para el conjunto de aislados europeos (81) y concuerda con la reducción de las tasas de resistencia informadas a dicha C3G (Figura 85).

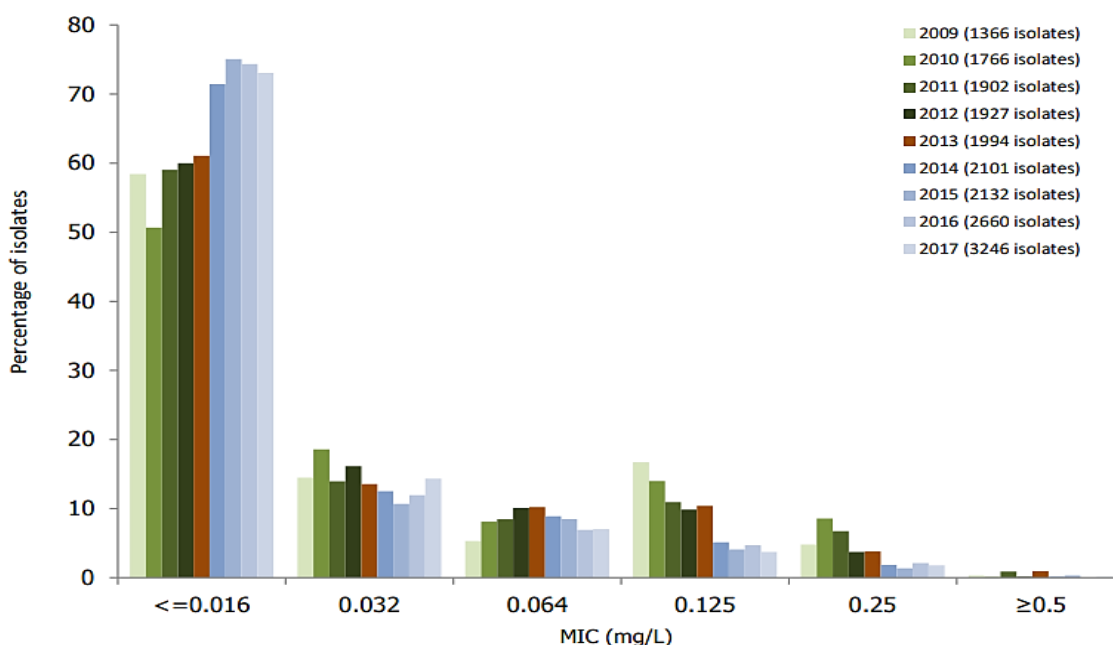


Figura 85. Distribución de CMI frente a cefixima presentada en el informe anual europeo del año 2017. Se aprecia la gran frecuencia de aislados con CMI $\leq 0,016$ mg/L así como la paulatina disminución de cepas con altas CMI ($\geq 0,125$ mg/L) desde el año 2009 al año 2017 (www.ecdc.europa.eu).

En nuestro estudio, y siguiendo criterios EUCAST, se observó una disminución en las tasas de resistencia entre el primer periodo (6,3%) y el segundo (5,6%), suponiendo

una resistencia global a la cefixima del 5,9%. Dicho resultado fue semejante al 5,5% reportado por el ECDC para España durante el periodo 2009 - 2017 (81).

Por otro lado y atendiendo a los datos de RedMIVA se constató, desde el año 2015, momento en el que se detectaron los mayores porcentajes de resistencia a dicha C3G oral (13,8%), una disminución progresiva de las cepas resistentes, obteniendo en el año 2019 un porcentaje de resistencia del 1,1%. La resistencia media observada durante todo este periodo fue del 5,2%.

Aunque en nuestro país son pocos los datos publicados, en el año 2011 Pladevall *et al.* estudiaron la sensibilidad de 100 cepas aisladas en Barcelona, encontrando una resistencia del 10% a cefixima (82). Este mismo grupo, entre agosto del 2012 y julio del 2016 analizó 1.355 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* concluyendo que, las cepas recogidas durante el año 2013, presentaron una resistencia a dicha cefalosporina del 8,3% (193). Cobo *et al.* encontraron tasas de resistencia a cefixima del 6,1% en 65 muestras recogidas durante los años 2012 – 2014 en el sur de España (163). El análisis realizado por dicho grupo con 134 cepas pertenecientes al periodo 2012 – 2016 resultó, sin embargo, en una tasa de resistencia a esta cefalosporina del 3,7% (188). Los datos de resistencia obtenidos para dicha C3G en el estudio desarrollado en Valencia durante el periodo 2013 – 2019 fueron del 3% (187).

Los resultados de CMI₅₀ (0,016 mg/L) y CMI₉₀ (0,125 mg/L) obtenidos en nuestra experiencia durante el proyecto GONOVig permanecieron estables durante todo el estudio y coincidieron con los resultados medios obtenidos a partir de los datos de RedMIVA. No obstante, y atendiendo a los resultados de RedMIVA, en el año 2019 la CMI₉₀ fue de 0,064 mg/L, suponiendo por tanto en este último año una reducción de la concentración necesaria para eliminar el 90% de las cepas. El estudio realizado en Cataluña obtuvo valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ similares (193).

Por otro lado, la discrepancia en los puntos de corte clínicos entre ambas sociedades científicas condicionó notablemente la clasificación de los aislados resistentes. De esta manera, siguiendo criterios CLSI (CMI >0,25 mg/L) se encontró 1 aislado resistente durante todo el periodo de estudio, resultado que dista mucho de

las 12 cepas clasificadas como resistentes atendiendo criterios EUCAST (CMI >0,125 mg/L).

De la misma manera, se estudió la evolución en la susceptibilidad a la **ceftriaxona**, C3G utilizada en el tratamiento de la infección gonocócica administrada en este caso por vía intramuscular. Su análisis adquiere gran importancia puesto que, como se ha comentado, la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a la cefixima motivó la sustitución de esta cefalosporina oral por la ceftriaxona. Así pues, en el año 2017, el 87% de los casos de gonorrea en Europa fueron tratados con dicha C3G (81), convirtiéndose esta cefalosporina en el antibiótico más empleado para el tratamiento de la infección gonocócica.

A pesar de su importancia al constituir la última opción para el tratamiento empírico de la infección por *Neisseria gonorrhoeae*, se ha evidenciado una disminución paulatina de su sensibilidad a nivel mundial.

En el año 2009 en Kyoto (Japón), se aisló la cepa H014 proveniente de la faringe de una mujer que presentó elevada resistencia a la ceftriaxona (CMI 2 mg/L) (169). Esta CMI supone un alto nivel de resistencia ya que, hasta ese momento, tan solo se había detectado un aislado con una CMI de 0,5 mg/L (194). Posteriormente en Francia, en el año 2010, se aisló otra cepa de alta resistencia tanto a cefixima (CMI >4 mg/L) como a ceftriaxona (CMI 1 - 2 mg/L) denominada F89 (94). En España, concretamente en Cataluña, en el año 2012 se identificaron dos nuevas cepas de alta resistencia a dicha C3G, ambas con CMI de 1,5 mg/L y aisladas en pacientes relacionados (109).

En nuestro análisis, el 64,5% de los aislados presentaron una CMI \leq 0,016 mg/L durante el primer periodo, porcentaje que aumentó hasta el 71,7% durante el periodo 2014 – 2018. A continuación, se muestra la distribución de las CMI a ceftriaxona en cepas recogidas entre el año 2009 y 2017 en el estudio europeo desarrollado por el ECDC (81).

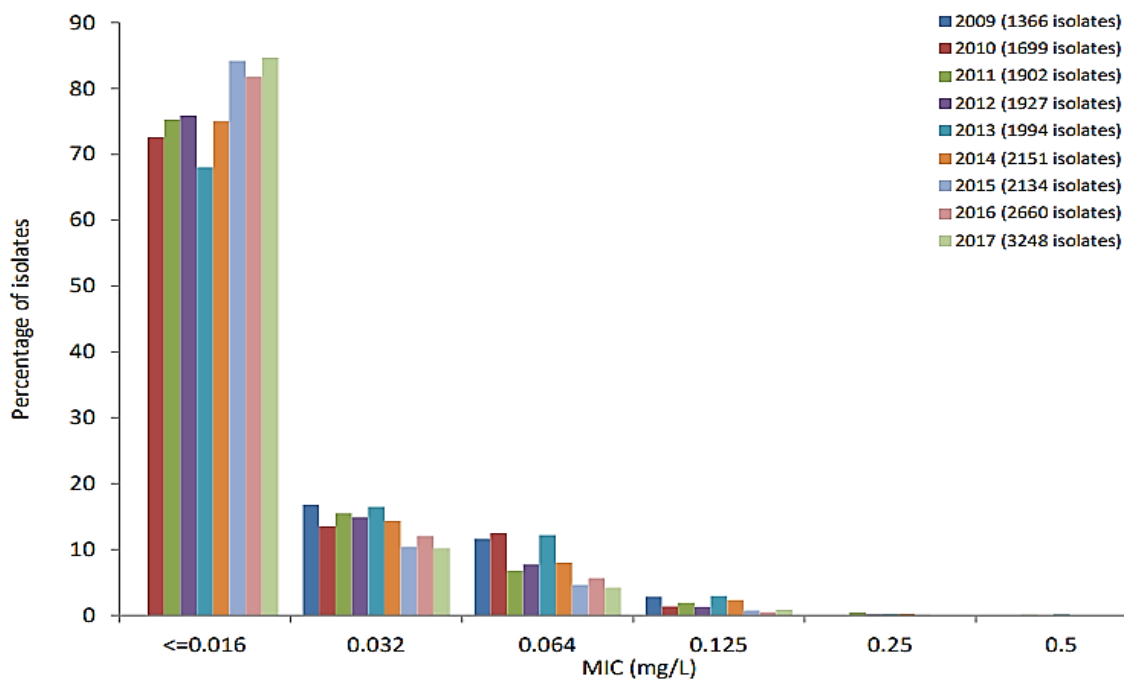


Figura 86. Distribución de las CMI frente a ceftriaxona presentada en el informe del Euro-GASP del año 2017. Se evidencia un aumento progresivo de las cepas de alta sensibilidad (CMI $\leq 0,016$ mg/L) con el transcurso de los años (www.ecdc.europa.eu).

Nuestro estudio reveló una baja resistencia a ceftriaxona, encontrando un porcentaje promedio del 1,5% siguiendo criterios CLSI (CMI $>0,25$ mg/L) y del 2,4% al atender criterios EUCAST (CMI $>0,125$ mg/L) durante los seis años de estudio, manteniéndose esta tasa estable. No se encontró ninguna cepa con alta resistencia (CMI >2 mg/L), siendo la CMI más elevada observada de 0,75 mg/L.

Los datos obtenidos de RedMIVA, y siguiendo las directrices de EUCAST, resultaron en una resistencia media del 1,6%, mostrando una tendencia descendente desde el año 2015 (3,5%) al 2019 (0,6%). No obstante, en este caso sí se detectaron dos cepas con alta resistencia a dicha C3G, tomadas en los años 2015 y 2017.

Los estudios anteriormente citados realizados en Cataluña, encontraron un porcentaje de resistencia global a ceftriaxona del 3% en el año 2011 (82) y del 2,8% durante los años 2012 – 2016 (193). En el análisis llevado a cabo en el sur de España se obtuvo una tasa de resistencia del 4,6% en cepas recogidas entre 2012 – 2014 (163) y del 2,9% en aislados obtenidos entre los años 2012 – 2016 (188). El estudio

desarrollado en el área de Bilbao no encontró ninguna cepa resistente a ceftriaxona (195) y el análisis realizado en Valencia obtuvo un 0,4% de resistencia para dicha ESC (187).

En nuestra investigación, la CMI₉₀ para la ceftriaxona fue de 0,047 mg/L y se mantuvo constante. La CMI₅₀ resultó $\leq 0,016$ mg/L durante todo el estudio, datos idénticos a los obtenidos en el periodo 2015 - 2019 a partir de la información contenida en RedMIVA. Estos resultados son similares a los publicados en el estudio liderado por Pladevall *et al.* (193).

Los aislados considerados de sensibilidad disminuida frente a ceftriaxona (CMI $>0,032$ y $\leq 0,125$ mg/L) supusieron el 13,2% y el 14,2% de las cepas recogidas en el proyecto GONOVig y RedMIVA, respectivamente. Dicho porcentaje resultó inferior al 17,7% observado por Day MJ *et al.* en el año 2016 tras el análisis de 2.660 cepas europeas (196).

Como conclusión, en nuestra experiencia ambas cefalosporinas demostraron una tasa de resistencia con tendencia a la baja en los últimos años, siendo mayor el porcentaje de resistencia medio de *N. gonorrhoeae* observado frente a cefixima (5,6%) respecto a ceftriaxona (2,4%) a partir de los resultados obtenidos en el proyecto GONOVig. De forma paralela, el análisis de los datos de RedMIVA reveló una resistencia media a cefixima del 5,2% y a ceftriaxona del 1,6%. En este último caso y al poseer datos hasta el año 2019, se pudo observar una clara tendencia a la baja en el porcentaje de resistencia frente a ambas cefalosporinas. Al atender a los *breakpoints* estipulados por CLSI y EUCAST, se produjeron diferencias significativas en la clasificación de las cepas en el caso de cefixima pero no de ceftriaxona.

Debido al desarrollo temprano de resistencias a cefixima, en la actualidad la ceftriaxona es la C3G recomendada y más utilizada combinada mayoritariamente con azitromicina en el tratamiento empírico de la gonorrea, ya que sigue cumpliendo los criterios exigidos por la OMS para poder formar parte del régimen inicial. La asociación de las C3G con la azitromicina presumiblemente ha derivado en una disminución de las tasas de resistencia a estas cefalosporinas. Sin embargo, los fracasos terapéuticos

asociados a elevadas CMI frente a ambos agentes, reportados en el continente asiático en primer lugar, y en Europa y en España con posterioridad, hacen imprescindible seguir vigilando la susceptibilidad antibiótica a estos antimicrobianos.

5.4.2. Otros antimicrobianos

A continuación, se describen las características y resultados de sensibilidad obtenidos en el resto de antibióticos testados en nuestro estudio. En el caso del ciprofloxacino, tetraciclina y penicilina, a día de hoy las altas tasas de resistencia mostradas en el gonococo imposibilitan su utilización empírica en la infección que dicho patógeno origina.

No obstante, quinolonas, tetraciclinas y espectinomicina se incluyen en las pautas alternativas de diferentes sociedades científicas para el tratamiento de la gonorrea no complicada de uretra, cérvix, recto o faringe. La doxiciclina por su parte, se considera de elección en la orquiepididimitis y en la enfermedad pélvica inflamatoria causada por el gonococo (43).

Por otro lado, es de gran importancia continuar vigilando las tasas de sensibilidad de estos fármacos ante la posibilidad de que se produzca una disminución gradual de la resistencia a los mismos. Esta situación, generada por su menor uso, podría suponer una oportunidad para considerar estos agentes como alternativa terapéutica en el futuro.

5.4.2.1. Ciprofloxacino

Se trata de una quinolona utilizada a partir del año 1983 para el tratamiento de la gonorrea (197), inicialmente empleada a dosis de 250 mg pero siendo necesario posteriormente duplicar dicha dosis para lograr la erradicación del gonococo. En el año 1989 se detectaron los primeros fracasos terapéuticos en Londres (198) aumentando estos a partir de 1990 (199). Finalmente, en el año 2000 y debido a las altas tasas de

resistencia, estas se eliminaron de las guías europeas, americanas y asiáticas para el tratamiento de primera línea (86). El ciprofloxacino por tanto no debe emplearse en la infección gonocócica sin un antibiograma previo que confirme su sensibilidad.

Su mecanismo de acción se basa en la formación de un complejo que impide la actividad de la DNA girasa y topoisomerasa IV, topoisomerasas esenciales para la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA (104).

Cambios en un solo aminoácido del gen *GyrA*, son capaces de generar resistencias de nivel intermedio (CMI 0,1 – 0,5 mg/L), mientras que el acúmulo de mutaciones en los genes *GyrA*, *ParC* y/o *ParE*, puede conllevar una CMI \geq 32 mg/L (200)(201)(202).

En nuestro estudio y siguiendo criterios EUCAST (CMI $>$ 0,06 mg/L) el 57% de los aislados presentó resistencia a dicha quinolona. Tras el análisis de los datos de RedMIVA, se concluyó en una tasa media de resistencia del 49,4%. En este caso, la diferencia en los puntos establecidos por EUCAST y CLSI no supuso cambios significativos en la clasificación de los aislados resistentes.

El Euro-GASP reportó en su informe del 2017 un porcentaje de resistencia al ciprofloxacino del 53,9% en España, y del 45,6% en Europa (81). El estudio realizado en Cataluña encontró una resistencia a este agente cercana al 50% (193) y el análisis de 104 aislados en Madrid reveló una resistencia a dicha quinolona del 42,3% (203).

Aunque en nuestra experiencia en los últimos años la resistencia a ciprofloxacino mostró una ligera disminución, los datos anteriormente expuestos continúan suponiendo un alto nivel de resistencia. Es por ello que, actualmente, se desaconseja el uso de este agente en el tratamiento de la gonorrea sin comprobar previamente la sensibilidad al mismo de forma individualizada. Con este propósito, se han desarrollado métodos moleculares rápidos, como es el caso del ResistancePlus GC (beta) assay (SpeeDx Pty Ltd), capaces de detectar la presencia de *N. gonorrhoeae* presente en muestras clínicas y, simultáneamente, llevar a cabo la amplificación de secuencias concretas del gen *GyrA*. De esta manera, es posible obtener información

sobre marcadores de susceptibilidad frente al ciprofloxacino durante el mismo proceso de identificación del gonococo (204).

5.4.2.2. Espectinomicina

Otra posible opción terapéutica es la espectinomicina, un aminociclitol administrado por vía intramuscular en dosis de 2 g. La espectinomicina es especialmente efectiva en el tratamiento de la gonorrea anogenital, no siendo así en el tratamiento de las infecciones faríngeas originadas por *N. gonorrhoeae* (205)(206). Como se ha comentado, dicho antimicrobiano ha sido utilizado en Japón y en otros países asiáticos como agente de primera línea cuando las cefalosporinas orales han resultado resistentes (205)(207)(208).

Posee la desventaja de presentar disminuciones drásticas de su efectividad frente al gonococo tras el desarrollo, por parte de este patógeno, de una sola mutación. Debido a este hecho, en el pasado la resistencia a la espectinomicina se extendió rápidamente entre soldados americanos así como en diversas zonas donde se utilizó de manera indiscriminada (209)(210).

No obstante, en la actualidad y a nivel mundial la resistencia a espectinomicina es esporádica, documentándose tan solo 5 casos en Estados Unidos entre los años 1986 – 2004 (158) así como sucesos aislados notificados por los sistemas de vigilancia ingleses y por la OMS (211).

En nuestra experiencia, el 100% de las cepas testadas frente a este antibiótico fueron sensibles. Se constató, a lo largo del proyecto GONOVig, un ligero aumento de las cepas con CMI de 6 mg/L (46,3% a 50,6%) y de aquellas con CMI de 8 mg/L (18,8% a 33,8%), siendo esta última la CMI más habitual registrada en el estudio de los aislados procedentes de RedMIVA (38,2%).

Debido a su bajo nivel de resistencia y poco uso frente al gonococo, el Euro-GASP realiza el estudio de sensibilidad antibiótica frente a dicho agente cada 3 años. Así pues, en el año 2016 no se encontró ninguna cepa resistente (CMI >64 mg/L) entre

los 2.018 aislados analizados, siendo el año 2008 el último en detectarse cepas no sensibles a este fármaco (182).

A pesar de esta elevada sensibilidad, la posibilidad de que *N. gonorrhoeae* desarrolle con gran rapidez resistencia a la espectinomicina tal y como sucedió en el pasado (210), la ineficacia de este antimicrobiano para el tratamiento de la gonorrea faríngea (212), así como su falta de disponibilidad en muchos países (70)(213)(214), hacen que la espectinomicina no sea un candidato prometedor para el tratamiento de primera línea de la gonorrea (93).

5.4.2.3. Tetraciclina

La tetraciclina fue introducida a partir del año 1950 como una alternativa en el tratamiento de la gonorrea en pacientes alérgicos a la penicilina (215). Este agente antimicrobiano inhibe la síntesis proteica bloqueando la unión del aminoacil-tRNA e impidiendo su unión a la subunidad 30S del ribosoma (216).

A partir del año 1970 empezaron a detectarse cepas con resistencia de tipo cromosómico a dicho fármaco (217). En el año 1985, la resistencia de tipo plasmídico a la tetraciclina surgió en los Estados Unidos y Bélgica como consecuencia de la adquisición del plásmido *tetM*. Dicho plásmido proveniente del estreptococo permite restaurar las proteínas ribosomales imprescindibles en la síntesis proteica. Dada la rápida diseminación de estas cepas resistentes, el tratamiento de la gonococia con tetraciclina dejó de estar recomendado a mediados de los años 80, momento en el que las quinolonas tomaron el relevo.

Se ha demostrado que el sistema de bombas de eflujo MtrC-D-E inducen resistencia no solo a la tetraciclina, sino también a penicilina, macrólidos y posiblemente a fluorquinolonas (218). La mutación de la porina codificada por el gen *penB* también parece disminuir la eficacia a dicho fármaco en conjunción con estos sistemas de eflujo (191).

En nuestro análisis, según el punto de corte establecido por EUCAST (CMI >1 mg/L), encontramos una resistencia media a tetraciclina cercana al 50%, siendo este porcentaje inferior tras el análisis de los resultados obtenidos de RedMIVA (38,9%). En el estudio realizado en el área de Bilbao, la sensibilidad obtenida a este agente fue del 41,2%, presentando el resto de aislados sensibilidad intermedia o resistencia (195). El Euro-GASP, por su parte, dejó de testar este agente debido a su exclusión de los regímenes de tratamiento (179).

El alto porcentaje de cepas resistentes a este antibiótico, a pesar de la ligera disminución de las mismas mostrada en nuestra experiencia, hace que el uso de tetraciclina no sea posible en el tratamiento empírico de la infección gonocócica.

5.4.2.4. Penicilina y cepas productoras de β -lactamasa

Como antibiótico β -lactámico, la penicilina inhibe la síntesis de la pared bacteriana mediante su unión e inactivación de enzimas con función transpeptidasa, conocidas como PBPs (219).

La penicilina comenzó a utilizarse en el tratamiento de la gonorrea en 1943 tras la detección de los primeros casos de fracaso terapéutico con sulfonamidas. A partir del año 1960, surgieron aislados de gonococo con susceptibilidad reducida a dicho agente. En el transcurso de 20 años, la dosis efectiva de penicilina se multiplicó por 24, pasando de 200.000 unidades a 4,8 millones de unidades.

Los mecanismos que ha utilizado *Neisseria gonorrhoeae* para disminuir su susceptibilidad a la penicilina durante los 50 años de uso han sido ampliamente descritos, estando relacionados con mutaciones en los genes implicados en la biosíntesis de la pared celular (*penA*, *ponA1*) así como en estructuras que afectan a la concentración periplasmática de dicho antibiótico (*penB*, *penC* y *mtrR*).

En 1970, algunas cepas de *N. gonorrhoeae* presentaron CMIs de hasta 128 mg/L, hecho que condujo al abandono de la penicilina en el tratamiento de la gonorrea. Estas CMI tan elevadas se debieron al desarrollo de un mecanismo de resistencia plasmídico

adicional mediado por una β -lactamasa (*bla*) codificada por el gen TEM (*bla-TEM*). A estos aislados se les clasificó como gonococos productores de penicilinasa (PPNG) caracterizándose en función de su origen geográfico (96).

En nuestra experiencia, la tasa de aislados sensibles a penicilina fue inferior al 10%, situándose la inmensa de mayoría de las cepas en la categoría de sensibilidad intermedia, dato muy similar al 84% observado de aislados aquí clasificados tras el análisis de los datos de RedMIVA. La diferencia en los puntos de corte establecidos por EUCAST y CLSI no afectó a la clasificación de las cepas, siendo en ambos casos el porcentaje de cepas sensibles inferior al 10%.

Por otro lado, el 5,6% de los aislados resistentes a dicho antimicrobiano fueron clasificados como PPNG, porcentaje similar al informado en el estudio llevado a cabo en Cataluña en el que se reportó un 9,1% de estas cepas (220). El estudio realizado por Pladevall *et al.* en el año 2016, reveló un porcentaje de sensibilidad a la penicilina del 6,1%, con una tasa de cepas PPNG de entre el 16% y el 18% (193), dato similar al 16,2% obtenido en el informe europeo del año 2016 (182), ambos superiores al observado en nuestro entorno. Otro estudio realizado en nuestro país destacó que, alrededor del 90% de las cepas presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a penicilina, y aproximadamente el 20% de los aislados mostraron resistencia plasmídica a la misma (153).

Debido a las elevadas tasas de resistencia y de la misma manera que sucede con la tetraciclina, el Euro-GASP no incluye este agente β -lactámico en sus análisis anuales, aunque sí continúa estudiando el porcentaje de cepas PPNG.

5.4.2.5. Gentamicina

Se obtuvieron 197 resultados provenientes de RedMIVA de cepas testadas frente a este aminoglucósido. Resulta interesante analizar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* frente a la gentamicina, puesto que aunque no existen *breakpoints* para el mismo, este antibiótico se postula como una posible alternativa de futuro para el

tratamiento de la gonorrea genital, faríngea y anal, tal y como posteriormente se desarrollará en el apartado de nuevos antimicrobianos (221)(222)(223).

Tras el estudio de la distribución de las CMI destacó que, aquellas comprendidas entre 3 y 4 mg/L fueron las mayoritarias (37,5%). Ante la falta de puntos de corte, Brown *et al.* aplicando criterios clínicos definieron como susceptibles aquellas cepas con CMI ≤ 4 mg/L, intermedias con CMI entre 8 y 16 mg/L, y resistentes aquellas con CMI ≥ 32 mg/L.

Atendiendo a estas premisas, el 77,7% de las estas cepas fueron sensibles y el 23,3% mostraron sensibilidad intermedia. No se encontró, sin embargo, ningún aislado con CMI superior y por tanto considerado resistente.

Estos datos son prometedores, por lo que futuros ensayos controlados podrán corroborar si el uso de gentamicina combinada con otros fármacos podrá resultar útil para el tratamiento de la infección gonocócica resistente a los tratamientos actuales.

5.4.2.6. Fosfomicina

Se estudiaron los resultados en 170 aislados de gonococo obtenidos de RedMIVA. De forma similar a lo ocurrido con la gentamicina, no existen puntos de corte asignados para este fármaco, aunque la fosfomicina se contempla como una estrategia de futuro para la gonorrea no complicada. Cabe destacar entre sus ventajas su dosificación única así como la toma por vía oral (224)(225)(226).

Se observó que predominaron los aislados con CMI entre 12 y 16 mg/L (34,7%), en contraste con aquellas cepas que presentaron una CMI ≤ 1 mg/L (0,6%). Por otro lado, se encontraron 9 aislados (5,3%) con CMI ≥ 256 mg/L.

Adicionalmente, se calculó la CMI₅₀ y la CMI₉₀ resultando en valores de 12 mg/L y 32 mg/L, respectivamente. Estos resultados, sin embargo, fueron superiores a los 8 mg/L y 16 mg/L (CMI₅₀ y CMI₉₀ respectivamente) reportados por Hauser *et al.* (227).

5.4.3. Multirresistencia

En función de la definición utilizada y de la combinación de fármacos utilizada para medir dicha resistencia combinada a *Neisseria gonorrhoeae*, se encontraron diferentes tasas de multirresistencia (214).

Así pues, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2018 y siguiendo criterios EUCAST el 13% de los aislados del proyecto GONOVig presentaron resistencia combinada a ciprofloxacino (CMI >0,06 mg/L) y a penicilina (CMI >1 mg/L), porcentaje concordante con el 19% encontrado en el estudio de Pladevall *et al.* en la región de Cataluña (193). Esta cifra fue inferior (8,7%) al estudiar la resistencia combinada de estos dos antimicrobianos con los datos obtenidos de RedMIVA.

Al analizar las cepas resistentes a ciprofloxacino, penicilina y tetraciclina, el porcentaje de multirresistencia observado fue del 11,5% y 6,5% según criterios EUCAST y CLSI, respectivamente. Atendiendo los resultados de RedMIVA y siguiendo criterios EUCAST, este porcentaje fue del 5,7%.

Teniendo en cuenta a las C3G, la tasa de resistencia múltiple a ciprofloxacino, penicilina, tetraciclina y cefixima fue del 1,9% siguiendo criterios EUCAST. No se encontró ningún aislado resistente a esta combinación de antimicrobianos según CLSI. Así mismo, no se encontraron cepas resistentes a azitromicina y C3G de forma simultánea en las cepas recogidas durante el proyecto GONOVig, aunque se analizó una cepa simultáneamente resistente a cefixima y a ceftriaxona.

En los datos recopilados por RedMIVA se observaron 2 cepas con resistencia combinada a cefixima y azitromicina, así como 1 aislado que presentó resistencia múltiple a ceftriaxona y azitromicina. En Cataluña, Cámara *et al.* describieron dos aislados con alta resistencia a ceftriaxona (109), siguiendo la definición de cepas de espectro extendido (XDR) realizada por Unemo *et al.* (86).

5.5. TRATAMIENTO DE LA GONORREA Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

La baja sensibilidad a los diferentes agentes antimicrobianos mostrada por *Neisseria gonorrhoeae* junto con la inexistencia actual de vacunas efectivas, convierten a la gonorrea en un grave problema de salud pública a nivel mundial que requiere de acciones inmediatas.

De manera global, las resistencias antibióticas constituyen un reto en el tratamiento de las infecciones causadas por estos patógenos multirresistentes. Las bacterias consiguen desarrollar esta resistencia mediante la adquisición y/o modificación de genes que les permiten sobrevivir a la acción de los agentes antimicrobianos que, de lo contrario, acabarían con ellas. Sin embargo, esta ventaja adquirida en presencia de los mismos puede implicar consecuencias negativas para estas bacterias cuando dichos antibióticos dejan de administrarse. Esto ocurre porque la resistencia generalmente afecta a genes esenciales de estos microorganismos y, una vez que se regresa a la situación inicial en un ambiente ausente de antibióticos, las bacterias pierden la capacidad de competir por su propia existencia.

Por tanto, los cambios genéticos que llevan a cabo las bacterias para asegurar su supervivencia en presencia de antibióticos afectan a su *fitness* biológico. Recientes estudios llevados en modelos animales concluyen que estos cambios y los diferentes niveles de resistencia mostrados por las bacterias se relacionan con la microbiota presente en los organismos (228). Este hecho abre una oportunidad en el tratamiento de infecciones generadas por bacterias multirresistentes con antibióticos que han estado en desuso durante largos periodos de tiempo.

5.5.1. Nuevos y viejos antimicrobianos útiles en la infección gonocócica

Mientras que el desarrollo de nuevos fármacos es a menudo complejo, la reutilización de viejos antibióticos u otros no empleados hasta ahora para el tratamiento de infecciones actuales se ha convertido en una práctica clínica habitual.

Un estudio randomizado evaluó paralelamente, en el tratamiento de la gonorrea faríngea y rectal, gentamicina a dosis de 240 mg por vía intramuscular y gemifloxacino a dosis de 320 mg por vía oral, ambos agentes combinados con azitromicina a dosis de 2 g. Los resultados se compararon con los obtenidos tras administrar el tratamiento de elección de 500 mg de ceftriaxona más 2 g de azitromicina. La asociación de gentamicina más azitromicina fue eficaz en el 100% de los casos y la asociación de gemifloxacino más azitromicina lo fue en el 99,5% de los casos. No obstante, en ambos regímenes se detectaron reacciones adversas de tipo gastrointestinal (221). Otro análisis comparó la utilidad de la asociación de gentamicina (240 mg) más azitromicina (1 g) frente al uso combinado de ceftriaxona (500 mg) y azitromicina (1 g), concluyendo que la eficacia, evaluada en función del porcentaje de curación, fue menor con el régimen gentamicina/azitromicina (91%) que con la pauta ceftriaxona/azitromicina (98%) (229).

Un estudio posterior también randomizado, evaluó la eficacia de la combinación de gentamicina (240 mg) con azitromicina (2 g), comprobando esta vez su utilidad en infecciones genitales. Esta asociación demostró ser altamente efectiva en todos los casos, destacando entre los principales efectos adversos las náuseas y vómitos, los cuales se minimizaron alimentando al paciente previamente a la instauración del tratamiento (222). La mayor eficacia mostrada en este caso se debió a la dosis superior de azitromicina empleada (223).

Puesto que se calcula que hasta un tercio del colectivo de HSH infectados con gonococo también presentan coinfección por *Chlamydia trachomatis*, ITS más prevalente a nivel mundial, esta combinación que utiliza 2 g de azitromicina supone además una ventaja frente aquellos regímenes que utilizan la dosis de 1 g (222)(230).

Dicho tratamiento puede ser utilizado tanto en casos de gonorrea multirresistente como en aquellos pacientes alérgicos a la ceftriaxona (231).

La espectinomicina, tal y como describe la bibliografía, muestra un elevado porcentaje de sensibilidad siendo en nuestra experiencia todas las cepas sensibles. Presenta entre sus inconvenientes la ineficacia en la gonorrea faríngea, su baja disponibilidad en muchos países y la gran facilidad que muestra el gonococo para generar mecanismos de evasión a la misma. Sin embargo, su combinación con azitromicina puede constituir una buena opción terapéutica, por lo que está descrita en el tratamiento alternativo del gonococo en guías como la europea (13) y la canadiense (232).

Otros antimicrobianos que se han planteado como posibles candidatos en el tratamiento en monoterapia de la gonorrea son el ertapenem intravenoso (233)(234) o la fosfomicina oral (194). Este último antimicrobiano presenta la ventaja de administrarse por vía oral en una sola dosis, hecho por el que se ha estudiado su eficacia en combinación con ceftriaxona o con azitromicina para el tratamiento de la gonorrea no complicada (227). Otros autores proponen, sin embargo, el uso de 3 dosis orales de 3 g cada una (225), a pesar de que dicha pauta puede suponer un incumplimiento del tratamiento. Por todo ello, es necesario llevar a cabo más ensayos clínicos para evaluar la eficacia de estos agentes frente al gonococo.

La búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos es un proceso complejo, lento y que requiere un gran desembolso económico. La actual era tecnológica apuesta por la inteligencia artificial, guiada por las redes neuronales y el *machine learning* para el descubrimiento mediante complejos algoritmos de moléculas altamente eficientes frente a microorganismos infecciosos polifarmacorresistentes (235)(236)(237)(238).

Existe una comisión dependiente de la OMS encargada del desarrollo de nuevos antibióticos frente a las peligrosas superbacterias que hoy en día amenazan nuestra existencia. Dicho grupo cataloga, en su informe del año 2019, de alta prioridad la búsqueda de nuevos fármacos efectivos frente a *Neisseria gonorrhoeae* (150).

Entre las nuevas moléculas que se están testando destaca el zoliflodacin (ETX0914), agente administrado por vía oral cuyo mecanismo de acción es inhibir la topoisomerasa II. Actualmente se encuentra en un ensayo clínico fase 3 para el tratamiento de la gonorrea no complicada, con la ventaja de no haberse descubierto hasta el momento reactividad cruzada con otros fármacos (239)(240)(241). También se está probando gepotidacin oral o intravenoso, con mismo mecanismo de acción que el anterior y que también se encuentra en fase 3 (242). Especial importancia reviste la solitromicina, fluoroquetólido en fase 3 perteneciente a la familia de los macrólidos con actividad similar a la telitromicina y que ha evidenciado una alta actividad frente a cepas de gonococo resistentes a azitromicina y cefalosporinas (243)(244). En adición, dicho compuesto ha demostrado mayor eficacia frente a *Mycoplasma genitalium* en comparación con azitromicina, doxiciclina y quinolonas, así como también actividad frente a *C. trachomatis* (245).

Otros fármacos con diferentes estructuras químicas también se han estudiado, destacando fluorquinolonas como el avarofloxacino, sitofloxacino y delafloxacino (246)(247), tetraciclinas como la eravaciclina (TP-434) y la tigeciclina (248), algunos carbapenems (249) y moléculas experimentales como SMT-571, prometedora frente a las cepas XDR de gonococo (250).

No obstante, se necesitan más ensayos clínicos para poder comprobar la eficacia y seguridad de estos agentes frente a las cepas resistentes de *Neisseria gonorrhoeae*.

5.5.2. Estrategias no farmacológicas frente a bacterias multiresistentes

Las altas tasas de resistencia sumadas al cada vez menor arsenal terapéutico disponible nos obligan a perseverar en la búsqueda de estrategias alternativas que erradiquen bacterias poco sensibles a los fármacos actuales, tal y como sucede con el gonococo.

Mientras que los antibióticos son sustancias químicas, los fagos se consideran parásitos estrictos de las bacterias, es decir, entidades biológicas que poseen relaciones complejas y coevolutivas con estos microorganismos. La terapia fágica o el uso de virus bacteriófagos para el tratamiento de las infecciones bacterianas existe desde hace más de 100 años. Sin embargo, esta estrategia terapéutica alternativa al uso de antibióticos presenta dificultades en su desarrollo así como en la regulación de su uso. A pesar de ello, durante los últimos 15 años se ha incrementado el número de investigadores y clínicos que apoyan esta estrategia en el contexto actual del incesante aumento de las resistencias bacterianas (251)(252)(253)(254)(255).

El uso de radiaciones ultravioleta (UV) con longitudes de onda concretas, se ha demostrado una técnica no dañina para los seres humanos pero útil en la destrucción de biofilms bacterianos presentes en ciertas infecciones crónicas. Además, el porcentaje de éxito de estas radiaciones aumenta al utilizarse en combinación con antimicrobianos (256)(257).

Por otro lado, se han estudiado los métodos que utilizan las bacterias para comunicarse entre ellas mediante la liberación en el huésped de diferentes sustancias químicas. Estas señales son capaces de modular y coordinar acciones como el crecimiento de las poblaciones bacterianas en respuesta al ambiente en el que se encuentran. El entendimiento de este proceso, denominado *quorum sensing*, puede en un futuro ser útil para atajar infecciones bacterianas diseminadas (258)(259)(260)(261).

5.6. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE GONOCOCO PERTENECIENTES AL PROYECTO GONOVIG

El segundo objetivo específico de la presente tesis consistió en la caracterización molecular de las cepas recogidas durante el proyecto GONOVig, proceso desarrollado mediante la técnica del NG-MAST (www.ng-mast.net). Dicho método, basado en el análisis de los alelos *porB* y *tbpB* del gonococo, clasifica los diferentes aislados en distintos secuenciotipos (STs).

Esta información posibilita establecer relaciones epidemiológicas entre los *clusters* encontrados en pacientes de diferente edad, sexo y orientación sexual, así como al atender a la zona geográfica de procedencia. Al entender los mecanismos de diseminación de las cepas que presentan idéntico secuenciotipo en una población concreta, es posible desarrollar estrategias de intervención dirigidas.

Por otro lado, la tipificación molecular también permite identificar ciertos patrones repetitivos que se producen al asociar un ST determinado y su perfil de sensibilidad antibiótica. De esta manera, y al conocer la información sobre la susceptibilidad de los aislados, podemos comprender qué secuenciotipos poseen tasas de resistencia más elevadas a los diferentes antimicrobianos, o bien son más susceptibles al desarrollo de mutaciones que les permitan generar resistencia a los diferentes tratamientos.

El análisis molecular de 175 cepas de dicho microorganismo, aisladas en la Comunidad Valenciana durante los años 2013 a 2018, mostró un conjunto de 86 STs diferentes. Sobre el total de cepas caracterizadas, 77 aislados pertenecieron al periodo 2013 (44%) y los 98 aislados restantes se recogieron en el periodo 2014–2018 (56%).

Por otro lado, 9 aislados no pudieron ser clasificados utilizando la base de datos disponible para ello. Así pues, se obtuvieron 6 secuencias nuevas del alelo *porB* que presentaron cierta analogía con otras secuencia preexistentes, mientras que en otras 3 cepas la combinación de ambas secuencias alélicas no correspondió a ningún ST

conocido. Esto hecho puede deberse a que ciertas cepas están mutando y, por tanto, están apareciendo nuevos secuenciotipos que deben ser investigados.

En primer lugar, cabe destacar el elevado número de STs que se presentaron en tan solo un aislado ($n = 51$), suponiendo el 59,3% del total de cepas caracterizadas. Ello puede estar relacionado con una localización subóptima de los contactos de las personas infectadas, circunstancia que acontece si no se realiza un adecuado seguimiento de estos pacientes y de sus contactos sexuales. Otra posibilidad es que el diagnóstico y tratamiento de los mismos se lleve a cabo en centros donde no se realice el cultivo ni, consecuentemente, el posterior estudio molecular de estas cepas.

Los resultados moleculares obtenidos, como posteriormente se detallará, revelan que la población de *N. gonorrhoeae* circulante en la Comunidad Valenciana muestra similitudes con cepas aisladas en otras zonas geográficas de nuestro país e incluso, en algunos casos, de Europa y del mundo. En otras ocasiones, sin embargo, se presentan secuenciotipos que hasta nuestro conocimiento no se han descrito anteriormente.

5.6.1. Secuenciotipos y genogrupos mayoritarios, relación con sensibilidad antibiótica y características demográficas

A continuación, se detallan los STs más frecuentes de nuestro estudio relacionándolos con el resto de información recabada. La edad media de los 51 pacientes de los que provinieron estas cepas fue de 29,4 años, 48 fueron hombres (94,1%) y 3 mujeres (5,9%). Sobre el total de cepas pertenecientes a estos STs, 34 se recogieron en el año 2013 (66,7%), 9 en el 2014 (17,6%), 3 en el 2015 (5,9%), 3 en el 2016 (5,9%) y 2 en el 2018 (3,9%). Respecto a su origen, 45 aislados procedieron de hospitales situados en Valencia (88,2%) y 6 cepas de centros ubicados en la provincia de Castellón (11,8%).

El **ST2992** ha conformado el secuenciotipo más prevalente en nuestro área (7,4%), hallándose presente también en otros estudios epidemiológicos de nuestro país como Cataluña (82), Andalucía (163) y Bilbao (262). Así mismo, ha sido encontrado

en el resto de Europa, constituyendo el ST más frecuente en Irlanda y Noruega, y siendo el segundo ST más prevalente en muchos de los países de la unión europea evaluados por el Euro-GASP, como Francia, Italia (144) y Alemania (263).

Respecto al perfil antibiótico, cabe señalar el estudio de Cobo *et al.* desarrollado en el sur de España, en el que de los 4 aislados allí detectados pertenecientes al ST2992, 1 de ellos fue resistente tanto a cefixima como a azitromicina (163). En nuestro estudio, se encontraron 13 cepas aquí incluidas, una de las cuales presentó resistencia a ceftriaxona (CMI 0,75 mg/L) y 5 de ellas fueron resistentes a tetraciclina. Todos los aislados se recogieron durante los años 2013 y 2014, a excepción de uno obtenido en el año 2018, y mayoritariamente en hospitales de la provincia de Valencia.

Estos datos revelan que se trata de un ST ampliamente distribuido tanto por Europa como por España, y que ha demostrado poseer la capacidad de representar un riesgo importante en la susceptibilidad de las C3G. Tanto los estudios europeos como los realizados en España afirman que, dicho ST, está altamente relacionado con hombres que practican sexo con hombres (HSH) (144)(193)(262).

El segundo secuenciotipo más frecuente en nuestro análisis fue el **ST3378**, el cual estuvo presente en el 6,9% de las cepas estudiadas. Dicho ST ha sido descrito por el Euro-GASP como muy prevalente en España, Francia e Hungría (264), así como en el norte de España (195). Además, este ST pertenece al genogrupo G1407, el mayor genogrupo encontrado en Europa con alta predisposición a conllevar baja sensibilidad a las C3G (144).

En nuestra experiencia, de los 12 aislados aquí clasificados y obtenidos en los años 2013 y 2014, uno de ellos fue resistente a cefixima (CMI 0,19 mg/L) según criterios EUCAST, mientras que otro aislado presentó una CMI de 4 mg/L frente a azitromicina, clasificándose por tanto como *non-wild-type*. Además, todas las cepas fueron resistentes a ciprofloxacino ($p = 0,02$) y a penicilina, y la mitad de ellas presentaron resistencia a tetraciclina. El conjunto de estas cepas fue obtenido en 6 hospitales distintos situados en las provincias de Valencia y Castellón.

En Francia, se encontró una cepa con ST3378 resistente simultáneamente a cefixima (CMI 0,25 mg/L), azitromicina (CMI 1,5 mg/L), ciprofloxacino, penicilina y tetraciclina (265). Dicho secuenciotipo fue el tercero más prevalente entre cepas de *Neisseria gonorrhoeae* que presentaron sensibilidad disminuida a ESC, resultado que se obtuvo en estudios moleculares llevados a cabo en Suecia (266) y Argentina (267).

Por su parte, el **ST13288** supuso en el 6,9% del conjunto de aislados analizados. Las 12 cepas aquí englobadas se recogieron durante los años 2013 y 2014, y provinieron de 4 hospitales localizados únicamente en la provincia de Valencia, predominando el Hospital Clínico entre ellos.

Respecto a su perfil antibiótico, destacó que 3 de estos aislados fueron resistentes a cefixima, siendo esta asociación estadísticamente significativa ($p = 0,032$), presentado uno de ellos una CMI de 0,19 mg/L y los dos restantes una CMI de 0,25 mg/L frente a esta C3G. En adición, la totalidad de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacino ($p < 0,01$) y una tercera parte también lo fue a tetraciclina.

Hasta donde sabemos, dicho ST no ha sido descrito anteriormente en otros estudios de carácter nacional ni internacional, hecho que indicaría que se trata de un secuenciotipo que podría circular particularmente en nuestro entorno. La presencia de 3 cepas resistentes a cefixima nos alerta de la posible aparición de un clon exclusivo en nuestro área con capacidad potencial para amenazar la efectividad del tratamiento empírico de la gonorrea. No obstante, y debido a los años a los que pertenecen dichas cepas, puede suceder que las mismas hayan sido eliminadas gracias al tratamiento dual establecido en España a partir del año 2012. Sería conveniente por tanto, realizar más estudios tanto en nuestra comunidad así como en otras regiones de España para poder realizar un seguimiento de dicho secuenciotipo.

Siguiendo el orden de frecuencia, el siguiente secuenciotipo fue el **ST2400**, representando el 4,6% del total de aislados recogidos. Dicho ST fue también muy prevalente en el estudio realizado en Cataluña (193) y en el área de Bilbao, donde mostraron una alta relación con HSH (262). De la misma manera, ha sido descrito en el norte de nuestro país, donde presentó una elevada resistencia a quinolonas y altas

CMI frente a cefixima (195). Guerrero-Torres *et al.* realizó un estudio con cepas de gonococo recogidas en Madrid, cuyos resultados ratificaron la frecuente relación entre este ST y la resistencia a quinolonas y a tetraciclina (203). Este secuenciotipo también se observó, aunque en menor medida, en algunos países Europeos (144) tales como Francia, Dinamarca, Italia, Groenlandia, Irlanda, Noruega, Bélgica y Polonia (268) e incluso Canadá (269).

En nuestro estudio, estas 8 cepas fueron recogidas durante el periodo 2013 – 2016 en 4 hospitales de la provincia de Valencia. De forma paralela a la información publicada, todas ellas fueron resistentes a ciprofloxacino ($p = 0,017$) y 6 también lo fueron a tetraciclina ($p = 0,048$). Además, en nuestra experiencia, este secuenciotipo estuvo presente en pacientes jóvenes con una edad promedio de 24 años ($p = 0,033$) y, por tanto, inferior a la media global obtenida tanto en las cepas del proyecto GONOVig (30,7 años) como de RedMIVA (31,4 años). No se obtuvo en nuestro análisis ninguna cepa resistente a C3G aquí incluida.

Por último, el **ST5441** supuso el 3,4% del total de nuestras cepas tipificadas. Dicho secuenciotipo también fue uno de los más prevalentes en el estudio realizado en el norte de España (195) así como en el estudio llevado a cabo en Madrid por Torres *et al.* (203). Además de su circulación en nuestro país, el Euro-GASP reportó que dicho ST estuvo presente en países como Francia, Alemania, Austria o Bélgica (264).

En este caso, los 6 aislados aquí englobados presentaron alta susceptibilidad a los 7 antibióticos testados, a excepción de una cepa recogida en el año 2018 que presentó una CMI de 6 mg/L frente a azitromicina. Cabe destacar que el periodo de aparición de estos aislados fue posterior a los anteriormente descritos, correspondiendo su obtención a los años 2015, 2016 y 2018.

Estos datos revelan que se trata de un secuenciotipo de más moderna aparición y que, tal y como exhibe la última cepa analizada, dicho ST puede estar presente en cepas con altas CMIs frente a la azitromicina, hecho que podría implicar fracasos en el tratamiento actual de la gonorrea. Por ello, consideramos muy necesario seguir

evaluando las características moleculares así como la sensibilidad antimicrobiana asociada de las cepas actualmente circulantes de la Comunidad Valenciana.

A pesar de que dichos ST han constituido los de mayor relevancia en nuestro análisis, especial importancia reviste el **ST1407**, el cual se ha descrito como el más prevalente tanto en nuestro país (82)(195)(188) como en Europa (264)(144). Además, dicho secuenciotipo presenta a nivel global una alta tasa de resistencias a las ESC (262)(86)(270)(94)(169)(109)(271)(272). Por este motivo, es considerado un clon especialmente comprometedor, tanto por su alta diseminación como por su baja susceptibilidad al tratamiento actual.

En nuestra experiencia, tan solo se encontraron 2 aislados con dicho ST. No obstante, uno de ellos presentó resistencia a cefixima (CMI 0,19 mg/L), a ciprofloxacino y a tetraciclina, datos que concuerdan con las elevadas tasas de resistencia aportadas por los diferentes estudios realizados. Por tanto, y aunque en nuestro área no fue altamente prevalente, es necesario seguir controlando la presencia, sensibilidad y evolución de este ST.

Cabe destacar el **ST437**, muy similar al ST225, presente en 4 aislados (2,3%) los cuales exhibieron en su totalidad resistencia a tetraciclina ($p = 0,41$), ciprofloxacino y penicilina. Dicho ST ha sido descrito frecuentemente en otros estudios españoles (262) y europeos, especialmente en Suecia y Malta (144).

Otros secuenciotipos que representaron más del 2% del total de cepas analizadas fueron el **ST21**, reportado como el cuarto más prevalente en España en el año 2013 y encontrado en otros países europeos (268), ST que en nuestro entorno estuvo vinculado a pacientes jóvenes con una edad promedio de 22 años ($p = 0,033$).

También destacaron el **ST387** y **ST4809**, presentes en España (262)(195)(188) y Europa (144) y el **ST11547**, perteneciente en nuestro análisis a pacientes con una edad media de 41 años ($p = 0,033$) y por tanto superior al promedio de todo el estudio, descrito con anterioridad en el área de Navarra (273). Por otro lado, aquí también fue incluido el **ST5118**, previamente registrado en el área de Bilbao (262).

Por otro lado, se analizaron los genogrupos más frecuentes, estando estos constituidos por un conjunto de secuenciotipos que poseen un alto porcentaje de concordancia molecular entre ellos. Estos genogrupos están representados por un ST que se considera mayoritario y da nombre a dicha agrupación.

En nuestra experiencia, del total de cepas caracterizadas, 23 aislados pertenecieron al **G1407** (13,1%) y otros 18 al **G2992** (10,3%), conformando estos dos los principales genogrupos de nuestro análisis. En tercer lugar destacó el **G2400**, al que pertenecieron un total de 11 cepas (6,3%) seguido del **G387** (3,4%), en el que se incluyeron 6 cepas.

Tras estudiar la literatura científica relacionada con los genogrupos mayoritarios de España y Europa, en ella se destaca el genogrupo G1407, más prevalente a nivel europeo y estrechamente asociado a casos de fracaso terapéutico en Francia (94), España (109), Eslovenia (75), Noruega (170), Austria (72) y Reino Unido (95). En nuestro análisis, su alta prevalencia vino definida por las 12 cepas pertenecientes al ST3378 aquí incluidas, entre las que se encontró una cepa resistente a cefixima y otra a azitromicina, tal y como se ha explicado anteriormente.

Chisholm *et al.* realizaron la tipificación molecular de 1.066 cepas de *N. gonorrhoeae* obtenidas en 21 países europeos participantes en el “*European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*” durante los años 2009 y 2010 (144). El estudio concluyó que, en nuestro país, el genogrupo más prevalente fue el G1407 seguido del G2992, tal y como corroboran los resultados obtenidos en nuestra investigación.

El ECDC informó que, a nivel europeo, el G1407 fue el más prevalente en el análisis del año 2009 (23,3%) aunque su presencia disminuyó en el año 2013 (14,8%) (264). Este mismo estudio informó que el G2992 conformó el segundo genogrupo más frecuente en Europa, estadísticamente asociado al sexo masculino, población HSH y pacientes de mayor edad. Esta misma asociación también ha sido reportada por estudios realizados en España (195). Nuestros resultados siguieron un patrón similar, confirmando una tendencia a la baja del G1407 y un aumento del G2992.

Respecto al G2400 y el alarmante aumento de aislados aquí clasificados, se trata de un hallazgo ya constatado por el estudio realizado por Pladevall *et al.* en el que se informó que, de la misma manera que sucede con el G1407, dicho genogrupo no solo es altamente frecuente sino que posee mayor facilidad en el desarrollo de resistencias bacterianas (11)(193).

Por su parte, el G387 (3,4%) presentó en nuestro análisis unas tasas muy similares a las reportadas en los estudios europeos anteriormente mencionados, los cuales informaron porcentajes del 3% y 2,5%, respectivamente (144)(264).

5.6.2. Resistencia antimicrobiana y secuenciotipos asociados

Las cepas que atendiendo criterios EUCAST mostraron resistencia a un determinado antibiótico, fueron relacionadas con el secuenciotipo obtenido durante la tipificación molecular, pudiendo extraer las siguientes conclusiones:

De las 12 cepas resistentes a azitromicina (CMI >1 mg/L), 4 de ellas (33,3%) pertenecieron al ST4809 ($p < 0,001$), exhibiendo por tanto este secuenciotipo una alta asociación con cepas insensibles a dicho macrólido. Estos aislados presentaron en concreto una CMI de entre 3 y 6 mg/L, y fueron tomados en el año 2013. Dicho secuenciotipo no ha sido descrito hasta el momento como característicamente resistente a este antimicrobiano, aunque sí como frecuente y exclusivo de nuestro país, tal y como reporta el informe del *European Centre for Disease Prevention and Control* del año 2018 (264). Estas cepas fueron sensibles a C3G, pero mostraron resistencia a ciprofloxacino, tetraciclina y penicilina.

Por otro lado, se encontraron dos cepas con ST4186, el cual ha sido informado por presentar altas CMI frente a azitromicina (274) y una cepa con ST3378 perteneciente al G1407, genogrupo destacado por mostrar habitualmente resistencia no solo a C3G sino también a la azitromicina (186). El ST6765 fue encontrado en una cepa resistente a azitromicina (CMI 8 mg/L), ST también reportado como resistente a

dicho antibiótico en el informe canadiense de susceptibilidad antibiótica a *N. gonorrhoeae* del año 2014 (275).

Respecto a las cepas resistentes a cefixima, en 3 de ellas fueron caracterizadas con el ST13288 ($p = 0,032$), no descrito hasta el momento según nuestros datos y ampliamente distribuido en nuestra zona como se ha explicado anteriormente. Otras de estas cepas presentaron el ST1407 y ST3378, ambas pertenecientes al genogrupo G1407, altamente prevalente y descrito con mecanismos de resistencia a las C3G. Un aislado poseyó el ST1034 (englobado dentro del G21) con una CMI 0,5 mg/L, descrito en España y varios países europeos, pero nunca reportado como resistente a las C3G (264). Cabe destacar que esta misma cepa encontrada con ST1034 resultó resistente a ceftriaxona. Finalmente, el ST11547 se encontró en 4 cepas de las que tan solo una de ellas (CMI 0,19 mg/L) fue resistente a cefixima.

Un dato observado referente a los ST de las cepas resistentes a cefixima es que estas presentaron una cierta homología en el alelo que codifica la transferrina tipo b del gonococo (*tbpB*). Estos alelos fueron el 10 (57%), 110 (29%) y 33 (14%). Ello nos hace pensar que dicha proteína tiene un papel esencial en la disminución de la susceptibilidad a cefixima, por lo que diferentes secuenciotipos con alelos *tbpB* similares pueden compartir resistencia a dicho agente.

Respecto a las 4 cepas caracterizadas resistentes a ceftriaxona, todas ellas mostraron secuenciotipos diferentes. Destaca el aislado que presentó una mayor resistencia (CMI 0,75 mg/L), perteneciente al ST2992, el secuenciotipo más frecuente del estudio y representante principal del G2992, el segundo genogrupo más prevalente en nuestro área.

Por otro lado, la cepa con ST1034 con CMI frente a ceftriaxona de 0,25 mg/L que también presentó resistencia a cefixima (CMI 0,5 mg/L). Este hallazgo es importante y consideramos que se debería seguir estudiando. Las dos cepas restantes pertenecieron al ST12547, encontrado en un estudio en nuestro país aunque sin resistencia a ceftriaxona (203) y al ST13252 no descrito hasta nuestro conocimiento.

En cuanto a la caracterización molecular de los aislados resistentes a ciprofloxacino y tetraciclina se descubre que, la resistencia a ambos antibióticos, es compartida por multitud de secuenciotipos. Este es caso del ST3378 estadísticamente relacionado con resistencia a dicha quinolona ($p = 0,02$) analizado anteriormente, así como del ST2400 que mostró resistencia a ciprofloxacino ($p = 0,017$) y a tetraciclina ($p = 0,048$), el ST13288 y el ST4809. El ST437, que también fue relativamente frecuente en nuestro estudio (2,3%), ha sido informado en diferentes países europeos relacionado también con la resistencia a ciprofloxacino y tetraciclina ($p = 0,041$) (121).

Al realizar el análisis concreto del ciprofloxacino, el ST13288 ($p < 0,01$) fue el más frecuente (46,3%) de entre las cepas resistentes a dicha quinolona. Respecto a la resistencia particular a tetraciclina, destacó el ST2992 (G2992).

Como conclusión, de estos hallazgos se desprende que los secuenciotipos más prevalentes mostraron resistencia a ambos fármacos, circunstancia que explica que las tasas de resistencias del gonococo a estos antimicrobianos sean tan elevadas en la actualidad.

De forma similar, las cepas resistentes a penicilina se tipificaron dentro del ST2992, ST13288, ST3378 y ST2400, hecho que concuerda con su baja sensibilidad actual frente a *N. gonorrhoeae*.

5.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y FINANCIACIÓN RECIBIDA

La principal limitación de los resultados que componen el presente estudio reside en el hecho de que las cepas analizadas pertenecen en su totalidad al área de la Comunidad Valenciana, siendo por tanto particulares de esta zona. Es por ello necesario seguir estudiando al agente causal de la gonorrea en diferentes áreas geográficas y con el mayor número de aislados posibles. No obstante, tal y como se ha podido comprobar, los patrones de sensibilidad obtenidos frente a los diferentes antimicrobianos así como los secuenciotipos y genogrupos mayoritarios en nuestro análisis son, en muchos casos, representativos de otros estudios desarrollados en España y Europa. Por otro lado, se desconoció la orientación sexual de los pacientes englobados en el proyecto GONOVig, información que puede resultar de utilidad a la hora de establecer relaciones epidemiológicas.

El proyecto GONOVig recibió en dos ocasiones financiación obtenida a través de becas de apoyo a la investigación. Estas ayudas permitieron la compra del material y de los medios necesarios para la realización de la fase experimental del estudio.

En el año 2012, el Hospital Universitario de La Ribera concedió la primera de estas becas al proyecto GONOVig, con el objetivo de facilitar la recogida de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y estudiar su sensibilidad frente a los diferentes antibióticos descritos. Los datos resultantes fueron expuestos en diferentes congresos de ámbito científico.

En el año 2017, y tras los datos inicialmente obtenidos, el Hospital Universitario de La Ribera concedió una segunda beca al proyecto GONOVig que posibilitó continuar con la última etapa del estudio, concluyendo esta investigación con los resultados expuestos en la presente Tesis. En este momento, con un número de cepas mucho mayor, se prosiguió con el análisis de la sensibilidad antimicrobiana del gonococo y se llevó a cabo la caracterización molecular de los aislados mediante la técnica del NG-MAST.

6. CONCLUSIONES

A. La incidencia de la infección gonocócica en la Comunidad Valenciana ha mostrado una clara tendencia ascendente durante el periodo 2013 – 2019, observándose un importante incremento de los casos de gonorrea en las provincias de Valencia, Alicante y Castellón, especialmente en el último año de estudio.

B. La resistencia media a cefixima durante el proyecto GONOVig fue del 6%, resultando del 5,2% al analizar los datos de RedMIVA. En ambos casos, se constató una disminución paulatina de dicha resistencia durante los años de estudio. Se observó una diferencia notable en la clasificación de las cepas como consecuencia de los distintos criterios establecidos por EUCAST y CLSI.

C. La tasa de resistencia a ceftriaxona se mantuvo baja, cercana al 2% y con pequeñas variaciones en función de los criterios utilizados para su clasificación. Las cepas provenientes de RedMIVA presentaron una resistencia media del 1,6%, mostrando un descenso progresivo de la misma durante el periodo estudiado.

D. El porcentaje de aislados con sensibilidad intermedia o resistencia a la penicilina se mantuvo elevado, oscilando entre el 80 y el 90%. Un 5,6% de las cepas fueron productoras de β -lactamasa.

E. El porcentaje medio de cepas con CMI >1 mg/L frente azitromicina fue del 6% en aislados del proyecto GONOVig. El análisis de los datos de RedMIVA resultó en un 9,5% sobre el total de los aislados estudiados. En ambas ocasiones, se registró una continua elevación en el número de cepas *non-wild-type* resistentes a dicho macrólido a lo largo del estudio.

F. La tasa media de resistencia a ciprofloxacino fue cercana al 50% en todos los aislados analizados, sin observarse grandes diferencias entre los dos periodos de estudio ni entre los criterios establecidos por ambas sociedades.

- G.** El 100% de las cepas analizadas fueron sensibles a espectinomicina.
- H.** La resistencia promedio obtenida frente a tetraciclina fue del 51% según criterios EUCAST y en cepas provenientes del proyecto GONOVig. Este porcentaje en cepas obtenidas de RedMIVA resultó del 39,1%. En ambos casos, se observó una ligera disminución en dicha tasa de resistencia durante los últimos años de estudio.
- I.** Los secuenciotipos más frecuentemente encontrados en nuestra experiencia fueron, en orden decreciente, el ST2992, ST3378, ST13288, ST2400 y el ST5441, mostrando la mayoría de ellos relación con cepas resistentes a ciprofloxacino, tetraciclina y penicilina. Este hecho explica la alta resistencia que posee actualmente el gonococo a dichos antimicrobianos.
- J.** El ST13288, característico en nuestro área y que supuso aproximadamente el 7% de las cepas incluidas en el proyecto GONOVig, se asoció con aislados que mostraron resistencia frente a cefixima.
- K.** El ST1407, en nuestra experiencia, tan solo estuvo presente en 2 aislados, resultando uno de ellos resistente a cefixima.
- L.** Los genogrupos más prevalentes del conjunto de cepas caracterizadas molecularmente fueron el G1407, G2992, G2400 y el G387.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization (WHO). 2018 Report on global sexually transmitted infection surveillance [Internet]. Geneva; 2018. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277258/9789241565691-eng.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). 69.^a Asamblea Mundial De La Salud [Internet]. Ginebra; 2016. Disponible en: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69-REC1/A69_2016_REC1-sp.pdf
3. Newman L, Rowley J, Hoorn S Vander, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS One*. 2015;10(12):1-17.
4. Rowley J, Hoorn S Vander, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 2019;97(8):548-562P.
5. World Health Organization (WHO). Guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. 2016; Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246114/9789241549691-eng.pdf>
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually Transmitted Diseases Surveillance - Gonorrhea [Internet]. 2017 [citado 1 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/stats17/Gonorrhea.htm>
7. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. *Future Microbiol*. 2012;7(12):1401-22.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom and Australia [Internet]. Stockholm; 2018. Disponible en: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-Gonorrhoea%2C Antimicrobial resistance-United Kingdom%2C Australia.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-Gonorrhoea%2C%20Antimicrobial%20resistance-United%20Kingdom%2C%20Australia.pdf)
9. Wi T, Lahra MM, Ndowa F, Bala M, Dillon JAR, Ramon-Pardo P, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. *PLoS Med*. 2017;14(7):1-16.

10. 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. *Eurosurveillance*. 2018;23(47):1-4.
11. Serra-Pladevall J, Barberá MJ, Rodríguez S, Bartolomé-Comas R, Roig G, Juvé 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*. 2016;35(9):1549-56.
12. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines (CDC). 2015;64(3):1-137.
13. Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*. 2013;24(2):85-92.
14. Bignell C, Fitzgerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS*. 2011;22(10):541-7.
15. Whiley DM, Jennison A, Pearson J, Lahra MM. Genetic characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to both ceftriaxone and azithromycin. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(7):717-8.
16. Martin I, Sawatzky P, Allen V, Lefebvre B, Hoang L, Naidu P, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada, 2012–2016. *Canada Commun Dis Rep*. 2019;45(2-3):45-53.
17. 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. *Eurosurveillance*. 2018;23(27):1-6.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018 [Internet]. ECDC. Stockholm; 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial-consumption-EU-EEA.pdf>

19. Bovre K. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N. R. Krieg and J. G. Holt, editor. Baltimore: The Williams & Wilkins; 1984. 288-290 p.
20. Tønjum T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2.^a ed. Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R. SJR, editor. Springer-Verlag; 2005. 777–798 p.
21. Rotman E, Seifert HS. The Genetics of Neisseria Species. *Annu Rev Genet.* 2014;48:405-31.
22. Caugant DA, Brynildsrud OB. Neisseria meningitidis: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):84-96.
23. Jeanne M. Marrazzo MAA. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8.^a ed. John E. Bennett RD and MJB, editor. 2014. 2446-2462 p.
24. Elias J, Frosch M VU. Manual of Clinical Microbiology. 11.^a ed. Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S WD, editor. Washington: ASM Press; 2015. 635-651 p.
25. Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(5):363-78.
26. Banerjee S, Parker Siburt CJ, Mistry S, Noto JM, Dearmond P, Fitzgerald MC, et al. Evidence of Fe 3+ interaction with the plug domain of the outer membrane transferrin receptor protein of Neisseria gonorrhoeae: Implications for Fe transport. *Metallomics.* 2012;4(4):361-72.
27. Quillin SJ, Seifert HS. Neisseria gonorrhoeae host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(4):226-40.
28. Noble RC, Cooper RM, Miller BR. Pharyngeal colonisation by Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis in black and white patients attending a venereal disease clinic. *Br J Vener Dis.* 1979;55(1):14–19.
29. Danby CS, Cosentino LA, Rabe LK, Priest CL, Damare KC, Macio IS, et al. Patterns of Extragenital Chlamydia and Gonorrhea in Women and Men Who Have Sex with Men Reporting a History of Receptive Anal Intercourse. *Sex Transm Dis.* 2016;43(2):105-9.
30. Lee JS, Choi HY, Lee JE, Lee SH, Oum BS. Gonococcal keratoconjunctivitis in

- adults. *Eye*. 2002;16(5):646-9.
31. Edwards JL, Apicella MA. The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):965-81.
 32. Virji M. Pathogenic neisseriae: Surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(4):274-86.
 33. Harvey HA, Porat N, Campbell CA, Jennings M, Gibson BW, Phillips NJ, et al. Gonococcal lipooligosaccharide is a ligand for the asialoglycoprotein receptor on human sperm. *Mol Microbiol*. 2000;36(5):1059-70.
 34. Xiong M, Lan L, Feng T, Zhao G, Wang F, Hong F, et al. Analysis of the sex ratio of reported gonorrhoea incidence in Shenzhen, China. *BMJ Open*. 2016;6(3):1-8.
 35. Muzny CA, Harbison HS, Austin EL, Schwebke JR, Van Der Pol B, Hook EW. Sexually Transmitted Infection Risk among Women Is Not Fully Explained by Partner Numbers. *South Med J*. 2017;110(3):161-7.
 36. Gottlieb SL, Deal CD, Giersing B, Rees H, Bolan G, Johnston C, et al. The global roadmap for advancing development of vaccines against sexually transmitted infections: Update and next steps. *Vaccine*. 2016;34(26):2939-47.
 37. 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;189(8):1497-505.
 38. Jerse AE, Deal CD. Vaccine research for gonococcal infections: Where are we? *Sex Transm Infect*. 2013;89(Suppl4):iv63-8.
 39. Shewell LK, Ku SC, Schulz BL, Jen FEC, Mubaiwa TD, Ketterer MR, et al. Recombinant truncated AniA of pathogenic *Neisseria* elicits a non-native immune response and functional blocking antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431(2):215-20.
 40. 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*. 2017;390(10102):P1603-1610.
 41. Gottlieb SL, Jerse AE, Delany-Moretlwe S, Deal C, Giersing BK. Advancing vaccine

- development for gonorrhoea and the Global STI Vaccine Roadmap. *Sex Health*. 2019;16(5):426-32.
42. Laura Mitchell, Bridie Howe, D. Ashley Price, Babiker Elawad KNS. Oxford Handbook of Genitourinary Medicine, HIV, and Sexual Health. 3.^a ed. Oxford University Press. Oxford; 2019. 137-148 p.
 43. Barberá MJ, Serra-Pladevall J. Infección gonocócica: un problema aún sin resolver. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(7).
 44. Hook III E, Handsfield H. Gonococcal Infections in Adolescents and Adults [Internet]. Sexually transmitted diseases. 2015 [citado 19 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/gonorrhea.htm>
 45. Morris GC, Stewart CMW, Schoeman SA, Wilson JD. A cross-sectional study showing differences in the clinical diagnosis of pelvic inflammatory disease according to the experience of clinicians: Implications for training and audit. *Sex Transm Infect*. 2014;90(6):445-51.
 46. Mayor MT, Roett MA, Uduhiri KA. Diagnosis and management of gonococcal infections. *Am Fam Physician*. 2012;86(10):931-8.
 47. Peters RPH, Nijsten N, Mutsaers J, Jansen CL, Morré SA, Van Leeuwen AP. Screening of oropharynx and anorectum increases prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection in female STD clinic visitors. *Sex Transm Dis*. 2011;38(9):783-7.
 48. Bleich AT, Sheffield JS, Wendel GD, Sigman A, Cunningham FG. Disseminated gonococcal infection in women. *Obstet Gynecol*. 2012;119(3):597-602.
 49. Serra-Pladevall J, Gulín Blanco C, Vila Olmo N, Arjona Camacho P, Andreu Domingo A. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae*: should swabs be refrigerated or not?: *Neisseria gonorrhoeae* preservation. *J Microbiol Methods*. 2018;145:37-9.
 50. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* - 2014. *MMWR Recomm Reports*. 63(RR02):1-19.
 51. Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis*. 2005;16(1):15-25.

52. 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* Clinical microbiology and vaccines. *BMC Microbiol.* 2015;15:142.
53. Schweitzer VA, Van Dam AP, Hananta IPY, Schuurman R, Kusters JG, Rentenaar RJ. Identification of *neisseria gonorrhoeae* by the bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system is improved by a database extension. *J Clin Microbiol.* 2016;54(4):1130–1132.
54. Morel F, Jacquier H, Desroches M, Fihman V, Kumanski S, Cambau E, et al. Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(12):2273-7.
55. Meyer T, Buder S. The laboratory diagnosis of *neisseria gonorrhoeae*: Current testing and future demands. *Pathogens.* 2020;9(2):1-19.
56. Martin DH, Cammarata C, Van der Pol B, Jones RB, Quinn TC, Gaydos CA, et al. Multicenter evaluation of AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(10):3544–3549.
57. Van der Pol B, Ferrero D V., Buck-Barrington L, Hook E, Lenderman C, Quinn T, et al. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):1008-17.
58. Van Doornum GJJ, Schouls LM, Pijl A, Cairo I, Buimer M, Bruisten S. Comparison between the LCx probe system and the COBAS AMPLICOR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in patients attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):829-35.
59. Unemo M, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus [Internet]. World Health Organization. 2013. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840_eng.pdf?sequence=1

60. Bartlett JG. False-positive gonorrhoea test results with a nucleic acid amplification test: The impact of low prevalence on positive predictive value. *Infect Dis Clin Pract.* 2004;38(6):814-9.
61. Guy RJ, Causer LM, Klausner JD, Unemo M, Toskin I, Azzini AM, et al. Performance and operational characteristics of point-of-care tests for the diagnosis of urogenital gonococcal infections. *Sex Transm Infect.* 2017;93(S4):S16-21.
62. Abbai NS, Moodley P, Reddy T, Zondi TG, Rambaran S, Naidoo K, et al. Clinical evaluation of the OneStep Gonorrhoea RapiCard InstaTest for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in symptomatic patients from KwaZulu-Natal, South Africa. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1348-50.
63. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100 30th edition. 2020.
64. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020 [Internet]. 2020. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf
65. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial del sector de la salud contra las Infecciones de Transmisión Sexual 2016 - 2021 [Internet]. 2016. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250253/WHO-RHR-16.09-spa.pdf;jsessionid=EA0FE7909CD42C79D2B6D005DF90BE2A?sequence=1>
66. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonorrhoea Annual Epidemiological Report for 2017 [Internet]. Stockholm; 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2017.pdf>
67. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Sexually transmitted infections in Europe 2012 [Internet]. Stockholm; 2014. Disponible en:

- <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/sexually-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2012.pdf>
68. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones de Transmisión Sexual, 2018 [Internet]. Madrid; 2020. Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos_A-Z/informes_anteriores_en_transmisión_sexual/Vigilancia_ITS_1995_2018_def.pdf
 69. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones de Transmisión Sexual, 2017 [Internet]. Madrid; 2019. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/Vigilancia_ITS_1995_2017_def.pdf
 70. Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhoea: The impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(4):555-77.
 71. Bolan GA, Sparling PF, Wasserheit JN. The emerging threat of untreatable gonococcal infection. *N Engl J Med*. 2012;366(6):485-7.
 72. Unemo M, Golparian D, Stary A, Eigentler A. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Eurosurveillance*. 2011;16(43):1-3.
 73. Unemo M, Golparian D, Hestner A. Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden, July 2010. *Eurosurveillance*. 2011;16(6):1-3.
 74. Golparian D, Ohlsson AK, Janson H, Lidbrink P, Richtner T, Ekelund O, et al. Four treatment failures of pharyngeal gonorrhoea with ceftriaxone (500 Mg) or cefotaxime (500 Mg), Sweden, 2013 and 2011. *Eurosurveillance*. 2015;19(3):1-4.
 75. Unemo M, Golparian D, Potočnik M, Jeverica S. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. *Eurosurveillance*. 2012;17(25):1-3.
 76. Morita-Ishihara T, Unemo M, Furubayashi KI, Kawahata T, Shimuta K, Nakayama SI, et al. Treatment failure with 2 g of azithromycin (extended-release formulation) in gonorrhoea in Japan caused by the international multidrug-resistant ST1407 strain of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*.

- 2014;69(8):2086-90.
77. L. Barbee, O. Soge J. Dombrowsky et al. Azithromycin-resistant neisseria gonorrhoeae in men who have sex with men (MSM) in Seattle, Washington: 2014-2015. *Sex Transm Infect.* 2015;66(5):712–718.
 78. Berçot B, Belkacem A, Goubard A, Mougari F, Sednaoui P, La Ruche G, et al. High-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolate in France, March 2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(44):1-3.
 79. Deguchi T, Yasuda M, Yokoi S, Ishida KI, Ito M, Ishihara S, et al. Treatment of uncomplicated gonococcal urethritis by double-dosing of 200mg cefixime at a 6-h interval. *J Infect Chemother.* 2003;9(1):35-9.
 80. Yokoi S, Deguchi T, Ozawa T, Yasuda M, Ito SI, Kubota Y, et al. Threat to cefixime treatment for gonorrhea. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(8):1275-7.
 81. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2017 [Internet]. Stockholm; 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Euro-GASP-2017.pdf>
 82. Serra-Pladevall J, Barberá-Gracia MJ, Roig-Carbajosa G, Juvé-Saumell R, Gonzalez-Lopez JJ, Bartolomé-Comas R, et al. *Neisseria gonorrhoeae*: Antimicrobial resistance and study of population dynamics. Situation in Barcelona in 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(9):579-83.
 83. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017 [Internet]. CDC. Atlanta; 2018. Disponible en: https://www.cdc.gov/std/stats17/2017-STD-Surveillance-Report_CDC-clearance-9.10.18.pdf
 84. Frieden TR, Harold Jaffe DW, Rasmussen SA, Leahy MA, Martinroe JC, Spriggs SR, et al. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. 2015;64(3):60. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/tg-2015-print.pdf>
 85. Health Ontario P. Ontario Gonorrhea Testing and Treatment Guide, 2nd Edition Guide, 2018 [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/guide-gonorrhea-testing-treatment.pdf?la=en>

86. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):587–613.
87. Kim WJ, Higashi D, Goytia M, Rendón MA, Pilligua-Lucas M, Bronnimann M, et al. Commensal *Neisseria* Kill *Neisseria gonorrhoeae* through a DNA-Dependent Mechanism. *Cell Host Microbe.* 2019;26(2):228-39.
88. Palmer HM, Young H, Winter A, Dave J. Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(3):490-4.
89. Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3812-6.
90. Starnino S, Stefanelli P. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1200-4.
91. Katz AR, Komeya AY, Soge OO, Kiaha MI, Maria Veneranda CL, Glenn MW, et al. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: Case report of the first isolate identified in the United States. *Clin Infect Dis.* 2012;54(6):841-3.
92. Unemo M, Golparian D, Hellmark B. First three *neisseria gonorrhoeae* isolates with high-Level resistance to azithromycin in sweden: A threat to currently available dual-Antimicrobial regimens for treatment of gonorrhea? *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):624–625.
93. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3538-45.
94. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaouie 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;56(3):1273-80.
95. Ison CA, Hussey J, Sankar KN, Evans J, Alexander S. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Eurosurveillance.*

- 2011;16(14):1-3.
96. Costa-Lourenço APR da, Barros dos Santos KT, Moreira BM, Fracalanza SEL, Bonelli RR. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. *Brazilian J Microbiol.* 2017;48(4):617-28.
 97. Hagman KE, Pan W, Spratt BG, Balthazar JT, Judd RC, Shafer WM. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system. *Microbiology.* 1995;141(Pt3):611-22.
 98. Olesky M, Hobbs M, Nicholas RA. Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(9):2811-20.
 99. Olesky M, Zhao S, Rosenberg RL, Nicholas RA. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. *J Bacteriol.* 2006;188(7):2300–2308.
 100. Zhao S, Tobiason DM, Hu M, Seifert HS, Nicholas RA. The penC mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol.* 2005;57(5):1238–1251.
 101. Percival A, Corkill JE, Arya OP, Rowlands J, Alergant CD, Rees E, et al. Penicillinase producing gonococci in Liverpool. *Lancet.* 1976;308(8000):1379-82.
 102. Müller EE, Fayemiwo SA, Lewis DA. Characterization of a novel β -lactamase-producing plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*: Sequence analysis and molecular typing of host gonococci. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7):1514-7.
 103. Johnson SR, Morse SA. Antibiotic resistance in *neisseria gonorrhoeae*: Genetics and mechanisms of resistance. *Sex Transm Dis.* 1988;15(4):217-24.
 104. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1354(1):12-31.
 105. Belkacem A, Jacquier H, Goubard A, Mougari F, La Ruche G, Patey O, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013-14. *J Antimicrob*

- Chemother. 2016;71(9):2471-8.
106. Allen VG, Seah C, Martin I, Melanoa RG. Azithromycin resistance is coevolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2528–2534.
 107. Stevens K, Zaia A, Tawil S, Bates J, Hicks V, Whiley D, et al. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Australia. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(4):1267-8.
 108. Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, et al. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(12):3744–3749.
 109. Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(8):1858-60.
 110. Gonococcal Isolate Surveillance Project. Protocol [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/gisp/gisp-protocol-feb-2015.pdf>
 111. Canada Public Health. National Surveillance of Antimicrobial Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Canada: Annual Summary 2017 [Internet]. 2017 [citado 4 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/national-surveillance-antimicrobial-susceptibilities-neisseria-gonorrhoeae-annual-summary-2017.html>
 112. Gianecini R, De Las Mercedes Romero M, Oviedo C, Vacchino M, Galarza P. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in Argentina, 2009 to 2013. *Sex Transm Dis*. 2017;44(6):351-5.
 113. Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales [Internet]. 2019. Disponible en: <https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/a>

ttachment_data/file/834924/GRASP__2018_report.pdf

114. Lahra MM, Enriquez R, George CRR. Australian Gonococcal Surveillance Programme Annual Report, 2017. *Commun Dis Intell* [Internet]. 15 de abril de 2019;43. Disponible en: [https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/75F30C0D2C126CAECA2583940015EDE3/\\$File/australian_gonococcal_surveillance_programme_annual_report_2017.pdf](https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/75F30C0D2C126CAECA2583940015EDE3/$File/australian_gonococcal_surveillance_programme_annual_report_2017.pdf)
115. M. Unemo, D. Golparian, Y. Grad AL et al. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. *Sex Transm Infect.* 2016;71(11):3096–3108.
116. Viscidi RP, Demma JC. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* housekeeping genes. *J Clin Microbiol.* 2003;197(4):197–204.
117. Unemo M, Olcén P, Berglund T, Albert J, Fredlund H. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae*: Sequence analysis of the *porB* gene confirms presence of two circulating strains. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3741–3749.
118. Ilina EN, Oparina NY, Shitikov EA, Borovskaya AD, Govorun VM. Molecular surveillance of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. *J Clin Microbiol.* 2010;40(10):3681-9.
119. Bilek N, Martin IM, Bell G, Kinghorn GR, Ison CA, Spratt BG. Concordance between *Neisseria gonorrhoeae* genotypes recovered from known sexual contacts. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3564–3567.
120. Palmer HM, Young H, Graham C, Dave J. Prediction of antibiotic resistance using *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing. *Sex Transm Infect.* 2008;84(4):280-4.
121. Monfort L, Caro V, Devaux Z, Delannoy AS, Brisse S, Sednaoui P. First *Neisseria gonorrhoeae* genotyping analysis in France: Identification of a strain cluster with reduced susceptibility to ceftriaxone. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3540–3545.
122. Whiley DM, Goire N, Ray ES, Limnios A, Lambert SB, Nissen MD, et al. *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing using non-cultured clinical specimens. *Sex Transm Infect.* 2010;56(1):51-5.

123. Martin IMC, Foreman E, Hall V, Nesbitt A, Forster G, Ison CA. Non-cultural detection and molecular genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* from a piece of clothing. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt4):487-90.
124. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26(11):2465-6.
125. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(Suppl3):1-46.
126. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. Característiques generals de la Comunitat Valenciana. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. [Internet]. 2018. Disponible en: http://www.san.gva.es/documents/157385/8232066/2.+SGGT+-+Rasgos+generales+de+la+C+Valenciana+2018_tr.pdf
127. Instituto nacional de Estadística. Censo poblacional por sexo, municipios y edad (año a año). [Internet]. 2018 [citado 7 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=2915>
128. Portal del Área de Documentación y Análisis de Datos de la Presidencia de la Generalitat [Internet]. 2019 [citado 29 de abril de 2020]. Disponible en: http://www.argos.gva.es/bdmun/pls/argos_mun/DMEDB_COMUDATOSINDICADORES.Dibujapagina?aNComuld=17&aNIndicador=2&aVLengua=c
129. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. Organització de la Conselleria: estructura administrativa, territorial i assistencial. Memòria de gestió de la Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. [Internet]. 2018. Disponible en: http://www.san.gva.es/documents/157385/8232066/3.+SGGT+-+Organización+de+la+conselleria+2018_tr.pdf
130. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales [Internet]. Emilia Cercenado y Rafael Cantón, editor. 2018. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiolo>

- gia/seimc-procedimientomicrobiologia24a.pdf
131. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, Knapp JS, Black CM, Gift TL, et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections--2002. *MMWR Recomm Rep.* 2002;51(RR-15):1-38.
 132. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *MMWR Recomm Reports.* 2014;63(RR02):1-19.
 133. Centers for Disease Control and Prevention. Characteristics of *N. gonorrhoeae* and Related Species of Human Origin. [Internet]. 2017 [citado 30 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm>
 134. García Rodríguez Rafael Cantón J Elías García Sánchez M^a Luisa Gómez-Lus Luis Martínez Martínez Carmen Rodríguez-Avial Jordi Vila JA. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. [Internet]. 2000. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/MétodosBásicos_SensibilidadAntibióticos.pdf
 135. Valenza G, Ruoff C, Vogel U, Frosch M, Abele-Horn M. Microbiological evaluation of the new VITEK 2 *Neisseria-haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3493–3497.
 136. Rennie RP, Brosnikoff C, Shokoples S, Reller LB, Mirrett S, Janda W, et al. Multicenter evaluation of the new Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2681–2685.
 137. Cercenado E, Saavedra-Lozano J. Desde el laboratorio a la clínica El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I) Del antibiograma a la práctica clínica. *An Pediatr Contin.* 2009;7(4):214-7.
 138. Redactores MU, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. [Internet]. Organización Mundial de la Salud (OMS); 2014. 244 p. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2014-cha-diagnostico-lab-its-vih.pdf>
 139. Intra J, Sala MR, Falbo R, Cappellini F, Brambilla P. Reducing time to

- identification of aerobic bacteria and fastidious micro-organisms in positive blood cultures. *Lett Appl Microbiol.* 2016;63(6):400-5.
140. Centers for Disease Control and Prevention. *Neisseria Gonorrhoeae* reference strains for antimicrobial susceptibility testing [Internet]. 2005. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/arg/b88-feb-2005.pdf>
 141. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Azithromycin Breakpoint for Neisseria gonorrhoeae - CLSI rationale document MR04.* 2019.
 142. *Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing (NG-MAST) [Internet]. [citado 22 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.ng-mast.net/>
 143. Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia (SCSIE - UV) [Internet]. [citado 1 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.uv.es/scsie>
 144. 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 multidrugresistant clone. *Eurosurveillance.* 2013;18(3):1-10.
 145. Muñoz I, Vanaclocha H, Martín-Sierra M, González F. Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1 de febrero de 2008;26(2):77-81.
 146. Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Heal.* 2017;1(8):e316-27.
 147. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* 2012;127(1):4-22.
 148. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial consumption in the EU/EEA - Annual epidemiological report for 2018* [Internet]. Stockholm; 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial-consumption-EU-EEA.pdf>
 149. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. *No Time To Wait:*

- Infections From Drug-Resistant Securing the Future From Drug-Resistant Infections [Internet]. 2019. Disponible en: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_EN.pdf
150. World Health Organization. 2019 Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 2019; Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330420/9789240000193-eng.pdf>
 151. Røttingen JA, Cameron WD, Garnett GP. A systematic review of the epidemiologic interactions between classic sexually transmitted diseases and HIV: How much really is known? *Sex Transm Dis.* 2001;28(10):579-97.
 152. Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: The contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect.* 1999;75(1):3-17.
 153. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(7):524-34.
 154. Shamez N Ladhani, Jay Lucidarme, Sydel R Parikh, Helen Campbell, Ray Borrow MER. Meningococcal disease and sexual transmission: urogenital and anorectal infections and invasive disease due to *Neisseria meningitidis*. *Lancet.* 2020;395(10240):1865-77.
 155. Otero-Guerra L, Vazquez F. Impacto de la resistencia microbiana en las decisiones terapéuticas de las infecciones de transmisión sexual. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(3):149-51.
 156. World Health Organization. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. [Internet]. WHO; 2003. Disponible en: <https://www.who.int/hiv/pub/sti/en/STIGuidelines2003.pdf>
 157. ONUSIDA/OMS. Enfermedades de transmisión sexual: políticas y principios de prevención y asistencia. [Internet]. 1999. Disponible en: https://www.who.int/hiv/pub/sti/en/prev_care_sp.pdf
 158. Newman LM, Moran JS, Workowski KA. Update on the Management of Gonorrhea in Adults in the United States. *Clin Infect Dis.* 2007;44(Suppl 3):S84-

- 101.
159. Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, Herring AJ. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):835-7.
160. Tabrizi SN, Unemo M, Limnios AE, Hogan TR, Hjelmevoll SO, Garland SM, et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10):3610-5.
161. Whiley DM, Tapsall JW, Sloots TP. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: An ongoing challenge. *J Mol Diagnostics*. 2006;8(1):3-15.
162. National Institutes of Health (NIH). Rapid diagnostic for gonorrhea wins \$19 million federal prize competition to combat antibiotic resistance [Internet]. 2020 [citado 5 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/rapid-diagnostic-gonorrhea-wins-19-million-federal-prize-competition-combat-antibiotic-resistance>
163. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Cabeza-Barrera MI. Antimicrobial susceptibility and typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012-2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(1):3-7.
164. 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. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(6):338-41.
165. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones de Transmisión Sexual, 2015 [Internet]. Madrid; 2017. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/va/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/Vigilancia_ITS_1995_2015.pdf
166. Workowski KA, Berman SM, Douglas JM. Emerging antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Urgent need to strengthen prevention strategies. *Ann Intern Med*. 2008;148(8):606-13.
167. Tanaka M, Nakayama H, Tunoe H, Egashira T, Kanayama A, Saika T, et al. A

- remarkable reduction in the susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to cepheems and the selection of antibiotic regimens for the single-dose treatment of gonococcal infection in Japan. *J Infect Chemother*. 2002;8(1):81-6.
168. Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, Yasuda M, Yokoi S, Ito SI, et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in central Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):137-43.
 169. Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama SI, Watanabe H, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):148–149.
 170. Unemo M, Golparian D, Syversen G, Vestrheim DF, Moi H. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Eurosurveillance*. 2010;15(47):1-3.
 171. Lewis DA, Sriruttan C, Müller EE, Golparian D, Gumede L, Fick D, et al. Phenotypic and genetic characterization of the first two cases of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *neisseria gonorrhoeae* infection in south africa and association with cefixime treatment failure. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(6):1267-70.
 172. Yasuda M, Ito S, Kido A, Hamano K, Uchijima Y, Uwatoko N, et al. A single 2 g oral dose of extended-release azithromycin for treatment of gonococcal urethritis. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(11):3116-8.
 173. Lynagh Y, Mac Aogáin M, Walsh A, Rogers TR, Unemo M, Crowley B. Detailed characterization of the first high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases in Ireland. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(8):2411-3.
 174. 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. *Eurosurveillance*. 2019;24(10):1-6.
 175. Kersh EN, Allen V, Ransom E, Schmerer M, Cyr S, Workowski K, et al. Rationale for a *Neisseria gonorrhoeae* Susceptible-only Interpretive Breakpoint for Azithromycin. *Clin Infect Dis*. 2020;70(5):798-804.

176. Jennison A V., Whiley D, Lahra MM, Graham RM, Cole MJ, Hughes G, et al. Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and high level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. *Eurosurveillance*. 2019;24(8):1-4.
177. Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries HJC, Francis SC, Mabey D, et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(8):e235-79.
178. Unemo M, Lahra MM, Cole M, Galarza P, Ndowa F, Martin I, et al. World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): Review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. *Sex Health*. 2019;16(5):412-25.
179. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe [Internet]. 2013. Disponible en:
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-europe-2013.pdf>
180. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe [Internet]. 2014. Disponible en:
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2014.pdf>
181. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2015.pdf>
182. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2016 [Internet]. 2016. Disponible en:
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/EURO-GASP-report-2016.pdf>
183. Poehlsaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics.

- Nat Rev Microbiol. 2005;3(11):870-81.
184. Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. CLSI Document M23 – A3. 5rd edition. 2018.
 185. Gose SO, Soge OO, Beebe JL, Nguyen D, Stoltey JE, Bauer HM. Failure of azithromycin 2.0 g in the treatment of gonococcal urethritis caused by high-level resistance in California. *Sex Transm Dis.* 2015;42(5):279-80.
 186. 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.* 1 de noviembre de 2016;71(11):3109-16.
 187. María Jesús Castaño Aroca, Beatriz Acosta Boga, Noelia Lozano Rodríguez RCA. Estudio de sensibilidad antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en el área de salud del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clínica.* 2020;38(7):348-9.
 188. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Avivar C. Typing and antimicrobial susceptibility of 134 *neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32(2):114–120.
 189. Wan C, Li Y, Le WJ, Liu YR, Li S, Wang BX, et al. Increasing resistance to azithromycin in *neisseria gonorrhoeae* in Eastern Chinese cities: Resistance mechanisms and genetic diversity among isolates from Nanjing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(5):e02499-17.
 190. Faruki H, Sparling PF. Genetics of resistance in a non- β -lactamase-producing gonococcus with relatively high-level penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30(6):856–860.
 191. Gill MJ, Simjee S, Al-Hattawi K, Robertson BD, Easmon CSF, Ison CA. Gonococcal resistance to β -lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB* locus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(11):2799–2803.
 192. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2012. 2012; Disponible en:

- <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2012.pdf>
193. Serra Pladevall J. *Neisseria gonorrhoeae*: monitorització de la sensibilitat antimicrobiana, estudi de la dinàmica poblacional i caracterització molecular de les resistències [Internet]. 2016. Disponible en: https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2016/hdl_10803_400390/jsp1de1.pdf
 194. Tanaka M, Nakayama H, Huruya K, Konomi I, Irie S, Kanayama A, et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(1):20-6.
 195. Ibarгойen García U, Nieto Toboso MC, Azpeitia EM, Imaz Perez M, Hernandez Ragpa L, Álava Menica JA, et al. Epidemiological surveillance study of gonococcal infection in Northern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020;38(2):59-64.
 196. Day MJ, Spiteri G, Jacobsson S, Woodford N, Amato-Gauci AJ, Cole MJ, et al. Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC Infect Dis*. 2018;18(609):1-18.
 197. Anderson JE, Hobbs MM, Biswas GD, Sparling PF. Opposing selective forces for expression of the gonococcal lactoferrin receptor. *Mol Microbiol*. 2003;48(5):1325-37.
 198. Gransden WR, Warren CA, Phillips I, Hodges M, Barlow D. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. *Lancet*. 1990;335(8680):P51.
 199. Deguchi T, Saito I, Tanaka M, Sato KI, Deguchi KI, Yasuda M, et al. Fluoroquinolone treatment failure in gonorrhoea: Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* strain with enhanced resistance to fluoroquinolones. *Sex Transm Dis*. 1997;24(5):247-50.
 200. Giles JA, Falconio J, Yuenger JD, Zenilman JM, Dan M, Bash MC. Quinolone Resistance—Determining Region Mutations and por Type of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates: Resistance Surveillance and Typing by Molecular Methodologies. *J Infect Dis*. 2004;189(11):2085-93.

201. Uehara AA, Amarin ELT, Ferreira MDF, Andrade CF, Clementino MBM, De Filippis I, et al. Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4208–4212.
202. Lindbäck E, Rahman M, Jalal S, Wretling B. Mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in quinolone-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *APMIS*. 2002;110(9):651-7.
203. Guerrero-Torres MD, Menéndez MB, Guerras CS, Tello E, Ballesteros J, Clavo P, et al. Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016. *Epidemiol Infect*. 2019;147(e274):1-11.
204. Ebeyan S, Windsor M, Bordin A, Mhango L, Erskine S, Trembizki E, et al. Evaluation of the ResistancePlus GC (beta) assay: A commercial diagnostic test for the direct detection of ciprofloxacin susceptibility or resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(7):1820-4.
205. Kojima M, Masuda K, Yada Y, Hayase Y, Muratani T, Matsumoto T. Single-dose treatment of male patients with gonococcal urethritis using 2 g spectinomycin: microbiological and clinical evaluations. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(1):50-4.
206. Judson FN. Comparative study of ceftriaxone and spectinomycin for treatment of pharyngeal and anorectal gonorrhoea. *JAMA J Am Med Assoc*. 1985;253(10):1417-9.
207. Lee H, Hong SG, Soe Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, et al. Trends in antimicrobial resistance of *neisseria gonorrhoeae* isolated from Korean patients from 2000 to 2006. *Sex Transm Dis*. 2011;38(11):1082-6.
208. Bala M, Kakran M, Singh V, Sood S, Ramesh V. Monitoring antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in selected countries of the WHO South-East Asia Region between 2009 and 2012: A retrospective analysis. *Sex Transm Infect*. 2013;
209. Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm Rep*. 2006;55(RR-11):1-94.
210. Boslego JW, Tramont EC, Takafuji ET, Diniega BM, Mitchell BS, Small JW, et al.

- Effect of Spectinomycin Use on the Prevalence of Spectinomycin-Resistant and of Penicillinase-Producing *Neisseria Gonorrhoeae*. *N Engl J Med*. 1987;317(5):272-8.
211. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific Region, 2006. *Commun Dis Intell*. 2008;32(1):48-51.
 212. Moran JS. Treating uncomplicated *neisseria gonorrhoeae* infections: Is the anatomic site of infection important? *Sex Transm Dis*. 1995;22(1):39-47.
 213. Kirkcaldy RD, Ballard RC, Dowell D. Gonococcal resistance: Are cephalosporins next? *Curr Infect Dis Rep*. 2011;13(2):196-204.
 214. 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;7(7):821-34.
 215. Unemo M, Shafer WM. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1230(E19–E28):1-15.
 216. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232–260.
 217. Whittington WL, Knapp JS. Trends in resistance of *neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial agents in the united states. *Sex Transm Dis*. 1988;15(4):202-10.
 218. De Jongh M, Dangor Y, Adam A, Hoosen AA. Gonococcal resistance: Evolving from penicillin, tetracycline to the quinolones in South Africa - Implications for treatment guidelines. *Int J STD AIDS*. 2007;18(10):697-9.
 219. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):361-85.
 220. Fuertes de Vega I, Baliu-Piqué C, Bosch Mestres J, Vergara Gómez A, Vallés X, Alsina Gibert M. Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhoea. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(3):165-8.
 221. Kirkcaldy RD. S08.1 Treatment of Gonorrhoea in an Era of Emerging Cephalosporin Resistance and Results of a Randomised Trial of New Potential

- Treatment Options. *Sex Transm Infect.* 2013;89(Suppl 1):A14-5.
222. Rob F, B Klubalová, E Nyčová, J Hercogová, Unemo M. Gentamicin 240 mg plus azithromycin 2 g vs. ceftriaxone 500 mg plus azithromycin 2 g for treatment of rectal and pharyngeal gonorrhoea: a randomized controlled trial. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(2):207-12.
223. Ross JDC, Brittain C, Cole M, Dewsnap C, Harding J, Hepburn T, et al. Gentamicin compared with ceftriaxone for the treatment of gonorrhoea (G-ToG): a randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 2019;S0140-6736(18):32817-4.
224. Tesh LD, Shaeer KM, Cho JC, Estrada SJ, Huang V, Bland CM, et al. *Neisseria gonorrhoeae* and fosfomicin: Past, present and future. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(3):290-6.
225. 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.* 2016;22(6):507-12.
226. Public Health Service of Amsterdam. New Antibiotic Treatment Options for Uncomplicated Anogenital Gonorrhoea [Internet]. 2017. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03294395>
227. Hauser C, Hirzberger L, Unemo M, Furrer H, Endimiani A. In vitro activity of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or azithromycin against clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(3):1605–1611.
228. Leónidas Cardoso, L., Durão, P., Amicone M et al. Dysbiosis individualizes the fitness effect of antibiotic resistance in the mammalian gut. *Nat Ecol Evol.* 2020;4(9):1268-78.
229. 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.* 2020;75(2):449–457.
230. Khosropour CM, Dombrowski JC, Barbee LA, Manhart LE, Golden MR. Comparing azithromycin and doxycycline for the treatment of rectal chlamydial infection: A retrospective cohort study. *Sex Transm Dis.* 2014;41(2):79-85.

231. Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea - the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. *BMC Infect Dis.* 2015;15(364):1-15.
232. Public Health Agency of Canada. Canadian Guidelines on Sexually Transmitted Infections-Gonococcal Infections [Internet]. 2013. Disponible en: <https://www.phac-aspc.gc.ca/std-mts/sti-its/cgsti-ldcits/assets/pdf/section-5-6-eng.pdf>
233. 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;56(7):3603–3609.
234. Quaye N, Cole MJ, Ison CA. Evaluation of the activity of ertapenem against gonococcal isolates exhibiting a range of susceptibilities to cefixime. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(6):1568–1571.
235. Stokes JM, Yang K, Swanson K, Jin W, Cubillos-Ruiz A, Donghia NM, et al. A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. *Cell.* 2020;180(4):688-702.
236. Camacho DM, Collins KM, Powers RK, Costello JC, Collins JJ. Next-Generation Machine Learning for Biological Networks. *Cell.* 2018;173(7):1581-92.
237. Lecun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning. *Nature.* 2015;521(7553):436–444.
238. Jing Y, Bian Y, Hu Z, Wang L, Xie XQS. Deep Learning for Drug Design: an Artificial Intelligence Paradigm for Drug Discovery in the Big Data Era. *AAPS J.* 2018;20(3):58.
239. Taylor SN, Marrazzo J, Batteiger BE, Hook EW, Seña AC, Long J, et al. Single-dose zoliflodacin (ETX0914) for treatment of urogenital gonorrhoea. *N Engl J Med.* 2018;379(19):1835-45.
240. Unemo M, Ringlander J, Wiggins C, Fredlund H, Jacobsson S, Cole M, et al. High in Vitro susceptibility to the novel spiropyrimidinetrione ETX0914 (AZD0914) among 873 contemporary clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates from 21 European countries from 2012 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(9):5220-5.

241. Alm RA, Lahiri SD, Kutschke A, Otterson LG, McLaughlin RE, Whiteaker JD, et al. Characterization of the novel DNA gyrase inhibitor AZD0914: Low resistance potential and lack of cross-resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(3):1478-86.
242. Taylor SN, Morris DH, Avery AK, Workowski KA, Batteiger BE, Tiffany CA, et al. Gepotidacin for the treatment of uncomplicated urogenital gonorrhea: A phase 2, randomized, doseranging, single-oral dose evaluation. *Clin Infect Dis*. 2018;67(4):504-12.
243. Fernandes P, Martens E, Bertrand D, Pereira D. The solithromycin journey-It is all in the chemistry. *Bioorganic Med Chem*. 2016;24(24):6420-8.
244. Flamm RK, Rhomberg PR, Sader HS. In vitro activity of the novel lactone ketolide nafithromycin (WCK 4873) against contemporary clinical bacteria from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(12):e01230-17.
245. Golparian D, Fernandes P, Ohnishi M, Jensen JS, Unemo M. In vitro activity of the new fluoroketolide solithromycin (CEM-101) against a large collection of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and international reference strains, including those with high-level antimicrobial resistance: Potential treatment op. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2739–2742.
246. Biedenbach DJ, Turner LL, Jones RN, Farrell DJ. Activity of JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, tested against *Neisseria gonorrhoeae*, including ciprofloxacin-resistant strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(2):204-6.
247. Soge OO, Salipante SJ, No D, Duffy E, Roberts MC. In vitro activity of delafloxacin against clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and selection of gonococcal delafloxacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):3106-11.
248. Zhang YY, Zhou L, Zhu DM, Wu PC, Hu FP, Wu WH, et al. In vitro activities of tigecycline against clinical isolates from Shanghai, China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;50(4):267-81.
249. Fujimoto K, Takemoto K, Hatano K, Nakai T, Terashit S, Matsumoto M, et al. Novel carbapenem antibiotics for parenteral and oral applications: in vitro and in vivo activities of 2-aryl carbapenems and their pharmacokinetics in laboratory animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):697-707.

250. Jacobsson S, Mason C, Khan N, Meo P, Unemo M. In vitro activity of the novel oral antimicrobial SMT-571, with a new mechanism of action, against MDR and XDR *Neisseria gonorrhoeae*: future treatment option for gonorrhoea? *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(6):1591-4.
251. Brives C, Pourraz J. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Commun.* 2020;6(100):1-11.
252. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* 2019;25(5):730-3.
253. Fauconnier A. Phage therapy regulation: From night to dawn. *Viruses.* 2019;11(4):352.
254. Hinchliffe S, Butcher A, Rahman MM. The AMR problem: demanding economies, biological margins, and co-producing alternative strategies. *Palgrave Commun.* 2018;4(142):1-12.
255. Romero-Calle D, Benevides RG, Góes-Neto A, Billington C. Bacteriophages as alternatives to antibiotics in clinical care. *Antibiotics.* 2019;8(3):138.
256. Argyraki A, Markvart M, Stavnsbjerg C, Kragh KN, Ou Y, Bjørndal L, et al. UV light assisted antibiotics for eradication of in vitro biofilms. *Sci Rep.* 2018;8(16360):1-9.
257. Argyraki A, Markvart M, Bjørndal L, Bjarnsholt T, Petersen PM. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after ultraviolet light-emitting diode treatment: a comparative study between ultraviolet C and ultraviolet B. *J Biomed Opt.* 2017;22(6):1-6.
258. Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature.* 2017;551(7680):313–320.
259. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):576-88.
260. Diggle SP, Griffin AS, Campbell GS, West SA. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature.* 2007;450(7168):411-4.
261. Waters CM, Bassler BL. QUORUM sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319-46.

262. M^a Carmen Nieto Toboso. Dinámica poblacional, características clínicas, sensibilidad antimicrobiana y tipado molecular de infección gonocócica: estudio clínico y epidemiológico en el área de Bilbao. [Internet]. Euskal Herriko Unibertsitatea; 2015. Disponible en: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/17249/TESIS_NIETO_TOBOSO_M^aCARMEN.pdf?sequence=1&isAllowed=y
263. Horn NN, Kresken M, Körber-Irrgang B, Göttig S, Wichelhaus C, Wichelhaus TA, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(5-6):586-91.
264. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae*-a study of 2013 isolates [Internet]. 2013. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Molecular-typing-N-gonorrhoeae-web.pdf>
265. De Curraize C, Kumanski S, Micaëlo M, Fournet N, La Ruche G, Meunier F, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates (2010 to 2014) in France characterized by using whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6962–6964.
266. Golparian D, Hellmark B, Fredlund H, Unemo M. Emergence, spread and characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with in vitro decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in Sweden. *Sex Transm Infect*. 2010;86(6):454-60.
267. 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;74(6):1551-9.
268. Mlynarczyk-Bonikowska B, Malejczyk M, Majewski S, Unemo M. Antibiotic resistance and NG-MAST sequence types of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Poland compared to the world. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2018;35(6):346–551.
269. Public Health Agency of Canada. National Surveillance of Antimicrobial

- Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* - Annual Summary [Internet]. 2014. Disponible en: <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-canadians/publications/drugs-products-medicaments-produits/2014-neisseria/alt/surveillance-gonorrhoeae-2014-eng.pdf>
270. Lahra MM, Ryder N, Whiley DM. A new multidrug-resistant strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. *N Engl J Med*. 2014;371(19):1850-1.
 271. Gianecini R, Oviedo C, Stafforini G, Galarza P. *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone and cefixime, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(6):1139–1141.
 272. Lefebvre B, Martin I, Demczuk W, Deshaies L, Michaud S, Labbé AC, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria Gonorrhoeae*, Canada, 2017. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(2):381–383.
 273. Xabier Beristain. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Navarra, Spain, 2014-2018. En Amsterdam; Disponible en: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=67057
 274. Shigemura K, Osawa K, Miura M, Tanaka K, Arakawa S, Shirakawa T, et al. Azithromycin resistance and its mechanism in *Neisseria gonorrhoeae* strains in Hyogo, Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2695–2699.
 275. Public Health Agency of Canada. Report on the enhanced surveillance of antimicrobial-resistant gonorrhea - results of 2014 [Internet]. 2014. Disponible en: <https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/documents/services/publications/diseases-conditions/gonorrhea-alternate-treatment/gonorrhea-2014-pilot-surveillance-antimicrobial-resistant-eng.pdf>