

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**DINÁMICA POBLACIONAL, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, SENSIBILIDAD  
ANTIMICROBIANA Y TIPADO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN GONOCÓCICA: ESTUDIO  
CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO EN EL ÁREA DE BILBAO**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> CARMEN NIETO TOBOSO**

**Bilbao, Junio 2015**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RAMÓN CISTERNA CANCÉR**



## AGRADECIMIENTOS



*A mi Director de Tesis, el Dr. Ramón Cisterna  
por confiar en mí y brindarme tantas oportunidades.*

*A todos mis compañeros y compañeras del Servicio  
por colaborar en esta tesis y alentarme cada día.*

*A mi familia  
que me han apoyado muy de cerca desde la distancia.*

*A Jorge  
por estar a mi lado.*



## ABREVIATURAS

ADPVP	Adictos a drogas por vía parenteral
CC	Control de calidad
CDC	Centers for Diseases Control
CES	Cefalosporinas de amplio espectro
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CTG	Cefalosporinas de tercera generación
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EDO	Enfermedades de declaración obligatoria
EEUU	Estados Unidos
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Euro-GASP	The European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
GASP	Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
IGD	Infección gonocócica diseminada
ITS	Infección de transmisión sexual
LGV	Linfogranuloma venéreo
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
LPSG	Lipopolisacárido gonocócico
MR	Multirresistencia a los antimicrobianos
OMS	Organización mundial de la salud
PBPs	Penicillin-binding proteins
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SIM	Sistema de Información Microbiológica
ST	Secuenciotipo
TAAN	Técnica de amplificación de ácidos nucleicos
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
UE	Unión Europea
UE/EEE	Estados miembros de la Unión Europea



UFC	Unidades formadoras de colonias
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHS	Virus del herpes simple
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
XR	Resistencia extendida a los antimicrobianos



## ÍNDICE DE CONTENIDOS



<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>ABREVIATURAS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	xi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	xviii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Generalidades	3
1. 2 Epidemiología y transmisión	5
1. 3 Patogenia	8
1.3.1 Proteínas de la membrana externa	9
1.3.2 Lipopolisacárido	11
1.3.3 Factores dependientes del huésped	12
1.3.4 Resistencia del gonococo a los antimicrobianos	13
1.4 Manifestaciones Clínicas	13
1.4.1 Infección urogenital	13
1.4.1.1 Infección en hombres	13
1.4.1.2 Infección en mujeres	13
1.4.1.3 Infecciones en hombres que tienen sexo con hombres (HSH)	14
1.4.2 Gonorrea anorrectal	14
1.4.3 Gonorrea faríngea	14
1.4.4 Síndrome de Fitz Hugh Curtis	15
1.4.5 Infección gonocócica diseminada (IGD)	15
1.4.6 Conjuntivitis	15
1.4.6.1 Conjuntivitis purulenta neonatal	15
1.4.6.2 Conjuntivitis en el adulto	16
1.5 Coinfección con otras infecciones de transmisión sexual (ITS)	17
1.5.1 VIH	17
1.5.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	18
1.5.3 Micoplasmas genitales	20
1.5.4 Sífilis	20
1.5.5 Virus del herpes simple (VHS)	22
1.5.6 Virus del papiloma humano (VPH)	24
1.5.7 Trichomonas	25

1.5.8 Molluscum	25
1.5.9 Escabiosis	25
1.5.10 Virus de la hepatitis B (VHB)	26
1.5.11 Otras ITS	26
1.6 Tratamiento antibiótico	28
1.6.1 Historia de los regímenes de tratamiento	28
1.6.2 Regímenes de tratamiento recomendados en la actualidad	33
1.6.3 Mecanismos de resistencia antimicrobiana en <i>N. gonorrhoeae</i>	34
Resistencia a Sulfonamidas	36
Resistencia a Penicilina	36
Resistencia a Tetraciclinas	38
Resistencia a Espectinomicina	39
Resistencia a Quinolonas	39
Resistencia a Macrólidos	40
Resistencia a Cefalosporinas	41
1.6.4 Respuesta internacional a la evolución de resistencia	42
1.6.5 Futuras perspectivas para el tratamiento	43
1.7 Diagnóstico de gonorrea	45
1.7.1 Recogida, transporte y almacenamiento de muestras	45
1.7.2 Diagnóstico presuntivo: Microscopía	46
1.7.3 Cultivo e identificación de <i>N. gonorrhoeae</i> (presuntiva y definitiva)	47
1.7.3.1 Identificación presuntiva de <i>N. gonorrhoeae</i> después del cultivo	49
1.7.3.2 Confirmación de la identificación después del cultivo	50
1.7.3.2.1 Pruebas bioquímicas	51
1.7.3.2.2 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight)	53
1.7.3.2.3 Ensayos inmunológicos	53
1.7.3.2.4 Ensayos moleculares	54
1.7.4 Detección Molecular	54
1.8. Sensibilidad antimicrobiana	57
1.8.1 Determinación de la CMI	59
1.8.1.1 Dilución en Agar	60

1.8.1.2 E-test	61
1.8.2 Difusión en agar disco-placa	61
1.8.3 Detección de resistencia plasmídica a penicilina	63
1.9 Secuenciotipado	65
1.10 Interés del estudio	67
<b>2. OBJETIVOS</b>	69
2.1 Objetivos principales	71
2.2 Objetivos secundarios	71
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	73
3.1 Diseño del estudio	75
3.2 Selección de las cepas	75
3.3 Características sociodemográficas y datos clínicos de los pacientes	75
3.3.1 Características sociodemográficas	76
3.3.2 Datos clínicos	76
3.3.3 Antecedentes personales	78
3.3.4 Mecanismo de transmisión más probable	78
3.3.5 Perfil de riesgo	78
3.4 Procesamiento de las muestras	79
3.4.1 Identificación de las cepas	81
3.4.2 Estudio de sensibilidad antibiótica	82
3.4.2.1 Método de difusión en agar disco-placa	82
3.4.2.2 Método de dilución en agar	84
3.4.2.3 Método de E-test	87
3.4.2.4 Detección de resistencia plasmídica a penicilina	88
3.4.3 Caracterización de los aislados de <i>N. gonorrhoeae</i>	88
3.5 Análisis estadístico de los resultados	91
3.6 Consideraciones éticas	92
<b>4. RESULTADOS</b>	93
4.1 Resultados epidemiológicos	95
4.1.1 Características sociodemográficas	95
4.1.2 Características clínicas	99
4.1.3 Antecedentes personales	108

4.1.4 Mecanismos de transmisión	108
4.1.5 Perfiles de riesgo	112
4.2 Análisis microbiológico	117
4.2.1 Sensibilidad antimicrobiana	118
4.2.1.1 Método de difusión en agar disco-placa	119
4.2.1.2 Método dilución en agar	124
4.2.1.3 Método E-test	127
4.2.1.4 Comparación entre los métodos de difusión en agar disco-placa y dilución en agar	127
<b>5. DISCUSIÓN</b>	135
5.1 Situación epidemiológica de la infección gonocócica	137
5.1.1 Características sociodemográficas de los pacientes con infección gonocócica	138
5.1.2 Características clínicas de los pacientes con infección gonocócica	140
5.1.3 Características relacionadas con la transmisión de la infección gonocócica	143
5.2 Análisis microbiológico	145
5.2.1 Tinción de Gram	146
5.2.2 Sensibilidad antimicrobiana	146
5.2.3 Comparación entre los métodos de difusión en agar disco-placa y dilución en agar	153
5.2.4 Caracterización de las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i>	154
5.3 Limitaciones del estudio	160
<b>6. CONCLUSIONES</b>	161
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	165
<b>8. ANEXOS</b>	189
ANEXO I	191



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



## A. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de ITS, número de casos y tasas por 100.000 habitantes	8
Figura 2. Prueba de identificación API NH con un perfil de <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	52
Figura 3. Fórmula desarrollada para calcular los mg de sustancia valorada necesarios para conseguir la concentración deseada	85
Figura 4. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según los grupos de edad	96
Figura 5. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según nivel de estudios	97
Figura 6. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según sexo y nivel de estudios	98
Figura 7. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según sexo y país de origen	99
Figura 8. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el servicio de procedencia de los pacientes	100
Figura 9. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según motivo de consulta y orientación sexual de los pacientes	101
Figura 10. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según si presentan o no síntomas y según la orientación sexual de los pacientes	102
Figura 11. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el número de localizaciones distintas en cada episodio	104
Figura 12. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el número de ITS diagnosticadas de forma concurrente	105
Figura 13. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según mecanismo de transmisión y país de origen	110
Figura 14. Prevalencia de coinfección de la infección gonocócica con otras ITS frecuentes según orientación sexual	111
Figura 15. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según lugar de origen y situación frente a la prostitución	114
Figura 16. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según lugar de origen y situaciones frente a la pareja sexual	116
Figura 17. Aislamientos de infección gonocócica según localización de la muestra	117
Figura 18. Diagrama de dispersión donde se correlacionan los resultados de diámetro de halo de inhibición por el método de difusión en agar con las CMI's obtenidas por dilución en agar ( $\mu\text{g/ml}$ ) para gentamicina	125
Figura 19. Porcentaje de aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> a lo largo de los años según la CMI a ceftriaxona obtenida mediante el método de dilución en agar	125
Figura 20. Porcentaje de aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> a lo largo de los años según la CMI a ciprofloxacino obtenida mediante el método de dilución en agar	126
Figura 21. Diagrama de dispersión donde se correlacionan los resultados de diámetro de halo de inhibición por el método de difusión en agar con las CMI's obtenidas por dilución en agar ( $\mu\text{g/ml}$ ) para gentamicina	129



## B. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia y prevalencia de los nuevos casos de gonorrea notificados durante el año 2008 por la OMS	5
Tabla 2. Manifestaciones clínicas de las infecciones gonocócicas, según datos de la OMS	16
Tabla 3. Utilización de Hidratos de carbono (azúcares) y actividad enzimática de diferentes especies de <i>Neisseria</i> y otras especies oxidasa-positivas tales como <i>Moraxella catarrhalis</i> y <i>Kingella denitrificans</i>	52
Tabla 4. TAANs aprobadas por la FDA para la detección de <i>N. gonorrhoeae</i> (Junio 2012)	55
Tabla 5. Rango de CMI aceptado como válido para cada antimicrobiano y algunas características de tipificación para las cepas de referencia recomendadas para el control de calidad	60
Tabla 6. Rangos de control de calidad y criterios de interpretación del diámetro de halo de inhibición según criterios de CLSI	84
Tabla 7. Antibióticos ensayados mediante el método de dilución en agar y puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST para interpretar su sensibilidad	87
Tabla 8. Puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST para la interpretación de la sensibilidad a azitromicina	88
Tabla 9. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según grupos de edad y año	96
Tabla 10. Distribución de los diagnósticos de gonorrea según lugar de origen	98
Tabla 11. Distribución del diagnóstico según el motivo de consulta	101
Tabla 12. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según localización de la muestra y sexo	103
Tabla 13. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según la presencia de otras ITS diagnosticadas de forma concurrente	105
Tabla 14. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según coinfección con el VIH	106
Tabla 15. Factores asociados a la coinfección por el VIH en los casos diagnosticados de infección gonocócica	107
Tabla 16. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según antecedentes de ITS	108
Tabla 17. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el mecanismo de transmisión	108
Tabla 18. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según las prácticas sexuales	109
Tabla 19. Prevalencia de la infección por el VIH en diagnósticos de infección gonocócica según el mecanismo de transmisión	110
Tabla 20. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según situaciones de riesgo para la adquisición de la infección	113
Tabla 21. Principales características de los pacientes con infección gonocócica que ejercen prostitución	115
Tabla 22. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el número aproximado de parejas sexuales en los últimos 12 meses	117
Tabla 23. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según la muestra en la que fueron aisladas y la observación microscópica de la tinción de Gram	118
Tabla 24. Sensibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas mediante el método de difusión en agar disco-placa	119

Tabla 25. mm de diámetro del halo de inhibición para eritromicina y azitromicina por el método de difusión en agar disco-placa	120
Tabla 26. Resultados de los diámetros de halo de inhibición (mm) para gentamicina por el método de difusión en agar disco-placa	121
Tabla 27. Porcentaje de resistencia y producción de $\beta$ -lactamasas en aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> durante el período 2011-2013, según el método de difusión en agar	121
Tabla 28. Distribución de cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> con sensibilidad intermedia o resistencia a los distintos antimicrobianos	122
Tabla 29. Sensibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas mediante el método de dilución en agar	124
Tabla 30. CMI <sub>50</sub> y CMI <sub>90</sub> de cefixima, ceftriaxona y ciprofloxacino obtenidas por el método de dilución en agar a lo largo de los años	125
Tabla 31. Número de aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> según la CMI de gentamicina obtenida por el método de dilución en agar	126
Tabla 32. Número de aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> resistentes a azitromicina según la CMI obtenida por el método de E-test	127
Tabla 33. Comparación de la interpretación de los valores de CMI de ciprofloxacino en los aislados de <i>N. gonorrhoeae</i> obtenidos por el método de dilución en agar con los resultados obtenidos por el método de difusión en agar	128
Tabla 34. Distribución de los ST en las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> aisladas durante el año 2012	131
Tabla 35. Distribución de los ST en las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> aisladas durante el año 2013	132
Tabla 36. Sensibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> con aislados que muestran sensibilidad intermedia o resistentes a azitromicina y/o CMI $\geq 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ para cefixima o ceftriaxona	133
Tabla 37. Características de los pacientes infectados con los STs de <i>N. gonorrhoeae</i> más prevalentes	134

## **1. INTRODUCCIÓN**





## 1.1 Generalidades

La gonorrea es una infección conocida desde la antigüedad, existen referencias a la uretritis venérea en antiguas escrituras chinas, el Antiguo Testamento de la Biblia (Levítico) y otras literaturas antiguas. Galeno (130aC) introdujo el término gonorrea (“flujo de simiente”), debido posiblemente a una confusión del exudado purulento con semen (1). El microorganismo causal fue descrito en 1879 por Neisser y se cultivó en 1882 por primera vez (Leistikow y Loeffler). En la actualidad es la segunda infección de transmisión sexual (ITS) de etiología bacteriana más prevalente en el mundo, tras la causada por *Chlamydia trachomatis*. La infección está producida por el microorganismo *Neisseria gonorrhoeae*. Se trata de un microorganismo cuyo único huésped es el hombre y que siempre es considerado patógeno, incluso aunque los síntomas de la enfermedad estén ausentes.

El género *Neisseria* comprende dos especies principalmente patógenas, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, y aproximadamente 30 especies normalmente no patógenas, entre las más habitualmente referidas *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. subflava*, y *N. mucosa*. Estos microorganismos se encuentran principalmente en las vías respiratorias altas como flora saprófita, y se pueden encontrar también con menor frecuencia en el tracto urogenital. Son cocos gram negativos (con un diámetro de hasta 2  $\mu\text{m}$ ), aeróbicos, capnófilos (crecen mejor en presencia de concentraciones definidas (3-7%) de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ )), no contienen flagelos, no producen esporas, y dan positivas las pruebas de la oxidasa y la catalasa. Normalmente se disponen en parejas con los lados adyacentes cóncavos, es decir, en microscopía aparecen con forma de riñón o grano de café. Lo que distingue a *N. gonorrhoeae* de otras *Neisserias spp* es que se trata de un microorganismo particularmente sensible a factores ambientales desfavorables tales como temperaturas extremas, la desecación y condiciones alcalinas o ácidas, por lo que requiere medios de cultivo complejos enriquecidos con nutrientes para su crecimiento *in vitro*. Contiene pilis en su superficie y utiliza glucosa pero no maltosa, sacarosa o lactosa en su metabolismo, lo que también la distingue del resto de *Neisserias* (2).

*N. gonorrhoeae* produce uretritis en hombres y cervicitis en mujeres. La infección urogenital asintomática no es común en hombres, pero sí en las mujeres (al menos el 50%). La infección rectal (proctitis) y faríngea, habitualmente asintomáticas, pueden darse en ambos sexos en función de la conducta sexual, pero es más frecuente en hombres que tienen sexo con hombres (HSH). Si no se detecta y no se trata o se trata de forma inadecuada, la infección puede ascender hacia el tracto genital superior y causar infección gonocócica complicada en mujeres, como, por ejemplo, enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y secuelas relacionadas como embarazo ectópico e infertilidad, y edema de pene y epididimitis en hombres. También puede producir conjuntivitis en adultos, pero más frecuentemente en niños recién nacidos, “*ophthalmia neonatorum*”, durante el paso a través del canal del parto de una madre infectada, lo que puede dar lugar a ceguera. Rara vez se puede producir en ambos sexos una infección gonocócica diseminada (IGD), lo que es considerado como una entidad clínica distinta de la gonorrea.

Este microorganismo representa un problema de salud pública muy relevante tanto por su magnitud, ya que, según datos publicados por la organización mundial de la salud (OMS), en el año 2008 se produjeron aproximadamente 106 millones de nuevos casos de infección gonocócica en todo el mundo (3), como por sus complicaciones. Además, la gonorrea está asociada a la transmisión de otras infecciones de transmisión sexual (ITS) y a infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Debido a la ausencia de vacunas efectivas contra la infección, la realización de un diagnóstico apropiado, así como un tratamiento antimicrobiano efectivo, son las principales herramientas para la prevención y el control de la infección gonocócica (4). Sin embargo, existe gran preocupación en todo el mundo en relación con el aumento de la incidencia de la gonorrea (5), junto con la alta prevalencia de resistencia a los agentes antimicrobianos históricamente recomendados para su tratamiento, es decir, sulfonamidas, penicilinas, eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacino, y la aparición de cepas con sensibilidad disminuida y / o resistencia a los agentes antimicrobianos actualmente recomendados tales como azitromicina y cefalosporinas de amplio

espectro, más concretamente cefixima y ceftriaxona. Por lo que *N. gonorrhoeae* se está convirtiendo en una "superbacteria" que podría llegar a ser intratable en ciertas circunstancias (6). En consecuencia, la infección gonocócica, incluyendo sus graves complicaciones, causa una importante morbilidad y consecuencias socioeconómicas (1). Por lo tanto, los esfuerzos internacionales para reunir información sobre las tendencias emergentes en sensibilidad antimicrobiana junto con la vigilancia de carácter regional, nacional e internacional de las características epidemiológicas y la propagación de *N. gonorrhoeae* se han convertido en una prioridad de salud pública.

## 1. 2 Epidemiología y transmisión

La gonorrea es un importante problema de salud pública a nivel mundial. La OMS publica un incremento global del 21% en el número de casos desde 2005, año en el que se notificaron 87,7 millones de casos, hasta el año 2008, en el que estima un total de 106 millones de casos nuevos de *N. gonorrhoeae* en adultos de entre 15 y 40 años (5).

Regiones analizadas	Incidencia (por 1000 habitantes)		Prevalencia (%)		Incidencia global (millones de casos)	Prevalencia global (millones de casos)
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres		
África	49,7	60,3	2,3	2,0	21,1	8,2
América	18,5	27,6	0,8	0,7	11,0	3,6
Sureste Asiático	16,2	37,0	0,8	1,2	25,4	9,3
Europa	8,3	7,0	0,3	0,2	3,4	1,0
Mediterráneo Oriental	8,1	11,6	0,3	0,3	3,1	1,0
Pacífico Occidental	34,9	49,9	1,5	1,3	42,0	13,3

Tabla 1. Incidencia y prevalencia de los nuevos casos de gonorrea notificados durante el año 2008 por la OMS (5)

Las estimaciones más altas fueron en la Región del Pacífico Occidental, el Sur de Asia Sudoriental y la Región de África (tabla 1). Sin embargo el número de casos publicados es sustancialmente más bajo, especialmente en entornos de bajos recursos. Esto se debe a una subestimación de los casos diagnosticados (por falta de

métodos de diagnóstico apropiados y el pobre manejo de los síntomas) y/o a una incompleta notificación de los casos y vigilancia epidemiológica (1).

Con el fin de obtener datos más relevantes, la OMS indica que hay que actuar sobre determinados puntos, en particular sobre:

- Los datos de prevalencia: no disponemos de muchos estudios de prevalencia de calidad. En concreto, se deberían de obtener los datos desglosados por poblaciones urbanas y rurales y por edad y sexo, además de fortalecer la vigilancia de ITS para monitorizar su incidencia.
- Las estimaciones de la duración de la infección: La duración media de la infección por un patógeno depende del patógeno, de la búsqueda de población susceptible por parte de la atención sanitaria, y del acceso a la atención médica. La información sobre estos tres factores se encuentra muy limitada, lo que lleva a estimaciones imprecisas de la duración de la infección.

Estos datos desempeñan un papel importante en la mejora de nuestro conocimiento sobre la carga de la infección gonocócica.

En EEUU Las infecciones por *N. gonorrhoeae* son la segunda enfermedad contagiosa de declaración obligatoria más común. El *Center of Diseases Control (CDC)* (7) informó en 2007, 355.991 casos en EEUU, lo que representa una incidencia de 118,9 por 100.000 habitantes, aunque en los últimos años se ha observado una leve disminución, con una incidencia en 2009 de 99,1 por 100.000 y en 2010 se publicaron 209.341 casos. La tasa de la gonorrea disminuyó en EEUU en un 74% desde 1975 hasta 1997 a raíz de la aplicación del programa de control de la gonorrea a mediados de los años 70 (7). A partir de 1997, sin embargo, la incidencia global se ha mantenido prácticamente sin cambios. Las tasas varían considerablemente entre los estados, con valores por debajo de 19/100.000 en el Noreste y el Oeste a valores de más de 250/100.000 en el Sur. Antes de 1996, la tasa de enfermedad era consistentemente mayor en los hombres, pero la incidencia ha sido similar o ligeramente mayor entre las mujeres en los últimos años. Los grupos de edad con mayor carga de la enfermedad son los adolescentes y adultos jóvenes entre 15 y 24 años. En 2007, las tasas de

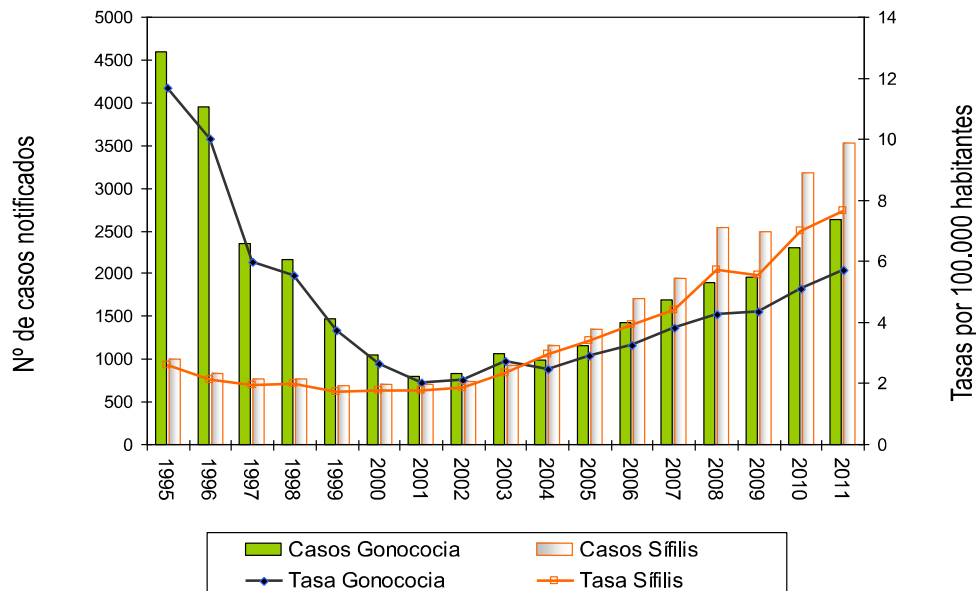
gonorrea se mantuvieron más altas entre los afroamericanos (663 por 100.000), afectando especialmente a las mujeres afroamericanas de entre 15 y 19 años (2.956 por 100.000).

Según datos del European Center for Disease Prevention and Control (ECDC)(8), en 2011, se notificaron 39.179 casos de gonorrea en 28 Estados miembros de la Unión Europea (UE/EEE), no incluyendo los datos de Alemania y Liechtenstein; la tasa global fue de 12,6 por 100.000 habitantes.

- La infección gonocócica se notificó tres veces más frecuentemente en hombres que en mujeres en el año 2011, con una tasa global de 21,2 por 100.000 en hombres y 7,6 por 100.000 en mujeres.
- Casi la mitad de los casos (42%) se registraron en adultos jóvenes. Un tercio de todos los casos de gonorrea en 2011 (33%) fueron notificados en hombres que tienen sexo con hombres (HSH).
- Desde 2008, la mayoría de los países de la Unión Europea (UE) han registrado tendencias crecientes informándose un aumento en la tasa global de infección gonocócica de un 31%. Aunque el ECDC señala que estas tendencias deben interpretarse con cautela debido a la heterogeneidad de los sistemas de información y de asistencia sanitaria.

En el Estado Español la información epidemiológica sobre las ITS se obtiene a través del Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) incluido en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). En el año 2011 este sistema notificó 2640 casos de infección gonocócica con unas tasas de 5,72 casos por 100.000 habitantes en el conjunto de la población española. Si analizamos los datos en el periodo 1995-2011 se observa un descenso en la incidencia desde el año 1995 en el que la tasa alcanzó un máximo de 11,69 casos por cada 100.000 habitantes hasta el año 2011 en el que se publicaron 5,72 casos por cada 100.000 habitantes (9). En cambio, este descenso no es homogéneo ya que desde el año 2002 se advierte un incremento continuo en la incidencia (figura 1). Otra fuente de información complementaria e independiente en nuestro país es el Sistema de Información Microbiológica (SIM), el cual recoge la información de aproximadamente el 25% de la

población, a partir de una red de laboratorios situados en 12 comunidades autónomas. Este sistema se encarga de la vigilancia epidemiológica de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y virus herpes simple, estos dos últimos no incluidos en el sistema EDO. En el año 2011 el SIM publicó 869 casos de *N. gonorrhoeae*. El grupo de edad más afectado fue el de 25 a 34 años y el 86,2% de los casos se dieron en hombres. El SIM coincidió con el sistema EDO en describir un incremento continuado de los diagnósticos microbiológicos de gonococo desde el año 2002. Aunque este aumento se atribuye en parte a la participación de nuevos laboratorios en el sistema de declaración.



**Figura 1.** Incidencia de ITS, número de casos y tasas por 100.000 habitantes (Centro Nacional de Epidemiología (9))

### 1. 3 Patogenia

Los gonococos se adhieren a las células mucosas, penetran en las células, se multiplican y, posteriormente, pasan a través de ellas al espacio subepitelial donde se produce la infección. Hay diferentes factores que contribuyen a la adherencia y penetración de los gonococos, como son los *pili*, las proteínas PorB y Opa. El

lipopolisacárido gonocócico estimula la respuesta inflamatoria y la liberación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), responsable de la mayoría de los síntomas que se asocian a la infección gonocócica. Estos y otros factores contribuyen a la patogenicidad del microorganismo y su conocimiento nos ayudará a diseñar sistemas de identificación utilizando estos factores como dianas así como desarrollar nuevos sistemas para combatir la infección.

### 1.3.1 Proteínas de la membrana externa

- **Fimbrias (*pili*):** Algunas cepas de *N. gonorrhoeae* presentan fimbrias en su superficie. Las cepas con fimbrias son más virulentas que las variantes que carecen de ellas ya que se adhieren mejor a las células de las superficies mucosas humanas y son más virulentas en modelos de cultivo de órganos y en experimentos de inoculación en seres humanos. En un modelo de explante de trompa de Falopio, las fimbrias median el anclaje de los gonococos a las células no ciliadas del epitelio cilíndrico. Este suceso inicia la fagocitosis de los gonococos y el transporte a través de estas células a los espacios intercelulares próximos a la membrana basal o directamente a los tejidos subepiteliales. En las células del epitelio urogenital tanto de varones como de mujeres existe CD46 (cofactor proteínico de membrana), y se ha determinado que es el receptor de *PilC* (10); esta subunidad está ubicada en la punta de la molécula de la fimbria y es crucial como mediadora de la adherencia. Las fimbrias son además fundamentales para la competencia genética y la transformación de *N. gonorrhoeae*, que permite la transferencia horizontal *in vivo* de material genético entre diferentes estirpes de gonococos.
- **Proteína de Opacidad (Opa):** Otra proteína importante de la superficie gonocócica en la adherencia a las células epiteliales es la proteína Opa (denominada anteriormente proteína II). Ésta contribuye a la adherencia intergonocócica, determinante del carácter opaco de las colonias de gonococo en el agar translúcido y de la adherencia del microorganismo a diversas células eucariotas, como los leucocitos polimorfonucleares. Ciertas variantes de Opa promueven la invasión de células epiteliales, y este efecto se ha relacionado con la capacidad de Opa de unirse a vitronectina, glucosaminoglucanos y a varios miembros de la familia de receptores de la molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario

(*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*, CEACAM). Las proteínas Opa de *N. gonorrhoeae* que enlazan con CEACAM 1 (10), la cual se expresa en los linfocitos T primarios CD4+, suprimen la activación y proliferación de estos linfocitos. Dicho fenómeno explica la reducción transitoria del linfocito T CD4+ en las infecciones gonocócicas.

- **Porina (PorB):** La porina (anteriormente denominada proteína I) está universalmente presente en la superficie de la membrana externa y es la proteína más abundante de la superficie gonocócica, constituyendo más del 50% del total de proteína de la membrana externa del patógeno. Esta proteína desempeña un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad. Las moléculas de porina existen en forma de trímeros que proporcionan canales acuosos aniónicos a través de la membrana externa hidrófoba. La porina no suele sufrir variación antigénica en el curso de la infección por lo que constituye la base de la serotipificación gonocócica (11). Se presenta en dos clases antigénicas mayores denominadas PorB1a y PorB1b, las cuales son profundamente investigadas ya que se consideran lo suficientemente antigénicas como para desarrollar una posible vacuna (12). Las cepas individuales expresan sólo uno de los dos grupos de proteínas PorB:

- Las cepas PorB1a, son asociadas con frecuencia a Inmunoglobulina D. Éstas cepas son, en general, resistentes a la acción bactericida del suero humano, no desencadenan una reacción inflamatoria local importante y, por tanto, pueden no provocar síntomas genitales. Estas características pueden estar relacionadas con la capacidad de unión a moléculas reguladoras del complemento mitigando la reacción inflamatoria. La porina puede trasladarse a la membrana citoplasmática de las células del huésped iniciando la endocitosis y la invasión gonocócica.

- Las cepas PorB1b, suelen provocar sólo infecciones genitales circunscritas (10).

- **Proteínas enlazadoras de transferrina (Tbp1 y Tbp2):** Son proteínas de membrana que, junto con la proteína enlazadora de lactoferrina, constituyen las proteínas necesarias para obtener el hierro de la transferrina y la lactoferrina *in vivo*.



Se ha demostrado que la transferrina y el hierro aumentan la adherencia de *N. gonorrhoeae* privando de hierro a las células endometriales del ser humano (10).

Existe un sistema de tipado, el cual se desarrolla más adelante, basado en la secuencia de fragmentos internos del gen que codifica la proteína porB junto con la secuencia del gen *tbpB*. Este gen codifica la subunidad  $\beta$  de la proteína Tbp (12), un componente expuesto en la superficie periférica de la membrana externa del microorganismo que se une a la transferrina humana (12).

- **Proteína H8:** Lipoproteína que abunda en la superficie de todas las cepas de gonococo y que constituye una excelente diana para las pruebas de diagnóstico serológicas (10).
- **Proteasa IgA1:** Esta proteasa destruye la inmunoglobulina A1 y, aunque su papel en la virulencia es desconocido, se cree que lo protege de la acción de la IgA mucosa (2).
- **Proteína modificable por reducción (Rmp),** anteriormente denominada proteína III: Proteína de la membrana externa que se relaciona con la propensión a reinfección gonocócica (10).

### 1.3.2 Lipopolisacárido

El lipopolisacárido gonocócico (LPSG) consta de lípido A y de un núcleo de oligosacáridos que carece de la cadena lateral antigénica de repeticiones de O-carbohidrato que se ve en otras bacterias gram negativas. El LPSG posee una actividad notable de endotoxina y contribuye a los efectos citotóxicos locales del modelo de trompa de Falopio. Los azúcares del núcleo del LPSG experimentan una gran variación antigénica en diferentes condiciones de crecimiento; esta variación es un reflejo de la regulación genética y de la expresión de genes de glucotransferasa que dirigen la estructura hidrocarbonada del LPSG. Estas variantes fenotípicas pueden afectar a las interacciones de *N. gonorrhoeae* con elementos del sistema inmunitario humoral (anticuerpos y complemento) y también puede influir en la unión directa de los microorganismos a fagocitos (10).

### 1.3.3 Factores dependientes del huésped

Además de las estructuras gonocócicas que interaccionan con las células epiteliales, los factores del huésped median en la entrada de los gonococos en las células no fagocíticas. La activación de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina y de la esfingomielinasa ácida por *N. gonorrhoeae*, cuyo resultado es la liberación de diacilglicerol y ceramida, es un requisito esencial para la entrada de *N. gonorrhoeae* en las células epiteliales. La acumulación de ceramida en el interior de las células origina la apoptosis, que puede quebrar la integridad epitelial y facilitar la entrada de gonococos en el tejido subepitelial.

La liberación de factores quimiotácticos por efecto de la activación del complemento contribuye a la inflamación, al igual que el efecto tóxico del LPSG, que provoca la liberación de citoquinas inflamatorias (10). La porina gonocócica promueve la proliferación de células T en personas con infección gonocócica urogenital. En personas con infección gonocócica de las mucosas se observa un aumento importante de los linfocitos T CD4+ productores de interleucina 4 y de linfocitos CD8+. Una parte de estos linfocitos, que muestran una respuesta TH2 específica de porina, podría dirigirse a las superficies mucosas y participar en la protección inmunitaria. Existen pocas referencias que indiquen que una infección gonocócica previa genere inmunidad protectora, aunque los anticuerpos bactericidas y opsoninas contra porina y LPSG podrían ofrecer una protección parcial. Por otra parte, las mujeres infectadas y que adquieren altos niveles de anticuerpos contra la proteína de membrana Rmp, son especialmente propensas a la reinfección gonocócica, porque los anticuerpos Rmp bloquean el efecto de los anticuerpos bactericidas contra porina y LPSG, aunque no se ha desarrollado completamente el mecanismo de bloqueo (4). La Rmp apenas muestra variación antigénica entre una y otra cepa, por lo tanto, los anticuerpos contra Rmp pueden ser bloqueadores potenciales de la destrucción de todos los gonococos. Como la Rmp posee una estrecha homología con la OmpA de las enterobacterias y las proteínas de clase 4 meningocócicas, es posible que estos anticuerpos bloqueadores sean una consecuencia de la exposición previa a proteínas de estas especies con reactividad cruzada, y también pueden desempeñar un papel en la primoinfección por *N. gonorrhoeae*.

### **1.3.4 Resistencia del gonococo a los antimicrobianos**

Por su importancia en el tema que nos aborda será tratada más adelante en el apartado “Tratamiento antibiótico” (1.6).

## **1.4 Manifestaciones Clínicas**

La enfermedad es principalmente transmitida a través de prácticas sexuales e infecta las superficies mucosas de uretra, cérvix, recto, faringe y ojo. Además el ojo puede ser infectado intraparto durante el paso del feto a través del canal del parto (2). La gonorrea es minoritariamente asintomática en hombres ( $\leq 10\%$ ), pero frecuentemente asintomática en mujeres ( $\geq 50\%$ ) (1), y en faringe y recto tanto en hombres como en mujeres, y los síntomas, si están presentes, pueden no ser específicos (tabla 2). Por lo que son necesarios procedimientos de laboratorio para el diagnóstico, la detección de casos, y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. El diagnóstico de la gonorrea se establece mediante la identificación de *N. gonorrhoeae* en las secreciones genitales o extra-genitales.

### **1.4.1 Infección urogenital**

#### **1.4.1.1 Infección en hombres**

La infección gonocócica no complicada que se manifiesta más frecuentemente en hombres es la uretritis aguda. Los principales síntomas son secreción uretral, a veces acompañada con disuria, por lo general sin gravedad. Es posible la coinfección del prepucio, la uretra y las glándulas bulbouretrales. Además, hasta en un 10% de los casos se producen infecciones completamente asintomáticos (2). La mayoría de los casos de uretritis no tratada se resuelven espontáneamente después de varias semanas. Se pueden dar complicaciones localizadas tras la uretritis gonocócica que pueden dar lugar a infertilidad, como son: epididimitis aguda, edema de pene, y abscesos de las glándulas bulbouretrales (1).

#### **1.4.1.2 Infección en mujeres**

En las mujeres, el endocérvix (cervicitis) es la principal localización de la infección genital. Además, *N. gonorrhoeae* puede infectar la uretra, el recto, las

glándulas periuretrales de Skene (skenitis) y las glándulas vestibulares mayores de Bartolino (bartolinitis). El epitelio escamoso de la vagina por lo general no está infectado en mujeres sexualmente maduras. La alta tasa de infección asintomática en las mujeres facilita la diseminación de la enfermedad. Las principales manifestaciones clínicas incluyen aumento de la secreción vaginal, disuria y sangrado intermenstrual. La ascensión de la bacteria puede dar lugar a complicaciones como enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), que puede manifestarse por diversas combinaciones de endometritis, salpingitis, absceso tubo-ovárico y peritonitis (2). También puede incrementar el riesgo de embarazos ectópicos e infertilidad (1). Además, aunque aparezcan los síntomas, a menudo no pueden ser claramente atribuidos a la infección por *N. gonorrhoeae*, ya que es frecuente la coinfección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* (2).

#### **1.4.1.3 Infecciones en hombres que tienen sexo con hombres (HSH)**

En este subconjunto de hombres, además de las infecciones urogenitales propias de esta enfermedad, son más frecuentes las infecciones extragenitales como la anorrectal y faríngea, que es frecuentemente asintomática. Esto es debido a que este colectivo se involucra con más frecuencia en conductas sexuales de riesgo, por ejemplo, relaciones con múltiples parejas anónimas y sexo oral y rectal sin protección (13).

#### **1.4.2 Gonorrea anorrectal**

Mientras que más del 80% de las infecciones rectales permanecen asintomáticas, algunos pacientes presentan proctitis aguda (2).

#### **1.4.3 Gonorrea faríngea**

La infección faríngea es adquirida por exposición sexual oral y generalmente es asintomática pero también puede causar faringitis o amigdalitis evidente (2). Aunque probablemente la infección faríngea es menos transmisible que la gonorrea rectal o uretral, su naturaleza silente y su considerable prevalencia entre HSH, hace de esta localización un reservorio frecuente de infección en HSH sexualmente activos (2). Sin

embargo, dependiendo de la práctica sexual, tanto la gonorrea anorrectal como la faríngea se pueden encontrar en ambos sexos (1).

#### **1.4.4 Síndrome de Fitz Hugh Curtis**

Se trata de una perihepatitis aguda asociada a EIP. Es un proceso que afecta a la cápsula hepática y al peritoneo adyacente, bien por diseminación directa desde la trompa de Falopio o bien por fenómenos inflamatorios locales mediados por mecanismos inmunes desencadenados por *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis* (14).

#### **1.4.5 Infección gonocócica diseminada (IGD)**

La IGD puede ocurrir en ambos sexos y refleja la difusión bacteriémica de *N. gonorrhoeae*. Hoy en día rara vez se encuentra, ya que menos del 1% de las infecciones mucosas se complican (1). Se da especialmente en el embarazo, puerperio y en situaciones de déficits del complemento (10). IGD se manifiesta generalmente como artritis séptica, sinovitis o dermatitis y debe sospecharse en pacientes con tenosinovitis, artritis y lesiones vasculares de la piel (exantema) (2). Casos de endocarditis, pericarditis y meningitis pueden surgir como complicaciones raras de la IGD.

#### **1.4.6 Conjuntivitis**

La conjuntivitis puede afectar a los adultos, pero con mayor frecuencia, la infección del ojo produce conjuntivitis en el recién nacido, que puede llegar a producir ceguera (1).

##### **1.4.6.1 Conjuntivitis purulenta neonatal**

La conjuntivitis del recién nacido (*ophthalmia neonatorum*) se transmite durante el parto y se ve favorecida por la rotura prematura de las membranas y el parto prematuro (2). Históricamente ha sido una causa frecuente de ceguera, ésta se puede prevenir mediante la administración de una solución acuosa al 1% de nitrato de plata o una pomada antibiótica (por lo general contiene eritromicina) en la conjuntiva tras el parto (2).

### 1.4.6.2 Conjuntivitis en el adulto

La conjuntivitis gonocócica en los adultos es generalmente unilateral (6) y suele ser resultado de autoinoculación, exposición oculogenital o exposición orogenital. Si no se trata a tiempo se podría desarrollar rápidamente ulceración corneal (2).

#### Gonorrea no complicada

<b>Uretra</b>	Copiosa secreción purulenta Escasa secreción clara Disuria
<b>Endocérvix</b>	Orificio cervical enrojecido Secreción purulenta Disuria Salpingitis Sensibilidad abdominal inferior unilateral o bilateral
<b>Recto</b>	Copiosa secreción purulenta Ardor, dolor agudo Tenesmo Sangre en heces
<b>Faringe</b>	Faringitis media Leve dolor de garganta Eritema
<b>Conjuntiva</b>	Copiosa secreción purulenta Queratitis y ulceración corneal, perforación de las lentes Cicatrización, opacificación de las lentes Ceguera
<b>Gonorrea complicada</b>	
<b>Complicaciones en hombres</b>	Edema de pene Absceso en las glándulas de Tyson Absceso en las glándulas de Cowper Vesiculitis seminal Epididimitis Infertilidad (raro)
<b>Complicaciones en mujeres</b>	Endometritis Salpingitis Absceso Bartolino Linfadenitis Absceso tubo-ovárico Embarazo ectópico Infertilidad
<b>IGD</b>	Bacteriemia Fiebre Dermatitis (lesión en piel: macular, eritematosis, pustular, necrótica, hemorrágicas) Tenosinovitis Artritis séptica Endocarditis Meningitis

**Tabla 2.** Manifestaciones clínicas de las infecciones gonocócicas, según datos de la OMS (3)

## 1.5 Coinfección con otras infecciones de transmisión sexual (ITS)

La infección gonocócica, debido a su corto período de incubación, es un buen indicador de prácticas sexuales de riesgo, y frecuentemente se asocia a la transmisión de otras ITS concurrentes. Más de 30 patógenos bacterianos, virales y parasitarios son transmitidos sexualmente y, aunque algunos patógenos pueden adquirirse también por otras vías, epidemiológicamente, el contacto sexual es la vía más importante para su transmisión de persona a persona. El fracaso para frenar la transmisión de la gonorrea también promueve la transmisión de otras ITS tan importantes como la infección por el VIH (1). En los años 80, la importancia epidemiológica del VIH dejó otras ITS en un segundo plano, pero en los últimos años, la idea de que son enfermedades centinelas del VIH, y de que muchas de ellas son transmitidas concurrentemente, ha vuelto a despertar el interés por estas infecciones. Además en los últimos años se han dado grandes avances que han contribuido al diagnóstico y la patogenia de las ITS como las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) y técnicas de secuenciación del genoma de muchos de estos microorganismos, el mejor conocimiento de los mecanismos de virulencia y el uso de muestras no invasivas para diagnóstico (orina, saliva, etc.). La OMS estima que el número de nuevos casos diagnosticados en 2008 de cuatro de las ITS más frecuentes (infección por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, sífilis y tricomoniasis) es de 498,9 millones en la población adulta entre 15 y 49 años (5).

### 1.5.1 VIH

El primer caso de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se describió en 1981. Desde entonces se ha extendido por todo el mundo con una estimación de 34 millones de personas infectados en todo el mundo y 2,7 millones de nuevas infecciones durante el año 2010 (15), llegando a alcanzar en algunos países una prevalencia >30% en adultos. A pesar de que se ha desarrollado un tratamiento antirretroviral efectivo siguen apareciendo nuevos casos. Por lo que las mejores estrategias para frenar la propagación de la infección son un diagnóstico accesible con asesoramiento para la prevención y la derivación de las personas infectadas a una atención especializada. La transmisión se produce por intercambio de fluidos y por

contacto con sangre contaminada con el virus. Las mujeres embarazadas infectadas por el VIH pueden transmitir la infección al niño durante el embarazo, a través del canal del parto (peri-natal) y durante el amamantamiento (post-natal). Hoy en día es rara la transmisión a través de los donantes de sangre ya que se llevan a cabo controles estrictos que detectan anticuerpos en la sangre del donante.

El diagnóstico se realiza a través de ensayos serológicos, fundamentalmente se utiliza la técnica de ELISA y en algunas situaciones pruebas inmunocromatográficas rápidas que no requieren mucha infraestructura y son utilizadas, sobre todo, en zonas de menos recursos. Aunque estas pruebas son muy sensibles se dan resultados falsos positivos por lo que se requieren pruebas confirmatorias con mayor especificidad. Estas pruebas consisten en ensayos de Inmunofluorescencia, western blot o inmunoensayo lineal. También se puede diagnosticar la infección detectando directamente el virus o componentes del virus (antígeno p24, ARN o ADN proviral) por TAAN.

### **1.5.2 *Chlamydia trachomatis***

La infección gonocócica frecuentemente viene acompañada por infección por *C. trachomatis*, sobre todo en adolescentes sexualmente activos. Según datos de la OMS, en el año 2008 se declararon globalmente 105,7 millones de casos nuevos de *C. trachomatis* (5). Esto sitúa a la clamidia como la ITS bacteriana más frecuente junto con gonorrea.

*C. trachomatis* se ha clasificado en tres biovars, que a su vez se dividen en varios serovares o genotipos, definidos según el tipo de infección, localización de la infección (tropismo tisular) y virulencia.

- El biovar ocular consiste en los serovares A al C, los cuales se encuentran principalmente en infecciones conjuntivales. El tropismo conjuntival no es único, especialmente en el serovar B que, aunque raramente, también se puede encontrar en infecciones genitales.
- El biovar que se transmite sexualmente es el predominante y consiste en los serovares D al K, infectan al epitelio genital causando uretritis en hombres y cervicitis (y menos



frecuentemente uretritis) en mujeres. Las infecciones asintomáticas son frecuentes, cerca de un 50% en hombres y más del 90% en mujeres (3). Si no se detecta la infección y no se trata, puede ascender al tracto genital superior y causar epididimitis en hombres y EIP en mujeres con secuelas como embarazo ectópico e infertilidad. Estos serovares pueden causar infecciones oculares en neonatos que lo adquieren a través del canal del parto, pero no suelen ser responsables del tracoma. Estas manifestaciones clínicas son similares a las de la infección gonocócica aunque *N. gonorrhoeae* tiende a producir una respuesta inflamatoria más fuerte que *C. trachomatis* (13).

- Por último, el biovar linfogranuloma venéreo (LGV) lo componen los serovares L1, L2 y L3, transmitidos sexualmente pero con preferencia tisular por células linfoides y una evolución de la enfermedad más agresiva, por lo que pueden causar enfermedad sistémica con más probabilidad que el resto de serovares. El LGV es endémico en muchos países desarrollados de todo el mundo y desde 2003, se han publicado brotes de proctitis y proctocolitis por LGV en HSH (16,17,18,19).

Para su diagnóstico históricamente se ha utilizado el cultivo, pero es una técnica compleja muy laboriosa y no presenta buena sensibilidad. Por lo que a principios de los años 80 se desarrollaron técnicas inmunológicas como la Inmunofluorescencia directa (IFD) y el enzimoimmuno análisis (ELISA) haciendo el diagnóstico más asequible. Actualmente los métodos moleculares, en la mayoría de los laboratorios, han sustituido al resto de técnicas, debido a sus múltiples ventajas: presenta mayor sensibilidad y especificidad, posibilidad de utilizar muestras no invasivas, posibilidad de automatización y no necesita que el microorganismo se encuentre viable; convirtiéndose en el patrón oro. Existen diferentes métodos comercializados a este respecto (20,21,22), algunos de los cuales permiten simultáneamente la determinación de clamidia y gonococo (3).

El tratamiento tiene como primeras alternativas doxiciclina oral 100 mg cada 12 h durante 7 días o azitromicina oral 1 g en dosis única. Como alternativa a estas pautas se dispone de eritromicina o levofloxacino. En gestantes, hay estudios que muestran que la amoxicilina es tan efectiva como eritromicina y la azitromicina (23).

### 1.5.3 Micoplasmas genitales

Micoplasmas es un nombre que se utiliza para englobar bacterias de vida libre, muy pequeñas, carentes de pared celular, pertenecientes a la clase *Mollicutes*. En el tracto urogenital podemos encontrar *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum* (clásicamente conocido como *U. urealyticum*, biovar1). *M. genitalium* se encuentra en un 1-3% de hombres y mujeres sexualmente activos. Los ureaplasmas se pueden encontrar en cérvix o vagina del 40-80% de mujeres asintomáticas sexualmente activas y *M. hominis* en el 20-50% (200,201). De acuerdo con esto los micoplasmas deberían ser considerados flora saprófita del tracto genital, sin embargo son causa de enfermedad extragenital en pacientes con déficits de células B (hipo- y agammaglobulinemia) y en recién nacidos prematuros. *M. genitalium* se ha asociado a uretritis no gonocócica detectándose en la uretra de un alto porcentaje de hombres sintomáticos (15-20%). *M. genitalium* también afecta a mujeres causando uretritis, cervicitis e infección del tracto genital superior. *M. hominis* y ureaplasmas se detectan más frecuentemente en individuos sanos y su asociación con infección urogenital tanto en hombres como en mujeres todavía no está clara (3).

El cultivo de *M. genitalium* es muy lento y difícil de realizar por lo que, por motivos prácticos, su diagnóstico está limitado a las TAAN. El tratamiento de elección es la doxiciclina y como alternativas clindamicina, azitromicina, levofloxacino o ciprofloxacino. Aunque ya se han publicado resistencias en *M. genitalium* a azitromicina (3) y quinolonas con alteraciones en *gyrA* y *parC* (24).

### 1.5.4 Sífilis

Se calcula que hay 10,6 millones de casos nuevos de sífilis en el mundo (5). Se trata de una ITS crónica, caracterizada por unas manifestaciones clínicas muy específicas y largos períodos de latencia. El microorganismo que produce la sífilis es el *Treponema pallidum subespecie pallidum*, una espiroqueta morfológicamente y antigénicamente idéntica a otras especies de espiroquetas de las cuales se diferencia por el mecanismos de transmisión, epidemiología, manifestaciones clínicas y métodos genotípicos. La transmisión se produce habitualmente por el contacto con lesiones infectadas de mucosas o erosiones en la piel, y en embarazadas, por transmisión

transplacentaria al feto. En general la enfermedad se divide en varias fases según las manifestaciones clínicas y el curso de la infección:

- **Infección:** Se produce una primera úlcera genital en el lugar de la infección seguida de un periodo de incubación de 9-90 días. La bacteria pasa rápidamente al torrente sanguíneo.
- **Sífilis primaria:** La primera manifestación en el adulto es una pequeña mácula, que pasa a pápula y después a úlcera (chancro primario). Esta lesión suele aparecer en el glande o pene en los hombres y en la vulva, la pared vaginal o el cérvix en mujeres. También se pueden producir lesiones orales, en prácticas sexuales orales, y perianales o rectales normalmente en HSH o mujeres con prácticas anales. Estas lesiones pueden pasar desapercibidas ya que son prácticamente indoloras, por lo que, si no se trata, la úlcera desaparecerá espontáneamente en 3-8 semanas sin dejar rastro. Estos chancros iniciales se pueden asociar con adenopatías inguinales bilaterales no dolorosas.
- **Sífilis secundaria:** si el paciente no se trata, aparece esta fase que puede darse desde 6 semanas a 6 meses después de la infección inicial. Incluso el chancro primario podría estar presente cuando aparecen las lesiones secundarias. La primera característica de esta fase es la aparición de una erupción de la piel distribuida uniformemente, no irritante que puede ser macular, papular o papulo-escamosa, con frecuencia aparecen en las palmas de las manos y plantas de los pies. La erupción puede ir acompañada de una linfadenopatía generalizada, fiebre, dolor de cabeza y malestar general. En las zonas vulvar y perianal la lesión puede agrandarse, formando verrugas elevadas conocidas como condilomas planos, y en las superficies de las mucosas se pueden formar lesiones blanquecinas. Si esta fase no se diagnostica y no se trata, todos los síntomas desaparecerán y el paciente pasará a otro periodo de latencia que podría durar años.
- **Sífilis latente:** se divide este período en sífilis latente precoz o tardía según si el diagnóstico se realiza antes o después de un año desde la adquisición de la enfermedad. Sin embargo a menudo es difícil saber el tiempo que ha pasado desde la infección inicial por lo que en estos casos se debe considerar infección latente tardía. En esta fase no están presentes los signos y síntomas de la enfermedad por lo que el diagnóstico se tiene que realizar con ensayos inmunológicos.

- **Sífilis terciaria:** es considerada la fase destructiva de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas aparecen años después de la infección inicial, aunque en pacientes coinfectados con VIH pueden aparecer antes. Las manifestaciones típicas de esta fase son enfermedad gomosa benigna, sífilis cardiovascular y neurosífilis, aunque en algunos casos pueden coexistir varias a la vez (25).

En cuanto al diagnóstico *T. pallidum* no puede crecer en los medios de cultivo artificiales, por lo que se realiza con la detección directa por métodos como la microscopía en campo-oscuro, Inmunofluorescencia directa, técnicas serológicas de aglutinación, y TAAN, en muestras de las lesiones.

La penicilina G parenteral es el antibiótico de elección para el tratamiento de la sífilis. La dosis, la duración y el tipo de penicilina que debe emplearse varían en función de que se trate de una sífilis primaria, secundaria, latente, tardía o neurosífilis, así como de las manifestaciones clínicas (26). Como alternativas se pueden utilizar doxiciclina o tetraciclina. Además de la penicilina G como antibiótico de elección clásico en el tratamiento de esta ITS, en las sífilis primaria y secundaria puede utilizarse la ceftriaxona.

### **1.5.5 Virus del herpes simple (VHS)**

El VHS es la primera causa de úlceras genitales en países desarrollados y subdesarrollados. Está constituido por los tipos 1 y 2, los cuales comparten una estructura genómica similar, con un 40% de homología en la secuencia y un 83% de regiones codificadoras de proteínas, lo que explica las numerosas similitudes viológicas y antigénicas. Durante la infección primaria el VHS entra a través de heridas de la piel y mucosas, después se adhiere y entra en las células epiteliales donde comienza a replicarse. El período de incubación de ambos virus es de 2 a 10 días, pudiendo llegar hasta 4 semanas. A continuación es transportado al ganglio sensorial a través de las terminaciones nerviosas sensoriales libres que corresponden a esa área de la piel. Las manifestaciones cutáneas que presenta son lesiones vesiculares que evolucionan a úlceras dolorosas superficiales, costras y finalmente sanan espontáneamente en un período de 2 a 3 semanas. Entre las complicaciones que puede desarrollar la infección

por el VHS encontramos meningitis aséptica, rash vesicular, retención urinaria, radiculopatía por la afectación de los nervios sacros, mielitis, incremento del riesgo de adquirir infección de VIH (por la exposición de las lesiones) y la infección del recién nacido por transmisión vertical a través del canal del parto de una madre infectada. Esto último puede dar lugar a diseminación del virus, afectando al sistema nervioso central y con la posibilidad de muerte neonatal. Sin embargo sólo del 10 al 30% de las nuevas infecciones son sintomáticas.

Tras la desaparición de la lesión inicial, el virus permanece latente en el ganglio sensorial. El virus puede reactivarse periódicamente y viajar de vuelta a la superficie a través de los nervios sensoriales. Se puede dar diseminación viral intermitente bien en presencia de lesiones o en situaciones subclínicas. Cuando el virus se encuentra en las superficies mucosas se produce la transmisión sexual. Los episodios sintomáticos recurrentes suelen ser más leves que los primarios, normalmente no duran más de 10 días, pero en individuos inmunodeprimidos pueden ser graves. Entre el 70 y el 90% de las personas con síntomas genitales producidos por VHS-2 y del 20 al 50% de las causadas por VHS-1 tendrán una recurrencia en el primer año. En los países desarrollados las infecciones genitales pueden ser producidas tanto por el VHS-1 como VHS-2, en cambio en los países subdesarrollados la infección por VHS-1 sigue asociándose a infección frecuente en niños y el VHS-2 a transmisión sexual. Las infecciones genitales por VHS-1 afectan casi a la mitad de los primeros episodios en adultos jóvenes y el VHS-2 aumenta después de la primera relación de manera constante con la edad.

La infección herpética genital normalmente se diagnostica por los signos clínicos. Sin embargo se pueden confundir con ulceraciones por otras infecciones por lo que se requiere la confirmación diagnóstica en el laboratorio. Los métodos de diagnóstico consisten en la detección directa del virus en material de las lesiones, la utilización de métodos serológicos indirectos y la utilización de TAAN. El cultivo viral, que se ha utilizado durante años, está siendo desplazado por las técnicas de detección de ADN de VHS en muestras clínicas por las ventajas que posee.

Tanto para el tratamiento del primer episodio como de las recurrencias se recomiendan aciclovir, valaciclovir o famciclovir, en distintas dosis (26).

### **1.5.6 Virus del papiloma humano (VPH)**

De los 120 tipos de papilomavirus conocidos, más de 30 infectan el tracto genital. Puede dar lugar a un espectro muy amplio de manifestaciones clínicas que van desde un estado asintomático a un carcinoma invasivo. Los tipos 6 y 11 son considerados “de bajo riesgo” y son generalmente los causantes de las verrugas visibles asociándose rara vez con carcinoma invasivo. En cambio los tipos 16, 18, 31, 33 y 35 se consideran de “alto riesgo” y se asocian a carcinoma genital. También pueden dar lugar a verrugas visibles, pero puede ser debido a otros tipos ya que la infección puede estar provocada por varios tipos a la vez. Por lo que todos los pacientes con verrugas genitales se deben considerar pacientes en riesgo de padecer cáncer genital. Se considera que el VPH produce a nivel mundial unos 270 millones de casos con presencia de ADN viral, 27 millones con condilomas genitales, 27 millones de lesiones de bajo grado, 1,5 de lesiones de alto grado y 0,4 carcinomas de cérvix (27). En mujeres presenta una alta prevalencia con un 15% de casos en países en vías de desarrollo, también se ha descrito una prevalencia elevada en HSH en algunos países como Holanda (206) y en pacientes VIH. Su presencia en la localización anorrectal se ha asociado a la infección con clamidias, gonococos o VHS.

El diagnóstico por cultivo es poco eficiente y el resultado serológico no tiene mucho valor, por lo que se basa en pruebas moleculares.

Las verrugas genitales pueden desaparecer espontáneamente, aunque, también pueden permanecer o incluso crecer. Por lo que se recomienda el tratamiento con el fin de eliminar las lesiones visibles y sintomáticas. Este tratamiento consiste en la aplicación tópica de ácido salicílico al 20% y, ácido láctico en coloidón, o de imiquimod en crema al 5%. Estos tratamientos tienen una respuesta inicial buena, aunque los resultados no suelen ser satisfactorios ya que las recurrencias son frecuentes. Tampoco se conoce muy bien el efecto del tratamiento sobre la infectividad del virus, aunque parece que se reduce. También se puede utilizar

criocirugía o cirugía con láser de CO<sub>2</sub> para eliminar las verrugas. Las formas graves diseminadas pueden tratarse con interferón  $\alpha$ -2b junto con ribavirina (26).

### **1.5.7 Trichomonas**

Se calcula que hay unos 276,4 millones de casos nuevos cada año en el mundo (4). En los últimos años se ha observado un descenso en los países occidentales pero la prevalencia en países subdesarrollados se mantiene elevada. Aunque el cultivo es el patrón oro, ya que muestra una sensibilidad elevada, requiere 2-7 días de incubación, por lo que hoy en día existen métodos moleculares comerciales para el diagnóstico que detectan *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida spp* (23). El tratamiento de elección es tinidazol o metronidazol aunque el CDC estima que en torno al 5% de las *T. vaginalis* aisladas presentan algún nivel de resistencia (28).

### **1.5.8 Molluscum**

Molluscum es un virus que pertenece a la familia *Poxviridae* y produce una infección benigna que frecuentemente afecta a niños, pero también se transmite por relación sexual produciendo pápulas en la piel. Las lesiones tienden a desaparecer espontáneamente en un período que va desde 6 meses a 5 años, aunque en los pacientes inmunodeprimidos, como los infectados por el VIH, pueden prolongarse más tiempo. La afección que produce no es grave, pero pueden producir molestias en las relaciones sexuales llegando a provocar problemas psicológicos. Por todo esto y con el fin de reducir la transmisibilidad y la autoinoculación, se recomienda realizar tratamiento. El tratamiento consiste en la aplicación tópica de imiquimod al 5% y como alternativas se puede administrar podofilotoxina al 0,5%, ácido siálico, hidróxido potásico al 10% (en niños), tretinoína 0,1-0,0025% o cantaridina 0,7% (26).

### **1.5.9 Escabiosis**

Esta infección está causada por el parásito humano *Sarcoptes scabiei var. hominis*. Éste excava túneles en el estrato córneo de la piel y se transmite por contacto directo por lo que el contacto sexual es una causa frecuente de contagio. Afecta más frecuentemente a hombres que a mujeres y también más a HSH que ha

heterosexuales con una incidencia de un 1,5% (23). El tratamiento indicado es permetrina tópica al 5% o la administración de una dosis de ivermectina 200 µg/kg.

#### **1.5.10 Virus de la hepatitis B (VHB)**

La transmisión del VHB se produce fundamentalmente por vía parenteral y sexual. La prevalencia de infección por el VHB en España es del 2-7%, por lo que es considerado como un país de endemidad intermedia. Gracias a la inclusión de la vacunación de VHB en el calendario vacunal ha disminuido su prevalencia por debajo del 2% (29). La OMS estima que la infección crónica por VHB es de 350 millones de casos a nivel global, con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo. Esta infección se asocia con un mayor riesgo de evolución a cirrosis hepática con la consiguiente mortalidad.

Para detertar la infección por VHB se realizan pruebas serológicas que detectan el HBsAg y pruebas moleculares que detectan la carga viral. La hepatitis B aguda muestra síntomas en más de la mitad de los casos y el 1% de las formas ictericas puede evolucionar a hepatitis fulminante. En niños y jóvenes suele ser asintomática. Un factor que predice la evolución a la cronicidad es la edad de adquisición de la enfermedad: en el 90% de los casos después de la infección perinatal, el 30% en niños de entre 1 y 5 años e inferior al 5% en adultos.

El tratamiento de la hepatitis B crónica tiene como objetivo mejorar la supervivencia de los pacientes evitando la progresión a cirrosis e impidiendo el desarrollo de descompensación hepática, hepatocarcinoma y muerte. La determinación del tratamiento se basa en la carga viral, el nivel de transaminasas y la inflamación hepática observada en la biopsia hepática. En la actualidad el tratamiento se realiza con el interferón pegilado o los análogos de nucleótidos o nucleósidos.

#### **1.5.11 Otras ITS**

Existen otras ITS que, aunque no menos importantes, se encuentran con menor frecuencia en nuestro medio.



- ***Haemophilus ducreyi***, es el productor del chancroide o chancro blanco. Se trata de una úlcera genital que produce adenopatías inguinales que pueden supurar y también puede dar lugar a úlceras cutáneas crónicas. Se encuentra distribuido especialmente en África, Asia y América Central y del Sur. Es importante su búsqueda ya que está descrito como un cofactor para la transmisión del VIH (23), por lo que su tratamiento supone una medida preventiva sobre esta infección.
- **Virus de la hepatitis A (VHA)**, se trata de una infección endémica en España cuya incidencia ha disminuido drásticamente a raíz de la implantación la vacunación en población de riesgo (en 1996). La principal vía de contagio es la vía feco-oral, bien a través de agua o alimentos contaminados o por contacto interpersonal. El virus se elimina por heces y puede ser contaminante hasta 3 meses después del episodio de ictericia. Se ha descrito también la transmisión a través de transfusiones, el uso de drogas vía parenteral y la transmisión sexual, siendo la prevalencia, en caso de brote en HSH, del 10% (30). Por otro lado, el riesgo materno-fetal es muy bajo. Por lo tanto se consideran grupos de riesgo los contactos sexuales de personas con hepatitis A sobre todo en HSH, adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), viajeros internacionales, niños y sanitarios de centros de día.
- **Virus de la hepatitis C (VHC)**: Su estimación es de 150 millones de infectados en el mundo con 3 millones de nuevas infecciones por año (31). La vía de transmisión más importante es la parenteral y, aunque históricamente se ha transmitido principalmente por transfusiones de sangre y hemoderivados, actualmente debido al control en la detección del VHC en bancos de sangre esta vía ha desaparecido, siendo la principal población de riesgo los ADVP. También se ha demostrado la transmisión sexual que, aunque menos efectiva, es posible y la transmisión vertical es muy poco frecuente. Por lo tanto se recomienda realizar el cribado de VHC en personas con relaciones sexuales de alto riesgo. De esta forma se pueden identificar aquellas personas que desconocen su estado de portador con el fin de realizar el seguimiento clínico necesario y evitar el diagnóstico tardío en fases muy avanzadas de la enfermedad con altas tasas de morbi-mortalidad.

También encontramos otros microorganismos con cierta implicación en infecciones genitales y con posible transmisión sexual aunque no se reconocen como

productores de ITS clásicas. Uno de ellos es *Haemophilus spp.* que ha sido aislado en algunos casos de uretritis, epididimitis, cervicitis y abscesos de Bartolino. Recientemente se ha asociado a *Haemophilus influenzae* con algunos casos de vulvovaginitis recurrente. También se han descrito casos de vaginitis, proctitis y uretritis causados por *N. meningitidis* y se ha demostrado su transmisión por vía oral-genital (23). En HSH se han descrito brotes de uretritis producidos por *Escherichia coli*. Al igual que se transmiten parásitos como *S. scabiei* o *Pthirus pubis* también se puede adquirir *tinea cruris* por medio de relaciones sexuales.

## **1.6 Tratamiento antibiótico**

En objetivo de la terapia antimicrobiana es curar casos individuales para reducir el riesgo de complicaciones y prevenir una mayor transmisión de la infección gonocócica.

### **1.6.1 Historia de los regímenes de tratamiento**

Antes de la era de los antibióticos, el tratamiento de la gonorrea consistió principalmente en vivir un estilo de vida más saludable, con aire fresco, comida adecuada y descanso, abstención alcohólica y de actividad sexual, y la administración de tratamiento basado en diferentes tipos de bálsamos, irrigaciones uretrales, compuestos químicos, e hipertermia. Durante la segunda mitad del siglo XIX, la gonorrea se trataba con la administración de diferentes sustancias y ungüentos cuya finalidad era mantener el cuerpo fresco, evitar la irritación y diluir la orina para disminuir los síntomas inflamatorios (32). La uretritis aguda también se trataba con irrigación uretral con diluciones de permanganato potásico caliente durante varias semanas (32,33). A finales de 1800, se inició la búsqueda de compuestos antibacterianos más específicos, y se investigaron muchos compuestos metálicos, como compuestos de arsénico, antimonio, bismuto, oro, plata y mercurio. Durante la Primera Guerra Mundial, los soldados recibieron paquetes profilácticos que contenían preservativos, ungüento calomel (cloruro de mercurio) y compuestos de plata, y disponían de centros de tratamiento poscoital (32,33). Los compuestos de mercurio fueron utilizados con frecuencia más tarde (34). La artritis gonocócica se trataba administrando calor, con tasas de curación del 80 al 90%, para ello se utilizaba una

cabina que sólo dejaba fuera la cabeza y alcanzaba temperaturas de unos 41°C durante 4-6 horas (35). De esta forma también se resolvían los síntomas genitales.

En 1935, Gerhard Domagk descubrió la sulfanilamida (33). Las sulfonamidas fueron los primeros antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la gonorrea, con una tasa de curación del 80 al 90% de los casos. Pronto se observaron fracasos con la sulfanilamida y entonces se utilizó sulfapiridina, aunque sólo llegó a estar disponible de 1940 a 1941 (36). El siguiente fármaco introducido fue el sulfatiazol, tan eficaz como la sulfapiridina pero con mejor tolerancia (37-39). En la década de los años 40 más del 90% de los aislamientos de gonococo eran resistentes a sulfonamidas *in vitro*, aunque algunas como el sulfametoxazol en combinación con trimetoprim, se siguieron utilizando durante décadas (33).

En 1928 Alexander Fleming descubrió accidentalmente un compuesto producido por un hongo que eliminaba estafilococos y otras bacterias. Este hongo se identificó como *Penicillium* y al compuesto se le llamó inicialmente “zumo de moho” y más tarde, a principios de 1929, penicilina. Sin embargo, la penicilina no se documentó hasta 1943 como tratamiento efectivo de la uretritis gonocócica, lo que marcó una nueva era en el tratamiento de la gonorrea, sustituyendo a las sulfamidas como tratamiento de primera línea (40,41). La penicilina era efectiva a dosis bajas (45 mg) curando más del 90% de los casos, pero con el tiempo, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de penicilina fueron aumentando por la aparición de resistencias cromosómicas, y las dosis se incrementaron para obtener mayores tasas de curación (42). En 1946, se publicaron los primeros casos de resistencia a altas dosis de penicilina (0,6 a 1,6 millones de unidades) y se siguieron aislando durante las dos décadas posteriores. A pesar de ello la penicilina se siguió utilizando hasta que, tras una “epidemia” de gonorrea en EEUU y en países asociados con la “revolución sexual” de los años 60, se publicaran los primeros fracasos en el tratamiento (42).

En 1976 se detectó la producción de dos tipos de  $\beta$ - lactamasas plasmídicas que causaban alto nivel de resistencia a penicilina en cepas aisladas en EEUU y Reino Unido provenientes de Asia Sur-Oriental y el oeste de África subsahariana (43). Sin embargo no fue hasta una década más tarde cuando se abandonó su uso en el tratamiento de la

gonorrea de primera línea, en EEUU y varios países de alrededor, por la aparición de resistencia mediada por codificación cromosómica (44). Actualmente, las cepas gonocócicas con resistencia a penicilina, mediada por plásmidos y / o cromosómica, son frecuentes a nivel mundial (42).

En 1945, Benjamin Minge Duggar descubrió la primera tetraciclina, clortetraciclina. Pronto se empezaron a utilizar para tratar la gonorrea, especialmente en pacientes con alergia a la penicilina. Sin embargo, las CMI de tetraciclina contra las cepas de gonococo se incrementaron con el tiempo, debido a los determinantes cromosómicos de resistencia (45). La aparición del determinante *tetM* (el cual ocasiona resistencia de alto nivel a tetraciclina) en el plásmido conjugativo a mediados de la década de 1980 (46) dio lugar a la exclusión de tetraciclina de las guías de tratamiento en los EEUU y muchos países de todo el mundo. Estas cepas de gonococos con resistencia de alto nivel a tetraciclinas actualmente están extendidas por todo el mundo (42,47).

A principios de 1960, se sintetizó y comercializó la espectinomicina como tratamiento de la gonorrea y fue muy utilizada en los casos con resistencia de alto nivel a penicilina (48). En 1967 se publicó la primera cepa de gonococo resistente a espectinomicina en Holanda (49) y durante los años 80 se publicaron muchos casos de resistencia en países en los que se había utilizado como tratamiento de primera línea (50-52) por lo que se terminó abandonando su uso como monoterapia empírica de primera línea a nivel internacional. En la actualidad es raro encontrar cepas de gonococo resistentes a espectinomicina en cualquier parte del mundo, sin embargo en muchos países, incluido España, se dejó de utilizar por el temor a una rápida aparición de resistencias al introducirlo en el tratamiento de primera línea, por lo que, actualmente no se encuentra disponible de forma comercial. Además las tasas de eficacia en la gonorrea faríngea no son muy altas por lo que no se recomienda su uso en esta localización (53).

En la década de los años 60, George Lesher y colaboradores descubrieron las quinolonas sintéticas como subproducto de la fabricación de cloroquina, introduciéndose el ácido nalidíxico para el tratamiento de las infecciones del tracto

urinario. Posteriormente se introdujeron las fluoroquinolonas ciprofloxacino y ofloxacino como quinolonas de más amplio espectro. A mediados de los años 80 se empezó a utilizar ampliamente ciprofloxacino en el tratamiento de la gonorrea a bajas dosis (250 mg), pero en 1990 se elevaron las dosis (500 mg) por la aparición de los primeros fracasos clínicos al tratamiento (54), extendiéndose rápidamente la resistencia desde la Región del Pacífico Occidental de Asia a todo el mundo o emergiendo de forma independiente (55-58). En el año 2000, en EEUU las cepas resistentes a fluoroquinolonas fueron importadas de Asia a través de Hawaii y posteriormente se propagaron por la costa oeste al resto de los EEUU en su mayoría entre HSH (59). En el año 2007 el CDC recomendó abandonar el uso de fluoroquinolonas en el tratamiento de primera línea de la gonorrea (60). En la actualidad, la prevalencia de cepas de gonococo resistentes a fluoroquinolonas es alta en todo el mundo (4,33,42,47,61,62,64).

En 1952, se descubrieron los macrólidos cuando se aisló eritromicina a partir de un microorganismo del suelo (*Streptomyces erythraeus*), y en 1980 se desarrolló la azitromicina, como derivado sintético de la eritromicina. Los datos clínicos y la resistencia *in vitro* mostraron que la eritromicina no era eficaz en el tratamiento de la gonorrea (33), sin embargo la azitromicina si resultaba eficaz . A mediados de los años 90 se empezaron a publicar casos de sensibilidad disminuida y resistencia a azitromicina en países donde se utilizaba frecuentemente azitromicina para el tratamiento de ITS bacterianas (65-69). Se han identificado cepas de gonococo con resistencia de alto nivel a azitromicina (CIM  $\geq 256$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) en diferentes países: Escocia (70), Inglaterra (71), Argentina (72), Italia (73), EEUU (74) , y Suecia (75). Por lo que, a pesar de que se sigue utilizando azitromicina en muchos países, no se recomienda su uso en monoterapia empírica para el tratamiento de la gonorrea, pero si que se recomienda su uso combinado con otros antibióticos (76,77), no solo por la preocupación de seleccionar rápidamente cepas resistentes, sino también por la posible aparición de efectos adversos al tomar azitromicina oral a dosis de 2 g (71).

Los primeros compuestos de cefalosporinas fueron aisladas de los cultivos del hongo *Cephalosporium acremonium*, descubiertos por Giuseppe Brotzu en 1948 (1).

Tras modificaciones químicas de estos compuestos surgió la primera cefalosporina de utilización en clínica, la cefalotina (en 1964). Tras la eliminación a nivel internacional de las fluoroquinolonas como tratamiento de primera línea en el tratamiento de la gonorrea, las cefalosporinas de tercera generación (CTG), ceftriaxona (inyectable) y cefixima (oral) son las recomendadas para el tratamiento (33,77,78). En algunas zonas también se han utilizado otras cefalosporinas orales cuando cefixima no ha estado disponible, como cefditoren y celdinir en Japón, cefuroxima en Europa, cefpodoxima en los EEUU, y ceftibuteno en Hong Kong (33,78-80).

Las primeras cepas resistentes a CTG se detectaron en Japón a finales de los años 90 (81-84). Esto puede ser debido a que en Japón no se aprobó el uso de ceftriaxona en el tratamiento de la gonorrea hasta finales de los años 90 y hasta ese momento se utilizaban regímenes de tratamiento múltiples con cefalosporinas orales a bajas dosis o se utilizaba cefixima en dosis única a dosis de 300mg, cuando la dosis utilizada internacionalmente era de 400 mg, por lo que no se alcanzaba la CMI y se seleccionaban cepas resistentes a cefalosporinas (82,83,85,86). Por todo esto en el año 2006, se excluyeron las CTG orales de todas las guías de tratamiento japonesas, y desde entonces, ceftriaxona (1 g por vía intravenosa), cefodizima (1 g por vía intravenosa), y espectinomicina (2 g por vía intramuscular) constituyen el tratamiento empírico de primera línea para el tratamiento de la gonorrea no complicada anogenital y faríngea en ese país (87).

Desde entonces se han publicado cepas con sensibilidad disminuida y resistencia a CTG en todo el mundo (42,62,63,64,65,66,88,89,90). La vigilancia de la resistencia antimicrobiana gonocócica es escasa en muchas regiones por lo que la carga global de sensibilidad disminuida y resistencia a CTG es en gran parte desconocida. En la actualidad hay casos publicados de fracasos en el tratamiento con cefixima en Japón, varios países de Europa, Canadá y Sudamérica (82,84,91-96), y fracasos en el tratamiento de la gonorrea faríngea con ceftriaxona en Japón, algunos países europeos, y Australia (97-101).

Es alarmante la aparición de las primeras cepas de gonococo con resistencia extendida (XR) que exhiben resistencia de alto nivel a las CTG utilizadas en el

tratamiento de la gonorrea con resistencia además a muchos de los antimicrobianos disponibles terapéuticamente, estas cepas se han identificado en Kyoto, Japón (97), Quimper, Francia (91) y Cataluña, España (102). Estas cepas XR han sido aisladas en población de alto riesgo de transmisión como trabajadores del sexo comercial o HSH. A partir del momento en el que la última opción de tratamiento de primera línea en monoterapia es la ceftriaxona, se puede producir un aumento en la aparición de cepas XR y podríamos llegar a una situación en la que la gonorrea no se podría tratar utilizando monoterapia antimicrobiana. Afortunadamente, tras la identificación de la primera cepa XR (H041) se produjo un incremento en la vigilancia, emprendido en Kyoto y Osaka (del año 2010 al año 2012), y esta cepa no se ha vuelto a aislar (103).

### **1.6.2 Regímenes de tratamiento recomendados en la actualidad**

Los regímenes de tratamiento recomendados en nuestro país para las infecciones gonocócicas no complicadas, infección uretral, cervical, rectal o faríngea, son la terapia con ceftriaxona en dosis única de 250 a 500 mg vía intramuscular (en niños dosis de 125mg) o cefixima en dosis única de 400 mg vía oral junto con azitromicina 1-2 g. En casos de infección gonocócica diseminada, bacteriemia y artritis las recomendaciones son ceftriaxona 1g al día vía intramuscular o intravenosa, durante dos o tres días y después continuar con cefixima 400 mg al día por vía oral hasta completar de 7 a 10 días de tratamiento. En casos de meningitis se recomienda ceftriaxona en dosis de 2 g al día vía intravenosa durante 10 días y en caso de endocarditis el mismo régimen terapéutico durante 4 semanas. Para el tratamiento de la *ophthalmia neonatorum* se administra ceftriaxona en dosis de 25-50 mg/kg vía parenteral (hasta 125mg) en dosis única (104).

Las alternativas al tratamiento de primera línea son las fluoroquinolonas orales, bien ciprofloxacino 500 mg (la más utilizada) o levofloxacino 500 mg, o azitromicina en dosis de 2 g vía oral en dosis única. La meningitis y la endocarditis pueden tratarse con penicilina G  $12 \times 10^6$  U/día (confirmando siempre que la cepa sea sensible). A la hora de utilizar las fluoroquinolonas para el tratamiento de la gonorrea hay que tener en cuenta que en algunas áreas de nuestro país más del 30% de las cepas de gonococo son resistentes. Si el tratamiento antimicrobiano se realiza con un antibiótico

betalactámico, es aconsejable añadir doxiciclina 100 mg cada 12 h vía oral durante 7 días o azitromicina 1 g en dosis única, con el fin de erradicar la posible infección coexistente por *C. trachomatis*. En áreas con prevalencia de cepas con sensibilidad disminuida a CTG (con prevalencias mayores del 5%), el tratamiento empírico inicial puede llevarse a cabo con la asociación de ceftriaxona en dosis de 500 mg por vía intramuscular y azitromicina 2 g vía oral en dosis única (104). Ceftriaxona y azitromicina en dosis única probablemente son eficaces también frente a la sífilis en período de incubación, en cambio la eficacia de cefixima en la sífilis no se conoce. Hay que tener en cuenta que las fluoroquinolonas no son activas frente a *T. pallidum*. Los espermicidas como el nonoxynol-9 reducen el riesgo de contagio por gonococo (104).

Otras indicaciones importantes que apuntan las guías de tratamiento de ITS son tratar a los contactos sexuales de hasta 2 meses antes del episodio, evitar el coito sin preservativo hasta que el paciente y sus contactos hayan completado el tratamiento y realizar pruebas para diagnóstico de otras ITS.

### **1.6.3 Mecanismos de resistencia antimicrobiana en *N. gonorrhoeae***

La resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* tiene importantes implicaciones en el control de la infección gonocócica y de sus complicaciones. Como ya se ha comentado, existe una gran preocupación debido a la aparición de cepas de *N. gonorrhoeae* multirresistentes (MR) y cepas con resistencia extendida (XR) que incluyen resistencia a la ceftriaxona que es la última opción de tratamiento de primera línea en monoterapia. Según Unemo *et al.* (1), se definen como cepas MR las cepas que son resistentes a una clase de antibióticos de los actualmente recomendados para el tratamiento de primera línea, (CTG [orales o inyectables son considerados por separado] o espectinomicina) y dos o más clases de antibióticos de los frecuentemente utilizados o recomendados para su tratamiento (por ejemplo, penicilinas, fluoroquinolonas, azitromicina, aminoglucósidos y carbapenems). Las cepas XR son las resistentes a 2 clases de antibióticos de los actualmente recomendados para el tratamiento de primera línea y tres o más clases de antibióticos de los frecuentemente utilizados o recomendados para su tratamiento. Aunque según otros autores, se



definen como MR las cepas resistentes a tres o más antibióticos de los frecuentemente utilizados o recomendados para su tratamiento (105).

Una propiedad que caracteriza a *N. gonorrhoeae* es su extraordinaria capacidad de mutación genética ya que presenta competencia natural para transferir fragmentos de genes o genes enteros (por transformación y posterior recombinación con el genoma) o por mutaciones específicas, durante todo su ciclo de vida. Estos mecanismos los utiliza para adaptarse y sobrevivir a los ambientes hostiles del entorno y las diferentes situaciones en el huésped humano, siendo un gran ejemplo de supervivencia. De esta manera *N. gonorrhoeae* va evolucionando y desarrollando mecanismos fisiológicos de resistencia a los antibióticos utilizados para su tratamiento, mediante diferentes mecanismos:

- ✓ destrucción o modificación del antimicrobiano por medios enzimáticos.
- ✓ modificación de la diana o reducción de la afinidad por los antimicrobianos.
- ✓ disminución de la entrada de los antimicrobianos al microorganismo.
- ✓ aumento del flujo de salida de los antimicrobianos del microorganismo.

En *N. gonorrhoeae* la mayoría de los determinantes de resistencia se sitúan en los cromosomas, y sólo se transmiten por plásmidos el gen *bla<sub>TEM</sub>*(106,107) y el gen *tetM* (46), que confieren resistencia de alto nivel a penicilina y tetraciclina respectivamente. La adquisición de determinantes de resistencia puede producir resistencia *in vivo* en algunos casos pero en otros casos sólo confiere un aumento gradual de resistencia que sólo se manifiesta clínicamente si hay más determinantes de resistencia acumulativos. Esto es lo que ocurrió con la penicilina, que desapareció como tratamiento efectivo de la gonorrea debido a la adquisición de varios determinantes cromosómicos de resistencia.

La exposición de *N. gonorrhoeae* y de otras especies de Neisserias a los antimicrobianos indicados para el tratamiento de la gonorrea u otras infecciones pueden seleccionar cepas resistentes. Las cepas de *Neisseria spp.* saprófitas habitan en zonas anatómicas, como la faringe, y a menudo están expuestas a los antimicrobianos. Por lo que la resistencia antimicrobiana puede surgir inicialmente en las cepas de

*Neisseria spp.* saprófitas actuando como reservorio de genes de resistencia que se pueden transferir fácilmente a las cepas gonocócicas por transformación. Se ha sugerido que la convivencia de cepas de gonococo con *Neisseria spp.* en la gonorrea faríngea asintomática durante largos periodos de tiempo sea lo que proporcione el ambiente propicio para que se lleve a cabo esta transferencia de genes (42,59,62,108,109). Estas cepas resistentes pueden propagarse posteriormente, primero dentro de una zona geográfica y después establecer una presencia internacional. La frecuencia de transformación de ADN cromosómico en gonococos es muy alta, sin embargo, la frecuencia con la que se da la transformación plasmídica es mucho más baja. De esta forma, aunque la tasa de mutaciones espontáneas que determinan resistencia sea baja (110), la transferencia horizontal de estos alelos por transformación es muy eficiente en la difusión de las resistencias dentro de la comunidad.

### **Resistencia a Sulfonamidas**

Las sulfonamidas se dirigen a la enzima bacteriana dihidropteroato sintetasa (DHPS), inhibiendo así la síntesis del ácido fólico en la bacteria. La resistencia a sulfamidas puede estar mediada por la síntesis excesiva de ácido p-aminobenzoico, que diluye el antimicrobiano, o por alteraciones en el gen *folP* (mutaciones puntuales o la presencia de un gen mosaico que contiene secuencias de ADN de *Neisseria spp.* saprófitas), que codifica la enzima DHPS diana. Las alteraciones de la enzima DHPS dan como resultado una disminución significativa de la afinidad de sulfonamidas y por lo tanto un efecto bacteriostático (87,111,112).

### **Resistencia a Penicilina**

#### ✓ **Resistencia plasmídica**

Los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, tales como penicilinas y cefalosporinas, inhiben la formación de los enlaces cruzados del peptidoglicano en la pared celular bacteriana a través de la unión del anillo beta-lactámico a la enzima transpeptidasa (proteína de unión a la penicilina [PBP]), lo que da lugar a una actividad bactericida. Las cepas gonocócicas con resistencia de alto nivel a la penicilina mediada por

plásmidos contienen tradicionalmente plásmidos con un gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, que codifica una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM-1. Esta enzima hidroliza el enlace amida cíclica de las penicilinas sensibles a  $\beta$ -lactamasas, abriendo el anillo  $\beta$ -lactámico e inactivando la penicilina. Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de *N. gonorrhoeae* fueron adquiridas probablemente por transferencia en la convivencia con *Haemophilus parainfluenzae*, lo que puede dar lugar a un plásmido R estrechamente relacionado, RSF0885 (113,114). Después de las primeras descripciones de cepas gonocócicas productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas en 1976 (78,79), estas cepas y los propios plásmidos se propagaron rápidamente a nivel internacional. Se han descrito diferentes tipos de plásmidos pero todos ellos contienen un elemento transponible TnA (Tn2) que lleva el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> que codifica la  $\beta$ -lactamasa TEM-1.

#### ✓ **Resistencia cromosómica**

En los gonococos resistentes a la penicilina, tradicionalmente ha habido de 5 a 9 mutaciones en el gen *penA* (que codifica PBP2, la principal diana letal de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos), y juntas disminuyen las tasas de acilación de PBP2, por consiguiente, disminuyen la sensibilidad a la penicilina (38,115,116). Estas mutaciones fueron adquiridas por gonococos a través de la transformación de secuencias *penA* de *Neisseria spp.* comensales. Aunque la alteración de la PBP2 es el principal mecanismo de resistencia cromosómica a penicilina en los gonococos, las cepas que exhiben resistencia de alto nivel a la penicilina también poseen una mutación sin sentido en el gen *ponA* (denominado el alelo *ponA1*) que codifica una PBP1, que tiene una tasa de acilación a la penicilina aproximadamente 16 veces menor que la cepa de tipo salvaje PBP2 (115). Las CMI de penicilina pueden aumentar aún más debido a mutaciones específicas que producen un aumento de la salida de penicilina por sobreexpresión de un sistema bomba de salida MtrCDE (determinante de resistencia *mtrR*) (117), y por mutaciones que producen disminución de la entrada de la penicilina, debido a la disminución de la permeabilidad a través de una porina de la membrana exterior PorB1b (determinantes *penB* resistencia) (118). Las mutaciones específicas en el gen *pilQ* (el cual codifica una secretina de membrana externa PilQ, que interacciona con los pili tipo IV formando un poro en la membrana externa a través del cual los

antimicrobianos pueden difundirse en el periplasma) también se encuentran en las cepas con resistencia de alto nivel a la penicilina que contienen otras alteraciones como *penA*. Sin embargo, es improbable que estas mutaciones *pilQ* se encuentren en los aislados clínicos, ya que interrumpen la formación adecuada de los pili de tipo IV, que son esenciales para la patogénesis de los gonococos (119). Por último, queda al menos un determinante de resistencia a la penicilina desconocido, no transformable: "El factor X", que aumenta las CIMs de penicilina (62,97).

## Resistencia a Tetraciclinas

### ✓ Resistencia plasmídica

Las tetraciclinas inhiben la unión de la aminoacil-ARNt al complejo ribosoma-ARNm, principalmente por la unión a la subunidad ribosomal 30S, y en consecuencia inhiben la síntesis de proteínas lo cual provoca un efecto bacteriostático. La resistencia de alto nivel a la tetraciclina mediada por plásmidos (CIM  $\geq 16$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) en los gonococos es debido al gen *tetM* que inicialmente se describió para el género *Streptococcus* (46). TetM confiere resistencia de alto nivel a la tetraciclina uniéndose a los ribosomas y causando la liberación de la molécula de tetraciclina, permitiendo así que la síntesis de proteínas se lleve a cabo. Esto lo consigue por su similitud estructural con el factor de elongación G (EF-G), involucrado en la síntesis de proteínas (120). El gen *tetM* se incorpora al gonococo por integración en el plásmido conjugativo 24.5-MDa para producir el plásmido 25.2-MDa (40,6 kb) que se mantiene estable y puede ser transferido a otro gonococo por conjugación (121).

### ✓ Resistencia cromosómica

La resistencia cromosómica a tetraciclinas en gonococo es debido a mutaciones que modifican la estructura de una proteína ribosomal (diana), interaccionando con determinantes de resistencia que modifican la salida del antibiótico a través de la membrana de la célula bacteriana. Estas mutaciones son la *tet-2*, junto con las mutaciones *mtrR* y *penB* (116). La mutación *tet-2* produce una serie de alteraciones en la proteína ribosomal S10 que reducen la afinidad de la tetraciclina por el ribosoma (122). Y las mutaciones *mtrR* y *penB* disminuyen la entrada de tetraciclina y aumentan

la salida de la misma aumentando aún mas la resistencia.

### **Resistencia a Espectinomicina**

La espectinomicina es un antibiótico bacteriostático ya que se une a la subunidad 30S ribosomal inhibiendo la traslación en la síntesis de proteínas. Este antimicrobiano interacciona específicamente con el ARNr 16S y bloquea el factor de elongación G (EF-G), catalizador de la traslocación del peptidil- ARNt del sitio A al sitio P durante la elongación polipeptídica. Pronto se demostró que la resistencia de alto nivel a la espectinomicina en gonococo (CMI > 1024 µg/ml) era causada por el polimorfismo de un nucleótido C1192U situado en la región de unión de la espectinomicina de la hélice 34 del ARNr 16S (123). También se produce resistencia de bajo nivel a la espectinomicina (CMI de 128 µg/ml) debido a una mutación T24P en la proteína ribosómica S5 lo que perturba su unión al ARNr 16S (129).

### **Resistencia a Quinolonas**

La ADN girasa y la topoisomerasa IV bacterianas son topoisomerasas tipo II esenciales para el metabolismo del ADN. Estas enzimas actúan rompiendo y desenrollando la doble hélice de ADN en una reacción que va acompañada con hidrólisis de ATP. Las quinolonas inhiben estas enzimas dando lugar a un efecto bacteriostático. Las bacterias desarrollan resistencia a quinolonas a través de mutaciones que alteran el reconocimiento de estas enzimas diana. La ADN girasa es una enzima heterotetramérica que está compuesta por dos subunidades GyrA y dos GyrB. Las mutaciones *gyrA* reducen la afinidad de la enzima por las quinolonas, haciendo a la bacteria resistente al efecto inhibitorio. La topoisomerasa IV es un tetrámero de dos subunidades ParC y dos ParE, codificadas por los genes *parC* y *parE* respectivamente. Las quinolonas pueden inhibir también la actividad de la topoisomerasa IV, aunque *in vitro* se necesitan concentraciones de antimicrobiano más altas que las necesarias para inhibir la ADN girasa.

La resistencia intermedia a quinolonas se produce por mutaciones específicas en un nucleótido en *gyrA*, pero la resistencia de alto nivel requiere una o varias mutaciones específicas concomitantes en *parC*. Estas mutaciones pueden ser

fácilmente seleccionadas por la exposición a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino y también transferidas a otros gonococos por transformación (125). Niveles de resistencia a quinolonas más altos requieren mutaciones en *parC* además de en *gyrA*. Las mutaciones en *gyrB* y *parE* no parecen tener ningún impacto significativo sobre la resistencia a ciprofloxacino (126).

### Resistencia a Macrólidos

Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas por unión a la subunidad ribosomal 50S. Evitan la translocación del peptidil-ARNt al interactuar con el ARNr 23S de la subunidad 50S, provocando de esta manera la liberación de polipéptidos incompletos. Por ello producen un efecto bacteriostático. La resistencia bacteriana a los macrólidos puede ser resultado de la modificación de la diana ribosomal bien por metilación asociada al ARNr 23S o por mutaciones específicas en el ARNr 23S y/o por una sobreexpresión del sistema bomba de salida:

- Las metilasas de ARNr pueden causar resistencia a los macrólidos a través del bloqueo de la unión del macrólido al ARNr 23S por metilación de un residuo de adenosina. Los genes que codifican el ARNr metilasa son los genes *erm* (o genes de resistencia macrolido-lincosamida-estreptogramina B) y pueden ser transportados por transposones de conjugación (127). Los genes *erm* pueden conferir resistencia de alto nivel a eritromicina (CMI de 4 a 16 µg/ml) y bajo nivel de resistencia a azitromicina (CMI de 1 a 4 µg/ml) en ausencia de otros determinantes de resistencia. Sin embargo, durante los últimos años, los genes *erm* han sido muy poco frecuentes entre las cepas gonocócicas resistentes a macrólidos (71).
- Las mutaciones específicas del ARNr 23S pueden también dar lugar a resistencias de bajo nivel (mutación C2611T) (128) y alto nivel (A2059G mutation) (71,72,74) a eritromicina y azitromicina. Las CMI de los macrólidos contra estas cepas gonocócicas resistentes dependen de cuántos de los cuatro alelos del gen ARNr 23S contienen la mutación específica, cuanto mayor es el número de mutaciones más posibilidades existen de desarrollar resistencia.
- Y por último, el aumento de la CMI de los macrólidos en las cepas de gonococo resistentes puede ser debido a la sobreexpresión de los sistemas de salida,

particularmente la bomba de salida MtrCDE (129), pero también las bombas de salida MacAB (130) y *mef*-encoded (127).

### Resistencia a Cefalosporinas

Las cefalosporinas, al igual que otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, inhiben los enlaces peptídicos cruzados del peptidoglicano de la pared celular de la bacteria por unión del anillo  $\beta$ -lactámico a las transpeptidasas PBP2 (penicillin-binding proteins), lo que da lugar a un efecto bactericida.

En *N. gonorrhoeae* los determinantes de resistencia primaria a cefalosporinas de amplio espectro (CES), al igual que en el caso de la penicilina, son alteraciones específicas del gen *penA* que codifica una PBP2 lo que constituye una diana letal para cefalosporinas (62). El gen *penA* de cepas resistentes a CES es un gen mosaico que contiene de 60 a 70 aminoácidos alterados (62). Se cree que estos alelos alterados del gen mosaico *penA* surgen por transformación del ADN seguido por recombinación con partes del gen *penA*, a causa de la convivencia con *Neisserias* saprófitas de la orofaringe como *Neisseria perflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria cinerea*, y / o *Neisseria flavescens*, durante las infecciones gonocócicas faríngeas (62). Este fenómeno produce un mayor aumento en la CMI de cefixima que en la de ceftriaxona probablemente causado por relaciones estructura-función, ya que la cadena lateral del extremo C-3 del esqueleto cefalosporánico de la ceftriaxona es más larga (62). Respecto a las cepas de *N. gonorrhoeae* con alto nivel de resistencia a todas las CES aisladas en Japón, el alelo del gen mosaico *penA* contenía 12 cambios aminoacídicos a diferencia del alelo X, relacionado con la mayoría de las resistencias y fracasos en el tratamiento temprano de cefixima en Japón (97).

Recientemente se han aislado cepas resistentes a CES en Francia (97) y en España (102), y ambas cepas pertenecen al secuenciotipo MLST ST1901 y al secuenciotipo NG-MAST ST1407, que se han identificado como un clon multirresistente que presenta una gran proporción de cepas con sensibilidad disminuida y resistencia a CES en muchos países del mundo (62). Ambas cepas también contenían el alelo tipo XXXIV en el gen mosaico *penA* con una alteración adicional

A501P por lo que manifiestan alto nivel de resistencia a ceftriaxona y cefixima. En general la causa de la resistencia total a las CES de las cepas gonocócicas XR todavía se tiene que aclarar.

Otro mecanismo de resistencia a CES es el aumento del flujo de salida y la disminución de la entrada al microorganismo debido a los determinantes de resistencia *mtrR* y *penB*. Curiosamente ambos tienen mayores efectos sobre la CMI de ceftriaxona que de cefixima, lo que sugiere que la cefixima no es buen sustrato para la bomba de salida MtrCDE o la porina PorB1b. Como en el casos de la penicilina, también se ha demostrado la transferencia de estos determinantes cromosómicos de resistencia (1).

#### **1.6.4 Respuesta internacional a la evolución de resistencia**

La aparición de cepas gonocócicas resistentes a ceftriaxona ha llevado a una situación de gran preocupación a nivel internacional y a la aparición de las primeras reacciones. En junio de 2012, la OMS lanzó una alerta resaltando la necesidad de actuar para frenar la propagación de la gonococia resistente, y ese mismo año publicó un plan de control con el objetivo de contribuir a este fin (131); el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC) también publicó en 2012 un plan de control para Europa (132). Además, todas las guías de tratamiento recomiendan regímenes con dos antibióticos para resolver la gonorrea no complicada anorrectal y faríngea, en Europa (77), EEUU (76) y en el Reino Unido (133). Actualmente se recomienda ceftriaxona intramuscular (250mg o 500mg en dosis única) junto con azitromicina oral (1g o 2g) o doxiciclina (100 mg dos veces al día durante 7 días) para cubrir las posibles infecciones por *C. trachomatis*.

La OMS estableció en el año 1990 el programa global GASP (*Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*) que fue relanzado en 2009. Este tiene como objetivo coordinar otros programas existentes en todo el mundo. Este refuerzo en la vigilancia de la resistencia debe monitorizar las tendencias de resistencia antimicrobiana, identificar la aparición de nuevas resistencias, e informar las recomendaciones de tratamiento. Para ello es crucial mantener los cultivos de



gonococo en los laboratorios y una vigilancia epidemiológica en todo el mundo. Estos planes requieren una voluntad política y una importante financiación para invertir en la infraestructura de los laboratorios y en personal entrenado. Todos los planes resaltan la importancia de acciones globales que disminuyan la carga de infecciones gonocócicas mejorando la prevención temprana, el diagnóstico, la búsqueda de contactos, el tratamiento y la vigilancia epidemiológica de los casos diagnosticados. Este compromiso debe combinarse con mejores estrategias para el control de los antimicrobianos (guías para un uso apropiado, selección, etc) y una mayor conciencia entre microbiólogos, epidemiólogos y clínicos. Los esfuerzos deben dirigirse a las poblaciones con mayor riesgo, como los trabajadores sexuales y los HSH, y al tratamiento de la gonorrea faríngea ya que es difícil de erradicar y un reservorio asintomático para la transmisión de la enfermedad y la aparición de resistencias.

### 1.6.5 Futuras perspectivas para el tratamiento

El régimen de tratamiento con ceftriaxona y azitromicina parece ser fuertemente efectivo y se debería de considerar en todas las situaciones en las que no haya suficientes datos de resistencia antimicrobiana o no se apoye otro régimen de tratamiento. A pesar de todo, la sensibilidad a ceftriaxona disminuye globalmente y la resistencia a azitromicina prevalece en muchas zonas donde se utiliza frecuentemente, y ya circulan cepas con las dos características. Además, la doble terapia no es posible en muchas zonas con pocos recursos, que además suelen ser las zonas con mayor carga de infección gonocócica, por lo que es muy difícil paralizar la propagación de nuevas cepas resistentes. Por todo lo expuesto la doble terapia no parece una solución efectiva a largo plazo. Desde una perspectiva global de salud pública es esencial incluir nuevos antimicrobianos en los regímenes de tratamiento. Aquí se destacan algunos de los más estudiados:

- Recientemente se ha publicado un ensayo clínico multicéntrico en el que se evalúa **gentamicina** (en dosis única de 240 mg vía intramuscular) más azitromicina (2 g vía oral en una sola dosis) y **gemifloxacino** (320 mg vía oral en una sola dosis) más azitromicina (2 g vía oral en una sola dosis) como potenciales alternativas al tratamiento en la gonorrea no complicada. En este estudio se observa un porcentaje

de curación del 100 % en los casos tratados con gentamicina-azitromicina y un 99,5 % en los casos de gemifloxacino-azitromicina, aunque se observan efectos adversos con relativa frecuencia en ambas opciones (134). En Malawi se lleva utilizando gentamicina parenteral como tratamiento de primera línea desde hace 20 años, sin observarse ninguna resistencia *in vitro* (135,136), aunque no se utiliza la gentamicina en monoterapia si no que se utiliza para el manejo de las infecciones urogenitales junto con doxiciclina y no hay datos sobre eficacia del tratamiento en la gonorrea anorrectal y faríngea. En Europa también se ha observado una alta sensibilidad de gentamicina *in vitro* (137). En un meta-análisis reciente realizado en EEUU se realiza monoterapia con gentamicina alcanzando porcentajes de curación del 91,5% (138). No obstante, no poseemos datos que relacionen las CMI de gentamicina y los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos con los resultados del tratamiento, por lo que no disponemos de puntos de corte de resistencia de referencia.

- **Solitromicina** es una nueva fluoroquinolona oral que ha mostrado una buena actividad contra gonococo *in vitro*, incluyendo cepas resistentes a CES, sin embargo no presentan buena actividad en cepas con resistencia de alto nivel a azitromicina (139).
- **Ertapenem** también presenta buena actividad *in vitro* frente a cepas multirresistentes aunque hay determinantes de resistencia a CES que aumentan la CMI de ertapenem (140).

Por lo tanto gentamicina, solitromicina y ertapenem podrían suponer una alternativa futura al tratamiento de la gonorrea, probablemente no en monoterapia empírica de primera línea si no como opción en las cepas resistentes a ceftriaxona o en regímenes de tratamiento con doble terapia.

Otros antibióticos que han mostrado cierta actividad *in vitro* contra las cepas de gonococo son **tigeciclina**, **eravaciclina** (análogo sintético de tetraciclina), **dalbavancina** (lipoglicopéptido semisintético) y dos nuevas fluoroquinolonas de amplio espectro **avarofloxacino** y **delafloxacino** (1).

## 1.7 Diagnóstico de gonorrea

Como ya se ha comentado, la infección gonocócica en muchas ocasiones es asintomática y si manifiesta síntomas faríngeos y rectales suelen ser muy inespecíficos. Por lo que los procedimientos del laboratorio son fundamentales para el diagnóstico, la detección de casos y la realización de pruebas de sensibilidad antibiótica. El diagnóstico consiste en la detección del microorganismo *N. gonorrhoeae* o su material genético tanto en muestras genitales como extragenitales.

### 1.7.1 Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

La localización anatómica de la muestra depende de muchos factores: el sexo, la edad, las prácticas sexuales, las manifestaciones clínicas y el método de diagnóstico que se vaya a realizar. En mujeres la mejor muestra para la realización de cultivo y microscopía es la endocervical, y secundariamente las muestras vaginales y uretrales. Y para TAANs la muestra endocervical o vaginal. En hombres heterosexuales la mejor muestra para el cultivo y microscopía es la uretral, y para TAANs la orina. En hombres y mujeres con signos clínicos indicativos/o de prácticas sexuales anales y orales, se deben de añadir las muestras rectales y faríngeas.

Para la obtención de la muestra se utilizan torundas de plástico o alambre flexible con punta de rayón (viscosa), dacrón (tereftalato de polietileno) o alginato cálcico con medio de transporte tipo Stuart-Amies. Se deben evitar las torundas de madera y punta de algodón y el uso de antisépticos, analgésicos y lubricantes a base de aceites ya que contienen ácidos grasos saturados que pueden ser tóxicos para el microorganismo (13). La toma de muestras debe realizarse antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. Para el diagnóstico con TAANs, se deben seguir detalladamente las recomendaciones del fabricante respecto a la recogida, transporte y almacenamiento de las muestras.

- **Endocervical:** Las muestras endocervicales se obtienen mediante la introducción de la torunda, tras la eliminación del moco que cubre el cuello uterino (2), 2-3 cm en el canal endocervical, y realizando un ligero movimiento de rotación

durante 5-10 segundos (13). Estas muestras no deben tomarse en niñas en prepubertad o mujeres que han sufrido una histerectomía.

- **Uretral:** las muestras uretrales se tienen que tomar al menos una hora después de que el paciente haya orinado. Con la torunda se toma muestra de la secreción y si no se obtiene exudado, se inserta una torunda fina 2-3 cm en la uretra y suavemente se rota durante unos 5-10 segundos. En mujeres, se masajea la uretra contra la sínfisis del pubis y se realiza la misma técnica que en el hombre.
- **Vaginal:** se toma muestra vaginal sólo en el caso de realizar una TAAN. La torunda se debe rotar contra las paredes posteriores de la vagina durante 5 segundos. Las torundas vaginales podrían ser obtenidas tanto por el propio paciente como por el clínico.
- **Recogida de la primera orina:** también se toma sólo en caso de realización de una TAAN. El paciente no tiene que limpiar el área genital. Se toman los primeros 10-20 ml de orina evacuados en un recipiente estéril al menos una hora después de la micción anterior.
- **Rectal:** Se inserta la torunda 2-3 cm dentro del recto y se rota contra las paredes durante 10 segundos. Las torundas muy contaminadas con heces tienen que ser desechadas. En pacientes sintomáticos, la recogida directa con torunda de las lesiones bajo la guía de un rectoscopio mejora el rendimiento del cultivo (3).
- **Faríngea:** hay que frotar con la torunda la zona de la faringe posterior por encima del borde inferior del paladar blando y las criptas de las amígdalas.
- **Conjuntival:** para tomar la muestra conjuntival hay que retraer el párpado inferior y deslizar una torunda delgada a través de la superficie de la conjuntiva palpebral inferior hacia la esquina mediana del ojo.

### 1. 7. 2 Diagnóstico presuntivo: Microscopía

Además de ser una técnica sencilla y rápida, la microscopía es un método fiable para el diagnóstico de la gonorrea en hombres con uretritis purulenta. En estos casos la observación en la tinción de Gram de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) con diplococos gram negativos intracelulares se puede considerar diagnóstico de infección gonocócica con una sensibilidad mayor del 99% y una especificidad del 99% (13). Pueden darse resultados falsos positivos, y la especificidad puede variar (80-99%)

dependiendo de la experiencia del microbiólogo que lo examina. Sin embargo una tinción de Gram negativa no se debería considerar suficiente para descartar infección en un hombre asintomático. En muestras rectales y faríngeas no se recomienda este análisis ya que en estas muestras podemos encontrar una gran cantidad de microorganismos saprófitos lo que disminuye la sensibilidad de la prueba.

### **1.7.3 Cultivo e identificación de *N. gonorrhoeae* (presuntiva y definitiva)**

Durante muchos años el cultivo de *N. gonorrhoeae* se ha considerado el “patrón oro” en el diagnóstico de la gonorrea genital y extragenital. Es una técnica sensible y con una especificidad de hasta el 100% si se realiza en unas condiciones adecuadas, además es barata y es el único procedimiento que permite realizar ensayos de sensibilidad antibiótica completos. Sin embargo, es una técnica relativamente lenta, y para obtener una alta sensibilidad y especificidad, es importante optimizar al máximo las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de las muestras, así como la metodología de cultivo, ya que *N. gonorrhoeae* es extremadamente sensible a condiciones ambientales hostiles.

#### ➤ **Transporte y cultivo**

Como ya hemos mencionado, *N. gonorrhoeae* es muy sensible a las condiciones ambientales adversas (temperatura, desecación, oxidación y sustancias tóxicas) por lo que el transporte de la muestra desde la consulta médica al laboratorio reducirá la viabilidad del microorganismo.

Las muestras inoculadas directamente en medios selectivos en el momento que se realizan las tomas en la misma consulta es el método óptimo, pero si esto no es posible, las torundas deben ser insertadas en un medio de transporte no nutritivo como Stuart o Amies o ser inoculadas en un sistema de transporte nutritivo como Transgrow, Jembec (141), Gono-Pak, o el sistema InTray GC (3). Estos sistemas de transporte nutritivos presentan algunas ventajas ya que tienen una vida útil más larga y recuperan mejor los microorganismos, aunque son más caros que el transporte con torunda (142). Si se utiliza un medio de transporte no nutritivo, la tasa de aislamiento después del transporte de la muestra a temperatura ambiente (20-25°C) durante 6

horas es aproximadamente del 100% y si pasan 12 horas hasta que se procesa la muestra es de más del 90%. Sin embargo, después de 48 horas, el número de gonococos decrece y la recuperación del microorganismo podría no ser posible, sobre todo en muestras de pacientes asintomáticos que contienen una carga microbiana muy baja. Cuando se espera un tiempo de transporte mayor de 48 horas, lo ideal es utilizar sistemas de transporte nutritivos que incorporan un medio de cultivo y proporcionan una atmósfera con una buena concentración de CO<sub>2</sub>. Con estos medios, se obtienen resultados aceptables si el tiempo de transporte no excede los 2 días (141).

Por lo tanto, la rentabilidad del cultivo para el diagnóstico de gonorrea está condicionada por los siguientes factores:

- El número de muestras de diferentes localizaciones.
- La técnica utilizada y las torundas utilizadas para la toma de muestra.
- Las condiciones y tiempo de duración del transporte de la muestra al laboratorio.
- La composición y calidad del medio de cultivo.
- Las condiciones de inoculación e incubación.
- Los reactivos y técnicas utilizadas para la identificación de *N. gonorrhoeae*.

Los medios de cultivo para el aislamiento *N. gonorrhoeae* incluyen una base de medio suplementado con sangre equina o bovina calentada (color achocolatado) para estimular el crecimiento de los gonococos. Los medios comerciales preparados de agar chocolate contienen Hemina sintética y factores de crecimiento para *N. gonorrhoeae*. Los medios selectivos difieren de los medios de cultivo de rutina en que contienen agentes antimicrobianos (es decir, vancomicina, colistina, nistatina y u otro agente antimicótico) que inhiben el crecimiento de otras bacterias y hongos (143). Para el diagnóstico rutinario de la gonorrea se recomienda el uso de medios de cultivo selectivos como Thayer- Martin (144), Thayer-Martin modificado (MTM) y agar Ciudad de Nueva York (NYC) (145). Se recomienda también utilizar un medio de cultivo no selectivo para las muestras urogenitales.

➤ **Control de calidad del medio de cultivo**

A cada lote de medio de cultivo se le debe de realizar un control de esterilidad, de su capacidad para permitir el crecimiento de los gonococos, y su capacidad para inhibir otros microorganismos contaminantes. Para la evaluación de la capacidad de crecimiento y control de calidad de todos los métodos de diagnóstico, se pueden utilizar cepas de *N. gonorrhoeae* de referencia como la cepa ATCC 49226 que describe el CLSI (146) o cepas de referencia de la OMS (147). Para el control de la inhibición de microorganismos distintos de *N. gonorrhoeae*, se pueden utilizar cepas de referencia de, por ejemplo, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *N. sicca* (ATCC 9913) y *Candida albicans* (ATCC 14053).

**1.7.3.1 Identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae* después del cultivo**

Con una tinción de Gram y la prueba de la oxidasa de las colonias sospechosas aisladas en los medios selectivos podemos hacer un diagnóstico presuntivo de gonorrea.

La prueba de la oxidasa detecta la presencia de citocromo c oxidasa en el microorganismo. Esta prueba se realiza frotando unas colonias directamente sobre una tira de papel de filtro humedecido con el reactivo (solución acuosa al 1% de dihidrocloruro tetrametil-para-fenilendiamina) preparado en el laboratorio o un reactivo comercial. Un resultado positivo muestra un color púrpura en unos pocos segundos (máximo 30 segundos). También se puede realizar añadiendo directamente el reactivo de la prueba sobre colonias de un cultivo puro, pero hay que tener cuidado ya que el reactivo es tóxico para las bacterias y si hay pocas colonias se deben subcultivar antes de realizar la prueba.

La observación de colonias con morfología típica en cultivos selectivos de muestras genitales, que son oxidasa positivos y con tinción de gram compatible pueden ser identificados presuntivamente como *N. gonorrhoeae*, sobre todo si se trata de una paciente con alto riesgo de sufrir una infección gonocócica. Con estos datos ya se puede iniciar la terapia antimicrobiana (142), incluso frecuentemente, en

situaciones donde los recursos son limitados, estas pueden ser las únicas pruebas realizadas.

Para realizar un diagnóstico definitivo, es necesario confirmar la identificación de *N. gonorrhoeae* distinguiéndolo de otras especies de *Neisseria* estrechamente relacionadas como *N. meningitidis*, *N. lactamica*, y *N. cinerea*, que también podrían crecer en los medios selectivos, sobre todo en el caso de muestras extragenitales donde la probabilidad de aislar estas *Neisserias* es muy alta.

➤ **Control de calidad de los reactivos para la prueba de la oxidasa**

El CC se debería realizar siempre que se vaya a utilizar un nuevo lote de reactivos. Se pueden utilizar cepas de referencia oxidasa positivas, tales como *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (146) o cepas de referencia de la OMS 2008 (147), y negativas, como *S. epidermidis* (ATCC 12228) o *E. coli* (ATCC 25922).

### **1.7.3.2 Confirmación de la identificación después del cultivo**

Se pueden utilizar tres enfoques para la confirmación: el uso de pruebas bioquímicas que diferencian a *N. gonorrhoeae* de otras especies, el uso de nuevas técnicas de espectrometría de masas como el MALDI-TOF, el uso de pruebas inmunológicas o el uso de la detección molecular.

La elección entre estos enfoques dependerá de número de cepas a ensayar, la experiencia, y del coste. En los laboratorios donde se aíslan gonococos con poca frecuencia, se aconseja el uso de un equipo comercial que proporcione una identificación completa. Ninguna prueba es 100% sensible y específica, así que si se dispone de recursos, actualmente se recomienda que los aislados clínicos de *N. gonorrhoeae* se confirmen mediante una combinación de pruebas bioquímicas e inmunológicas o pruebas moleculares. Este enfoque está especialmente recomendado para los laboratorios de referencia.



### 1.7.3.2.1 Pruebas bioquímicas

Tradicionalmente la principal propiedad de *N. gonorrhoeae* utilizada para su identificación ha sido su habilidad para producir ácido tras la utilización de glucosa en su metabolismo. Esta propiedad se detecta por un cambio de color producido cuando el pH disminuye debido a la presencia de un indicador de pH. Esta propiedad se puede detectar inoculando una muestra de cultivo puro en un medio de Agar Cisteína Tripticasa (*Cysteine trypticase agar* (CTA)) que contiene glucosa, maltosa y sucrosa, tras 24 horas de incubación. También se puede utilizar una prueba rápida como la RCUT (*Rapid carbohydrate utilization test* (RCUT)) (148, 149) que muestra los resultados en 4 horas ya que no depende del crecimiento del microorganismo si no de la producción de enzimas.

También hay pruebas comerciales basadas en la detección de diferentes enzimas, como *Gonochek-II* (E-Y Laboratories) (150,151) y *Neisseria Preformed Enzyme Test* (PET; Key Scientific) (150). Estas pruebas pueden dar resultados falsos positivos por la similitud entre *N. gonorrhoeae* y otras especies de Neisserias y falsos negativos ya que no todos los gonococos producen las enzimas que muestran estas pruebas.

Lo ideal es la combinación de las pruebas de utilización de los carbohidratos con la detección de enzimas ya que supone una identificación más fiable. Las pruebas comerciales API-NH (bioMérieux) y Rapid NH (Remel) (152) son dos ejemplos muy utilizados. Ambos contienen sustratos deshidratados en una serie de cúpulas o pocillos, que se llenan con una suspensión de las colonias que van a ser identificadas. Tras 2-4 horas de incubación a 37 °C, se registran las reacciones de color. Se obtiene un número de perfil que corresponde a la identificación de la especie por comparación con una base de datos registrada bien en las instrucciones del equipo o en la página web del fabricante. El API NH permite la identificación de 13 pruebas en 10 pocillos, que incluyen la prueba de la  $\beta$ -lactamasa, 4 pruebas de utilización de carbohidratos, y 8 pruebas bioquímicas para diferentes reacciones enzima-sustrato (figura 2).



Figura 2. Prueba de identificación API NH con un perfil de *Haemophilus parainfluenzae*.

El equipo RapID NH consiste en dos depresiones y 11 pocillos con pruebas bioquímicas para diferenciar reacciones enzima-sustrato. Las principales reacciones para distinguir las especies de *Neisseria* se muestran en la tabla 3.

Especies	Actividad Bioquímica							
	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa (sucrosa)	Fructosa (levulosa)	ONPG <sup>a</sup>	GGT <sup>b</sup>	PIP <sup>c</sup>
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-	-	-	+(-)
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-	-	-	+(-)	-(+)
<i>N. lactamica</i> <sup>d</sup>	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>N. polysaccharea</i> <sup>d</sup>	+	+	-	+/-	-	-	-	+
<i>N. cinerea</i> <sup>d</sup>	-(+)	-	-	-	-	-	-	+
<i>N. subflava</i> <sup>d,e</sup>	+	+	-	+/-	+/-	-	-	+
<i>N. sicca</i>	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>N. flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. catarrhalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-(+)
<i>K. denitrificans</i>	+	-	-	-	-	-	-	+

**Tabla 3:** Utilización de Hidratos de carbono (azúcares) y actividad enzimática de diferentes especies de *Neisseria* y otras especies oxidasa-positivas tales como *Moraxella catarrhalis* y *Kingella denitrificans* (3); <sup>a</sup> ONPG, o-nitrofenil-β-galactosidasa; <sup>b</sup> GGT, ganma-glutamyl-aminopeptidase (transferasa); <sup>c</sup> PIP, proliliminopeptidasa (hidroxiprolina aminopeptidasa; HPA; prolina arilamidasa; PRO); <sup>d</sup> *N. lactamica*, normalmente crece en medios selectivos, pero también pueden aparecer otras especies de *Neisseria* saprófitas no patógenas; <sup>e</sup> Incluye biovariedades subflava, flava, y perflava, las cuales difieren en su actividad frente a la sacarosa y fructosa; +/-, no es un resultado consistente para la especie; +(-), la mayoría de las cepas son positivas pero también hay cepas negativas; -(+), la mayoría son negativas pero también hay cepas positivas.

➤ **Control de calidad de los ensayos bioquímicos de verificación de especie**

Se debe llevar a cabo un control de calidad con cepas de referencia de *N. gonorrhoeae* y otras como *N. meningitidis* (ATCC BAA-335), *N. lactamica* (ATCC 23970), *N. sicca* (ATCC 9913), y *N. cinerea* (ATCC 14685) con cada lote de prueba comercial o reactivo casero.

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

La espectrometría de masas se ha introducido recientemente en los laboratorios dotados de recursos como técnica para identificar la mayoría de las especies bacterianas incluidas las Neisserias (153). MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas cuyo nombre es el acrónimo MALDI formado por las siglas en inglés de *Matrix-Assisted Laser Desorption* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time of Flight*. Entre las ventajas más importantes que presenta este método destacan tres: sólo se requiere una pequeña cantidad de material biológico, consta de un protocolo de medición rápido y fácil y posee una alta especificidad en la diferenciación de especies (154). El equipo para este sofisticado método es caro, sin embargo, el coste para la identificación de especies es bajo.

**1.7.3.2.3 Ensayos inmunológicos**

Hasta ahora no se dispone de ensayos de Inmunofluorescencia directa, enzimoimmunoanálisis, o pruebas rápidas para la detección de antígeno con suficiente sensibilidad y especificidad como para ser utilizadas en el diagnóstico de la gonorrea. Tampoco hay métodos comerciales aprobados para la detección de anticuerpos de gonococo en suero, y estos métodos no podrían diferenciar infección aguda de infección pasada. Por lo que no se recomienda su uso para el diagnóstico de rutina de la infección gonocócica.

#### 1.7.3.2.4 Ensayos moleculares

En las dos últimas décadas, se han introducido técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAANs) como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la detección de ADN específico de *N. gonorrhoeae*. Incluso en algunos lugares con más recursos han reemplazado al cultivo para la detección de gonococos. Las TAANs tienen muchas ventajas frente al cultivo, detectan microorganismos no viables, tienen una sensibilidad superior, y son menos exigentes en cuanto a la recogida, el transporte y el almacenamiento de las muestras. Las TAANs son rápidas, permiten la automatización y la detección simultánea de varios patógenos. Sin embargo, también presentan desventajas ya que no permiten, al menos hoy en día, realizar estudios de sensibilidad antibiótica y todavía se debate el tiempo necesario para considerar la infección curada, existiendo además técnicas comerciales y caseras que muestran diferente sensibilidad y especificidad.

#### 1.7.4 Detección Molecular

La detección molecular de secuencias de ácidos nucleicos (ADN/ARN) de *N. gonorrhoeae* es la técnica comercial que más habitualmente se utiliza para la detección de *N. gonorrhoeae*. Frecuentemente se realiza junto con la detección de *C. trachomatis* en un mismo equipo, algunas veces simultáneamente, y a menudo sin coste adicional. Las TAANs gonocócicas detectan una región de ADN o ARN específica de *N. gonorrhoeae* que difiere según los equipos utilizados (tabla 4). La secuencia diana se amplifica utilizando varios métodos (tabla 4) para producir múltiples copias que se pueden detectar fácilmente.

El rendimiento de TAAN con respecto a la sensibilidad y especificidad es mejor que el de cualquier otra técnica, aunque depende sustancialmente de la TAAN utilizada. Estas técnicas poseen una mayor tolerancia a las deficiencias en la toma, el transporte y el almacenamiento de las muestras, y se pueden utilizar con muestras no invasivas (orinas en hombres y torundas vaginales en mujeres). Además, son técnicas más rápidas que el cultivo (mínimo 2-3 días) ya que el resultado se obtiene en pocas horas, y a menudo son métodos automatizados lo que permite un alto rendimiento. Por todo esto, el CDC recomienda TAAN validadas por la FDA (Food and Drug

Administration) (3) para el diagnóstico de rutina de infección de *N. gonorrhoeae* tanto en hombres como en mujeres con o sin síntomas. Las desventajas de estas técnicas son el alto coste de los equipos y reactivos, la ausencia de una TAAN comercial autorizada para muestras extragenitales, su incapacidad para realizar estudios de sensibilidad antimicrobiana, y la baja especificidad de algunas TAAN. A pesar de estas desventajas, debe de fomentarse su uso además del cultivo, para la realización de pruebas de sensibilidad, incluso en entornos con bajos recursos. Este se podría llevar a cabo con la creación de laboratorios de referencia regionales que proporcionen un servicio de diagnóstico utilizando ambos métodos. Los laboratorios de referencia regionales ofrecen muchas ventajas ya que disponen de volúmenes de ensayos más grandes, una rigurosa adhesión a las buenas prácticas de laboratorio, y un mejor conocimiento técnico.

Ensayo	APTIMA Combo 2(AC2)	Cobas Amplicor	Cobas 4800	Probetec ET	Probetec GC Qx	Real Time CT/NG
Fabricante	Gen-Probe	Roche	Roche	Becton-Dickinson	Becton-Dickinson	Abbott
Diana	ARNr 16S	Gen Citosina ADN metil-transferasa	Repetición Directa Región 9 (DR9)	PivNg (Homólogo de la proteína invertida Pilin)	Pilin (diferente región a Probetec-ET)	Genes Opa
Tecnología	Amplificación mediada por transcripción (TMA)	PCR	PCR a tiempo real	Amplificación de desplazamiento de cadena (SDA)	SDA	PCR a tiempo real
Ensayo suplementario disponible	Sí (diferente región del ARNr 16S)	No	No	No	No	No

**Tabla 4:** TAANs aprobadas por la FDA para la detección de *N. gonorrhoeae* (Junio 2012) (3).

### ➤ Tipos de muestras para las TAANs de *N. gonorrhoeae*

Se pueden utilizar diferentes tipos de muestras con TAANs: muestras invasivas como las muestras líquidas Papanicolaou (Pap), torundas cervicales, y torundas uretrales (en hombres), y, muestras no invasivas como muestras vaginales y orina (en hombres y en mujeres). La FDA no valida el uso de muestras faríngeas y anorrectales

para la detección de *N. gonorrhoeae* por TAAN, pero, a pesar de ello, el CDC las recomienda para este uso ya que hay evidencias de que las TAANs con más sensibles que el cultivo en estas localizaciones (155-157) y por la facilidad de transporte y procesamiento que ofrecen estas muestras. Por lo tanto, cada laboratorio debe establecer las especificaciones en cuanto al rendimiento de esta técnica en muestras extragenitales y, se recomienda la confirmación de cualquier resultado positivo con otra prueba suplementaria como por ejemplo, otra TAAN con una secuencia diana distinta, antes de informar los resultados al clínico, para evitar resultados falsos positivos (158,159). También hay que destacar que la muestra de orina no es una buena muestra para realizar con este tipo de técnicas, ya que presenta una baja sensibilidad para la detección de *N. gonorrhoeae* en mujeres (155).

➤ **Especificidad de las TAANs de *N. gonorrhoeae***

Un tema que preocupa en este tipo de técnicas es la especificidad de la secuencia diana utilizada para llevar a cabo la detección, ya que las especies del género *Neisseria* están genéticamente muy relacionadas y podemos encontrar especies de *Neisseria*, tales como *N. meningitidis*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. lactamica*, *N. sicca* y *N. subflava* (155,158,159,160) en muestras faríngeas, rectales y con menor frecuencia en el tracto genital. Actualmente los equipos que se encuentran en el mercado han mejorado notablemente en este sentido, pero todavía sigue siendo un factor importante a considerar a la hora de seleccionar el equipo adecuado para cada tipo de muestra ya que no todas las TAAN son iguales en este sentido (160). Aun así, la interpretación de los resultados de las muestras faríngeas debe de hacerse con cautela por esta razón.

➤ **Sensibilidad, especificidad y prevalencia: el efecto sobre el valor predictivo positivo (VPP)**

La baja especificidad de estas técnicas dan lugar a un valor predictivo positivo (VPP) bajo en poblaciones de baja prevalencia (3,77,161). En Europa y Australia, si el VPP obtenido utilizando TAAN es  $\leq 90\%$  en el ámbito local, se recomienda una TAAN suplementaria (con una secuencia diana diferente) para confirmar el cribado de todas

las muestras que resulten positivas (77,162). Esto es particularmente importante para TAAN que combinan la detección de *N. gonorrhoeae* con *C. trachomatis* ya que en muchas zonas la prevalencia de *C. trachomatis* es mucho mayor que la de *N. gonorrhoeae* por lo que el resultado de *N. gonorrhoeae* podría necesitar confirmación con una segunda TAAN. Es importante destacar que, en las zonas donde solo se utilizan las TAANs para la detección de gonococos, es esencial para los laboratorios epidemiólogos y clínicos la participación en un adecuado programa de vigilancia epidemiológica local, nacional y/o internacional.

➤ **Control de calidad y garantía de calidad de las TAANs**

Cada vez que se lleva a cabo una prueba se debe de incluir un control interno. También se debe realizar una evaluación interna de la prueba cada vez que se invalide un resultado. El número y frecuencia de estas evaluaciones internas dependerá del número total de pruebas realizadas, un ejemplo es realizar entre un 1 a un 5% del total de pruebas realizadas en un mes. También se pueden llevar a cabo controles de calidad externos mediante el uso de paneles de muestras que algunos proveedores cualificados entregan a muchos países, tales como el Servicio de Evaluación de Calidad Externa del Reino Unido (United Kingdom National External Quality Assessment Services (UK NEQAS; [www.ukneqas.org.uk](http://www.ukneqas.org.uk))), o el Control de Diagnóstico Molecular (Quality Control of Molecular Diagnostics (QCMD; [www.qcmd.org](http://www.qcmd.org))); o mediante un intercambio más informal de muestras entre laboratorios.

### **1.8. Sensibilidad antimicrobiana**

Los métodos para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos se deben realizar a partir de un cultivo puro y fresco (18- 24 horas) de *N. gonorrhoeae* sembrado en un medio de cultivo no selectivo. A la hora de realizar las pruebas de sensibilidad, es importante seguir todos los pasos del procedimiento con detenimiento, incluyendo la selección y el uso del medio de agar, los reactivos (potencia antimicrobiana, tiras de E-test, discos y tampones), la inoculación, incubación e interpretación de los resultados.

➤ **Elección de los antimicrobianos incluidos en las pruebas de sensibilidad**

Los antimicrobianos incluidos en las pruebas de sensibilidad deben ser los utilizados o recomendados para el tratamiento de la infección gonocócica a nivel nacional así como antibióticos recomendados por los programas de vigilancia locales. Sin embargo se pueden incluir antibióticos adicionales, sobre todo en los laboratorios de referencia, como los recomendados para el tratamiento en otros entornos, o los posibles tratamientos futuros así como antibióticos útiles para estudios longitudinales locales de *N. gonorrhoeae*.

➤ **Criterios de interpretación**

Hay varias organizaciones que establecen los criterios de interpretación para las pruebas de sensibilidad antibiótica en *N. gonorrhoeae*. Dos de las más importantes son el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (146) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org))). Cada institución decide por que criterios se rige basándose en su experiencia o, en ocasiones, en los antibióticos que se vayan a utilizar. Según el CLSI (146) los antibióticos se van a categorizar en sensible, intermedio y resistente según los resultados obtenidos por los distintos métodos:

- El término **sensible** indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis de antimicrobiano recomendadas, en función del tipo de infección y de la especie considerada.
- El término **intermedio** indica que la CMI o el halo de inhibición se aproximan a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre/tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano (p. ej. fluoroquinolonas en orina) o cuando se emplean dosis mas elevadas de lo habitual. El CLSI también incluye en esta categoría aquellos antimicrobianos con márgenes de toxicidad estrechos en los que pequeños errores técnicos podrían suponer cambios de interpretación en la categoría clínica.
- El término **resistente** se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben



por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando el correspondiente antimicrobiano se ha usado como tratamiento.

### **1.8.1 Determinación de la CMI**

La determinación de la CMI (en  $\mu\text{g/ml}$  o  $\text{mg/l}$ ) se puede llevar a cabo por métodos de dilución en agar y E-test.

#### ➤ **Medio de agar recomendado**

El medio recomendado para la determinación de la CMI, tanto para el método de dilución en agar como E-test, en los aislados de *N. gonorrhoeae*, es una base de agar GC, como la “Difco GC Medium Base (Becton Dickinson)”, enriquecida con el 1% de suplemento de crecimiento definido o 1% de IsovitaleX/Vitox. De acuerdo con el CLSI (146) este suplemento de crecimiento definido tiene que estar compuesto por: 1,1 g L-cisteína, 0,03 g de clorhidrato de guanina, 3 mg de clorhidrato de tiamina HCl, 13 mg de ácido para-aminobenzoico (PABA), 0,01 g de B12, 0,1 g cocarboxilasa, 0,25 g de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), 1 g de adenina, 10 g L-glutamina, 100 g de glucosa, y 0,02 g de nitrato férrico (en 1 litro de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Para las pruebas de dilución en agar con carbapenems y ácido clavulánico este medio no tiene que incorporar cisteína.

#### ➤ **Criterios de interpretación**

Tanto CLSI (146) como EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)) establecen los criterios de interpretación según la CMI obtenida. En general los puntos de corte del EUCAST son ligeramente inferiores a los establecidos por el CLSI.

#### ➤ **Control de calidad de la determinación de CMI**

Se deben incluir cepas de referencia (cepa ATCC 49226 (146) o cepas de referencia de la OMS (147)) con cada lote de sensibilidad que se vaya a realizar, y

siempre que se vaya a utilizar un nuevo lote de antimicrobianos, medio de agar, o tiras de E-test. Los valores de CMI válidos para el control de calidad de los diferentes antimicrobianos para las principales cepas de referencia utilizadas se pueden ver en la tabla 5.

Cepas de referencia de la OMS						
Antimicrobiano (mg/l)	OMS G	OMS K	OMS M	OMS O	OMS P	ATCC49226 <sup>a</sup>
Penicilina G	0,25-1	1-4	4-16	>32	0,125-0,5	0,25-1
Cefixima	<0,016	0,25-1	<0,016	<0,016-0,032	<0,016	0,004-0,032
Ceftriaxona	0,004-0,016	0,032-0,125	0,008-0,032	0,016-0,064	0,002-0,008	0,004-0,016
Eritromicina	0,5-2	0,5-2	0,5-2	0,5-2	2-8	1-2
Azitromicina	0,125-0,5	0,125-0,5	0,125-0,5	0,125-0,5	1-4	0,5-1 <sup>b</sup>
Ciprofloxacino	0,064-0,25	>32	1-4	0,004-0,016	0,002-0,008	0,001-0,008
Espectinomicina	8-32	8-32	8-32	>1024	8-32	8-32
Producción de β-lactamasa	no	no	si	si	no	no
Secuenciotipo	ST621	ST1424	ST3304	ST495	ST3305	
PIP- negativo <sup>c</sup>	si	no	no	no	no	

**Tabla 5.** Rango de CMI aceptado como válido para cada antimicrobiano y algunas características de tipificación para las cepas de referencia recomendadas para el control de calidad (3); <sup>a</sup> Rangos de CMI aceptados por el CLSI; <sup>b</sup> Rango establecido por el Laboratorio Nacional de Microbiología, Canadá; <sup>c</sup> No producen el enzima prolyliminopeptidasa (PIP), lo que puede producir una identificación dudosa y / o falsos negativos de *N. gonorrhoeae* utilizando algunas pruebas bioquímicas o de enzima-sustrato (173, 181).

### 1.8.1.1 Dilución en Agar

Es el método “patrón oro” recomendado para la determinación de la CMI de los antimicrobianos frente a los aislados de *N. gonorrhoeae*, pero resulta demasiado tedioso por lo que se limita a laboratorios con alta capacidad de procesamiento y grandes volúmenes de muestra o estudios de vigilancia epidemiológica (13). Los antibióticos son añadidos a una base de agar GC enriquecida con el 1% de suplemento de crecimiento definido (IsovitaleX/Vitox) en diluciones seriadas. Los aislados de *N. gonorrhoeae* a ensayar se cultivan durante la noche en un medio de agar no selectivo y luego se suspenden unas 10<sup>4</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) en caldo Mueller-Hinton o solución salina estéril (o equivalente). A continuación son inoculados en la superficie de los medios que contienen el antimicrobiano y en dos placas de control cuyo medio no contiene antimicrobiano con un replicador de Steer, el cual permite

sembrar varias cepas simultáneamente (142,143,154,163), o con un asa calibrada. Las placas son entonces incubadas y se examina el crecimiento.

Una modificación del método de dilución en agar es la técnica del punto de corte. Esta técnica es similar a la dilución en agar pero sólo contiene dos concentraciones de antimicrobiano, y se utiliza para categorizar a los aislados como resistentes (utilizando una placa de agar con la concentración exacta del punto de corte de resistencia) o con sensibilidad intermedia (utilizando una placa de agar con la concentración en el punto de corte de sensibilidad intermedia). La técnica del punto de corte es utilizada para el cribado de un gran número de aislados.

### **1.8.1.2 E-test**

E-test (Epsilon test) es una técnica cuantitativa para determinar la CMI de los antimicrobianos contra los microorganismos y tiene una buena correlación con la técnica de dilución en agar. Esta técnica utiliza tiras de plástico (6 cm de largo por 5 mm de ancho) calibradas con una escala de CMI en  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{mg/l}$ ) y un código de identificación del agente antimicrobiano. Un gradiente de concentración antibiótica predefinido es inmovilizado en la superficie opuesta de la tira, con aproximadamente unas 15 diluciones. Una vez aplicada en la superficie del agar el antibiótico difunde en el medio. Antes de añadir la tira se inocula la suspensión de *N. gonorrhoeae* en el medio. Después de 18- 24 horas de incubación, se observará una zona de inhibición del crecimiento elíptica si el microorganismo es sensible a la prueba. La CMI se debe leer como la inserción de la elipse formada por el crecimiento microbiano, con la escala de gradiente antibiótico marcada en la tira. En lo que respecta al almacenamiento de las tiras de E-test, el rendimiento y la lectura de los resultados es importante seguir las instrucciones del fabricante. Se trata de un método sencillo para determinar la sensibilidad a gonococo, aunque la FDA no ha aprobado las tiras de E-test de cefixima para su uso en los EEUU (13).

### **1.8.2 Difusión en agar disco-placa**

La técnica de difusión en disco disco-placa o difusión en disco, es una técnica cualitativa para categorizar los aislados de gonococo en sensible, intermedio

(sensibilidad disminuida) o resistente a los diferentes antimicrobianos. Este método utiliza discos impregnados con una concentración conocida de antimicrobiano. El agente antimicrobiano del disco produce un gradiente de concentración en la superficie del agar, inoculado con la bacteria, que es mayor cerca del disco y disminuye proporcionalmente a la distancia del disco. Tras la incubación, se visualiza la zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la CMI obtenida por métodos de dilución. Por ello, los métodos de difusión no permiten una lectura directa del valor de CMI, si no que se mide el diámetro del halo de inhibición en mm y se extrapolan a valores estandarizados de CMI para cada antimicrobiano. Hay varios métodos de difusión disponibles internacionalmente que se distinguen en la potencia de los discos utilizados (el contenido de antimicrobiano) y el agar utilizado, lo que da lugar a diferentes puntos de corte para categorizar la sensibilidad. El método de difusión del CLSI (146) y el de la Sociedad Británica de Terapia Antimicrobiana (164) se han utilizado y son recomendadas en diferentes zonas (165).

Los métodos de difusión no son caros pero sólo se recomienda su uso cuando no se puede realizar la determinación de la CMI, debido a limitaciones en los recursos o de otro tipo como puede ser la presencia de una gran carga asistencial.

➤ **Medio recomendado para el método de difusión en disco**

Se han validado varios métodos para la determinación de la sensibilidad por el método de difusión en disco, CLSI recomienda agar CG con el 1 % de suplemento de crecimiento definido (146), también se puede utilizar el agar chocolate como el agar Columbia (Oxoid) con 8% de sangre de caballo hervida a 70°C durante 30 minutos (3). Aunque hay que tener en cuenta que hay publicaciones que certifican que el método de difusión en agar chocolate muestra diámetros de resistencia menores que con agar GC, lo que lleva a un 5,5% de resultados falsos positivos de resistencia (166).

➤ **Criterios de interpretación para el método de difusión en disco**

El CLSI publica los criterios de interpretación para sensible, intermedio y resistente por el método de difusión en disco (146).

➤ **Control de calidad del método de difusión en disco**

Se deben de añadir cepas de *N. gonorrhoeae* de referencia cada vez que se utiliza un nuevo lote de medio de agar y antimicrobianos. Los mm de halo de inhibición para cada antimicrobiano con la cepa ATCC 49226 son publicados por el CLSI (146).

### **1.8.3 Detección de resistencia plasmídica a penicilina**

Como ya se ha documentado, *N. gonorrhoeae* puede transportar plásmidos que producen enzima  $\beta$ -lactamasa (penicilinas) que inactiva las penicilinas como bencilpenicilina, penicilina, ampicilina y amoxicilina. Se han utilizado varios métodos de calidad para detectar la producción de  $\beta$ -lactamasa por el microorganismo. El más extendido es el método de la cefalosporina cromogénica. Este método es simple, sensible y específico, para la detección de  $\beta$ -lactamasa en gonococo. Cuando es hidrolizado el anillo  $\beta$ -lactámico de la cefalosporina cromogénica (nitrocefina) por acción de la  $\beta$ -lactamasa, se produce un cambio de color de amarillo a rojo. Esta prueba está disponible comercialmente en una variedad de formatos, y la nitrocefina liofilizada también se puede preparar de forma casera (167). Otros métodos menos utilizados para la detección de  $\beta$ -lactamasa son el método acidométrico y el método iodométrico.

➤ **Método del disco de Nitrocefina**

Para realizar este método se hidrata un disco de nitrocefina en un portaobjetos con agua destilada estéril. Con un asa estéril se cogen varias colonias de un cultivo puro de gonococo que ha estado incubando toda la noche. Una reacción positiva normalmente produce color rojo en un minuto. Puede haber reacciones positivas débiles que tarden más en desarrollar el color. Por último un resultado negativo permanece amarillo sin mostrar cambio de color.

➤ **Método de dilución de Nitrocefina**

El método de dilución de la nitrocefina se realiza bien añadiendo unas gotas de reactivo directamente sobre el crecimiento en el medio de cultivo o por inoculación de la solución sobre un portaobjetos o sobre papel de filtro con colonias. Para ello se puede utilizar tanto solución de nitrocefina comercial como de preparación casera usando polvo de nitrocefina.

➤ **Método acidométrico**

Para realizar este método se coloca una tira de papel de filtro en una placa de Petri limpia. Se satura el papel con solución de penicilina (0,05 mol/l de tampón fosfato, pH 8,0, 0,2 g/l de púrpura de bromocresol, y 50 g/l de bencilpenicilina sin tampón). Con un asa estéril se extienden 10-20 colonias sobre un área de 5 mm del papel de filtro. Se incuba el papel de filtro inoculado a temperatura ambiente durante 30 min con la tapa puesta. Transcurridos unos 10 minutos, la actividad  $\beta$ -lactamasa se expresará con un cambio de color de azul a amarillo.

➤ **Método Iodométrico**

Se prepara una mezcla de penicilina-yodo añadiendo 1,1 ml de una solución de yodo (1,5 mg de yoduro de potasio y 0,3 g de yodo en 100 ml de 0,1 mol/l de tampón fosfato, a pH 6,4, almacenado en una botella marrón a 4 °C) a un vial que contiene 0,15 ml de solución de bencilpenicilina (1.000.000 UI/ml, almacenadas a -20 °C). La mezcla de reactivos se debe utilizar en la hora siguiente a su preparación. Con un asa estéril se cogen varias colonias de la placa de crecimiento del microorganismo y se emulsionan con una gota de la mezcla penicilina-yodo en un portaobjetos. Se añade una gota de solución de almidón (4 g/l en agua destilada, autoclavada y almacenada a 4 °C) dando un color púrpura intenso a la mezcla. Si el color permanece durante 5 minutos nos está indicando que este resultado es negativo. Un cambio a incoloro en 5 minutos indica resultado positivo de la prueba.

## 1.9 Secuenciotipado

El conocimiento de las cepas y poblaciones de *N. gonorrhoeae* que circulan en las diferentes áreas, los cambios temporales y geográficos entre las cepas, y los patrones de aparición y transmisión de las cepas individuales, son cruciales para la prevención y control de la infección. Las caracterizaciones fenotípicas de la bacteria tienen varias limitaciones, por lo que se han estudiado diferentes métodos de genética molecular con el fin de realizar una caracterización objetiva y reproducible. El genotipo de *N. gonorrhoeae* puede ser descrito por diferentes métodos moleculares. Los siguientes métodos son los que poseen un mayor poder de discriminación:

- **Electroforesis de campo-pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)*):** está basado en la digestión del ADN genómico por endonucleasas de restricción, seguido por la separación de estos fragmentos mediante PFGE. Con éste método se puede clasificar prácticamente todo el genoma por lo que resulta altamente discriminatorio (23).
- **Opa-typing:** está basado en la amplificación de 11 genes *Opa* seguido por la digestión con una endonucleasa de restricción, separación de los fragmentos por electroforesis en gel y visualización de las bandas patrón (168,169).

Las principales desventajas de PFGE y Opa-typing son la interpretación subjetiva de las bandas patrón en geles y la falta de normas para comparar entre laboratorios.

- **Secuenciación completa de genes *porB* (*Full-length porB gene sequencing*):** se ha observado que la amplificación por PCR y la secuenciación de la totalidad de los alelos del gen *porB* es útil para la caracterización molecular de *N. gonorrhoeae*. Este método puede ser utilizado como herramienta epidemiológica para el examen de aparición y transmisión de cepas de *N. gonorrhoeae* en la comunidad, pero requiere una alta experiencia en este campo (170,171).
- **Tipificación de secuencias de diferentes zonas (*Multi Locus Sequence Typing, (MLST)*):** este método se basa en los principios de la electroforesis con múltiples enzimas de restricción, pero la caracterización de los alelos presentes en los múltiples genes se produce directamente por secuenciación de nucleótidos en lugar de

indirectamente por la movilidad electroforética de los productos génicos. Una de las ventajas de MLST es que los resultados pueden ser compartidos entre laboratorios y se prestan al análisis de las relaciones genéticas entre los aislados. Entre otras aplicaciones, los datos generados por MLST se han utilizado para tratar aspectos genéticos de poblaciones y biología evolutiva de especies bacterianas (172).

➤ **Secuenciotipado multiantigénico de *N.gonorrhoeae* (*N.gonorrhoeae* Multiantigen Sequence Typing, NG-MAST):** Los métodos de tipificación basados en secuencias de nucleótidos tienen muchas ventajas, debido a que tienen un alto rendimiento y proporcionan datos inequívocos que pueden ser fácilmente comparados entre distintos laboratorios a través de internet. Para la realización de estudios epidemiológicos sobre la transmisión de gonorrea en una comunidad, un enfoque basado en la secuencia de nucleótidos debe utilizar genes altamente variables en los que la variación genética se acumula rápidamente. Los genes que codifican las proteínas de la superficie externa de la bacteria sufren una gran variabilidad genética, que se acumula rápidamente, derivada de la selección que provoca la respuesta inmunológica del huésped. Por lo tanto la secuenciación de estos genes sirve para identificar un gran número de secuencias diferentes (alelos) entre los diferentes aislados de un patógeno bacteriano.

Se ha evaluado un sistema de tipificación basado en la secuencia completa del **gen *por*** que codifica una porina de la membrana externa gonocócica. Este gen es muy variable y proporciona un alto nivel de discriminación entre los aislados. Sin embargo la secuenciación de todo el gen supone mucho trabajo y la mayoría de las variaciones en *por* se encuentran en secuencias de fragmentos internos del gen, lo que requiere una única reacción de secuenciación para cada hebra de ADN. También se ha evaluado el **gen *tbpB*** que codifica la subunidad  $\beta$  de la proteína Tbp. Estudios de secuencias de *tbpB* de *N. meningitidis* y de las 5 secuencias de *tbpB* gonocócicas disponibles en GenBank han demostrado una gran variabilidad en la secuencia. Se ha demostrado que la secuenciación de fragmentos internos de *por* y *tbpB*, proporciona un alto rendimiento en el proceso de tipado, adecuado para la identificación de individuos dentro de una comunidad que recientemente han sido infectados por la misma cepa gonocócica (12).



Tanto MLST como NG-MAST se basan en el análisis de secuencias de ADN, y proporcionan datos inequívocos que se pueden comparar entre laboratorios utilizando bases de datos on-line (<http://www.ng-mast.net/>, <http://pubmlst.org/neisseria/>).

➤ **Número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number Tandem Repeats, VNTR*):** es otro enfoque utilizado en epidemiología. Tiene una alta capacidad de discriminación. En los últimos años, el análisis VNTR de multilocus (*Multiple Loci VNTR Analysis, MLVA*) se ha usado para tipificar aislados de diversas bacterias, incluyendo *Neisseria meningitidis*. Además recientemente se ha desarrollado un MLVA usando cinco locus VNTR para genotipar *N. gonorrhoeae* (173).

### 1.10 Interés del estudio

La infección gonocócica representa 106 millones de los aproximadamente 498 millones de casos nuevos de ITS curables que se producen en el mundo cada año (3). La aparición en las cepas de *N. gonorrhoeae* de una disminución en la sensibilidad y concretamente el aumento de resistencia a las cefalosporinas “última línea de tratamiento”, junto con la alta prevalencia, durante muchos años, de resistencia a penicilinas, sulfonamidas, tetraciclinas y, más recientemente, fluoroquinolonas y macrólidos (incluyendo la azitromicina), suponen un gran motivo de preocupación. La gonorrea tiene el potencial de convertirse en una infección intratable en la realidad actual debido a las limitadas opciones en el tratamiento, sobre todo en entornos subdesarrollados donde también tienen una elevada carga de infección gonocócica. Esta pérdida de opciones de tratamiento eficaces y fáciles de conseguir dará lugar a un aumento significativo de la morbilidad y la mortalidad de esta enfermedad, ya que en un futuro podríamos estar en una situación similar a la era pre-antibiótica cuando había un riesgo de muerte por infecciones tales como una infección estreptocócica de garganta o una infección de rodilla en un niño.

Por esta razón nos planteamos el reto de realizar un estudio de vigilancia epidemiológica de la infección gonocócica en nuestra área sanitaria que nos aporte un conocimiento detallado de la incidencia de aislados, de la población de riesgo de sufrir esta infección, la sensibilidad antibiótica de las cepas aisladas, así como la

caracterización de estas cepas con el objetivo de prevenir la aparición de cepas resistentes a todos los antibióticos actualmente disponibles.

## **2. OBJETIVOS**



## 2.1 Objetivos principales

1. Estimar la incidencia de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* identificados en el laboratorio del Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto (Bilbao) durante los años 2011, 2012 y 2013.
2. Conocer la epidemiología de los casos de infección gonocócica correspondientes a estos aislamientos: datos sociodemográficos y clínicos, antecedentes relacionados con la infección, mecanismos de transmisión y perfiles de riesgo.
3. Determinar los porcentajes de sensibilidad antimicrobiana de estas cepas a distintos antimicrobianos recomendados para su tratamiento o que pueden suponer una opción terapéutica en el futuro, por el método de dilución en agar y/o por el método de difusión en agar disco-placa.
4. Realizar la caracterización molecular de las cepas aisladas.

## 2.2 Objetivos secundarios

1. Establecer la correlación entre los resultados obtenidos por los distintos métodos de sensibilidad antimicrobiana utilizados.
2. Estimar los puntos de corte de sensibilidad a gentamicina mediante el método de difusión en agar disco-placa.
3. Analizar la relación de los distintos secuenciotipos obtenidos y las características de los pacientes.
4. Evaluar los resultados obtenidos a lo largo del estudio y compararlos con los datos obtenidos por otros estudios similares realizados en España y en otros países.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio epidemiológico descriptivo prospectivo, en el que se analizan tanto los aislamientos de *N. gonorrhoeae* realizados en el Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto, situado en Bilbao, durante los años 2011, 2012 y 2013, así como los datos demográficos de los pacientes a los que pertenecen estos aislamientos.

### 3.2 Selección de las cepas

El Hospital Universitario Basurto es un hospital terciario de 640 camas, que da cobertura al área "Comarca Bilbao" con una población de 346.574 habitantes en el año 2014 (según datos del Instituto Nacional de Estadística), los cuales son atendidos en Hospitalización, en el Servicio de Urgencias o las Consultas Externas del hospital. Además el Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección ofrece cobertura a 25 ambulatorios de la comarca Bilbao.

El Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección posee un archivo de cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en el laboratorio, que se conserva a una temperatura de -80°C en crioviales Viabank (Medical Wire & Equipment Co, Corsham, Reino Unido). La colección de cepas incluidas en este estudio ha sido almacenada desde Enero del año 2011 a Diciembre del año 2013 y está compuesta por un total de 371 aislamientos.

### 3.3 Características sociodemográficas y datos clínicos de los pacientes

La población incluida en este estudio es aquella a la que pertenecen las cepas seleccionadas, y son aquellos pacientes clínicamente diagnosticados de infección gonocócica cuya confirmación se realizó mediante métodos microbiológicos en el Laboratorio del Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Universitario Basurto durante los años 2011, 2012 y 2013 (desde Enero de 2011 a Diciembre de 2013). Estos pacientes fueron atendidos en las Urgencias del Hospital Universitario Basurto, en distintas Consultas externas, así como en ambulatorios pertenecientes al área que cubre el Hospital Universitario Basurto.

La unidad de análisis a la hora de estudiar las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes ha sido el episodio en el que se diagnosticó la infección gonocócica, considerando un **nuevo episodio** siempre que, después de una primera infección gonocócica y transcurridos al menos 3 meses tras la administración tratamiento antimicrobiano indicado, hayan desaparecido los signos y síntomas de la infección junto con la erradicación del microorganismo con confirmación microbiológica, volviendo a ser infectado con otra cepa de gonococo distinta a la anterior. Solo se consideró una cepa de *N. gonorrhoeae* por paciente dentro del mismo episodio y en los casos donde la infección se detectó en distintas localizaciones se tuvo en cuenta cada localización.

Por otro lado, consideramos **reinfección** cuando, un paciente que tras una primera infección gonocócica y habiendo recibido tratamiento efectivo con la consiguiente mejoría o desaparición de signos o síntomas de infección gonocócica, junto con la erradicación del microorganismo confirmado microbiológicamente, vuelve a ser infectado por una pareja sexual infectada no tratada.

Los datos epidemiológicos fueron recogidos en la Historia Clínica de cada paciente, por el médico clínico que les atendió en el momento del episodio de infección gonocócica. Los datos más relevantes fueron plasmados en un informe epidemiológico (ANEXO I) que recoge las variables que se describen a continuación.

### **3.1.1 Características sociodemográficas**

1. Sexo: hombre, mujer o travesti/transsexual.
2. Fecha de nacimiento.
3. Nivel de estudios: primarios, secundarios, superiores o desconocido.
4. País de origen del paciente: España u otros (especificando el país de origen del paciente).

### **3.1.2 Datos clínicos**

5. Diagnóstico: la encuesta recoge, como premisa, que el diagnóstico de infección gonocócica se ha realizado en el presente episodio.

6. Motivo del diagnóstico: se indica si el diagnóstico se ha realizado como consecuencia de:
  - Manifestaciones clínicas: Si el paciente ha acudido a la consulta como consecuencia de la aparición de síntomas relacionados con la infección.
  - Cribado: Si el paciente ha acudido a la consulta para realizar un estudio de control de ITS por ser un paciente asintomático con contactos sexuales de riesgo, relaciones con múltiples parejas sexuales, por ser trabajador sexual, por simple deseo voluntario o por distintos protocolos clínicos de cribado (sospecha de abuso sexual, embarazo de riesgo, etc.). Entendemos por contacto sexual de riesgo, el mantenimiento de relaciones sexuales sin utilización de preservativo.
  - Investigación de contactos: si el paciente acude a la consulta para realizar un estudio de ITS por mantener contacto sexual con una persona infectada de gonorrea.
7. Se señala si se ha realizado la confirmación de la infección gonocócica por métodos microbiológicos, aunque en nuestro caso esta condición es un criterio de inclusión.
8. Localización anatómica de la infección: Anorrectal, orofaríngea, cervical, uretral u otras localizaciones (especificando cuál es esta localización).
9. Fecha de diagnóstico: fecha en la que se diagnostica clínicamente el episodio de gonorrea.
10. Se recoge la información sobre si el paciente presenta otra ITS de forma concurrente en el momento del diagnóstico de gonorrea, y cuál es esa infección concurrente: Sífilis, clamidiasis, tricomoniasis, condilomas, herpes genital, hepatitis B, moluscum u otras infecciones concurrentes (que se especifican por el clínico).
11. Situación del paciente frente a la infección por VIH en el momento del diagnóstico de gonorrea: Se marca si el paciente presenta serología de VIH positiva previa al episodio de gonorrea en estudio, si presenta serología de VIH positiva diagnosticada con motivo de este episodio de infección, y si resulta VIH negativo o si, por el contrario no constan en la historia datos sobre el VIH.

12. Tipo de paciente: Si el paciente es visto por primera vez en la consulta de ITS o si ya es conocido por haber acudido antes a la consulta.

### **3.1.3 Antecedentes personales**

13. Antecedentes de ITS: Señalar si existe un episodio previo de ITS reflejado en la historia o comunicado por el paciente.

### **3.1.4 Mecanismo de transmisión más probable**

14. Se indica cuál es el mecanismo de transmisión más probable de la infección gonocócica en este episodio:

- Relaciones homosexuales no protegidas: anal, oral o no consta el tipo de relación.
- Relaciones heterosexuales no protegidas: vaginal, anal, oral o no consta el tipo de relación.
- Otro tipo de relaciones no protegidas, especificando cuáles son.

15. Se indica si este episodio de infección gonocócica se atribuye a un accidente con el preservativo.

16. País donde probablemente ocurrió la infección gonocócica: se informa si la relación sexual que dio lugar a la infección ocurrió en España o en otro país.

### **3.1.5 Perfil de riesgo**

17. Se indica el perfil o perfiles de riesgo de transmisión sexual que cumple el paciente:

- Si ha ejercido la prostitución.
- Si ha tenido contacto sexual con prostitución.
- Si ha tenido una relación sexual con un contacto esporádico.
- Si mantiene relaciones sexuales con una pareja estable.

- Si ha tenido relaciones sexuales con una persona que el paciente sabía que estaba infectada por el VIH.

- Si mantiene relaciones sexuales con una pareja estable infectada por VIH.

18. Se señala el número aproximado de parejas sexuales en los últimos 12 meses.

Además de los datos recogidos en el informe, se recogieron y analizaron datos referentes a la respuesta al tratamiento como el fracaso terapéutico. Considerando **fracaso terapéutico** cuando no aparecen cambios en los signos y síntomas de la infección o se produce un empeoramiento de los mismos, tras la administración de un tratamiento antibiótico aprobado para el tratamiento de la infección gonocócica.

Toda esta información se almacenó en una base de datos y posteriormente analizada.

### 3.4 Procesamiento de las muestras

Las distintas muestras de los pacientes con sospecha o diagnóstico clínico de infección gonocócica fueron tomadas por el clínico que atendió al paciente en el momento del episodio y enviadas al Laboratorio de Microbiología donde se procedió a su procesamiento.

#### ➤ Tinción de Gram

En el Laboratorio de Microbiología se realizó una Tinción de Gram a las muestras uretrales, endocervicales y vaginales. El procedimiento de la tinción de Gram es el siguiente:

1. Se cubre el frotis fijado con cristal violeta durante 30 segundos y se lava suavemente con agua fría.
2. Se inunda el portaobjetos con una solución de yodo durante 30 segundos y se lava suavemente con agua fría.

3. Se decolora la preparación con acetona, acetona-etanol o etanol unos segundos solo hasta que el color púrpura desaparece y se lava rápidamente con agua corriente para detener la decoloración.

4. Se realiza una contratinción con safranina o fucsina durante 1 minuto.

5. Se lava con agua corriente y se seca suavemente el portaobjetos con papel absorbente.

Posteriormente, se observa el frotis con aceite de inmersión y un objetivo de 1000 aumentos. Y se describe lo que se ve en el frotis: células epiteliales, LPMN, morfología de las bacterias, y localización intracelular o extracelular. El frotis se examina durante al menos 2 minutos antes de concluir que no contiene ningún diplococo Gram negativo intraleucocitario.

#### ➤ **Inoculación e incubación del cultivo**

Para proceder a la inoculación de la muestra, se hace rotar la torunda que contiene la muestra sobre aproximadamente un cuarto de la superficie del medio de cultivo y se extiende el inóculo sobre el resto del medio para asegurar el crecimiento de colonias aisladas. Todas las muestras se sembraron en medio de agar GC-Lect<sup>TM</sup> y agar chocolate (Becton Dickinson). Los medios inoculados se incubaron en estufa a 35°C, en una atmósfera de un 70% de humedad y suplementados con 5% de CO<sub>2</sub> (con una bomba inyectora de CO<sub>2</sub>). Las placas se examinan a las 18-24 horas, y si son negativas se vuelven a incubar hasta 48 horas. Tras 24 horas de incubación, las colonias típicas pueden variar de diámetro desde 0,5 a 1 mm, con un color de gris a blanco, un aspecto de transparentes a opacas, y de forma convexa o plana (dependiendo de la cepa gonocócica y del medio de cultivo). Después de una incubación adicional, pueden llegar a medir hasta 3 mm de diámetro y su aspecto es más rugoso. Hay que tener en cuenta, que con frecuencia aparecen colonias pleomórficas, aunque se trate de la misma cepa gonocócica. Una vez obtenidas las colonias sospechosas de *N. gonorrhoeae* se siguieron trabajando, como se describe a

continuación, para su posterior identificación y estudio de sensibilidad y secuenciado.

La información referente a las muestras recibidas en el laboratorio se obtuvo a través de la base de datos del Sistema Informático utilizado en el Laboratorio de Microbiología, donde se registran los datos reflejados en los volantes de las muestras. Entre otros, estos datos son:

- Tipo de muestra
- Fecha de toma de la muestra.
- Servicio de procedencia de la muestra.

#### **3.4.1 Identificación de las cepas**

Ante la presencia de colonias compatibles con *N. gonorrhoeae* se realizó una identificación presuntiva con la Tinción de Gram, donde se observaron diplococos gram negativos, y la prueba de la Citocromo-C-Oxidasa (Pathotec®), que resulta positiva para *N. gonorrhoeae*. Para confirmar la identificación se realizó la batería de pruebas bioquímicas API® NH (bioMérieux). Una vez confirmada la identificación de las cepas de *N. gonorrhoeae*, se procedió a la realización del estudio de sensibilidad antibiótica de rutina por el método de difusión en agar disco-placa en el medio agar chocolate. Una vez completada la identificación y el antibiograma, estos aislados fueron almacenadas en el cepario del laboratorio. Para ello, se inoculó todo el crecimiento de un cultivo puro de un día de incubación en el medio selectivo agar GC-Lect™, en viales que contienen aproximadamente 0,5-1 ml de un caldo nutritivo estéril crioprotector con 15-20% de glicerol, con bolas Viabank (Medical Wire & Equipment Co, Corsham, Reino Unido).

Para la realización de este estudio se descongelaron estos aislados y se realizó un pase de cada aislado a un medio de Agar Chocolate (Becton Dickinson) que se incubó en estufa a 35°C, con una atmósfera de un 70% de humedad, suplementados con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 18-24 horas.

### 3.4.2 Estudio de sensibilidad antibiótica

Se estudió la sensibilidad antibiótica de las cepas aisladas mediante el desarrollo de distintas técnicas de antibiograma.

#### 3.4.2.1 Método de difusión en agar disco-placa

Para la realización de este método se elaboró medio sólido de Agar GC (Becton Dickinson) con 1% de suplemento de crecimiento definido Vitox (OXOID™). El suplemento de crecimiento definido Vitox contiene los siguientes ingredientes en gramos por litro:

- 0,01 g vitamina B 12
- 10 g L-glutamina
- 1 g adenina
- 0,03 g clorhidrato de guanina
- 0,003 g ácido p-aminobenzoico
- 1,1 g L-cistina
- 100 g glucosa
- 0,23 nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)
- 0,1 g tiamina pirofosfato (cocarboxilasa)
- 0,02 g nitrato férrico
- 0,003 g clorhidrato de tiamina
- 25,9 g clorhidrato de L-cisteína

#### ➤ **Elaboración del medio**

El medio agar GC se elaboró siguiendo las recomendaciones descritas por el CLSI (174). Para ello se preparó 1 litro de agar GC desde una base deshidratada disponible comercialmente (Difco GC Medium Base, Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez elaborado el medio se procedió a su autoclavado. Después de autoclavar el medio, se enfrió en un baño de agua a 45°C y se añadieron 10 ml de suplemento de crecimiento definido. Posteriormente se distribuyeron en placas Petri estériles de 150 mm de diámetro (30 ml de solución)



dentro de una cabina de flujo laminar donde se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificadas se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4°C, donde se almacenaron durante un máximo de cinco días antes de ser utilizadas, según lo recomendado por algunas guías (175).

➤ **Preparación del inóculo**

Para preparar el inóculo se realizó una suspensión con 2-3 colonias de *N. gonorrhoeae* tomadas directamente del medio de cultivo de Agar Chocolate (Becton Dickinson) con solución salina hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0,5 en la escala MacFarland con la ayuda de un nefelómetro. Rápidamente se insertó una torunda estéril en la suspensión y se extendió en el medio de Agar GC preparado, para ello se deslizó el escobillón por la superficie del agar en tres direcciones rotando la placa unos 60 grados cada vez que se cambiaba de dirección.

➤ **Dispensación de los discos antibióticos**

Con un dispensador manual se colocaron los discos antibióticos ensayados sobre la superficie del medio preparado y se incubaron en estufa a 35°C, con una atmósfera de un 70% de humedad, suplementados con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 18-24 horas. Los antibióticos testados por esta técnica y sus correspondientes concentraciones se exponen en la tabla 6.

➤ **Control de calidad**

Como control de calidad se utilizó la cepa de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 sobre la que se llevó a cabo todo el proceso con cada remesa de placas o cada vez que se trabajaba con un nuevo lote de antibióticos.

➤ **Lectura e interpretación de los resultados**

Transcurridas 18-24 horas se procedió a la lectura e interpretación de los antibiogramas. La lectura se realizó observando el diámetro del halo de inhibición de crecimiento del microorganismo producido alrededor de los discos antibióticos. Estos resultados se interpretaron según las categorías sensible (S), intermedio (I) o resistente

(R) a los antibióticos utilizados según los criterios de interpretación publicados por CLSI (146) (tabla 6). Sólo se validaron los resultados obtenidos tras comprobar que los diámetros de los halos de inhibición de la cepa control (*N. gonorrhoeae* ATCC 49226) se encontraban dentro de los rangos establecidos por el CLSI (146) (tabla 6).

Antibiótico	Concentración del disco	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Diámetro de halo de inhibición (mm)		
			S	I	R
Penicilina	10 Unidades	47	≥47	27-46	<27
Cefixima	5 µg	37-45	≥31	-	-
Ceftriaxona	30 µg	39-51	≥35	-	-
Ciprofloxacino	5 µg	48-58	≥41	28-40	<28
Espectinomicina	100 µg	23-29	≥18	15-17	<15
Tetraciclina	30 µg	30-42	≥38	31-37	<31
Azitromicina <sup>1</sup>	15 µg	-	≥27	26-24	<24
Eritromicina <sup>2</sup>	15 µg	-	-	-	-
Cefepima	30 µg	37-46	≥31	-	-
Cefuroxima	30 µg	28-36	≥31	26-30	<26
Gentamicina <sup>2</sup>	120 µg	-	-	-	-

**Tabla 6.** Concentración de antibióticos ensayados, rangos de control de calidad y criterios de interpretación del diámetro de halo de inhibición según criterios de CLSI (146); I: sensibilidad intermedia; R: resistente; S: sensible; <sup>1</sup>Aunque CLSI y EUCAST no describen los criterios de interpretación del diámetro de halo de inhibición para azitromicina consideramos estos criterios basándonos en la experiencia de otros estudios en nuestro país (3); <sup>2</sup>No hay criterios de interpretación de los halos de inhibición definidos, por lo que únicamente se recogen los resultados de los milímetros de halo de inhibición obtenidos.

### 3.4.2.2 Método de dilución en agar

El método de dilución en agar se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo agar GC con 1% de suplemento de crecimiento definido.

➤ **Elaboración del medio**

El medio se preparó como se describe en el apartado anterior aunque se utilizaron placas Petri de 90 mm de diámetro y, el antimicrobiano se incorporó el mismo día que se preparó el medio cuando éste aún estaba fundido. También se prepararon placas de agar sin antimicrobiano para utilizar como control negativo. Para lograr el rango de dilución deseado se prepararon diferentes medios con diferente concentración de antibiótico.

➤ **Preparación del antimicrobiano**

Para llevar a cabo este método se emplearon sustancias valoradas de las que se conoce la potencia (microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de sustancia pura por cada miligramo (mg) de sustancia valorada) y se calculó la cantidad de antibiótico en miligramos (mg) necesaria para preparar 1 mililitro (ml) de solución madre siguiendo la fórmula descrita por el CLSI (175):

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \cdot \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}$$

**Figura 3.** Fórmula desarrollada para calcular los mg de sustancia valorada necesarios para conseguir la concentración deseada.

La sustancia valorada se pesó en una balanza de precisión y se prepararon 10 diluciones seriadas para cada antibiótico a partir de la solución madre, desde 0,5 mg/ml hasta 0,001 mg/ml. Una vez solidificado el medio se inocularon las distintas cepas a estudio. Las soluciones madre también pueden almacenarse en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o, preferiblemente a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 6 meses.

➤ **Preparación del inóculo**

Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo de *N. gonorrhoeae* de 18-24 horas de incubación en medio agar chocolate. Con un asa estéril se cogen colonias del cultivo y se suspenden con 1 ml de solución salina estéril hasta alcanzar una suspensión equivalente a 0,5 en la escala McFarland (lo que equivale aproximadamente a  $10^8$  UFC por ml). Las placas se secan antes de ser inoculadas, colocándolas en una estufa en posición invertida con la tapa entreabierta. Con la micropipeta se transfieren 1–3  $\mu$ l de cada suspensión problema en la superficie del agar en áreas circulares con diámetros de 5 a 7 mm, consiguiendo un inóculo final de aproximadamente  $10^4$  UFC. Se inoculan las placas empezando por la placa de menor concentración de antibiótico. Una vez que el inóculo se ha secado se incuban las placas invertidas durante 18-24 horas a 35 °C en atmósfera con humedad (70%) enriquecida con el  $5\pm 1\%$  CO<sub>2</sub>.

➤ **Control de calidad**

Para realizar un control de calidad del medio, antes (control de crecimiento inicial) y después (control de crecimiento final) de inocular los medios con antibiótico, se utilizaron dos placas con medio agar GC con 1% de suplemento de crecimiento definido elaboradas sin antibiótico. También se añadió la cepa control *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 en cada medio con el fin de realizar un control de la interpretación.

➤ **Lectura e interpretación de los resultados**

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de las CMI de cada aislado. La lectura se realizó anotando el valor de la CMI, es decir, la menor concentración de antibiótico que inhibía completamente el crecimiento del aislado (no se consideró crecimiento a la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo). Estos resultados se interpretaron según las tres categorías descritas anteriormente: como microorganismo sensible al antibiótico (S), con sensibilidad intermedia (I) o resistente (R) según los criterios de interpretación publicados por EUCAST (176) (tabla 7). Sólo se validaron los resultados obtenidos tras comprobar que todas las cepas crecieron en los medios de control de crecimiento sin

antibiótico inicial y final, y que la CMI mostrada por la cepa control (*N. gonorrhoeae* ATCC 49226) se encontraba dentro de los rangos establecidos por el CLSI (146) (tabla 7).

Antibiótico	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 <sup>1</sup>	Puntos de corte CMI (mg/l)		
		S	I	R
Cefixima <sup>2</sup>	0,004-0,03	≤0,12	-	≥0,25
Ceftriaxona <sup>2</sup>	0,004-0,015	≤0,12	-	≥0,25
Ciprofloxacino <sup>2</sup>	0,001-0,008	≤0,03	0,06	≥0,12
Gentamicina <sup>3</sup>	-	-	-	-

**Tabla 7.** Antibióticos ensayados mediante el método de dilución en agar y puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST para interpretar su sensibilidad; I: sensibilidad intermedia; R: resistente; S: sensible;<sup>1</sup> Según los criterios de CLSI; <sup>2</sup> Según los criterios de EUCAST; <sup>3</sup> No están establecidos los puntos de corte

### 3.4.2.3 Método de E-test

Para las cepas interpretadas con sensibilidad intermedia o resistencia a azitromicina por el método de difusión en agar disco-placa se analizó la CMI correspondiente por el método de difusión en agar E-test.

#### ➤ **Elaboración del medio**

El medio se procesó como se describe en el método de difusión en agar, pero se prepararon placas de 90 mm de diámetro.

#### ➤ **Preparación del inóculo**

Se preparó el inóculo y se extendió por la placa de CG con el 1% de suplemento de crecimiento definido, como se ha descrito en el método de difusión en agar. Se dejó 15 minutos a temperatura ambiente para que se absorbiera el exceso de humedad en la superficie del agar antes de dispensar la tira de E-test.

➤ **Dispensación de la tira de E-test**

Con ayuda de unas pinzas estériles, se colocó una tira de E-test por placa inoculada. Las placas se incubaron a 35°C, con una atmósfera de un 70% de humedad, suplementados con 5% de CO<sub>2</sub>.

➤ **Lectura e interpretación de los resultados**

Transcurridas 18-24 horas se procedió a la lectura e interpretación de los resultados. La CMI se tomó como la concentración más baja de azitromicina, señalada en la tira de E-test, que confluye con la elipse formada por la inhibición del crecimiento del microorganismo y la interpretación se realizó según los criterios establecidos por EUCAST (<http://www.eucast.org>) (tabla 8).

Antibiótico	Puntos de corte CMI (mg/l) según EUCAST		
	S	I	R
Azitromicina	≤0,25	0,5	>0,5

**Tabla 8.** Puntos de corte clínicos establecidos por EUCAST para la interpretación de la sensibilidad a azitromicina(<http://www.eucast.org>); I: sensibilidad intermedia; R: resistente; S: sensible

#### 3.4.2.4 Detección de resistencia plasmídica a penicilina

La presencia de producción de β-lactamasas se detectó mediante la realización de una prueba rápida comercializada, basada en la hidrólisis de una cefalosporina cromogénica, Nitrocefín SRO112C (OXOID™).

#### 3.4.3 Caracterización de los aislados de *N. gonorrhoeae*

Para llevar a cabo el tipado molecular de los aislados se utilizó el método NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae multi-antigen sequence typing*) siguiendo la metodología descrita por *Martin et al* (12). Se extrajo el ADN y se amplificaron, por PCR ,

fragmentos internos de los genes *porB* y *tbpB*. A continuación se secuenciaron en los 2 sentidos y se analizó la secuencia.

➤ **Extracción del ADN o Preparación del ADN**

Se recuperaron las cepas de *N. gonorrhoeae* almacenadas a -80°C en caldo de glicerol, posteriormente se cultivaron en agar GC-Lect™ (Becton Dickinson) y se incubaron durante la noche a 35°C, con una atmósfera de un 70% de humedad, suplementados con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 18-24 horas de incubación se realizó una suspensión de api® Suspensión Médium (bioMérieux) con una turbidez equivalente a 4 en la escala McFarland. Se vorteo la suspensión durante 1 minuto y se realizó un choque térmico calentando la suspensión a 95°C durante 10 min y posteriormente enfriando a 4°C durante 2-5 min. El lisado se centrifugó a 10000 g durante 5 min y se congeló el sobrenadante a -20°C.

➤ **Selección de fragmentos internos de *por* y *tbpB***

Las regiones internas variables de *por* y *tbpB* se secuenciaron en ambas direcciones mediante el uso de un único par de cebadores que se identificaron a partir de alineaciones de las secuencias disponibles en GenBank mediante el uso del software ClustalX (versión 1.8, disponible en: <http://www.igbmc.ustrasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>) (12).

Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento interno del gen *por* fueron diseñados mediante el uso de secuencias conservadas que codifican los alelos *por* IA y IB. Éstos amplifican un fragmento de 737 pares de bases (pb): 5'-<sup>350</sup>CAA GAA GAC CTC GGC AA<sup>366</sup>-3' (*por* forward) y 5'-<sup>1086</sup>CCG ACA ACC ACT TGG T<sup>1071</sup>-3' (*por* reverse) (la numeración se basa en la secuencia *por* de la cepa MS11) (12). Los cebadores para *tbpB* fueron diseñados utilizando secuencias conservadas, y amplifican un fragmento de 589 pb: 5'-<sup>1098</sup>CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC<sup>1118</sup>-3' (*tbpB* forward) y 5'-<sup>1686</sup>TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG<sup>1666</sup>-3' (*tbpB* reverse) (la numeración se basa en la secuencia *tbpB* de la cepa UU1008; número de acceso GenBank 2286066) (12).

➤ **Amplificación de los fragmentos *por* y *tbpB***

La PCR del fragmento del gen *por* se realiza en volúmenes de reacción de 20 µl usando capilares de vidrio que se incorporan en un carrusel de polipropileno. Cada PCR contiene 20 pmol de cada cebador, 10 µl de mezcla de reactivo LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), 5 µl de lisado de ADN, y agua para PCR hasta un volumen de 20 µl. Para realizar la PCR hemos utilizado el termociclador LightCycler® 2.0 (Roche). El ciclo de PCR comprende una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de, 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 62°C y 10 segundos a 72°C, seguido por una temperatura de fusión de 5 segundos a 95°C, una extensión final de 30 segundos a 72°C y un posterior enfriamiento a 4°C. La amplificación del fragmento del gen *tbpB* se realizó con los cebadores *tbpB*, mediante el uso del mismo método, pero con una temperatura de hibridación de 69°C. Los fragmentos de ADN amplificados fueron purificados con el equipo UltraClean® PCR Clean-Up (MoBio laboratories, Inc) según indican las instrucciones del fabricante.

➤ **Secuenciación de los fragmentos *por* y *tbpB***

Los fragmentos internos de los genes *porB* y *tbpB* amplificados por PCR se secuenciaron en ambas direcciones (“forward” y “reverse”) con los cebadores usados en la amplificación inicial de PCR mediante el uso del equipo BigDye Terminator Cycle Sequencing (versión 3.1; Applied Biosystems™) y se aplicaron a un secuenciador de ADN HITACHI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™). Las reacciones de secuenciación trazadas en las direcciones “forward” y “reverse” fueron analizadas y editadas con el uso del software Sequencing Analysis (versión 5.3; Applied Biosystems) y cortadas a una longitud establecida.

➤ **Análisis de las secuencias**

En el caso de *por*, se utiliza una secuencia de 490 pb para definir los alelos, a partir de una secuencia conservada que se extiende desde el nucleótido 455 en la secuencia de la cepa MS11, “TTGAA” (12). Para definir los alelos de *tbpB*, se selecciona



una secuencia de 390 pb, a partir de una secuencia conservada que se extiende desde el nucleótido 1118 en la secuencia de la cepa UU1008, "CGTCTGAA" (12).

Utilizando la página web de NG-MAST ([www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net)) se asigna el correspondiente alelo a cada gen y el secuenciotipo (ST) resultante de la combinación de ellos a cada cepa. A las secuencias de los genes *porB* y *tbpB* no descritas anteriormente se les asigna un nuevo número alélico utilizando la base de datos disponible en <http://www.mlst.net>.

### 3.5 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados descriptivos para las variables cuantitativas se representan como media y desviación estándar (DE) y en algún caso como mediana y rango (mínimo-máximo). Las variables categóricas se representan como frecuencia y porcentaje.

Se ha utilizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de la distribución a la hora de analizar las variables cuantitativas (edad, CMI y mm de halo de inhibición).

Para analizar la relación entre variables categóricas se ha utilizado la prueba de Chi Cuadrado o la prueba exacta de Fisher según proceda.

Para comprobar si existe asociación entre las variables cuantitativas (mm de halo de inhibición de azitromicina y eritromicina) se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson si se ajustan a una distribución normal o el coeficiente de correlación de Spearman si la distribución no cumple los criterios de normalidad.

Para comprobar la relación lineal entre los resultados de sensibilidad a gentamicina obtenidos mediante un método de referencia (dilución en agar) y otro método analítico (difusión en disco-placa) se ha llevado a cabo un análisis de regresión lineal.

Para determinar la concordancia entre distintos métodos analíticos (dilución en agar y difusión en disco-placa) en el caso de ciprofloxacino, se ha aplicado la prueba estadística Kappa.

Para estudiar los factores relacionados con la presencia de coinfección con el VIH, en primer lugar se han realizado análisis univariantes mediante los modelos de regresión logística para estudiar la influencia individual de cada una de las variables sobre la presencia de coinfección con el VIH. A continuación se ha considerado un modelo de regresión logística multivariante para estudiar la influencia conjunta. En este caso se consideran como posibles variables independientes aquellas que han resultado estadísticamente significativas en el análisis univariante. En el modelo multivariante final únicamente se han considerado aquellas variables que han alcanzado la significación estadística. Los datos se presentan mediante el odds-ratio (OR) así como su intervalo de confianza del 95%.

Para la comparación la CMI<sub>50</sub> de cefixima, ceftriaxona y ciprofloxacino a lo largo de los 3 años de estudio (2011-2013) se ha utilizado la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ya que no se cumplen los requisitos de normalidad.

Un resultado se considera estadísticamente significativo siempre que el p-valor sea inferior a 0,05. Los datos han sido analizados utilizando el software estadístico SPSS 22.0.

### **3.6 Consideraciones éticas**

El estudio realizado es de carácter descriptivo, por lo que durante su realización nos hemos limitado a recopilar información existente sin que se haya realizado a los pacientes pruebas diagnósticas o se les haya sometido a tratamiento alguno para llevar a cabo la investigación.

Toda la información recopilada para el mismo se ha considerado confidencial y se ha utilizado única y exclusivamente en el ámbito profesional.

Se obtuvo permiso para acceder a la revisión de las historias clínicas a través del comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Basurto.

## 4. RESULTADOS



## 4.1 Resultados epidemiológicos

Durante el período de estudio se obtuvieron 371 aislamientos de *N. gonorrhoeae* pertenecientes a 292 pacientes. En 15 pacientes (5%) se detectó más de un episodio de infección gonocócica a lo largo de todo el período de estudio, en dos de ellos tres episodios, por lo que, teniendo en cuenta que nuestra unidad de análisis es el episodio en el que se diagnosticó la infección tal y como se define en el apartado de “Material y Métodos”, nuestro tamaño muestral es de 309 episodios.

### 4.1.1 Características sociodemográficas

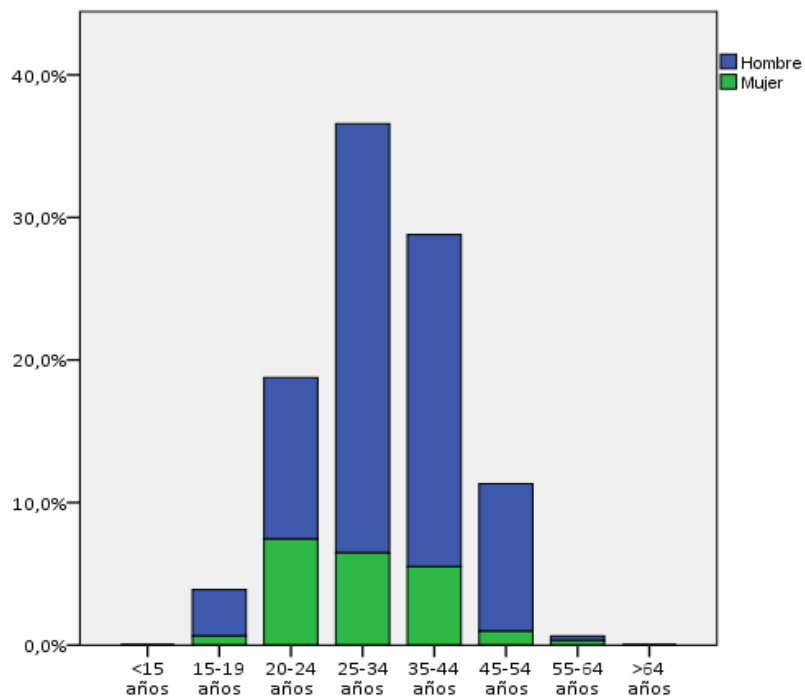
Las tasas de incidencia de infección gonocócica por 100.000 habitantes a lo largo de los tres años de estudio son de 38 en el año 2011, 26 en el año 2012 y 24 en el año 2013. En el año 2011 se diagnosticaron 134 episodios (el 74,6% de los diagnósticos se produjeron en hombres y 25,4% en mujeres), en el año 2012 se diagnosticaron 91 episodios (82,4% en hombres y 17,6% en mujeres), y en el año 2013 se diagnosticaron 84 episodios (81,0% en hombres y 19,0% en mujeres).

La edad media de los pacientes fue de 33 años (DE=9,1) (mediana 33 y rango de 16-59 años). El patrón sociodemográfico muestra un predominio de los hombres (243 (78,6 %)) con una edad media de 34 años (DE=9,1) (mediana de edad 33 años y rango de 16-59 años), frente a las mujeres (66 (21,4 %)) con una edad media de 31 años (DE:9,1) (mediana de edad 29 años y rango de 18-57 años), observándose diferencias estadísticamente significativas entre la edad media de hombres y mujeres ( $p=0,022$ ). Como se puede observar en la tabla 9, la distribución de infección gonocócica según los grupos de edad fue similar durante los tres años de estudio sin encontrar variaciones estadísticamente significativas ( $p=0,55$ ).

Edad (años)	N episodios (%)		
	2011	2012	2013
15-19	2 (1,5)	3 (3,3)	5 (6,0)
20-24	21 (15,7)	14 (15,4)	17 (20,2)
25-34	50 (37,3)	37 (40,6)	29 (34,5)
35-44	44 (32,8)	25 (27,5)	22 (26,2)
45-54	16 (12,0)	12 (13,2)	9 (10,7)
55-64	1 (0,7)	0	2 (2,4)

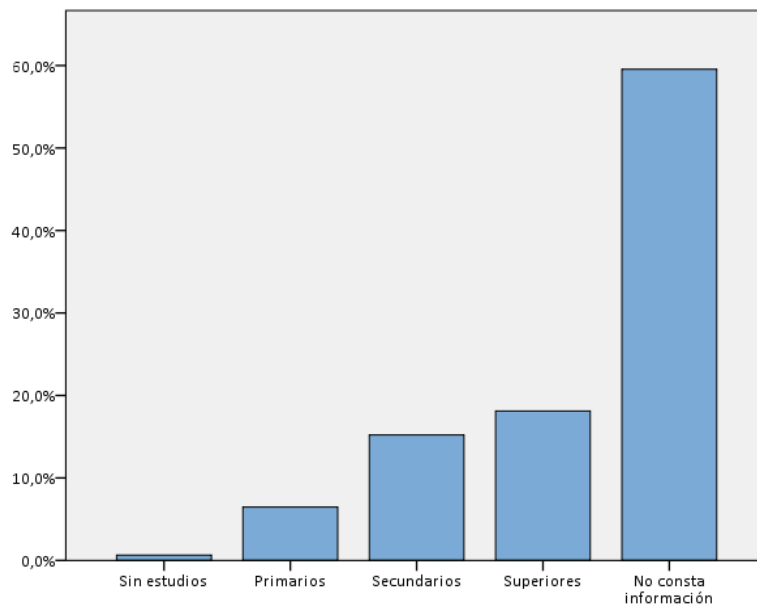
**Tabla 9.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según grupos de edad y año.

El grupo de edad más afectado fue el de 25 a 34 años (37%) (figura 4). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,04$ ) entre los grupos de edad de hombres y mujeres, las mujeres (32% de las mujeres entre 20-24 años) fueron más jóvenes que los hombres (47% de los hombres entre 25-34 años).



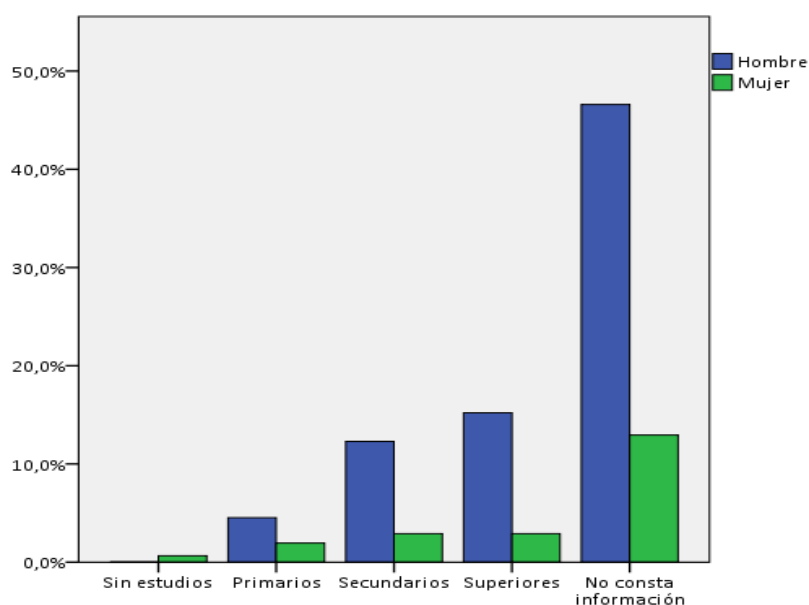
**Figura 4.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según los grupos de edad.

En cuanto al nivel de estudios en más de la mitad de los casos no se registró esta información, pero de los 125 pacientes en los que si se registró esta información, observamos que el 44,8% de los pacientes tenían estudios superiores (figura 5).



**Figura 5.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según nivel de estudios.

Observamos algunas diferencias en el nivel de estudios según el sexo. El 35,0% de los hombres tenían estudios secundarios o superiores frente al 27,3% de las mujeres (figura 6), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,143$ ). Pero si se observó significación estadística entre el porcentaje de españoles con niveles secundarios y superiores frente a extranjeros (42% frente a 13%) ( $p<0,05$ ).



**Figura 6.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según sexo y nivel de estudios.

En cuanto al país de origen de los diagnosticados de gonorrea, el 70,9% de los pacientes eran autóctonos y el 27,5% procedían de otras zonas, principalmente Latinoamérica (62,3% de los extranjeros), siendo Colombia (13 casos), Paraguay (10 casos) y Ecuador (9 casos) los países predominantes. El Norte de África fue la siguiente procedencia con mayor porcentaje de diagnósticos, siendo Marruecos el país de procedencia más frecuente (11 casos). En 5 casos no se registró el país de origen, 4 de ellos fueron atendidos en centros de salud y uno en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario Basurto, ninguno de ellos fue estudiado en una consulta especializada en ITS.

Lugar de origen	N (%)
<b>España</b>	<b>219 (70,9)</b>
<b>Otras procedencias</b>	<b>85 (27,5)</b>
África subsahariana	9 (2,9)
Asia	2 (0,6)
Europa del Este	4 (1,3)
Europa Occidental	2 (0,6)
Latinoamérica	53 (17,2)
Norte de África	14 (4,5)
Oriente medio	1 (0,3)
No consta información	5 (1,6)
<b>Total</b>	<b>309 (100)</b>

**Tabla 10.** Distribución de los diagnósticos de gonorrea según lugar de origen.



En cuanto a la distribución por sexo según el país de origen, se observa una mayor proporción de mujeres entre los casos de otros países con respecto a las españolas (35,3% frente a 15,1%) ( $p < 0,05$ ) (figura 7). También se observan diferencias en la edad al diagnóstico entre los españoles y los pacientes procedentes de otros países (34 (DE:8,4) frente a 30 (DE:9,1)) ( $p = 0,002$ ).

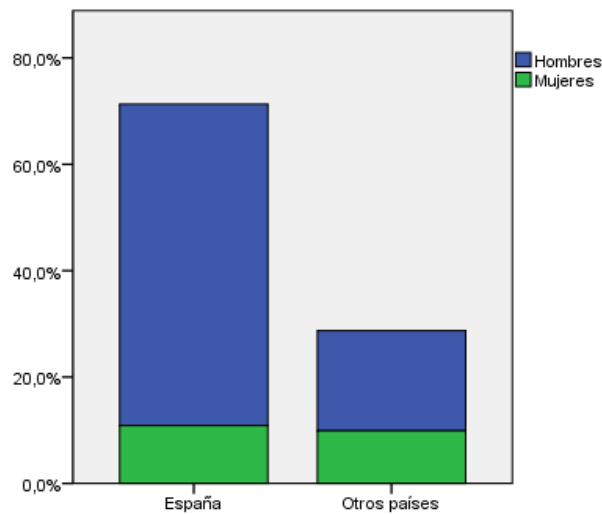
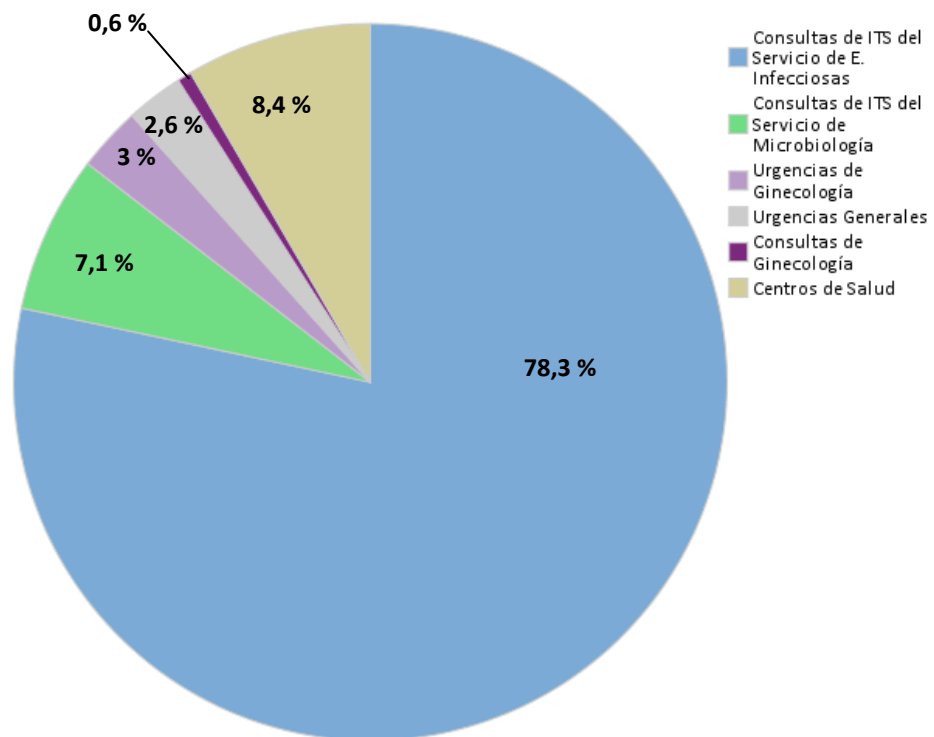


Figura 7. Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según sexo y país de origen.

#### 4.1.2 Características clínicas

Los datos obtenidos referentes al servicio sanitario de procedencia de los pacientes nos muestran un elevado número de diagnósticos realizados en las consultas especializadas de ITS (85,4%), de las cuales 91,7% fueron atendidas en la consulta del Servicio de Enfermedades Infecciosas y un 8,3% en la consulta del Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección. El resto de pacientes fueron atendidos en el Servicio de Urgencias del hospital, tanto de Ginecología (3%) como Generales (2,6%), en las Consultas externas de Ginecología (0,6%) y en diferentes Centros de Salud pertenecientes al área "comarca Bilbao" (8,4%). De los pacientes que no fueron atendidos en las consultas especializadas de ITS durante el diagnóstico de este

episodio de infección gonocócica (14,6%), el 82,2% fueron remitidos a una consulta especializada tras este primer diagnóstico y el 17,8% no se remitieron a una consulta especializada o el paciente no acudió a la consulta de ITS. Con lo cual hay datos referentes a estos pacientes, sobre todo en lo que concierne a la historia sexual, que no se registraron en la historia clínica.

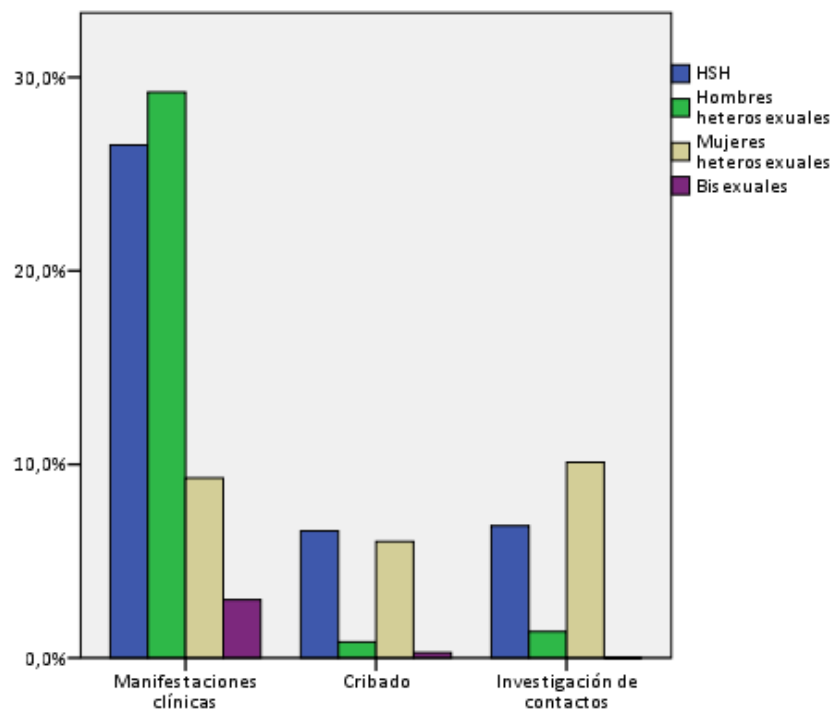


**Figura 8.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el servicio de procedencia de los pacientes.

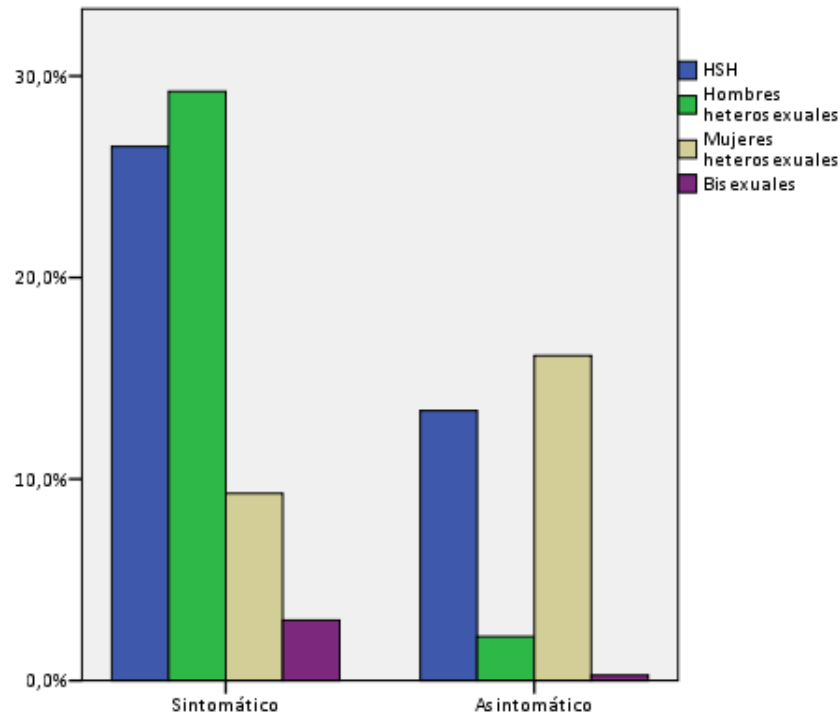
La mayoría de los pacientes presentaban manifestaciones clínicas (68%) en el momento del diagnóstico, y un 14% se diagnosticaron durante la realización de un estudio de cribado de ITS ya que se trataba de pacientes con relaciones sexuales de riesgo.

Motivo de consulta	N (%)
Manifestaciones clínicas	210 (68,0)
Cribado	43 (14,0)
Investigación de contactos	56 (18,0)

**Tabla 11.** Distribución del diagnóstico según el motivo de consulta.



**Figura 9.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según motivo de consulta y orientación sexual de los pacientes.



**Figura 10.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según si presentan o no síntomas y según la orientación sexual de los pacientes.

Los síntomas observados en mujeres de mayor a menor frecuencia fueron la leucorrea vaginal (13 casos), dolor abdominal por EIP (4 casos), disuria (2 casos), faringitis (1 caso), proctitis (1 caso) y uretritis (1 caso). Y en el caso de los hombres fueron la uretritis (174 casos), proctitis (8 casos), balanitis (5 casos) y disuria (1 caso).

Destacar los 4 casos (6%) de EIP en mujeres. Un caso diagnosticado en el año 2011 y 3 en el año 2013. Se trata de tres pacientes españolas y una colombiana. Todas se diagnosticaron por el Servicio de Urgencias de Ginecología del hospital. En todos los casos la localización del diagnóstico fue endocervical y en un caso además se aisló en la muestra vaginal. Tres de ellas presentaron también un diagnóstico positivo a otras ITS, dos a *C. trachomatis* y una a *C. trachomatis*, *T. vaginalis* y VHS. Este último caso se trata de una paciente autóctona que ejercía prostitución mientras que en el resto de casos se trataba de pacientes con pareja estable. Todas estas pacientes dieron un resultado negativo en la prueba del VIH y negaron tener episodios previos de ITS o algún episodio de aborto. Tres de ellas eran portadoras de DIU. Todas presentaron:

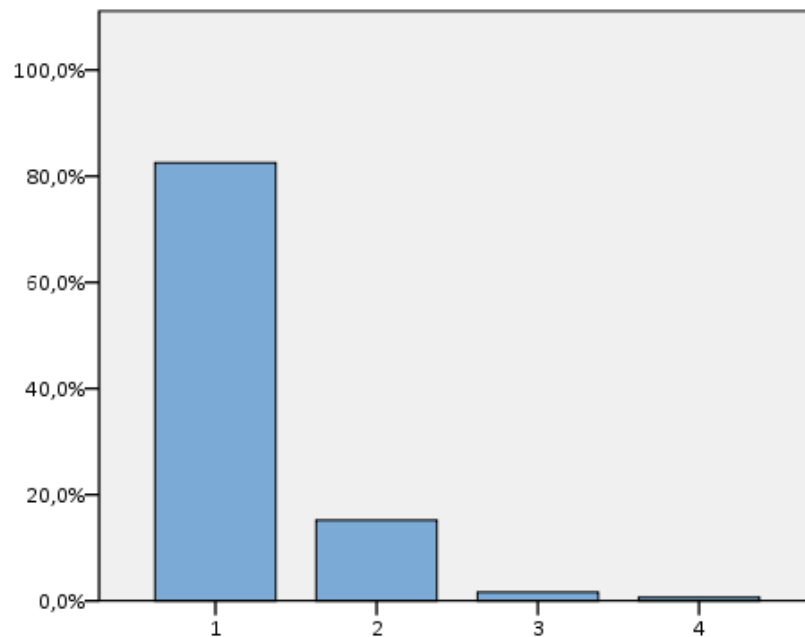
dolor abdominal, fiebre, leucorrea, cérvix doloroso a la movilización; sin embargo no se observó ningún caso de endometritis. En un caso se detectó absceso tubo-ovárico derecho, el cual se drenó mediante cirugía y se cultivó aislándose también *N. gonorrhoeae*. En tres casos se mostró leucocitosis, neutrofilia y proteína C-reactiva positiva (en uno de ellos de 17,6) y 2 presentaron esterasa leucocitaria de 500. Dos casos requirieron ingreso de 3 y 5 días respectivamente. En ningún caso se llegó a realizar control de la pareja.

Respecto a la localización de la muestra observada en este trabajo, el 64% de los diagnósticos presentaron localización uretral, seguido de un 21,7% de localización anorrectal, 16,5% orofaríngea, 14,2% cervical y 3,9% vaginal. El porcentaje de localización vaginal puede estar infravalorado ya que en el protocolo de toma de muestras que se sigue en las consultas específicas de ITS, al incluir tomas de todas las localizaciones simultáneamente, no incluye el medio específico GC-Let en el procesamiento de la muestra vaginal por su menor rendimiento frente al foco endocervical. La localización más frecuente en los hombres fue la uretral seguida de la anorrectal y la faríngea. En las mujeres la localización más frecuente fue la endocervical, seguida de la faríngea, vaginal, anorrectal y uretral (tabla 12). Sólo se encontró un caso de faringitis en los casos de localización orofaríngea y 8 casos de proctitis en la localización rectal, lo que supone un 98% y un 85% de pacientes asintomáticos respectivamente para estas localizaciones.

Localización	N (%)	
	Hombres	Mujeres
Uretral	191 (78,6)	7 (10,6)
Anorrectal	57 (23,4)	10 (15,1)
Orofaringea	27 (11,1)	24 (36,4)
Endocervical	-	44 (66,7)
Vaginal	-	12 (18,2)

**Tabla 12.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según localización de la muestra y sexo.

Si sumamos el número de localizaciones por episodio observamos que en el 82,5% de los diagnósticos la presentación fue en una sola localización. El 15,2% en dos localizaciones, el 1,6% en 3 localizaciones y el 0,6% en cuatro localizaciones diferentes.

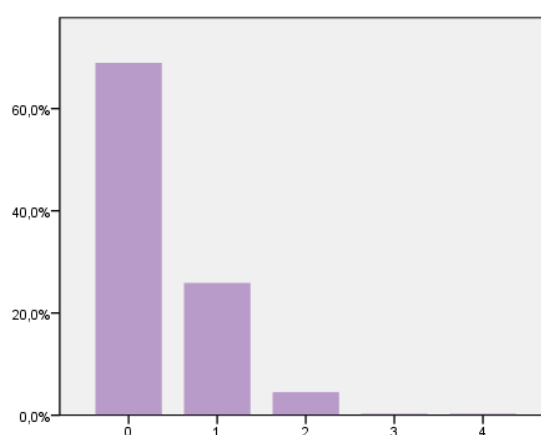


**Figura 11.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el número de localizaciones distintas en cada episodio.

Se obtuvo información sobre la presencia de otras ITS diagnosticadas de forma concurrente distintas al VIH. El 31% (95 pacientes) de los pacientes con infección gonocócica presentaron además otra infección. El 15% (14 pacientes) presentaron coinfección de dos o más ITS (figura 12). La prevalencia de coinfección clamidia-gonococia fue del 22% y la de coinfección condiloma-gonococia fue del 5,8%, las prevalencias de infección por VHB, tricomonas, sífilis, escabiosis y VHS fueron inferiores al 3% (tabla 13). La coinfección por clamidia fue más evidente en el grupo de las mujeres (30%) frente a los hombres (20%) mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

ITS diagnosticadas de forma concurrente	N	%
<b>1 ITS concurrente</b>		
Sífilis primaria	1	1,1
Sífilis secundaria	0	0
Sífilis latente precoz	2	2,1
Clamidia	56	58,9
Tricomonas	1	1,1
Condilomas	13	13,7
VHS	1	1,1
VHB	4	4,1
Molluscum	0	0
Escabiosis	2	2,1
Otras ITS	1	1,1
Subtotal	81	85,3
<b>2 ITS concurrentes</b>		
Clamidia + tricomonas	1	1,1
Clamidia + condilomas	3	3,1
Clamidia + VHB	2	2,1
Clamidia + molluscum	1	1,1
Clamidia + sífilis latente precoz	1	1,1
Clamidia + sífilis secundaria	1	1,1
Clamidia + sífilis primaria	1	1,1
Tricomonas + condilomas	1	1,1
Tricomonas + VHB	1	1,1
Subtotal	12	12,6
<b>3 ITS concurrentes</b>		
Clamidia + Condilomas + molluscum	1	1,1
Clamidia + Tricomonas + VHS	1	1,1
Subtotal	2	2,1
Total	95	100

**Tabla 13.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según la presencia de otras ITS diagnosticadas de forma concurrente.



**Figura 12.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el número de ITS diagnosticadas de forma concurrente.

Respecto a la situación del VIH en los casos diagnosticados de infección gonocócica, el 12% de los pacientes estaban previamente coinfectados con el VIH, 6 casos (2%) fueron diagnosticados como consecuencia del diagnóstico de infección gonocócica a estudio. En un caso se desconocía su estatus serológico, se trata de un paciente que acudió a urgencias del hospital y no fue atendido posteriormente en una consulta especializada en ITS.

Situación frente al VIH	N (%)
VIH + previo a este episodio	31 (10,0)
VIH + diagnosticado en este episodio	6 (2,0)
VIH -	271 (87,7)
No consta información	1 (0,3)
Total	309 (100,0)

**Tabla 14.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según coinfección con el VIH.

La tabla 15 muestra los factores asociados a la coinfección con VIH en los pacientes con infección gonocócica. Las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los VIH positivos y los VIH negativos fueron el diagnóstico por cribado frente al diagnóstico por manifestaciones clínicas (23,3% frente a 11,0%), la presentación de uretritis frente a otros síntomas (10,3% frente a 3,9%), los HSH frente a hombres y mujeres heterosexuales (25,6% frente a 17,0%), la presencia de antecedentes de ITS, la presencia de ITS concomitantes, la coinfección con sífilis, la coinfección con una ITS distinta del VIH, y rozando la significación estadística las relaciones sexuales con contactos esporádicos (15,2% frente a 9,3%) y la procedencia de consultas especializadas en ITS frente a otras consultas (13,6% frente a 2,3%). En el análisis multivariante para predecir la asociación con la coinfección del VIH se incluyeron todas las variables significativas en el análisis univariante. Los HSH (OR de 14,27; IC del 95%: 4,16 a 48,89;  $p < 0,001$ ), los antecedentes de ITS (OR de 4,00; IC del 95%: 1,66 a 9,64;  $p = 0,002$ ) y la presencia de otras ITS concomitantes (OR de 2,76; IC del 95%: 1,26 a 6,05;  $p = 0,011$ ) fueron las únicas variables que predicen la presencia de VIH concomitante de forma estadísticamente significativa. La capacidad predictiva del análisis multivariante es de 0,852 (“Área bajo la curva ROC”), por lo que



seconsidera que este análisis tiene un buen poder discriminativo y que estos resultados no son debidos al azar.

Variable, n (%)	VIH positivo (n=37)	VIH negativo (n=271)	OR (IC del 95 %)	Valor p
Sexo				
Hombres	37 (15,3)	205 (84,7)	1	
Mujeres	0	66(100)	-	0,001*
Edad media (rango)	34 (16-50)	33 (18-59)	1,01(0,98-1,05)	0,383
País de origen				
Autóctonos	25 (11,5)	193 (88,5)	1	
Otros países	12 (14,1)	73 (85,9)	1,26 (0,60-2,65)	0,528
Motivo del diagnóstico				
Manifestaciones clínicas	23 (11,0)	186 (89,0)	1	
Cribado	10 (23,3)	33 (76,7)	2,45 (1,07-5,62)	0,034
Investigación de contactos	4 (7,1)	52 (92,9)	0,62 (0,20-1,88)	0,400
Síntomas				
Uretritis	18 (10,3)	156 (89,7)	1	
Otros	1 (3,9)	22 (12,0)	0,35(0,04-2,71)	0,313
Orientación sexual				
HSH	34 (25,6)	99 (74,4)	19,50 (5,83-65,01)	<0,001
Hombres y mujeres heterosexuales	3 (17,0)	170 (98,3)	1	
ITS previas	29 (23,2)	96 (76,8)	6,61 (2,91-15,02)	<0,001
ITS concomitantes	19 (19,8)	78 (80,2)	2,66 (1,32-5,34)	0,006
Clamidia	12 (17,6)	56 (82,4)	1,84 (0,87-3,89)	0,109
Condilomas	4 (22,2)	14 (77,8)	2,22 (0,69-7,16)	0,180
HBV	1 (14,3)	6 (85,7)	1,22 (0,14-10,48)	0,852
Sífilis	4(66,7)	2(33,3)	16,30 (2,87-92,46)	0,002
1 ITS	16 (19,8)	79 (80,2)	2,41 (1,19-4,90)	0,015
2 ITS	3 (27,3)	8 (72,7)	2,90 (0,73-11,46)	0,129
Relaciones de riesgo				
Ejerce prostitución	2 (13,3)	14 (86,7)	1,10 (0,24-5,07)	0,904
Contacto con prostitución	1 (3,2)	30 (96,8)	4,63 (0,61-35,04)	0,137
Relación sex. contacto esporádico	23 (15,2)	128 (84,8)	2,15 (0,95-4,90)	0,067
Relación sex. pareja estable	5 (6,3)	74 (93,7)	1,35(0,65-2,76)	0,415
Relación sex. esporádica-pareja estable	6 (14,0)	37 (86,0)	1,17 (0,45-3,02)	0,746
Lugar donde fueron atendidos				
Consulta especializada de ITS	36 (13,6)	228 (86,4)	6,79 (0,91-50,85)	0,062
Otros Centros	1 (2,3)	43 (97,7)	1	

**Tabla 15.** Factores asociados a la coinfección por el VIH en los casos diagnosticados de infección gonocócica.

\*El p-valor proviene del análisis Chi cuadrado ya que al tener valores 0 no se puede estimar el OR.

### 4.1.3 Antecedentes personales

En relación a los antecedentes personales, el 71,2% de los pacientes acudían por primera vez al centro sanitario por causa de una ITS, y más de un tercio (40,5%) referían haber tenido previamente algún episodio de ITS.

Situación	N (%)
Visto por primera vez	220 (71,2)
Ya había acudido antes al centro	89 (28,8)
Afirma antecedentes de ITS	125 (40,5)
Niega antecedentes de ITS	184 (59,5)

**Tabla 16.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según antecedentes de ITS.

### 4.1.4 Mecanismos de transmisión

Si desglosamos los datos de infección gonocócica por sexo y prácticas sexuales, la transmisión entre HSH, que agrupa hombres homosexuales y bisexuales, supone la mayoría de los diagnósticos de infección gonocócica (43,0%). En dos casos no se registró la información sobre el mecanismo de transmisión, se trata de 2 hombres que se diagnosticaron en un centro de salud y en las urgencias generales del hospital respectivamente, y que no fueron atendidos en una consulta especializada en ITS.

Mecanismo de transmisión	N (%)
Relaciones heterosexuales no protegidas	174 (56,3)
• Hombres con relaciones heterosexuales no protegidas	108 (35,0)
• Mujeres con relaciones heterosexuales no protegidas	66 (21,3)
Hombres con relaciones homosexuales no protegidas	125 (40,4)
Hombres con relaciones bisexuales no protegidas	8 (2,6)
Mujeres con relaciones homosexuales no protegidas	0 (0)
No consta información	2 (0,7)
Total	309 (100)

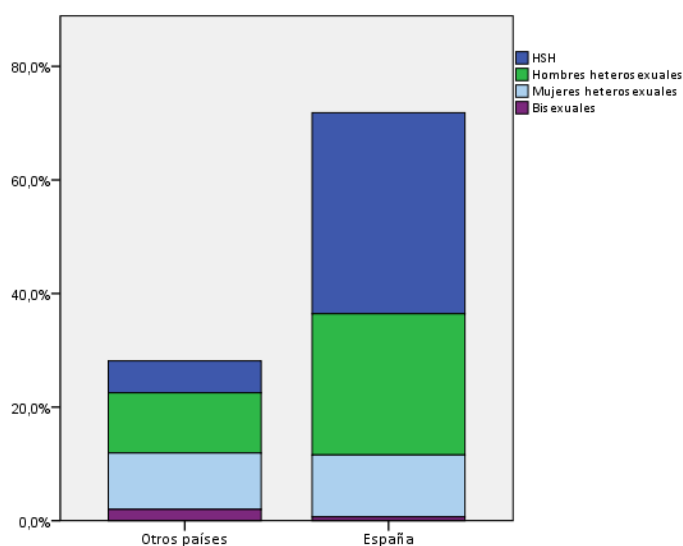
**Tabla 17.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el mecanismo de transmisión.

Más de un tercio (35,3%) de las relaciones homosexuales no protegidas se atribuyen a sexo oral (tabla 18).

Práctica sexual	N (%)
<b>Hombres que tienen sexo con hombres</b>	
Anal	3 (2,3)
Oral	47 (35,3)
Anal + oral	83 (62,4)
Total	133 (100)
<b>Hombres y mujeres heterosexuales</b>	
Vaginal	20 (11,5)
Anal	0 (0)
Oral	28 (16,1)
Vaginal + anal	9 (5,2)
Vaginal + oral	78 (44,8)
Anal + oral	0 (0)
Vaginal + anal + oral	37 (21,3)
No especifica práctica sexual	2 (1,1)
Total	174 (100)

**Tabla 18.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según las prácticas sexuales.

Se observan diferencias en cuanto al mecanismo de transmisión entre españoles y extranjeros. En los españoles el mecanismo de transmisión más frecuente fueron las relaciones entre HSH (49,7%), y en los extranjeros el mecanismo de transmisión más frecuente fueron las relaciones heterosexuales de los hombres (37,6%). No se consideran aquí los 5 casos en los que no se registró el país de origen (1,6%), se trata de dos hombres, uno de ellos homosexual, y tres mujeres heterosexuales.



**Figura 13.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según mecanismo de transmisión y país de origen.

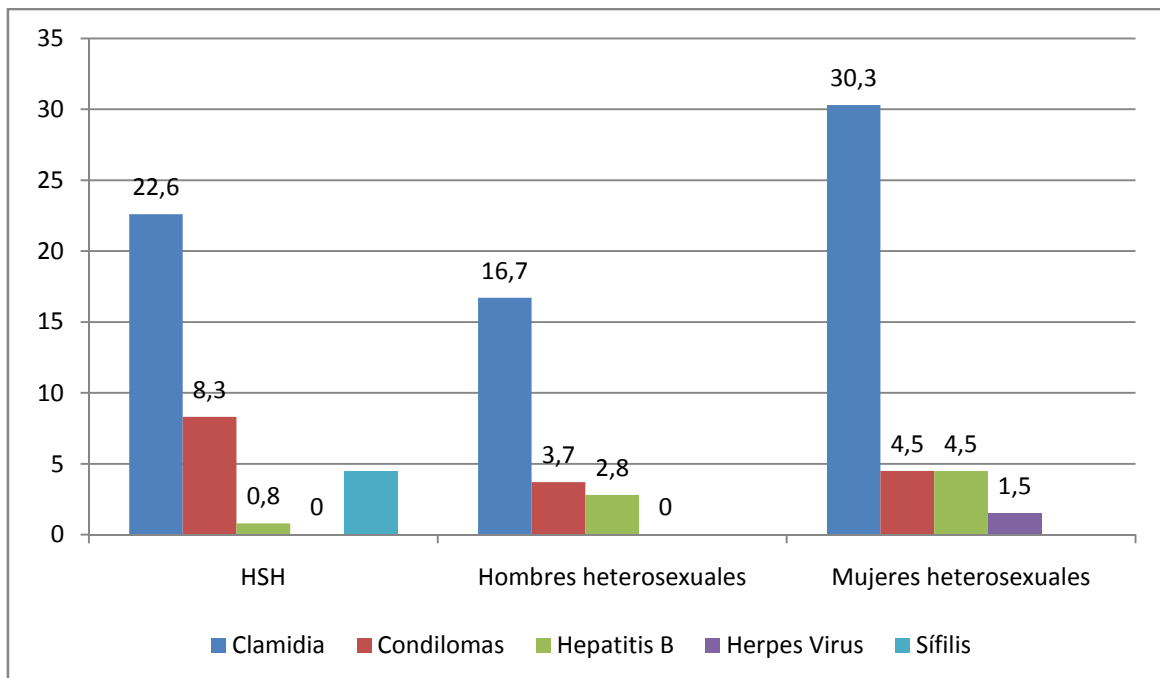
Al analizar la prevalencia de coinfección con el VIH según el mecanismo de transmisión observamos mayores prevalencias en HSH que en hombres heterosexuales (25,6% frente a 2,8%;  $p < 0,05$ ) (tabla 19).

Mecanismo de transmisión	Número total de casos	Prevalencia VIH (%)	Situación de VIH desconocida (n)
HSH	133	25,6	0
Hombres heterosexuales	108	2,8	1
Mujeres heterosexuales	66	0	0

**Tabla 19.** Prevalencia de la infección por el VIH en diagnósticos de infección gonocócica según el mecanismo de transmisión.

Si desglosamos la localización de la infección según el tipo de relación sexual observamos que en las mujeres heterosexuales la localización más frecuente fue la endocervical (41,5%), seguida de la orofaríngea (24,5%), vaginal (13,8%), rectal (10,6%) y uretral (9,6%), en hombres heterosexuales la localización más frecuente fue la uretral (92,2%) seguido de la faríngea (7%) y en HSH y bisexuales la localización más frecuente fue la uretral (53,0%) seguido de la rectal (34,0%) y la faríngea (13,0%).

En cuanto a las coinfecciones distintas de VIH según orientación sexual, encontramos que la coinfección por clamidia fue más frecuente en mujeres heterosexuales y HSH que en hombres heterosexuales (30,3% y 22,6% respectivamente frente al 16,7%), los condilomas se observaron más frecuentemente en HSH (8,3%) que en heterosexuales (3,7%) o en mujeres (4,5%) y el VHB fue más frecuente en hombres y mujeres heterosexuales que en HSH (2,8% y 3,4% respectivamente frente al 0,8%) (figura 14).



**Figura 14.** Prevalencia de coinfección de la infección gonocócica con otras ITS frecuentes según orientación sexual.

Un total de 133 hombres fueron homosexuales, con una edad media de 33 años (la mayoría entre 25-34 años). El 82,6% (109 casos) eran autóctonos frente al 17,4% (23 casos) que procedían de otros países ( $p < 0,05$ ). El 63,9% (85 casos) se diagnosticaron como consecuencia de las manifestaciones clínicas presentadas en el momento del diagnóstico, con los siguientes síntomas: uretritis (76 casos, 57,1%),

proctitis (7 casos, 5,3%) y balanitis (2 casos, 1,5%). El 8,2% se diagnosticaron por cribado y el 2,4% por contacto sexual de riesgo. El 15,1% de los aislamientos en HSH se realizó en muestras faríngeas, el 42,1% en rectales y el 63,9% en uretrales. El 58,6% de los HSH tenían antecedentes de ITS previos al episodio de infección gonocócica. El 35% de los HSH presentaron otras ITS distintas del VIH frente al 23% de los heterosexuales rozando la significación estadística ( $p=0,06$ ), entre estas ITS la más frecuente fue la detección de clamidia (22,6%), seguido por condiloma (8,3%), escabiosis (1,5%) y tricomonas y HV y VHB con un 0,8%. El 30,8 % sólo presentaban una ITS concomitante y el 4,5 % (6 casos) dos. Un 25,6 % de los pacientes homosexuales eran VIH positivo, el 21,1% ya conocido, y el 4,5% se diagnosticaron a raíz del episodio de gonorrea. Un 15,8% (21 casos) de los HSH tenía únicamente pareja estable, un 84,1% (111 casos) mantenía contactos esporádicos y el 19,2% (25 casos) presentaba pareja estable y contactos esporádicos a la vez. A su vez el 33% afirmaban haber tenido entre 2 y 5 contactos y/o parejas sexuales diferentes en los últimos 12 meses, el 19% entre 6 y 10 y el 40% más de 10.

En 3 casos la adquisición de la infección gonocócica (1%) se atribuyó a un accidente con el preservativo. Respecto al país donde probablemente fue adquirida la infección, el 3% (9 casos) de las infecciones se produjeron fuera de España, 4% en heterosexuales (en Argelia, Filipinas, República Dominicana y Tailandia) y un 4% en homosexuales (3 en Londres y uno en Portugal y Grecia respectivamente).

#### **4.1.5 Perfiles de riesgo**

La situación de riesgo más frecuente para contraer una infección gonocócica fueron las relaciones sexuales con un contacto esporádico. El 4,8% de los diagnósticos de gonorrea ejercían la prostitución (tabla 20). En 8 casos no se conoce la situación de riesgo, ya que se trata de pacientes que fueron atendidos en centros de salud o en el Servicio de Urgencias del hospital y no fueron atendidos en un centro especializado en ITS.

Situaciones de riesgo*	N (%)
Ejerce prostitución	15 (4,8)
Contacto con prostitución	31 (10)
Relación sexual con contacto esporádico	194 (62,8)
Relación sexual con pareja estable	123 (39,8)
Perfil de riesgo desconocido	8 (2,6)

**Tabla 20.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según situaciones de riesgo para la adquisición de la infección; \*Un mismo paciente puede presentar más de una situación de riesgo

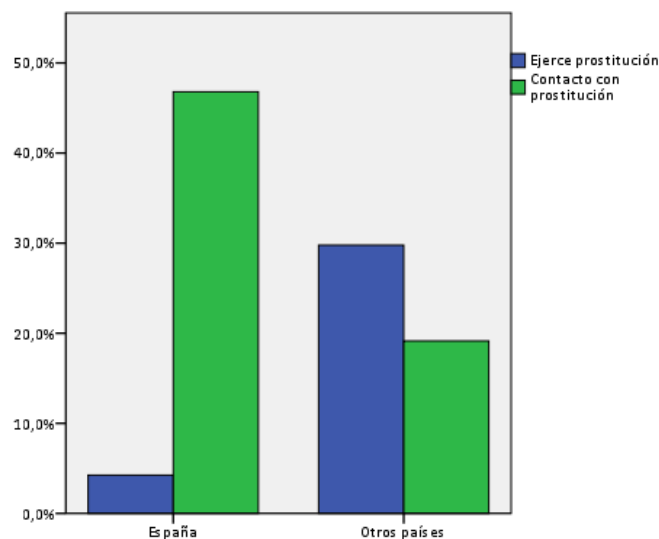
El 43,1% (53 casos) de los pacientes con pareja estable afirmaron haber tenido también algún contacto esporádico (44 casos (9 mujeres)), contacto con la prostitución (4 casos, todos hombres) o haber ejercido la prostitución (5 casos, todos mujeres).

En cuanto a los pacientes que alegaron ejercer prostitución, si analizamos las situaciones de riesgo más frecuentes según el lugar de origen encontramos algunas diferencias estadísticamente significativas, la proporción de personas que ejercen prostitución es superior entre los extranjeros que entre los españoles (15,3% frente a 0,9%) ( $p < 0,05$ ). Sin embargo la proporción de personas que son clientes de prostitución fue similar en ambos grupos, en torno al 10%. La media de edad de las personas que ejercen prostitución es de 32 años (DE=8,11), la media de edad de los hombres 24 años (DE=10,59) y de las mujeres 34 años (DE=6,91). La media de edad de los españoles y de los extranjeros que ejercen prostitución es respectivamente 33 y 32 años. Las principales características epidemiológicas y clínicas de los pacientes que ejercen prostitución se describen en la tabla 21.

La mayoría de los pacientes que ejercen prostitución son mujeres (tabla 21). Hay que destacar el caso de una mujer española que fue atendida en el Servicio de Urgencias de Tocología y Ginecología del hospital con clínica de EIP y coinfección por *C. trachomatis*, *T. vaginalis* y VHS tipo II. Además de esta mujer, tres mujeres más fueron diagnosticadas en las consultas de ITS por la presentación de manifestaciones clínicas como faringitis, leucorrea vaginal y disuria respectivamente.

Todos los pacientes que afirmaron tener contacto con prostitución (10%) eran hombres, el 93,5% eran hombres heterosexuales y el restante 6,5% hombres bisexuales.

El porcentaje de gonococia en el que estaban implicadas las relaciones no protegidas con un contacto esporádico fue superior en los españoles que en los extranjeros (68,4% frente al 54,1%) ( $p < 0,05$ ). Como ya hemos comentado, hay cinco pacientes en los cuales no se registró su país de origen, y 8 en los que no se registró su perfil de riesgo, cuatro de los cuales coinciden con los pacientes cuyo origen se desconoce y los otros 4 son españoles, estos casos no han sido incluidos en este análisis. Encontramos marcadas diferencias en cuanto al porcentaje de contactos esporádicos según la orientación sexual, ya que el 84% de los HSH afirmaron tener contactos esporádicos, frente al 62% de los hombres heterosexuales y el 27% de las mujeres ( $p < 0,01$ ).

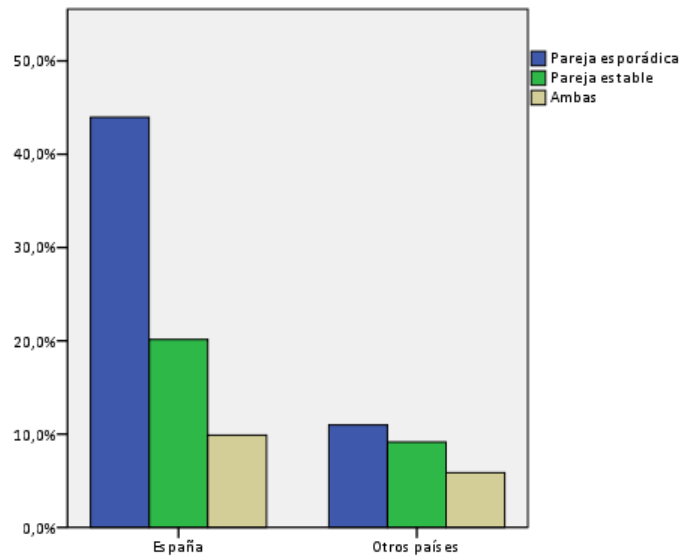


**Figura 15.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según lugar de origen y situación frente a la prostitución.



Variable, n (%)	M	H
Sexo	13 (19,7)	2 (13,0)
Edad media	34	24
Nivel de estudios		
Sin estudios	1 (7,7)	0
Estudios primarios	2 (15,4)	0
Estudios secundarios	0	1 (50,0)
Estudios superiores	0	0
No consta información	10 (77,1)	1 (50,0)
Orientación sexual		
Heterosexual	13 (100,0)	0
HSH	0	2 (100,0)
País de origen		
Autóctonos	2 (15,4)	0
Otros países:	11 (84,6)	2 (15,4)
Brasil	6 (46,1)	1 (7,7)
Colombia	2 (15,4)	1 (7,7)
República Dominicana	1 (7,7)	0
Paraguay	1 (7,7)	0
Venezuela	1 (7,7)	0
Localización de la infección		
Uretral	0	1 (50,0)
Rectal	2 (15,4)	1 (50,0)
Faríngea	5 (38,4)	0
Faríngea y rectal	1 (7,7)	0
Faríngea y endocervical	1 (7,7)	0
Rectal y endocervical	2 (15,4)	0
Endocervical y uretral	1 (7,7)	0
Endocervical	1 (7,7)	0
Motivo del diagnóstico		
Manifestaciones clínicas	4 (30,8)	0
Cribado	5 (38,4)	2 (100,0)
Investigación de contactos	4 (30,8)	0
ITS previas	8 (61,5)	1 (50,0)
Tipo de pareja		
Pareja estable y pareja esporádica o clientes	5 (38,5)	0
Pareja esporádica o clientes	13 (100,0)	2 (100,0)
ITS concomitante		
Clamidia	3 (23,1)	1 (50,0)
Tricomonas	1 (7,7)	0
HV	1 (7,7)	0
VIH –	13 (100,0)	0
VIH + previo	0	2 (100,0)
VIH + diagnosticado con motivo de la infección gonocócica	0	0
Parejas en los últimos 12 meses	>55	>25
Lugar donde fueron atendidos		
Consulta especializada de ITS	12 (92,3)	2 (100,0)
Urgencias Tocología-Ginecología	1 (7,7)	0
Centros de Salud	0	0

**Tabla 21.** Principales características de los pacientes con infección gonocócica que ejercen prostitución.



**Figura 16.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según lugar de origen y situaciones frente a la pareja sexual.

En dos casos se declaró situación de riesgo con pareja estable VIH positivo (0,6%), se trata de dos varones de 36 y 24 años, de España y de Ecuador respectivamente, y con diagnóstico de VIH previo a este episodio de gonorrea.

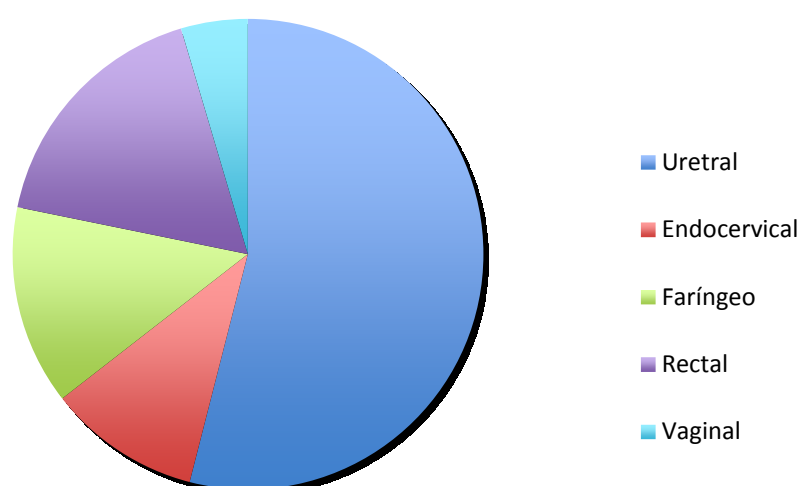
El número aproximado de parejas en los últimos 12 meses según la orientación sexual y el sexo se muestra en la tabla 22. El 22% de los diagnósticos de infección gonocócica habían tenido más de 10 parejas en el último año, observándose diferencias estadísticamente significativas en el grupo de HSH respecto del resto (34,6% frente a 8,3% y 21,2%)( $p < 0,01$ ).

Nº aproximado de parejas en los últimos 12 meses	HSB (133)	Hombres heterosexuales (108)	Mujeres (66)	Hombres (243)	Total (309)
1	10 (7,5)	17 (15,7)	27 (41,0)	27 (11,1)	54 (17,5)
2-5	44 (33,1)	57 (52,8)	21 (31,8)	101 (41,6)	122 (39,5)
6-10	25 (18,8)	19 (17,6)	1 (1,5)	44 (18,1)	45 (14,5)
Más de 10	46 (34,6)	9 (8,3)	14 (21,2)	55 (22,6)	69 (22,3)
No consta información	8 (6,0)	6 (5,6)	3 (4,5)	16 (6,6)	19 (6,2)

**Tabla 22.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según el número aproximado de parejas sexuales en los últimos 12 meses.

## 4.2 Análisis microbiológico

En el período comprendido entre enero del año 2011 y diciembre del año 2013, se estudiaron un total de 371 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en diferentes muestras clínicas. Se aislaron 157 cepas en el año 2011, 116 en el año 2012 y 98 en el año 2013. En cuanto a la localización de las muestras, 198 cepas (53,4%) se aislaron en exudados uretrales, 67 cepas (18,1%) en muestras rectales, 51 (13,7%) en frotis faríngeos, 44 (11,8%) en endocervicales y 12 (3,2%) en exudados vaginales.



**Figura 17.** Aislamientos de infección gonocócica según localización de la muestra.

Con el objetivo de realizar un diagnóstico presuntivo, se realizó un frotis de las muestras uretrales, endocervicales y vaginales, directamente sobre un portaobjetos para realizar una tinción de Gram y ser observada posteriormente al microscopio. Los resultados de la observación de la tinción de Gram se muestran en la tabla 23. En el 53,4% (n=232) de las muestras en las que se realizó la tinción de Gram directa sobre el frotis de la muestra, se observaron leucocitos polimorfonucleares y diplococos gram negativos intraleucocitarios.

Observación Tinción Gram n (%)	No realizado	No se observan LPMN	LPMNv	LPMNv y DCGNI	Aislamientos totales	
Uretral	Total	16 (8)	9 (4,5)	55 (27,5)	120 (60,0)	200 (100)
	Hombres	11 (5,7)	9 (4,7)	55 (28,4)	118 (61,2)	193 (100)
	Mujeres	5 (71,4)	0	0	2 (28,6)	7 (100)
Endocervical		5 (12,8)	10 (25,6)	23 (59,0)	1 (2,6)	39 (100)
Vaginal		3 (17,7)	5 (29,4)	6 (35,2)	3 (17,7)	17 (100)

**Tabla 23.** Distribución de los diagnósticos de infección gonocócica según la muestra en la que fueron aisladas y la observación microscópica de la tinción de Gram; LPMN: leucocitos polimorfonucleares; LPMNv: leucocitos polimorfonucleares valorables; DCGNI: diplococos gram negativos intraleucocitarios.

#### 4.2.1 Sensibilidad antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad antimicrobiana de las 371 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas, se llevó a cabo utilizando diferentes métodos. Mediante el método de difusión en agar se realizó el estudio de sensibilidad a penicilina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino, espectinomina, tetraciclina, azitromicina, eritromicina, cefepime, cefuroxima y gentamicina; mediante el método de dilución en agar se determinó la sensibilidad antimicrobiana para cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino y gentamicina; por último, se realizó la determinación de sensibilidad antimicrobiana por el método de E-test en aquellas cepas cuyo resultado por el método de difusión en agar disco-placa se interpretó como sensibilidad intermedia o resistencia a azitromicina.

#### 4.2.1.1 Método de difusión en agar disco-placa

Los porcentajes de sensibilidad antimicrobiana observados en las 371 cepas de *N. gonorrhoeae* estudiadas mediante el método de difusión en agar se muestran en la tabla 24.

El 98,9% de las cepas estudiadas presentaron sensibilidad intermedia o resistencia a penicilina, de las cuales el 8,7% (32 cepas) lo fueron por acción de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica, y de esas cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa plasmídica el 53,1% (17 cepas) mostraron un diámetro de halo de inhibición  $\leq 19$  mm, mientras que el resto mostraron un rango de diámetro de halo de inhibición de entre 20-24 mm.

El total de cepas estudiadas fueron sensibles a cefixima y ceftriaxona mediante la técnica de difusión en disco-placa.

Por lo que refiere a ciprofloxacino, el 53,9% de las cepas fueron resistentes y 45,8% fueron sensibles.

Antibiótico	Difusión en agar disco-placa, N (%)		
	S	I	R
Penicilina	4 (1,1)	302 (81,4)	65 (17,5)
Cefixima	371 (100,0)	-	-
Ceftriaxona	371 (100,0)	-	-
Ciprofloxacino	167 (45,0)	16 (4,3)	188 (50,7)
Espectinomicina	370 (99,7)	1 (0,3)	-
Tetraciclina	135 (36,4)	152 (41,0)	84 (22,6)
Azitromicina	352 (94,8)	8 (2,2)	11 (3,0)
Eritromicina	307 (82,7)	51 (13,7)	13 (3,5)
Cefepima	350 (94,3)	-	21 (5,7)
Cefuroxima	290 (78,2)	32 (8,6)	49 (13,2)

**Tabla 24.** Sensibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas mediante el método de difusión en agar disco-placa; I: sensibilidad intermedia; R: resistente; S: sensible

Fueron sensibles a espectinomicina el 99,7% de los gonococos estudiados, aislándose una única cepa con sensibilidad intermedia, mostrando un halo de inhibición de 16 mm.

El 36,4% de las cepas fueron sensibles a tetraciclina presentando el resto de los aislamientos sensibilidad intermedia o resistencia.

Un 5,2% de los aislamientos presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a azitromicina. El 3% de los aislamientos fueron resistentes a azitromicina, 2 aislamientos pertenecientes al mismo paciente no presentaron halo de inhibición (0 mm de diámetro), un tercer aislamiento presentó 18 mm de halo y el resto 22 mm. Por otro lado, se observó una gran correlación ( $r=0.813$ ;  $p<0,05$ ) entre los resultados del diámetro de halo de inhibición de azitromicina y eritromicina, presentando azitromicina una mayor actividad in vitro que eritromicina con un porcentaje de variabilidad del 66,1% (tabla 25).

Antibiótico	Rango	Media	Mediana	Moda
Eritromicina	0- 50	31	30	30
Azitromicina	0-50	34	36	36

**Tabla 25.** mm de diámetro del halo de inhibición para eritromicina y azitromicina por el método de difusión en agar disco-placa.

En el caso de cefepima y cefuroxima, tan solo un 7,5% de los aislamientos fueron resistentes a cefepima y un 21,8% fueron resistentes a cefuroxima. Todas las cepas resistentes a cefepima mostraron sensibilidad disminuida o resistencia a cefuroxima.

En el caso de gentamicina, no existen puntos de corte para los halos de inhibición definidos por CLSI o EUCAST. Los resultados de los mm de diámetro del halo de inhibición obtenidos por el método de difusión en agar se muestran en la tabla 26.

Antibiótico	Rango	Media	Mediana	Moda
Gentamicina	16-36	22	20	20

**Tabla 26.** Resultados de los diámetros de halo de inhibición (mm) para gentamicina por el método de difusión en agar disco-placa.

Los porcentajes de resistencia obtenidos para algunos antimicrobianos así como el porcentaje de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas a lo largo del período de estudio se muestran en la tabla 27. En general la resistencia a penicilina muestra algunas fluctuaciones, observándose un decrecimiento en el número de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas a lo largo de los años. La resistencia a ciprofloxacino ha ido en descenso y la resistencia a azitromicina se ha ido incrementando significativamente.

Antimicrobiano	Número (%) de aislados resistentes			
	2011	2012	2013	Total
Penicilina	36 (23,1)	10 (8,6)	16 (16,4)	62 (16,7)
Cefixima y Ceftriaxona	0	0	0	0
Ciprofloxacino	91 (58,3)	60 (51,7)	37 (37,7)	188 (50,7)
Espectinomicina	0	0	0	0
Azitromicina	2 (1,3)	4 (3,5)	5 (5,1)	11 (3,0)
Producción de $\beta$ -lactamasas	17 (10,9)	11 (9,5)	4 (4,1)	32 (8,7)
N cepas totales	156 (100,0)	116 (100,0)	98 (100,0)	371 (100,0)

**Tabla 27.** Porcentaje de resistencia y producción de  $\beta$ -lactamasas en aislamientos de *N. gonorrhoeae* durante el período 2011-2013, según el método de difusión en agar.

A excepción de eritromicina, cefuroxima y cefepima, que actualmente no constituyen una alternativa al tratamiento de la infección gonocócica, analizando el resto de antimicrobianos, observamos que, de las 371 cepas estudiadas ninguna fue sensible a los siete antimicrobianos utilizados (penicilina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino, espectinomicina, tetraciclina y azitromicina). Detectamos 82 cepas

(22,1%) resistentes o con sensibilidad intermedia sólo a penicilina o a ciprofloxacino, 132 cepas (35,6%) resistentes a dos antimicrobianos, 157 cepas (42,3%) restantes pueden considerarse multirresistentes, ya que fueron resistentes a 3 o más antimicrobianos (364). Diez cepas (2,7%) fueron resistentes a más de 3 antimicrobianos: una de las cepas fue resistente a penicilina, ciprofloxacino, tetraciclina y con sensibilidad intermedia a espectinomicina y 9 cepas fueron resistentes o con sensibilidad intermedia a penicilina, ciprofloxacino, tetraciclina y azitromicina. Aunque si consideramos la definición de MR descrita por Unemo *et al.* (53), en nuestro estudio tan sólo encontraríamos una cepa MR (0,3%), la cepa resistente a penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino y espectinomicina.

Nº de antibióticos con SI o R (%)	Antibióticos con SI o R	N	%
1 (22,1)	Penicilina	78	21,0
	Ciprofloxacino	4	1,1
2 (35,6)	Penicilina y Tetraciclina	79	21,3
	Penicilina y Ciprofloxacino	51	13,7
	Penicilina y Azitromicina	2	0,5
3 (39,6)	Penicilina, Tetraciclina y Ciprofloxacino	139	37,5
	Penicilina, Tetraciclina y Azitromicina	8	2,2
>3 (2,7)	Penicilina, Tetraciclina, Ciprofloxacino y Espectinomicina	1	0,3
	Penicilina, Tetraciclina, Ciprofloxacino y Azitromicina	9	2,4
Total cepas estudiadas		371	100,0

**Tabla 28.** Distribución de cepas de *N. gonorrhoeae* con sensibilidad intermedia o resistencia a los distintos antimicrobianos.

Dos de estas cepas multirresistentes, presentaron sensibilidad intermedia a penicilina y resistencia a ciprofloxacino, tetraciclina y azitromicina (ausencia total de halo de inhibición tanto para azitromicina como para eritromicina). Estas cepas se aislaron en las muestras endocervical y vaginal de una paciente que fue atendida en la consulta especializada de ITS perteneciente al Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Basurto. Se trata de una chica española de 22 años que, cinco días antes de acudir a la consulta de ITS, había sido atendida por su médico de atención primaria con las siguientes manifestaciones clínicas: leucorrea de 10 días de evolución y dolor en región supra-púbica. Su médico de atención primaria le tomó una



muestra vaginal que fue remitida al laboratorio de su hospital de referencia (distinto al Hospital Universitario Basurto) con el resultado de *G. vaginalis* y *N. gonorrhoeae* sensible a cefalosporinas y resistente a quinolonas, sin estudiar la sensibilidad a más antimicrobianos. En la historia clínica de la paciente figuraba que era alérgica a antimicrobianos betalactámicos, por lo que ante esta situación, su médico decidió remitirla a la consulta de ITS sin pautarle ningún tratamiento antibiótico. En la primera visita en la consulta de ITS (día 1) la paciente presentaba los mismos síntomas, y en la exploración se observó cervicitis sin mostrar adenopatías ni faringitis. Se elaboró una historia sexual completa y se volvieron a tomar muestras, en esta ocasión vaginal, endocervical y faríngea. La paciente no presentaba antecedentes de ITS y afirmaba que sus contactos sexuales no se encontraban en el país (3 en el último año), por lo que se le remitió la información oportuna para aportar a los contactos. Por su posible alergia a betalactámicos se decidió tratamiento con azitromicina en dosis única de 2 g y metronidazol, por el aislamiento de *G. vaginalis*. Curiosamente, esta vez en el laboratorio de Microbiología no se aisló *N. gonorrhoeae* en ninguna localización aunque si se siguió aislando *G. vaginalis* en el cultivo vaginal; además se realizó PCR para *C. trachomatis* y cultivo de *Trichomonas vaginalis* con resultado negativo. La paciente afirmó no haber recibido ningún tratamiento antibiótico previo a este episodio. Dos semanas más tarde vuelve a ser citada en la consulta de ITS (día 14) para realizar control post-tratamiento. La paciente presentaba una leve ectopia cervical. Se le vuelven a extraer muestras genitales y faríngeas y son remitidas al laboratorio de Microbiología. Esta vez no se pauta tratamiento en espera al resultado del cultivo. La paciente aseguraba que desde su última visita a la consulta no había tenido relaciones sexuales. En esta ocasión se aisló *N. gonorrhoeae* tanto en la muestra vaginal como endocervical, el resto de cultivos fueron negativos. El resultado del antibiograma mostró sensibilidad intermedia a penicilina, resistencia a ciprofloxacino, tetraciclina y azitromicina, sensibilidad a espectinomicina y una CMI de 8 a gentamicina. Ante esta situación y por la dificultad de obtener espectinomicina en nuestro país, se decidió tratar alternativamente con gentamicina 280 mg vía intramuscular en dosis única (día 17). En el siguiente control (día 24) la paciente se encontraba totalmente asintomática. En esta ocasión los resultados de los cultivos en muestras genitales fueron totalmente negativos.

#### 4.2.1.2 Método dilución en agar

Al igual que en el método de difusión en agar, todas las cepas fueron sensibles a cefixima y ceftriaxona por el método de dilución en agar. El total de las cepas estudiadas presentaron una CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> a cefixima de 0,002 y 0,008 µg/ml, mientras que las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> a ceftriaxona fueron de 0,008 y 0,03 µg/ml, respectivamente (tabla 29).

El porcentaje de cepas con sensibilidad disminuida o resistencia a ciprofloxacino fue de un 54,5%. Las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> para ciprofloxacino fue de 1 y 2 µg/ml respectivamente (tabla 29).

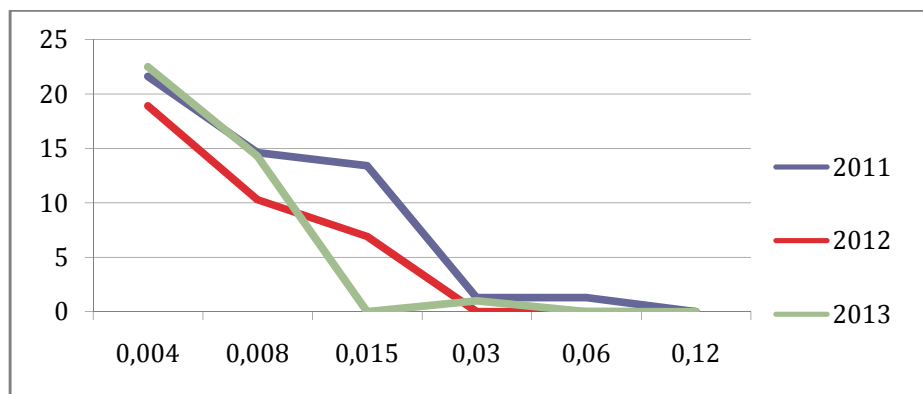
Antibiótico	Dilución en agar, N(%)		
	S	I	R
Cefixima	371 (100)	-	-
Ceftriaxona	371 (100)	-	-
Ciprofloxacino	170 (45,8)	1 (0,3)	200 (53,9)

**Tabla 29.** Sensibilidad antimicrobiana de las cepas estudiadas mediante el método de dilución en agar; I: sensibilidad intermedia; R: resistente; S: sensible

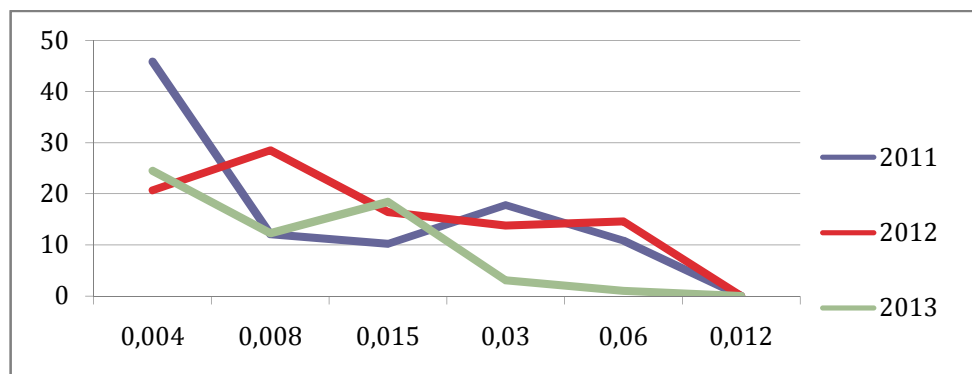
Los datos de prevalencia de gonorrea según la CMI obtenida para cefixima, ceftriaxona y ciprofloxacino a lo largo de los años muestran un ligero descenso de las CMIs durante el periodo de estudio (figuras 18, 19, 20). Destacar que en el año 2012 el 15% de las cepas de *N. gonorrhoeae* mostraron una CMI de 0,06 µg/ml para ceftriaxona. Si analizamos las CMI<sub>50</sub> de cefixima y ceftriaxona a lo largo de los años (tabla 30) observamos diferencias significativas en la disminución de la CMI<sub>50</sub> tanto de cefixima ( $p=0,013$ ) como de ceftriaxona ( $p=0,002$ ), y que ceftriaxona presenta unas CMI<sub>90</sub> muy elevadas en los primeros años del estudio (CMI<sub>90</sub> = 0,06 µg/ml). En el caso de ciprofloxacino se observa un descenso aún más pronunciado a lo largo de los años, sobre todo en lo referente a la CMI<sub>50</sub> ( $p<0,001$ ).

Antibiótico	2011		2012		2013		Total	
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Cefixima	0,004	0,015	0,002	0,008	0,002	0,008	0,002	0,008
Ceftriaxona	0,008	0,06	0,008	0,06	0,004	0,015	0,008	0,03
Ciprofloxacino	4	8	0,5	1	0,008	2	1	2
Gentamicina	8	8	4	8	8	8	8	8

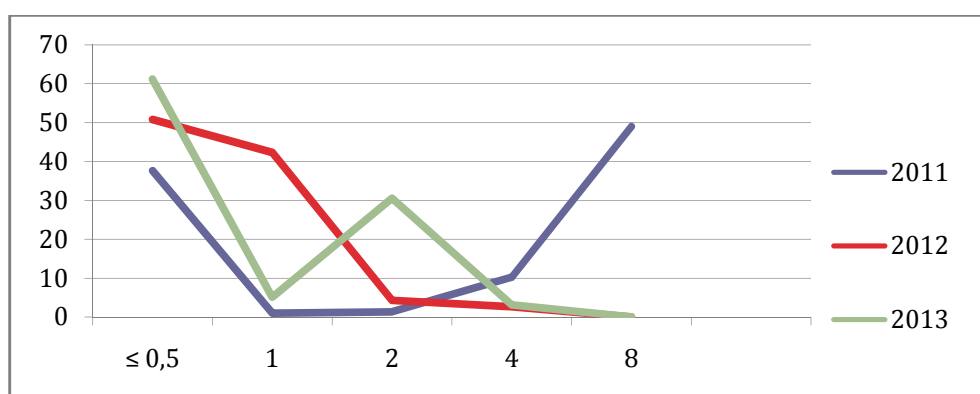
**Tabla 30.** CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de cefixima, ceftriaxona y ciprofloxacino obtenidas por el método de dilución en agar a lo largo de los años.



**Figura 18.** Porcentaje de aislamientos de *N. gonorrhoeae* a lo largo de los años según la CMI a cefixima obtenida mediante el método de dilución en agar.



**Figura 19.** Porcentaje de aislamientos de *N. gonorrhoeae* a lo largo de los años según la CMI a ceftriaxona obtenida mediante el método de dilución en agar.



**Figura 20.** Porcentaje de aislamientos de *N. gonorrhoeae* a lo largo de los años según la CMI a ciprofloxacino obtenida mediante el método de dilución en agar.

En el caso de gentamicina, el rango de CMI por el método de dilución en agar fue de 2-16  $\mu\text{g/ml}$  (tabla 31). Podemos observar que cerca del 60% de las cepas muestran una CMI de 8  $\mu\text{g/ml}$  y el 94,1% muestran una CMI entre 4 y 8  $\mu\text{g/ml}$ . La CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de gentamicina es de 8  $\mu\text{g/ml}$  y prácticamente no ha variado a lo largo de los años del estudio (tabla 30).

CMI (mg/l) gentamicina	2	4	8	16	Aislamientos totales
Nº (%) aislamientos	15 (4,0)	127 (34,3)	222 (59,8)	7 (1,9)	371 (100,0)

**Tabla 31.** Número de aislamientos de *N. gonorrhoeae* según la CMI de gentamicina obtenida por el método de dilución en agar.

Hasta el momento las guías no establecen los puntos de corte para la interpretación de las CMIs de gentamicina, aunque algunos estudios aplican criterios basados en la comparación de la curación clínica con la CMI (135), definiendo como sensibles las cepas con CMI  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ , sensibilidad intermedia las cepas con CMI entre 8- 16  $\mu\text{g/ml}$  y resistentes las cepas con CMI  $>32 \mu\text{g/ml}$ . Según este criterio, en este estudio no se aísla ninguna cepa resistente a gentamicina.

#### 4.2.1.3 Método E-test

La correlación entre la interpretación de los resultados de sensibilidad a azitromicina obtenidos por difusión en agar disco-placa y E-test fue del 100 %. Todas las cepas con sensibilidad disminuida a azitromicina (2,2%) (tabla 24) según el método de difusión en agar disco-placa (24- 26 mm de halo) presentaron una CMI de 0,5 µg/ml mediante el método de E-test y las cepas resistentes mostraron distintas CMIs. Dos aislamientos resistentes a azitromicina por el método de difusión en disco-placa con una ausencia de halo de inhibición total (0 mm de halo) presentaron una CMI de 96 µg/ml por el método de E-test. Estos aislamientos son los pertenecientes a las dos muestras positivas del caso clínico descrito anteriormente.

CMI (µg/ml)azitromicina	0,75	1	1,5	2	4	96	Aislamientos resistentes
N° aislamientos	2	1	3	1	1	2	11

**Tabla 32.** Número de aislamientos de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina según la CMI obtenida por el método de E-test.

#### 4.2.1.4 Comparación entre los métodos de difusión en agar disco-placa y dilución en agar

Para cefixima y ceftriaxona, la concordancia entre los métodos de difusión y dilución en agar fue del 100%, todas las cepas fueron sensibles por ambos métodos.

En el caso de ciprofloxacino se aplicó la prueba estadística kappa para determinar la concordancia entre ambos métodos (tabla 33). Este análisis mostró un acuerdo “casi perfecto” entre los dos métodos ( $\kappa=0,922$ ), según lo descrito por Landis JR, *et al.* (177). El porcentaje de acuerdo entre ambos métodos fue de 95,96 %.

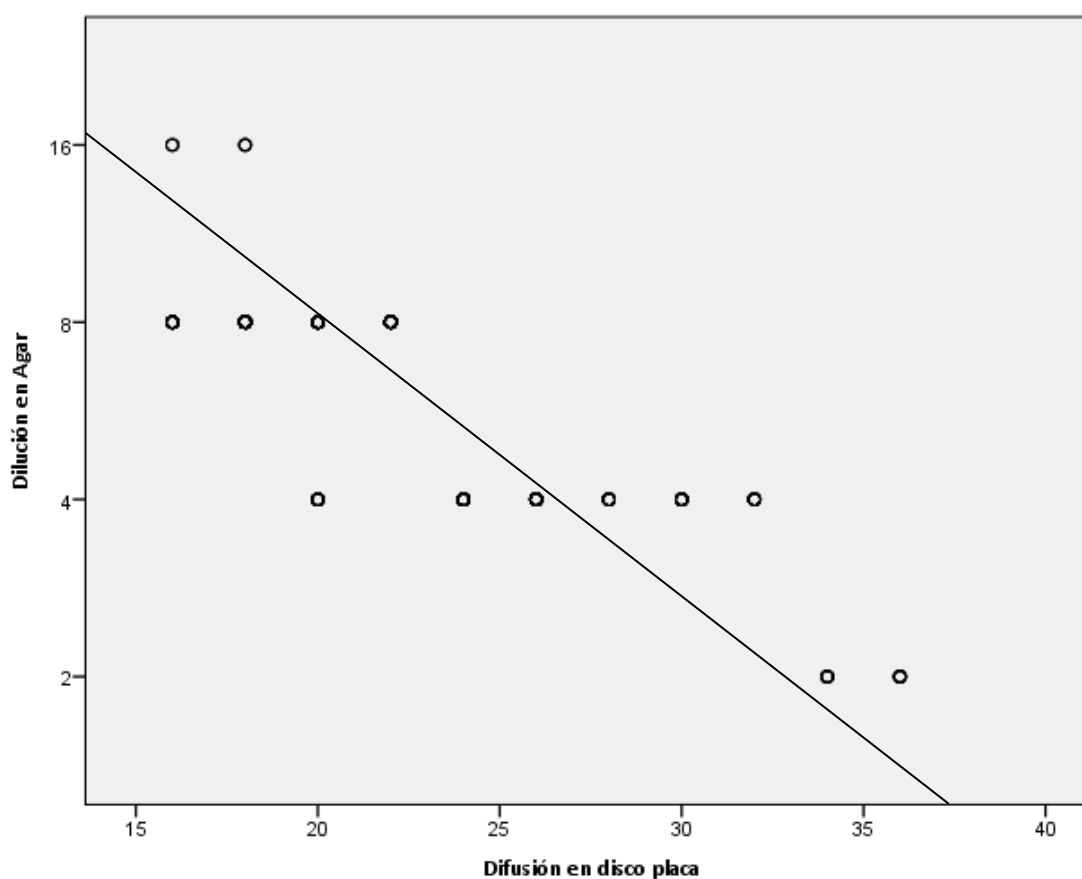
Dilución en agar (CMI µg/ml) N (%)	Difusión en agar disco-placa N (%)			Total
	S	I	R	
S	167 (45,0)	3 (0,8)	0	170 (45,8)
I	0	1 (0,3)	0	1 (0,3)
R	0	12 (3,2)	188 (50,7)	200 (54,0)
<b>Total</b>	167 (45,0)	16 (4,3)	188 (50,7)	371 (100,0)

**Tabla 33.** Comparación de la interpretación de los valores de CMI de ciprofloxacino en los aislados de *N. gonorrhoeae* obtenidos por el método de dilución en agar con los resultados obtenidos por el método de difusión en agar.

Se observaron resultados discrepantes en 15 cepas. Mientras 3 cepas fueron interpretadas como sensibles por el método de dilución en agar por difusión en disco mostraron sensibilidad intermedia y, 12 cepas resistentes por el método de dilución en agar se interpretaron con sensibilidad intermedia por difusión en agar.

En el caso de gentamicina se observó una correlación moderada y positiva entre los resultados obtenidos por el método de difusión en agar y dilución en agar ( $r=0,769$ ,  $p\leq 0,05$ ) (figura 21).

Basándonos en los criterios de sensibilidad publicados por el estudio de Brown LB *et al.* (135), según los cuales se define como cepa de *N. gonorrhoeae* sensible a gentamicina aquella cuya CMI sea  $\leq 4$  µg/ml, cepa con sensibilidad intermedia la que presenta una CMI entre 8 y 16 µg/ml y cepa resistente  $\geq 32$  µg/ml, y aplicando una recta de regresión lineal entre los resultados obtenidos por ambos métodos, estimamos como cepas resistentes por el método de difusión en disco aquellas que presentan un diámetro de halo de inhibición  $< 18$ mm, con sensibilidad intermedia las cepas entre 18-28mm y sensibles las cepas  $> 28$  mm.



**Figura 21.** Diagrama de dispersión donde se correlacionan los resultados de diámetro de halo de inhibición por el método de difusión en agar con las CMI obtenidas por dilución en agar ( $\mu\text{g/ml}$ ) para gentamicina.

#### 4.2.2 Caracterización de las cepas

La tipificación molecular mediante NG-MAST se llevó a cabo sobre todos los aislamientos de los años 2012 ( $n=115$ ) y 2013 ( $n=97$ ), excepto 2 cepas cuya secuencia no consta en la base de datos on-line de NG-MAST (<http://www.ng-mast.net/>), con lo cual no se determinó su secuenciotipo (ST), obteniendo el ST de un total de 212 aislamientos. Estos aislamientos pertenecen a 178 pacientes ya que en 18 pacientes se aisló la misma cepa en distintas localizaciones y en un paciente se declaró un caso de reinfección ya que, tras la obtención de una muestra control negativa, se volvió a aislar la misma cepa en una muestra realizada un mes y medio después del primer aislamiento.

La caracterización molecular de los 212 aislamientos descubrió 50 STs diferentes, representando 42 alelos *porB* y 26 alelos *tbpB*. Veinte STs fueron

representados por dos o más aislados y 30 STs fueron representados por un solo aislado. Los STs más prevalentes (representados por 8 aislados o más) fueron el ST210 (25 aislados, 11,7 %), seguido del ST292 (23 aislados, 10,7 %), ST2400, ST2992 y ST2018 (14 aislados, 6,5%), ST5533 (12 aislados, 5,6%), ST5793 (11 aislados, 5,1 %), ST1407 (10 aislados, 4,7%) y ST387 (8 aislados, 3,1%). Estas cepas más prevalentes mostraron distintos alelos *porB*, pero algunos STs comparten el mismo alelo *tbpB*: los STs 210 y 292, 1407 y 5533, 2018 y 2992 comparten, respectivamente, los alelos *tbpB* 4, 110 y 29.

Las cepas resistentes o con sensibilidad intermedia a azitromicina pertenecen a 6 STs diferentes. Los STs más prevalentes de estas cepas son el ST21 y el ST5049 con 3 aislados resistentes o con sensibilidad intermedia a azitromicina, seguidos del 4120 con dos aislados y los STs 4805, 4812, 437 con un aislado cada uno. Los dos aislados del ST4120 provienen de dos muestras de la misma paciente (vaginal y endocervical) y corresponden al caso clínico descrito anteriormente, cuya CMI de azitromicina fue de 96 µg/ml.

En algunos aislados se observaron CMIs para ceftriaxona muy elevados, CMIs de 0,06 y 0,03 µg/ml, cercanos a los puntos de corte correspondientes a sensibilidad disminuida según los criterios establecidos por EUCAST (CMI > 0,12 µg/ml). Los STs asignados a los aislados con CMI de 0,06 µg/ml para ceftriaxona son los ST2018 con 6 aislados, ST5533 con 5 aislados, ST1407 con 4 aislados, ST7245 con 2 aislados y los STs 4812 y 292 con 1 aislado (n= 19 aislados). El ST4812 mostró además resistencia a azitromicina. Y los STs asignados a los aislados con CMI de 0,03 µg/ml para ceftriaxona son los ST292 con 4 aislados (uno de ellos con una CMI de 0,03 µg/ml también a cefixima), ST5533 con 3 aislados, ST1407 y ST2018 con 2 aislados y los STs 437, 2142, 3808, 5793, 7245, 8419 y 8516 con un aislado (n= 18 aislados).

En las tablas 35 y 36 se muestra la distribución de STs de *N. gonorrhoeae* aisladas durante los años 2012 y 2013 respectivamente, junto con las sensibilidades a ceftriaxona, cefixima y azitromicina y los alelos de los genes *porB* y *tbpB*.



ST	Nº aislados (%)	Sensibilidad antimicrobiana			Alelo	
		Ceftriaxona	Cefixima	Azitromicina	porB	tbpB
21	2 (1,7)	S	S	S	14	33
147	1 (0,9)	S	S	S	53	21
210	5 (4,3)	S	S	S	59	4
292	18 (15,5)	S	S	S	28	4
437	4 (3,4)	S	S	S	14	4
887	1 (0,9)	S	S	S	997	137
897	1 (0,9)	S	S	S	609	29
1407	8 (6,9)	s (2) S(6)	S	S	908	110
1737	1 (0,9)	S	S	S	1050	98
1929	1 (0,9)	S	S	S	1223	29
2018	14 (12,1)	s (7) S (9)	S	S	182	29
2142	3 (2,6)	S	S	S	997	522
2487	1 (0,9)	S	S	S	1534	241
2992	6 (5,2)	S	S	S	1808	29
3181	1 (0,9)	S	S	S	1923	602
3307	1 (0,9)	S	S	S	30	743
3808	1 (0,9)	S	S	S	28	110
4210	1 (0,9)	S	S	S	2586	883
4444	1 (0,9)	S	S	S	262	29
4528	2 (1,7)	S	S	S	1873	24
4805	1 (0,9)	S	S	R (1)	30	1004
4812	1 (0,9)	s (1)	S	R (1)	905	110
5004	2 (1,7)	S	S	S	30	263
5049	6 (5,2)	S	S	R (2) I (1)	3059	29
5119	1 (0,9)	S	S	S	3104	29
5533	12 (10,3)	s (8) S (4)	S	S	3345	110
5793	11 (9,5)	S	S	S	55	39
6206	1 (0,9)	S	S	S	263	1261
7245	4 (3,4)	s(2) S (2)	S	S	4330	110
8419	1 (0,9)	S	S	S	28	563
8516	1 (0,9)	S	S	S	4991	507
8517	1 (0,9)	S	S	S	1142	1531
No consta	1 (0,9)	S	S	S	-	-
Total	116 (100)	-	-	-	-	-

**Tabla 34.** Distribución de los ST en las cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas durante el año 2012; S: cepas sensibles con CMI  $< 0,03 \mu\text{g/ml}$ ; s: cepas sensibles con CMI =  $0,03$  o  $0,06 \mu\text{g/ml}$ .

ST	Nº aislados (%)	Sensibilidad antimicrobiana			Alelo	
		Ceftriaxona	Cefixima	Azitromicina	porB	tbpB
21	3 (3,1)	S	S	R (2) Y I (1)	14	33
210	20 (20,4)	S	S	S	59	4
292	5 (5,1)	s (1) S(4)	s (1) S(4)	S	28	4
387	8 (8,2)	S	S	S	266	118
396	1 (1)	S	S	S	28	123
437	1 (1)	S	S	I	14	4
730	1 (1)	S	S	S	59	29
1407	2 (2)	s (2)	S	S	908	110
1501	1 (1)	S	S	S	961	383
2212	1 (1)	S	S	S	1388	110
2400	14 (14,3)	S	S	S	1489	563
2487	3 (3,1)	S	S	S	1534	241
2992	8 (8,2)	S	S	S	1808	29
2997	1 (1)	S	S	S	866	21
3149	1 (1)	S	S	S	1903	110
3674	1 (1)	S	S	S	1142	4
4120	2 (2)	S	S	R (2)	2513	110
4444	1 (1)	S	S	S	262	29
4751	1 (1)	S	S	S	2866	29
5016	1 (1)	S	S	S	3040	29
5118	1 (1)	S	S	S	3040	32
5624	2 (2)	S	S	S	90	953
6146	1 (1)	S	S	S	3643	110
7228	1 (1)	S	S	S	65	1103
7245	3 (3,1)	S	S	S	4330	110
7289	2 (2)	S	S	S	1259	33
8058	1 (1)	S	S	S	90	884
8361	1 (1)	S	S	S	878	33
8511	1 (1)	S	S	S	5056	1553
8517	6 (6,1)	S	S	S	1142	1531
9559	2 (2)	S	S	S	5671	4
No consta	1 (1)	S	S	R	-	-
Total	98 (100)	-	-	-	-	-

**Tabla 35.** Distribución de los ST en las cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas durante el año 2013; S: cepas sensibles con CMI < 0,03 µg/ml; s: cepas sensibles con CMI = 0,03 o 0,06 µg/ml

En la tabla 36 se muestran los perfiles de sensibilidad antibiótica así como la moda y el rango de las CMIs obtenidas para gentamicina, cefixima y ceftriaxona, en los STs de *N. gonorrhoeae* que mostraron sensibilidad intermedia o resistencia a azitromicina y/o CMI mayor o igual a 0,03 µg/ml para cefixima y/o ceftriaxona. La cepa multirresistente con ST4120 es la correspondiente al caso clínico presentado.

Las características sociodemográficas así como la orientación sexual y los principales factores de riesgo de los pacientes en los que se aisló alguno de los STs más frecuentes se muestran en la tabla 37.

ST	N	BL	Sensibilidad antimicrobiana (n aislados para cada categoría)						Moda CMI µg/ ml (rango)	
			P	CIP	AZI	TE	ESP	GEN	CFM	CRO
1407	10	N	R (3) I(6) S (1)	R	S	I (6) S (4)	S	8 (2-8)	0,008 (0,002-0,008)	0,06 (0,015-0,06)
2018	14	N	I	R	S	I (10) S (4)	S	4 (2-8)	0,004 (0,001-0,004)	0,06 (0,002-0,06)
4805	1	N	I	S	R	I	S	4	0,001	0,008
4812	1	N	I	R	R	R	S	4	0,008	0,06
5049	6	N	I	R(1) S(5)	R(2) I(1) S(3)	R(1) I(2) S(3)	S	4 (4-8)	0,001 (0,001-0,002)	0,008 (0,004-0,015)
5533	12	N	I	R	S	R(2) I(4) S(6)	S	4 (2-8)	0,008 (0,004-0,015)	0,06 (0,004-0,06)
7245	7	N	R(1) I(6)	R	S	R(1) I(3) S(4)	S	4 (2-8)	0,008 (0,008-0,15)	0,06 (0,004-0,06)
292	23	N	I	R(11) S(12)	S	R(2) I(6) S(15)	S	4 (4-16)	0,001 (0,001-0,03)	0,008 (0,002-0,06)
437	5	N	I	R(4) S(1)	I (1) S(4)	I(4) S(1)	S	8 (4-8)	0,004 (0,002-0,008)	0,015 (0,008-0,03)
4120	2	N	I	R	R	R	S	8	0,008	0,015

**Tabla 36.** Sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *N. gonorrhoeae* con aislados que muestran sensibilidad intermedia o resistentes a azitromicina y/o CMI  $\geq 0,03$  µg/ml para cefixima o ceftriaxona; N= número de aislados; BL= producción de beta-lactamasas; P= penicilina; CIP= ciprofloxacino; AZI= azitromicina; TE= tetraciclina; ESP= espectinomina; GEN= gentamicina; CFM= cefixima; CRO= ceftriaxona

ST (n)	Edad media (rango)	Españoles (%)	H (%)	HSH (%)	Heterosexuales <sup>a</sup> (%)	Otras ITS (%)	VIH (%)	Prostitución <sup>b</sup> (%)	≥2 parejas sexuales <sup>c</sup> (%)
<b>210 (19)</b>	32 (19-53)	16 (84)	18 (95)	7 (37)	12 (63)	5 (26)	0	3 (16)	15 (79)
<b>292 (21)</b>	31 (22-51)	16 (76)	18 (86)	14 (67)	7 (33)	5 (24)	5 (24)	0	18 (86)
<b>2400 (12)</b>	30 (19-43)	9 (75)	12 (100)	11 (92)	1 (8)	3 (25)	2 (17)	0	12 (100)
<b>2992 (11)</b>	41 (30-53)	10 (91)	11 (100)	9 (82)	2 (18)	6 (55)	2 (18)	0	9 (82)
<b>2018 (11)</b>	39 (22-51)	6 (55)	6 (55)	0	11 (100)	8 (73)	4 (36)	1 (9)	7 (64)
<b>5533 (9)</b>	34 (20-51)	5 (56)	6 (67)	2 (22)	7 (78)	3 (33)	1 (11)	1 (11)	7 (78)
<b>5793 (5)</b>	26 (19-37)	2 (40)	4 (80)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	2 (40)	0	5 (100)
<b>1407 (9)</b>	31 (20-42)	6 (67)	7 (78)	1 (11)	8 (89)	1 (11)	0	1 (11)	7 (78)
<b>387 (7)</b>	25 (18-31)	6 (86)	3 (43)	0	7 (100)	5 (71)	0	0	3 (43)

**Tabla 37.** Características de los pacientes infectados con los STs de *N. gonorrhoeae* más prevalentes; Edad media(rango en años); H (%): número de hombres y porcentaje; Heterosexuales: número de heterosexuales de ambos sexos; a: todas las mujeres están incluidas en el grupo de pacientes heterosexuales; b: pacientes que ejercen la prostitución o están en contacto con la prostitución; c: pacientes con 2 o más parejas sexuales en el último año

## 5. DISCUSIÓN



## 5.1 Situación epidemiológica de la infección gonocócica

En muchos países desarrollados, tras la aparición de la pandemia del SIDA, las tasas de infección gonocócica disminuyeron, pero, desde mediados de los años 90, se ha observado un aumento sustancial de infección gonocócica en algunos de estos países, entre ellos Estados Unidos (178) y Reino Unido (179). En nuestro país este aumento se ha hecho notable a partir del año 2002 (9). Esta tendencia se ha relacionado con cambios en los comportamientos sexuales de mayor riesgo. Dichos cambios se han documentado especialmente en varones homosexuales (179-181) con el aumento de relaciones anales y orales no protegidas. Esto podría ser debido a diferentes factores, como son el impacto negativo del tratamiento antirretroviral de gran actividad en la prevención de las ITS, ya que ha disminuido la mortalidad por SIDA y ha contribuido a mejorar el bienestar físico de los pacientes que padecen la enfermedad, lo que facilita la actividad sexual de estos pacientes, a la vez que aumenta el desinterés por el riesgo de la transmisión del VIH. Otros factores son la ignorancia y las dificultades para mantener comportamientos sexuales seguros.

En nuestro estudio, en cambio, al analizar los datos de infección gonocócica durante el periodo 2011-2013 se observa un marcado descenso en la incidencia, cuyas tasas por 100.000 habitantes descendieron desde 38 en el año 2011 a 24 en el año 2013. Debiendo resaltar que durante este periodo no se han producido cambios en la actuación de nuestro sistema de trabajo que justifiquen esta tendencia.

A pesar de esto, las tasas de incidencia de infección gonocócica alcanzadas en el presente trabajo son las más altas documentadas en nuestro país (según el Centro Nacional de Epidemiología la tasa por 100.000 habitantes en el año 2011 es de 5,72) (9), estando también por encima de la tasa europea (tasa por 100.000 habitantes de 10,4) (8) y asemejándose a las tasas publicadas en Inglaterra (tasas por 100.000 habitantes de 40,1 en 2011)(179) que históricamente mantiene una de las tasas más altas de Europa (8). Aun así, seguimos encontrando tasas muy por debajo de las tasas informadas por el CDC en EEUU (tasa por 100.000 habitantes de 103,3 en 2011) (178). La alta tasa de incidencia encontrada puede deberse a que el área "Comarca Bilbao" cuenta con dos consultas de ITS altamente organizadas y experimentadas, las cuales

llevan a cabo la detección clínica de nuevos casos y el seguimiento de los pacientes y sus contactos sexuales. Estas consultas tienen un estrecho contacto con el laboratorio del Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección del Hospital Basurto donde se realizan las determinaciones microbiológicas, lo que implica que haya una excelente conexión entre los casos, las muestras y la detección microbiológica. Estos datos nos indicarían muy probablemente que la infección gonocócica está infradiagnosticada y/o infranotificada en muchas zonas del territorio nacional, como ya se apuntó en el estudio realizado por *Vall et al.* (182), donde se relaciona este hecho con la escasez de recursos destinados a las ITS en nuestro país.

Este estudio presenta una descripción de las características clínicas y epidemiológicas de los casos de gonorrea diagnosticados en el área sanitaria de Bilbao, así como las características de sensibilidad antimicrobiana y moleculares de las cepas de *N. gonorrhoeae* que los producen.

### **5.1.1 Características sociodemográficas de los pacientes con infección gonocócica**

Los resultados mostrados en este trabajo ayudarán a caracterizar los grupos de mayor riesgo de sufrir una infección gonocócica en el área de Bilbao, y muestran diferencias por sexo, vía de transmisión y país de origen lo cual podría ser tomado en consideración a la hora de implementar las medidas de control de la infección.

La gran mayoría de los nuevos diagnósticos de infección gonocócica se produjeron en HSH (43%), lo que hace evidente la representación de este colectivo entre los casos de gonorrea en el área de Bilbao, un resultado común con otros estudios realizados en entornos similares tanto en España (182,183) como en otras zonas de Europa (184). Por lo que todos los estudios atribuyen a este colectivo el incremento generalizado de la infección gonocócica en los últimos años. El grupo de edad más afectado fue el de 25-34 años con una edad media de 33 años, ligeramente superior a la expresada en otros estudios realizados en nuestro país (183,185,186), presentando las mujeres una edad media significativamente menor que los hombres. El 71% de los pacientes eran españoles y un alto porcentaje tenían estudios secundarios y superiores. Aunque una de las limitaciones que muestra el presente



trabajo es el elevado número de valores perdidos en la variable “Nivel de estudios” ya que en el 60% de los pacientes se desconoce esta información.

Según datos del Instituto Nacional de Estadística los principales países de procedencia de los inmigrantes en nuestro país, en orden de mayor a menor población, son Rumanía, Marruecos, Reino Unido, países latinoamericanos con Ecuador y Colombia a la cabeza, Italia y China. Estos datos se encuentran en consonancia con los resultados de este estudio donde los países de procedencia más frecuentes fueron Colombia, Marruecos, Paraguay y Ecuador. Esta población inmigrante es frecuentemente población con un bajo nivel adquisitivo que viene a nuestro país en busca de trabajo, sin estudios reglados o con un nivel de estudios primarios. No obstante, como ya hemos comentado, nos encontramos con una gran limitación a este respecto, ya que en el 74% de los inmigrantes se desconoce este dato. La gran representación de extranjeros entre los pacientes de sexo femenino en este estudio es consecuencia de la alta proporción de trabajadoras sexuales en este grupo de población (36,7% de las mujeres extranjeras son prostitutas) y a las facilidades de accesibilidad gratuita al sistema de control de ITS en nuestra área para este colectivo, resultando por tanto un dato esperable dado que es bien sabido que en España más del 90% de las mujeres que ejercen prostitución provienen de otros países (184). Así mismo, el porcentaje de hombres y mujeres que ejercen prostitución y provienen de otros países es muy elevado (87%), todos ellos latinoamericanos, predominantemente de Brasil y Colombia. Aun así, cabe señalar la baja frecuencia de infección gonocócica en mujeres que ejercen la prostitución encontrada en este estudio (20%) comparada con otros estudios realizados en España como el llevado a cabo por Díaz *et al.* (40,9%) (186).

En general, las mujeres que ejercen prostitución y son atendidas en centros especializados en ITS presentan unas frecuencias relativamente bajas de coinfecciones venéreas, incluido el VIH (184,186). Esto se podría deber, como ya se ha descrito en otros trabajos (187,188), a la mayor frecuencia en la utilización del preservativo con los clientes, al menos en el sexo vaginal, y al bajo nivel de prevalencia de VIH entre sus clientes. La gonorrea faríngea en este grupo de población fue muy común (54%), lo

que nos indica el bajo nivel de utilización del preservativo en las prácticas orales en relación al sexo vaginal. También se puede deber a la realización de protocolos de cribado realizados en las consultas especializadas en ITS que incluyen el frotis faríngeo, ya que, excepto una chica que acudió al Servicio de Urgencias con clínica de EIP, todas las pacientes fueron atendidas en estas consultas. No ocurre lo mismo en los varones que ejercen prostitución, mayoritariamente HSH (186), ya que presentan altas tasas de VIH y otras ITS (184). En el presente trabajo encontramos tan sólo dos hombres que ejercen prostitución y ambos presentan serología de VIH positiva, uno además coinfección por *C. trachomatis*. También hay que destacar la baja edad observada en los hombres que ejercen prostitución comparada con las mujeres. Por este motivo es importante realizar también intervenciones dirigidas a varones que ejercen la prostitución.

### 5.1.2 Características clínicas de los pacientes con infección gonocócica

Aunque las localizaciones de la infección gonocócica más frecuentemente son las genitales tanto en hombres como en mujeres, las localizaciones extragenitales (orofaríngeas y rectales) juegan un papel importante ya que suponen un 38% de las localizaciones y ascienden al 56% en el caso de HSH y bisexuales. Esta proporción de gonorrea extragenital es más elevada que la observada en otros estudios similares realizados en nuestro país (183,186) y en países como Francia (189) y Alemania (190). Por lo que la proporción de gonorrea extragenital hallada en el presente trabajo es muy elevada a pesar de la ausencia de TAAN en el diagnóstico en el laboratorio. Esto es debido al alto número de HSH detectados y a la realización de protocolos completos llevados a cabo en las consultas de ITS que incluyen la toma de muestra de estas localizaciones aún en ausencia de síntomas, ya que el 98% y 85% de los pacientes con aislamiento de *N. gonorrhoeae* en frotis faríngeos y rectales respectivamente, no presentaban síntomas en el momento del diagnóstico. Por lo tanto, es previsible que si dispusiéramos de TAAN podríamos encontrar un aumento en el porcentaje de infecciones extragenitales como ocurrió en Inglaterra tras la introducción de este tipo de técnicas diagnósticas (183). Estas observaciones hacen altamente recomendable el examen de las localizaciones extragenitales en los pacientes que lleven a cabo prácticas sexuales orales y anales aun en ausencia de síntomas. Esto supone un

hallazgo importante respecto a la detección, políticas de control y el tratamiento debido a que tanto las infecciones rectales como faríngeas son más difíciles de tratar y la elección del antibiótico adecuado es crucial.

En este trabajo se observa una alta proporción de casos con episodios previos de ITSs (40%) y/o que presentan otras ITS concurrentes (31%), además de una alta prevalencia de casos de VIH (12%), por lo que a su vez estos pacientes presentan un mayor riesgo de contraer y transmitir la gonorrea, es decir, son las principales poblaciones de riesgo de esta infección.

Las ITS en general, son un importante problema de salud pública tanto por su morbilidad como por las complicaciones y secuelas que presentan si no se realiza un diagnóstico y tratamiento precoz. Destacar los cuatro casos de EIP observados durante el periodo de estudio, los cuales nos muestran las graves complicaciones de la gonorrea, ya que todos los casos fueron atendidos en Urgencias de Ginecología por su presentación aguda, con unos parámetros bioquímicos alterados (leucocitosis, neutrofilia, proteína C-reactiva y esterasa leucocitarias muy elevadas). Requiriendo en dos de los casos ingreso de al menos 3 días e incluso cirugía.

Así mismo, existe una importante interrelación entre la infección gonocócica y la infección por el VIH ya que, por un lado la infección gonocócica aumenta el riesgo de adquisición y transmisión del VIH (183) y por otro lado, al compartir vías de transmisión y tener un periodo de latencia más corto (normalmente de 2 a 5 días) (191), la incidencia de gonorrea se puede utilizar como un indicador muy sensible de cambios en los comportamientos sexuales de riesgo. Por tanto a los pacientes diagnosticados de gonorrea u otras ITS se les debe ofrecer la prueba del VIH, de la misma forma que se debe hacer un mayor énfasis en el cribado periódico de ITS en personas infectadas por el VIH.

En el presente trabajo hemos observado que los HSH y las mujeres presentaron más coinfecciones distintas del VIH que los hombres heterosexuales. La infección por *C. trachomatis* y los condilomas producidos por el VPH fueron las ITS más frecuentes en todas las categorías de transmisión sexual, pero los HSH tuvieron un mayor

protagonismo en la infección por sífilis (4,5%) que el resto de pacientes ya que todos los casos se detectaron en este grupo de transmisión sexual, con además elevadas tasas de coinfección con el VIH. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros países como Inglaterra (192) y en el estudio de *Diaz et al.* (186) en nuestro país, aunque los porcentajes de coinfección por clamidia en el presente trabajo son más elevados.

En cuanto a la infección por el VIH, en el País Vasco en el año 2013 se notificaron 143 nuevos casos, lo que supone un mínimo histórico desde que se comenzaron a registrar los casos de VIH en el año 1997 (193). A pesar de esto la transmisión en HSH mantiene una tendencia ascendente llegando a alcanzar el 56% de los nuevos casos de VIH. Esta misma tendencia se observa en todo el estado español (194), por lo que la transmisión en el grupo de HSH es la más importante en lo que a VIH se refiere (193). La proporción de VIH detectada en el presente estudio (12,0%) es similar a la proporción hallada en otros países con alta prevalencia de VIH, como Dinamarca (12,3%), Holanda (12,0%), Italia (10,3%) e Inglaterra (10,5%) (195) y también coincide con países en los que la proporción de HSH con infección gonocócica es muy elevada.

La elevada edad media de los pacientes (34 años), el alto porcentaje de relaciones sexuales esporádicas (78%), el acusado número de pacientes con múltiples parejas sexuales (el 22% habían tenido más de diez parejas sexuales en el último año) y la presencia de antecedentes de otras ITS (78%) muestran una tendencia hacia la falta de prácticas sexuales seguras. La mayoría de los pacientes con serología de VIH positiva fueron HSH (92%), el 2% de los casos diagnosticados con motivo del episodio de infección gonocócica. Es preocupante que el 84% de estos casos de VIH ya conocían su estado antes del episodio de infección gonocócica, y sin embargo no habían utilizado preservativo. Esta situación se da sobre todo entre la población homosexual ya que, según describen algunos estudios (179,190), los casos de HSH con serología positiva para el VIH diagnosticados de gonorrea son más propensos a reportar comportamientos sexuales de alto riesgo que los HSH con serología negativa para el VIH. La causa de esto puede ser un fenómeno extendido en Europa (192) que se da

entre HSH VIH-positivos que practican relaciones sexuales sin protección con parejas de ese mismo estado serológico (“serosorting”) (192), creando así un grupo de riesgo desproporcionadamente alto que propaga rápidamente las enfermedades de transmisión sexual. Otra razón puede ser la deficiente protección contra la reinfección a causa del estado de inmunodepresión de algunos de estos pacientes (190). Otros estudios que comparan el comportamiento de riesgo sexual entre HSH VIH positivos y VIH negativos encontraron que los hombres VIH positivos suelen ser receptivos sin protección sobre todo si la pareja que penetra es VIH negativo o su estado es desconocido (190). Estos datos nos alertan de la importancia de continuar reforzando la prevención en HSH infectados con el VIH, y por ello se recomienda que los HSH que tienen relaciones sexuales sin protección con parejas nuevas o esporádicas realicen un cribado de VIH/ITS al menos anualmente, y cada tres meses si el cambio de pareja es habitual (183).

### **5.1.3 Características relacionadas con la transmisión de la infección gonocócica**

Como ya hemos adelantado, los HSH están involucrados más frecuentemente en conductas sexuales de riesgo ya que un alto porcentaje tienen relaciones sexuales con múltiples parejas, más de la mitad muestran antecedentes de ITS y más de un tercio presentaban otras ITS distintas al VIH. Esto constituye un verdadero problema de salud pública debido a su potencial para la transmisión del VIH. Por otro lado el porcentaje de coinfección por clamidia en HSH (22%) es más elevado que el publicado en otras zonas de Europa como el Reino Unido (10%) (132) donde la proporción de infección gonocócica en HSH es similar a la nuestra.

Entre el colectivo de HSH encontramos un alto porcentaje de sexo oral y rectal sin protección lo que conduce a las infecciones en estas localizaciones extragenitales. El porcentaje de gonorrea rectal encontrado en HSH (42%) es superior a lo descrito en el estudio realizado por Díaz *et al.* (186) en Clínicas de ITS de nuestro país y lo publicado en Clínicas de ITS en Alemania (190) y en Reino Unido (192) (21%, 35% y 31% respectivamente). Del mismo modo el porcentaje de infección faríngea (15%) es mayor que los porcentajes mostrados en el estudio de Díaz *et al.* (186), en

Alemania (190) y en un estudio realizado a nivel Europeo (190) (5,2%, 7,3% y 7% respectivamente) (186,190), y es igual al publicado en el Reino Unido (192). Esto puede deberse a las diferencias en las poblaciones de estudio, y dado que tanto la infección gonocócica como la rectal suelen ser asintomáticas, esto nos indica que las tasas de cribado en la población de HSH en el área de Bilbao son mayores que las obtenidas en otras zonas, y que el diseño y desarrollo de los protocolos de actuación en las consultas especializadas en ITS de Bilbao son seguramente más eficientes, ya que el 92,5% de los HSH en este estudio fueron atendidos en estas consultas. Para evitar este porcentaje de ITS en HSH, además de los mensajes de prevención del VIH, se deberían de desarrollar otras estrategias como el cribado de rutina en HSH sexualmente activos que están en contacto con sistemas sanitarios y la detección e información in situ del conjunto de las ITS en lugares donde los HSH buscan parejas sexuales.

Aunque el mecanismo de transmisión más frecuente de infección gonocócica fueron las relaciones homosexuales entre hombres (43%), destaca una elevada proporción de hombres heterosexuales (35%). Hay que subrayar que el 27% de hombres heterosexuales contrajo la infección a través del contacto con una trabajadora sexual, de los cuales el 4% fue consecuencia del turismo sexual fuera de nuestro país. Por otro lado, los estudios realizados en otros países de Europa (179) encontraron una proporción importante de hombres heterosexuales infectados de gonorrea en el extranjero, pero este no es el caso de nuestro estudio donde en todas las categorías de transmisión sexual la mayoría de las infecciones se han adquirido en nuestro país. Los altos porcentajes de localizaciones extragenitales en este grupo de población probablemente también nos muestran un cambio en las prácticas heterosexuales. Igualmente la población heterosexual muestra porcentajes de coinfección con otras ITS más bajos que la población de HSH, aunque en el caso del VHB ocurre lo contrario, ya que se diagnostica mayoritariamente en hombres y mujeres heterosexuales (2,8% y 3,4% respectivamente frente al 0,8%).

Existen marcadas diferencias en las características de las mujeres infectadas en comparación con los hombres tanto heterosexuales como homosexuales. Un tercio de

las mujeres diagnosticadas tenían una edad inferior a 25 años y un 41% indicaban haber tenido una sola pareja sexual en el último año, mientras que en los hombres el grupo de edad predominante fue el de 25-34 años y tan sólo un 11% declaraban haber tenido una sola pareja sexual en los últimos 12 meses.

El sexo sin protección con parejas ocasionales fue la fuente más importante de infección en los varones. Estos resultados son muy importantes porque reflejan una falta de percepción del riesgo en los hombres y hacen que sea más difícil llevar a cabo la notificación y control de la pareja. Por otro lado el elevado porcentaje de contactos esporádicos entre las parejas estables (43%) apunta una tendencia creciente, ya mencionada, en la disminución de las prácticas sexuales seguras. Estos datos indican que las medidas de educación y promoción de la salud que actualmente se realizan sobre la población general, no son suficientes.

Los datos referidos indican que los esfuerzos en la prevención de la infección gonocócica, como la mayor cobertura de detección de ITS y el fácil acceso a los servicios especializados en ITS, deben de mantenerse e incluso reforzarse en la atención de los principales grupos de riesgo. La promoción y educación en salud para aumentar la conciencia pública y fomentar comportamientos sexuales más seguros como el uso necesario del preservativo con todas las nuevas parejas sexuales o contactos esporádicos, siguen siendo fundamentales en la prevención de las ITS. Este hecho es, además, de particular importancia en el contexto que vivimos actualmente respecto a la disminución de la sensibilidad antimicrobiana en el tratamiento de la gonorrea y la publicación de un plan de respuesta europeo (131) y mundial (132).

## 5.2 Análisis microbiológico

Debido a la evidente tendencia a la aparición de cepas de gonococo multirresistentes, es esencial desarrollar programas de monitorización de resistencias, como el que presentamos, para mantener las guías terapéuticas actualizadas con el objetivo de llevar a cabo un correcto manejo del paciente y del control de la infección tanto a nivel local como regional y mundial. Así mismo, es importante detectar los cambios poblacionales de *N. gonorrhoeae* con el propósito de controlar y prevenir su

diseminación. Debido a la diversidad genética de *N. gonorrhoeae*, se han desarrollado una gran variedad de métodos para su estudio, siendo los métodos genotípicos los de elección por su elevado poder de discriminación, reproducibilidad y especificidad. Entre ellos el método NG-MAST es uno de los más utilizados ya que permite comparar los clones circulantes entre diferentes áreas geográficas, por lo que es adecuado para aplicaciones que aporten información epidemiológica a corto plazo.

Los datos sobre la propagación de la resistencia entre cepas de gonococo en nuestro país y los STs hallados mediante NG-MAST son escasos. Destacar el estudio llevado a cabo por Serra-Pladevall *et al.* realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron (4), en Barcelona, con 100 cepas analizadas y, el estudio recientemente publicado por el equipo de Cobo *et al.* (185) desarrollado por el Servicio de Microbiología del Hospital de Poniente, en Almería, donde se analizaron 65 cepas. Ambos estudios reflejan la situación local, aunque el número de cepas que presentan es escaso y no relacionan los STs descritos con las características de los pacientes. En el resto de Europa, en cambio, ya hay descritas series con un número elevado de muestras (196-200).

### **5.2.1 Tinción de Gram**

La tinción de gram resulta un método de presunción diagnóstica de infección gonocócica que aporta información muy útil, sobre todo en el caso de las muestras uretrales, ya que en el 87,5% de estas muestras se observaron LPMN valorables y/o diplococos gram negativos intraleucocitarios. Por lo que se recomienda realizar la tinción de Gram en todas las muestras genitales tanto en hombres como en mujeres.

### **5.2.2 Sensibilidad antimicrobiana**

La OMS apoya la teoría de que el régimen de tratamiento de la gonorrea es eficaz si consigue curar al menos un 95% de las infecciones (5). Por lo tanto, viendo los resultados de este trabajo y, ya que espectinomicina no se encuentra comercializada en nuestro país, ceftriaxona y cefixima son las mejores opciones de tratamiento empírico de la gonorrea en nuestro entorno.



Este estudio muestra el alto porcentaje de resistencia antimicrobiana en las cepas de *N. gonorrhoeae* que circulan en nuestro medio, de manera que penicilina (98,9% de cepas con sensibilidad disminuida o resistentes), ciprofloxacino (55% de cepas con sensibilidad disminuida o resistentes) y tetraciclina (63,6% de cepas con sensibilidad disminuida o resistentes) no deben de utilizarse como tratamiento empírico de elección. Sin embargo, tanto el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino como la CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de este antimicrobiano, sufren un decrecimiento a lo largo de los años, probablemente debido a la exclusión de este antibiótico como tratamiento empírico de primera línea de la gonorrea no complicada en nuestro entorno.

Más de la mitad (53,1%) de los aislados resistentes a penicilina con producción de  $\beta$ -lactamasa plasmídica mostraron un halo de inhibición  $\leq 19$  mm, lo que coincide con la afirmación del CLSI de que todas las cepas de *N. gonorrhoeae* con un diámetro de halo de inhibición  $\leq 19$  mm son productoras de  $\beta$ -lactamasa plasmídica. Aunque no es recomendable determinar la producción de  $\beta$ -lactamasa por este método ya que, cepas que presentan diámetro de halo  $>19$  mm también pueden ser cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa, por lo que habría que confirmarlo con alguna de las pruebas específicas aprobadas para la detección de  $\beta$ -lactamasas.

En el año 2010 el ECDC, en el estudio de vigilancia de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* EuroGASP (*The European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*), publicó que el 9% de las cepas de gonococo presentaba sensibilidad disminuida a cefixima (CMI $>0,125$   $\mu\text{g/ml}$ ), porcentaje se elevaba al 16% en las cepas procedentes de España (132). En el año 2011, se publica la primera cepa en España con resistencia de alto nivel a cefalosporinas (102,150), el cual supone uno de los primeros casos a nivel mundial. La primera cepa se aisló en Japón en el mismo año de un frotis faríngeo de una paciente asintomática (97), la segunda y tercera en Francia (91) y Austria (201), de la muestra uretral de 2 varones homosexuales, y la cuarta y quinta en España, de localización anorrectal y uretral, respectivamente, en dos varones relacionados sexualmente (102,150).

En nuestro estudio hemos observado que las CMI's de cefixima y ceftriaxona muestran un ligero descenso a lo largo de los años, observación que también es percibida en otros estudios como el llevado a cabo por el programa de vigilancia europeo Euro-GASP (202) durante los años 2009-2011 con cepas provenientes de 21 países europeos; y lo recientemente publicado por Lebedzeu *et al.* (203) durante los años 2010-2013 en el Este de Europa. Las razones de esta disminución en las CMI's de ceftriaxona a y cefixima son desconocidas. Sin embargo, aunque no encontramos ninguna cepa con sensibilidad disminuida o resistente a cefixima y/o ceftriaxona, encontramos un 9,7% de cepas con CMI a ceftriaxona de 0,06 µg/ml. Esta CMI se encuentra una dilución por debajo del punto de corte de sensibilidad disminuida para cefalosporinas según los criterios de EUCAST (CMI>0,12 µg/ml). También se observan CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> muy elevadas, sobre todo en el caso de ceftriaxona que en el año 2011 y 2012 alcanza una CMI<sub>90</sub> de 0,06 µg/ml. Este hecho es importante ya que , aunque el tratamiento empírico de primera línea de la gonorrea no complicada es ceftriaxona 250 mg, algunas guías como la guía Mensa *et al.* (104) o la del Reino Unido (133) empiezan a recomendar aumentar la dosis a 500 mg debido a la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a estos antimicrobianos en todo el mundo. Las guías terapéuticas de Estados Unidos y del Reino Unido recomiendan cefixima 400 mg como alternativa cuando ceftriaxona no es una opción válida para el tratamiento, no obstante, en el presente trabajo, cefixima muestra CMI's más bajas que ceftriaxona. Estos datos nos indican la posible aparición de cepas con sensibilidad disminuida o resistencia a ceftriaxona y cefixima en nuestro medio, si se siguen utilizando como tratamiento de elección, lo que hace recomendable mantener una estrecha vigilancia de la tendencia de la CMI en estos antimicrobianos con el fin de detectar posibles cambios de sensibilidad a lo largo del tiempo. En cuanto a los criterios de sensibilidad hay algunas diferencias en los puntos de corte entre CLSI y EUCAST. Según CLSI las cepas de gonococo son resistentes a ceftriaxona y cefixima cuando la CMI es  $\geq 0.25$  µg/ml y según EUCAST cuando la CMI es  $>0,12$  µg/ml. Teniendo en cuenta estas diferencias, sería necesario aclarar los puntos de corte para el estudio de sensibilidad a estos antimicrobianos según criterios clínicos y microbiológicos.

Por otro lado las cefalosporinas cefuroxima y cefepime, mostraron buenos niveles de actividad *in vitro* contra las cepas de *N. gonorrhoeae* pertenecientes a este trabajo, observándose un 78% y un 92% de sensibilidad a estos antimicrobianos respectivamente. Lo que nos indica que cefuroxima y cefepime podrían suponer una alternativa eventual en el tratamiento de las infecciones causadas por estas cepas, aunque no es posible conocer el significado clínico de estos datos.

La azitromicina es un antibiótico que presenta buena penetración en los tejidos, larga vida media, prolongado efecto postantibiótico y que se administra por vía oral, por lo que *a priori* constituye una excelente opción de tratamiento para las infecciones de transmisión sexual de etiología bacteriana. Estas características junto con su amplia utilización para tratar infecciones respiratorias y de transmisión sexual por *C. trachomatis*, han sido probablemente las principales causas de aparición de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina en los últimos años. Se ha descrito resistencia de alto nivel a azitromicina en gonococo (CMI > 256 µg/ml) debido a alteraciones de su diana por mutaciones específicas en el gen que codifica el ARNr 23S, o resistencia de bajo nivel debida a mutaciones que inducen la sobreexpresión de una bomba de salida del fármaco (72,74). En este trabajo no hay cepas con resistencia de alto nivel a azitromicina, pero sí se ha obtenido un 5,2% de cepas con sensibilidad intermedia o resistencia (3%) (CMI > 0,25 µg/ml) según criterios de EUCAST, dos de ellas con una CMI muy elevada (96 µg/ml). También observamos un ascenso del porcentaje de resistencia en los últimos años, llegando a obtenerse en el año 2013 un porcentaje del 5,1%. En cuanto a los resultados publicados en otras zonas de nuestro país, observamos que los porcentajes de resistencia a azitromicina varían, desde el 4% en Barcelona en el año 2011 (4) al 13,8% publicado en Almería en cepas aisladas desde el año 2012 al 2014 (185). El programa de vigilancia de ITS del ECDC publicó, en el año 2011, una prevalencia global de resistencia a azitromicina del 5,3% (99/1865), donde se observa una gran variabilidad entre los diferentes países que oscila entre el 0% en Hungría, Malta y Reino Unido al 14% en España (151). Sin embargo Euro-GASP, sigue diferentes criterios para la definición de cepas resistentes a azitromicina (CMI ≥ 1 µg/ml), y según estos criterios obtendríamos un 2,2% de resistencias a azitromicina en nuestro estudio. Por todo esto se hace necesario, una vez más, aunar criterios a la

hora de definir los puntos de corte de sensibilidad intermedia y resistencia a azitromicina para poder comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios. En este mismo estudio Euro-GASP detecta, por primera vez desde el año 2007, dos cepas con resistencia de alto nivel a azitromicina, una perteneciente a un hombre heterosexual en Italia y otra a un HSH en Irlanda (151). En el año 2011 se aísla también la primera cepa con resistencia de alto nivel en Estados Unidos (204). Aunque la correlación entre la resistencia de bajo nivel o la sensibilidad intermedia y el fallo del tratamiento con azitromicina no ha sido bien estudiada, es necesaria una estrecha vigilancia de la epidemiología de la resistencia a azitromicina en la infección gonocócica, ya que actualmente las guías recomiendan el tratamiento conjunto de azitromicina con una cefalosporina de tercera generación para el tratamiento de la gonorrea (75,104,133).

Por otro lado, no se han establecido los criterios de interpretación de los halos de inhibición de azitromicina frente a *N. gonorrhoeae* por el método de difusión en disco-placa, pero, tomando los criterios establecidos por otros estudios (sensibles las cepas con halo  $\geq 27$  mm, con sensibilidad intermedia las cepas entre 24-26 mm y resistentes las cepas cuyo halo de inhibición sea  $< 24$  mm) (4), observamos que la correlación entre los mm de halo obtenidos por el método de difusión en disco-placa y las CMIs obtenidas por el método de E-test es total. Este hecho fortalece estos criterios de interpretación y demanda la necesidad de nuevos estudios que, comparando diferentes métodos, ayuden a establecer los puntos de corte definitivos. Esto es importante ya que en muchos laboratorios de diagnóstico clínico la sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo por el método de difusión en disco-placa ya que supone una alternativa más económica que el método de E-test.

Los datos obtenidos afianzan la recomendación de no utilizar azitromicina como tratamiento único de las infecciones gonocócicas por la tendencia a desarrollar resistencias, ya que en el año 2013 supera el 5% de prevalencia que la OMS establece como límite de indicación de tratamiento empírico en monoterapia. Pero sí en tratamiento combinado de las infecciones por *C. trachomatis* ya que, *in vitro*, muestra sinergia con las cefalosporinas y mejora la erradicación de la gonorrea faríngea (133).

Su única opción en monoterapia es como alternativa en las infecciones gonocócicas no complicadas de pacientes con alergia documentada a penicilinas o cefalosporinas (en monodosis de 2 g vía oral), y en aquellos casos en los que se haya confirmado la sensibilidad antimicrobiana previamente al inicio de la terapia de la infección gonocócica.

En cuanto a la eritromicina, no se utiliza como terapia de la infección gonocócica ya que se ha demostrado que no resulta eficaz (33). En cambio se puede utilizar *in vitro* con fines epidemiológicos, para predecir la respuesta a azitromicina, ya que hemos observado una excelente correlación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de difusión en agar para ambos antimicrobianos.

Espectinomicina dejó de utilizarse en nuestro país como tratamiento de la infección gonocócica debido a la rápida aparición de resistencias en el pasado cuando era ampliamente utilizado (51), y a su ineficacia en el tratamiento de la gonorrea faríngea (205). Su desuso podría explicar el porcentaje de sensibilidad tan elevado a este antimicrobiano en las cepas de este estudio (99,7%). Actualmente espectinomicina está retirada del mercado por lo que resulta muy difícil adquirirla en nuestro medio.

Aunque gentamicina no es recomendada por las guías clínicas para el tratamiento de la gonorrea, se ha utilizado como tratamiento alternativo de la infección gonocócica en países de África y en Indonesia durante muchos años (135,147) debido a la emergencia de cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de penicilinas (206). El motivo de su uso para el tratamiento de estas infecciones es que se trata de un antimicrobiano barato, que se puede administrar vía intramuscular en dosis única de 240 mg o 280 mg (135,207,208), con un importante efecto postantibiótico (de hasta 7 horas) y que ha mostrado tasas de curación de hasta un 95% en algunos ensayos (135,206,209). Las CMI's obtenidas para gentamicina en nuestras cepas se mantienen a lo largo del periodo de estudio, hecho también observado en los resultados obtenidos por el Euro-GASP en el año 2011(151), además no se han observado incrementos de CMI en las zonas donde su utilización ha sido masiva (135,137,210), lo que nos muestra que gentamicina podría utilizarse como

terapia empírica en el futuro y actualmente resulta una alternativa en los casos de alergia a betalactámicos con resistencia a fluoroquinolonas y azitromicina como el caso que hemos presentado en este estudio. Sin embargo estos resultados se basan en datos *in vitro* y no es del todo conocida la relación entre la CMI de gentamicina y el resultado clínico del tratamiento de la infección gonocócica debido a los escasos datos publicados y a las dificultades que se encuentran a la hora de diferenciar reinfección gonocócica de fracaso terapéutico. En consecuencia, no hay criterios de interpretación para las CMIs de gentamicina, aunque un estudio publicado en 2007 (135), realizado en cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en Malawi, aplica unos criterios basados en comparaciones entre CMI de gentamicina y curación clínica, definiendo como sensibles las cepas con CMI  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , con sensibilidad intermedia entre 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$  y resistentes  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ . Con los resultados obtenidos en el presente trabajo y basándonos en estos criterios de interpretación, hacemos una estimación de los puntos de corte de sensibilidad a gentamicina mediante el método de difusión en disco-placa, estableciendo como sensibles las cepas con diámetros de halo de inhibición  $> 28$  mm, sensibilidad intermedia 18-28 mm y resistentes las cepas con halos  $< 18$  mm. Por otro lado, hay estudios que han comparado los resultados de CMI obtenidos por el método de dilución en agar y E-test, observando una buena correlación entre ambos métodos (151), obteniéndose por el método de E-test CMIs más bajas que por el método de dilución en agar (137,211). Por lo tanto, sería conveniente establecer unos puntos de corte de referencia basados en ensayos clínicos adecuados de manera que cada laboratorio establezca los puntos de corte del método utilizado basándose en los métodos de referencia.

Durante el periodo de estudio se detectó un caso de fracaso terapéutico de infección gonocócica, con una cepa multirresistente, en el que las opciones terapéuticas se encontraron muy limitadas, a la vez que se observaron posibles fallos en el manejo y procesamiento de la muestra. Por un lado el laboratorio que realizó el diagnóstico sólo estudió la resistencia a cefalosporinas y ciprofloxacino. Por otro lado nos encontramos ante un probable maltrato de la muestra, que impidió el aislamiento de *N. gonorrhoeae* en las muestras recogidas en la consulta de ITS. Todos estos inconvenientes retrasaron el tratamiento antibiótico efectivo de la paciente 17 días

pudiendo ocasionar complicaciones derivadas de la infección gonocócica. Finalmente el caso se resolvió con éxito clínico y microbiológico tratando con una sola dosis de 280 mg de gentamicina vía intramuscular. Este caso nos muestra una vez más el papel de las consultas de ITS donde se llevan a cabo protocolos completos de cribado, junto con una correcta toma de la muestra y la importancia del manejo en el transporte y procesamiento de las muestras en las ITS, tanto bacterianas como víricas, producidas por agentes tan exigentes y que tan fácilmente se degradan en contacto con el medio externo como es *N. gonorrhoeae*.

En cuanto a las cepas MR, dependiendo de la definición de multiresistencia que tomemos como referencia, encontramos un porcentaje muy diferente (que varía de 42,3% a 0,3%), lo que hace muy difícil la comparación de nuestros resultados con otros estudios. Por lo que consideramos que es necesario normalizar la definición de cepas gonocócicas MR, utilizando una definición más apropiada que se base en los antimicrobianos que más frecuentemente se utilizan en el tratamiento de la gonorrea. Aunque si podemos decir que no encontramos ninguna cepa XR, según lo descrito por Unemo *et al.* (1), como ya se ha observado en otras zonas de nuestro país (102).

### **5.2.3 Comparación entre los métodos de difusión en agar disco-placa y dilución en agar**

La determinación de la CMI se puede llevar a cabo mediante los métodos de dilución en agar o E-test. Para que el método de dilución en agar resulte eficiente, requiere el procesamiento de un elevado número de aislados de una sola vez y en muchos laboratorios clínicos el número de aislados suele ser reducido, por lo que no resulta viable para la determinación de CMI en un laboratorio convencional. Algunos estudios han comparado el método de dilución en agar con la prueba de E-test (212) y se ha demostrado una excelente correlación entre ambos métodos a la hora de determinar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos normalmente utilizados en su tratamiento (92-99% de acuerdo) (196,213). No hay muchos estudios que comparen la CMI con el método de difusión en agar para *N. gonorrhoeae* y los que hay utilizan diferentes métodos de referencia y no disponen de gran número de muestras (196,213-216).

Frente a esta situación, decidimos comparar el método de referencia de dilución en agar con el método de difusión en agar para determinar la sensibilidad a ciprofloxacino, ceftriaxona y cefixima. A la hora de determinar la sensibilidad a ciprofloxacino, detectamos un acuerdo “casi perfecto” entre los dos métodos. A su vez, comprobamos que el método de difusión en agar es un método más preciso en cuanto a la caracterización de las cepas de sensibilidad intermedia, ya que muestra aislados con sensibilidad intermedia a ciprofloxacino que por el método de dilución en agar se muestran sensibles o resistentes cerca del punto de corte de sensibilidad intermedia. En el caso de ceftriaxona y cefixima los resultados de difusión en agar para la mayoría de los aislados determinados estaban correlacionados con las CMI obtenidas por el método de dilución en agar.

Ambos métodos mostraron resultados reproducibles. Sin embargo el método de difusión en agar es más rentable y fácil de realizar, características que lo convierten en una buena alternativa para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en los laboratorios de rutina, tanto para la vigilancia epidemiológica como para el manejo del paciente. Por lo tanto, recomendaríamos la realización del método de difusión en agar disco-placa para la determinación de la sensibilidad a *N. gonorrhoeae* de forma rutinaria y la confirmación mediante la determinación de la CMI de ceftriaxona y cefixima en todas aquellas cepas cuyos resultados de diámetro de halo de inhibición estén en los límites de sensibilidad intermedia o resistencia.

#### **5.2.4 Caracterización de las cepas de *N. gonorrhoeae***

En este estudio se muestra que la población de gonococos circulantes en el área de Bilbao es similar a lo expuesto en otras zonas relacionadas geográficamente, ya que los STs 2992 y 1407 son dos de los más prevalentes como ocurre en otras áreas de nuestro país (4,185) y en países como Francia, Irlanda y Noruega, según datos del Euro-GASP (217). En cambio, difieren de los STs que circulan en países de Asia (189,218,219) o América (220). También detectamos dos cepas cuyas secuencias no constan en la base de datos on-line de NG-MAST, con lo cual podríamos estar ante dos nuevos STs que anteriormente no habían sido descritos.



El análisis de los STs de los gonococos aislados durante los años 2012 y 2013 (212 aislamientos) muestra una variedad de 50 STs diferentes. El elevado número de aislados únicos (n= 31) puede estar asociado con la localización subóptima de los contactos, bien porque no se realiza un adecuado seguimiento de los contactos o bien porque éstos se diagnostican y se tratan en centros donde no se realiza el cultivo y consiguiente estudio de las cepas.

Los ST más prevalentes identificados en el presente estudio son los ST210, ST292, ST2400, ST2992, ST2018, ST5533, ST5793, ST1407, ST387, ST7245, ST8517, ST5049, ST437 y ST21 y ST2487. Todas estas cepas más prevalentes tuvieron un único alelo *porB* pero algunos STs comparten el mismo alelo *tbpB*: los STs 210 y 292, 1407 y 5533, 2018 y 2992 comparten, respectivamente, los alelos *tbpB* 4, 110 y 29. Esto nos puede indicar que estos STs provienen de la misma cepa que ha ido evolucionando.

Identificar la asociación entre ST y la resistencia antimicrobiana nos ayuda a entender la diseminación de los clones de resistencia dentro de una población y facilitaría el desarrollo de estrategias de intervención dirigidas. Por otro lado, al analizar las características socio-demográficas, la orientación sexual y los perfiles de riesgo de los pacientes cuyos STs de *N. gonorrhoeae* se encuentran entre los más prevalentes también podemos observar algunas asociaciones de interés epidemiológico.

El **ST210** es el más prevalente en nuestra área (12%) y también se ha descrito como uno de los STs más prevalentes en Portugal (221), en cambio no se describe ningún aislado con este ST en el estudio realizado en el sur de nuestro país (4) y sólo se describe un aislado en el estudio realizado en Barcelona (185). Éste ST se asoció en su mayoría con hombres autóctonos (37% HSH y 63% heterosexuales). Tres de ellos (16%) son hombres heterosexuales que refieren haber tenido contacto con trabajadoras sexuales y más de 5 parejas sexuales distintas en el último año.

El siguiente ST más prevalente en nuestro estudio, el **ST292 (11%)**, se trata de una cepa que podría circular particularmente en nuestro medio ya que no se ha observado en otros estudios de nuestro país. A su vez, cinco aislados pertenecientes a

este ST muestran CMI de cefixima y/o ceftriaxona mayor o igual a 0,03 µg/ml, lo que nos alerta de la posible selección de resistencias a cefalosporinas de tercera generación debido a su utilización para el tratamiento de la infección gonocócica no complicada. El ST292 podría estar asociado al colectivo homosexual, ya que un 70% de los pacientes con este ST lo eran, y con el VIH ya que un 36% de los HSH fueron diagnosticados de VIH previo diagnóstico del episodio de infección gonocócica.

EL **ST2400** (7%) también está ampliamente representado en nuestro estudio y no ha sido descrito en el resto de estudios de nuestro país. Se observa una gran asociación con HSH (92%) y por consiguiente también con el VIH (17%). Todos los pacientes declararon haber tenido más de dos contactos sexuales en el último año, lo que facilitaría la diseminación de la infección. La primera cepa con este ST se aísla en Enero de 2013 y se sigue aislando a lo largo de todo el año lo que podría indicarnos la aparición de un brote asociado al colectivo homosexual, aunque sería necesaria una vigilancia más prolongada para contrastar este hecho.

El **ST2992** se aisló en un 6% de los pacientes con infección gonocócica. Se encuentra asociado con el colectivo de HSH en un 82%, hecho que ya se describió en el estudio molecular realizado por Euro-GASP (217). ST2992 se distribuye por otras zonas de nuestro país ya que se encontró un aislado en el estudio de Serra-Pladevall *et al.* (4) y es una de las cepas más frecuentemente aisladas en el estudio de Cobo *et al.* (185) y también se distribuye por el resto de Europa, siendo la cepa más prevalente en Irlanda y Noruega (217) y una de las más prevalentes en Alemania (222). Hecho importante teniendo en cuenta que en el reciente estudio de Cobo *et al.* (185) ya se ha encontrado un aislado de este ST resistente a cefixima y azitromicina (185). En nuestro estudio es la cuarta cepa más prevalente y su aislamiento se distribuyó a lo largo de los dos años estudiados. Todos estos datos nos indican que nos encontramos ante una cepa ampliamente distribuida, que podría estar dando lugar a un brote dentro de la población homosexual, aunque sería necesaria una vigilancia más prolongada de una muestra suficientemente representativa para verificar este hecho.

Los **STs 2018** (6,5%) y **5533** (5,6%) se asocian a brotes que circularon durante el año 2012 en pacientes predominantemente heterosexuales, con un alto porcentaje de

coinfección con otras ITS. En el caso del ST2018, cuatro pacientes eran VIH. El primer caso de infección por el ST2018 se detectó en una mujer en la que se aisló *N. gonorrhoeae* por primera vez en cuatro localizaciones distintas (muestra uretral, rectal, vaginal y endocervical). La paciente padecía VIH y manifestó tener pareja estable y ser el único contacto sexual en el último año. Todos los aislados de ambos STs mostraron resistencia a ciprofloxacino. Además la CMI de ceftriaxona fue 0,06 µg/ml en más de la mitad de los aislados tanto del ST2018 (6 aislados) como del ST5533 (8 aislados). El ST2018 se aísla desde Enero hasta Septiembre del año 2012 y el ST5533 desde Enero hasta Abril del mismo año, aunque en el año 2013 no se detectó ningún aislado, lo que supondría la posible erradicación de los brotes generados por las cepas pertenecientes a estos STs . Tampoco se han detectado estos STs en otros estudios de nuestro país ni de Europa.

El **ST5793** (5%) se asocia particularmente a pacientes provenientes de otros países, sobre todo Sudamérica (Paraguay y Venezuela), en su mayoría HSH. Hay 2 casos de VIH en dos pacientes españoles homosexuales que podrían estar asociados ya que fueron aislados en el mismo mes. Todos los casos manifestaron haber tenido 2 o más parejas sexuales en el último año.

El **ST1407** es otro de los STs más prevalentes en nuestro medio así como en el resto de estudios de nuestro país y en muchos países de Europa y del resto del mundo. Estudios realizados anteriormente, durante los años 2003 a 2005, no muestran cepas pertenecientes al ST1407 o STs relacionados en Europa o en otros continentes. En cambio, en el año 2007 se describió por primera vez en un centro de Escocia (200) donde se realizaba la caracterización molecular de todos los casos de gonorrea del país, alcanzando valores del 15,4% de aislados en el año 2009 y siendo la cepa más prevalente en estudios recientes de Portugal (221), Noruega (223) y Alemania (222). Un estudio publicado por el Euro-GASP (217) en el año 2013 demuestra una amplia difusión del ST1407 en toda Europa. También se ha documentado su distribución a nivel mundial, mostrando sensibilidad disminuida y resistencia a cefalosporinas de tercera generación en Europa (201,224-227), los Estados Unidos (228), Canadá (220), Australia (229), Hong Kong (230) y Taiwán (219) y en un estudio realizado en Japón

(189). Nuestro estudio confirma la gran asociación del ST1407 con la resistencia a ciprofloxacino, ya que todos los aislados mostraron resistencia a este antimicrobiano, al igual que lo publicado en diferentes países de la Unión Europea (217). También se demuestra la relación de este ST con el aumento de las CMI en las cefalosporinas de tercera generación ya que 6 aislados (60%) mostraron una CMI  $\geq 0,03$   $\mu\text{g/ml}$ . Esto pone de manifiesto la utilidad epidemiológica de la caracterización molecular como herramienta para predecir la resistencia a los antimicrobianos, ya que parece cada vez más evidente que ciprofloxacino y ceftriaxona, serían regímenes inapropiados para tratar la infección gonocócica producida por el ST1407. En el presente estudio, el ST1407 no se asoció con resistencia a azitromicina, como se ha publicado en cepas aisladas en Japón (231), en cambio si se ha asociado la resistencia a azitromicina al **ST4120**. El ST4120, al que pertenece la cepa con CMI de azitromicina de 96  $\mu\text{g/ml}$ , se encuentra genéticamente relacionado con el ST1407 ya que presentan el mismo alelo *tbpB* y al menos un 99% de similitud en el alelo *porB* (diferencia entre las secuencias de *porB* en, como máximo, 5 pares de bases). Este ST es uno de los más extendidos en Rumania junto con el ST1407 (217). El ST1407 fue más común entre la población heterosexual (8 casos, 90%) que la homosexual (1 caso, 11%), como también se observa en un estudio recientemente publicado en Alemania donde se relaciona principalmente con la población heterosexual y con una mayor proporción de mujeres (222). Sin embargo en otros estudios este ST se ha relacionado con la población homosexual (224), esto puede indicar un cambio en la distribución de este ST que podría haber pasado de la población homosexual a la heterosexual. Por todo esto, el ST1407 representa un potencial problema de salud pública si se sigue difundiendo sin adoptar medidas para su reconocimiento y poder así restringir su diseminación.

Todas las cepas del **ST387** se aíslan en hombres y mujeres heterosexuales, en su mayoría autóctonos (6 casos, 86%). Cinco pacientes (71%) presentaron infección por clamidia en el mismo episodio. En el estudio realizado por Cobo *et al.* (185) se aislaron dos cepas con este ST. Esta cepa no se asocia con resistencia antimicrobiana como ya ha sido publicado en otros estudios (223), pero parece ser particularmente persistente dentro de la población heterosexual, debido a que ya fue publicado en estudios moleculares del año 2004 (199).

Excepto el ST5533 y el ST5793 que fueron mayormente asociados con pacientes extranjeros, el resto de STs fueron aislados en un alto porcentaje, en pacientes españoles. Por otro lado la persistencia de los STs 292, 1407, 2992 y 7245 a lo largo de los dos años estudiados, nos indica que podría tratarse de clones altamente estables en nuestra área.

El **ST5049**, mostró 3 aislados con sensibilidad disminuida o resistencia a azitromicina. Este ST se encuentra genéticamente relacionado con el ST2992, y no había sido asociado anteriormente a la disminución de la sensibilidad a azitromicina por ningún estudio, al igual que los **ST4812** y **4805**. El **ST437**, aunque no se ha aislado con mucha frecuencia, es otro de los STs que presenta un aislado con sensibilidad disminuida a azitromicina en este trabajo, y se encuentra genéticamente relacionado con el ST225 (poseen el mismo alelo *tbpB* y  $\geq 99\%$  de similitud en el alelo *porB*), el cual es uno de los STs más frecuentes en Suecia y Malta (217). Aunque serían necesarios más aislamientos para relacionar el ST437 con la aparición de cepas resistentes.

En el marco actual de multirresistencia en *N. gonorrhoeae* consideramos imprescindible realizar vigilancia epidemiológica, alertando, educando e implicando a la población en la prevención de las ITS, de manera que nos permita anticiparnos en la búsqueda e implementación de nuevas estrategias de tratamiento y control de la infección. A nuestro entender, este estudio es el primero en nuestro país y específicamente en el área de Bilbao, en cuanto a la amplitud de la caracterización que realiza de la infección gonocócica. No cabe duda que, por lo tanto, puede permitir una mayor vigilancia de la gonorrea ya que complementa información de la resistencia a los antimicrobianos con tipificación molecular y características de los pacientes a nivel local. Aun así, consideramos necesario realizar estudios con un número mayor de cepas de manera que nos permita realizar un análisis estadístico adecuado que explore con mayor fiabilidad la asociación entre características de los pacientes, resistencias antimicrobianas y STs. Además surge la necesidad de acordar un enfoque estándar en el futuro a la hora de realizar estos trabajos que nos permitan comparar los resultados de los diferentes estudios.

### **5.3 Limitaciones del estudio**

En este trabajo hemos encontrado algunas limitaciones. Por un lado la ausencia de información sobre la variable “Nivel de estudios” en gran parte de los pacientes. Por otro lado, la limitada información sobre el comportamiento sexual de los pacientes atendidos en servicios de Urgencias Generales y Centros de Salud que, nos advierte una vez más de la importancia de llevar a cabo un estudio completo de todos los pacientes con sospecha de padecer alguna ITS en una consulta especializada con el fin de realizar un cribado completo de otras ITS, atender, tratar y controlar a las parejas y contactos, realizar un seguimiento adecuado de la evolución del tratamiento y recopilar información útil para conocer con más exactitud la epidemiología existente en el área de Bilbao.

La principal limitación del estudio y al tiempo su gran valor es que todas las cepas proceden del área de Bilbao, por lo que las conclusiones son totalmente representativas de este territorio. Por otro lado, en contraposición hay que destacar que presentamos un tamaño muestral importante difícil de obtener en muchos laboratorios actualmente debido, entre otras razones, a la introducción de las técnicas de PCR para el diagnóstico de la gonococia, que ha provocado que estos laboratorios utilicen exclusivamente esta técnica sin llevar a cabo el cultivo y, como consecuencia, su posterior estudio de sensibilidad y caracterización.

## **6. CONCLUSIONES**





1. Las tasas de infección gonocócica detectadas en este estudio son las más altas documentadas de nuestro país, estando incluso por encima de la tasa europea. Sin embargo, es notable el descenso progresivo en la incidencia observada durante los tres años de estudio.
2. El perfil epidemiológico de los pacientes con infección gonocócica en el área de Bilbao, es el de HSH, de procedencia española y que tienen relaciones sexuales con múltiples parejas. HSH que, además, presentan más frecuentemente que otros grupos de población antecedentes de ITS, así como coinfección con otras ITS, factores que predicen la presencia de VIH conocomitante en los pacientes con infección gonocócica.
3. No se ha detectado ninguna cepa con sensibilidad disminuida a cefixima y/o ceftriaxona y hemos observado que sus CMIs muestran un ligero descenso a lo largo de los años. Sin embargo, encontramos cepas con CMI a ceftriaxona cercana al punto de corte de sensibilidad disminuida para cefalosporinas según los criterios de EUCAST. Se observa un aumento de resistencia a azitromicina que afianza la recomendación de no utilizar azitromicina como único tratamiento de las infecciones gonocócicas. Los datos presentados muestran que actualmente penicilina, ciprofloxacino y tetraciclina no deben de utilizarse como tratamiento empírico de elección en nuestro entorno ya que el porcentaje de resistencia antimicrobiana en las cepas de *N. gonorrhoeae* que circulan en nuestro medio es muy elevado.
4. Las CMIs de gentamicina en las cepas que circulan en nuestra área, se mantienen a lo largo del periodo de estudio, lo que muestra que gentamicina podría utilizarse como alternativa en los casos de infección gonocócica no complicada, con alergia a betalactámicos y resistencia a fluoroquinolonas y azitromicina, como el caso que presentamos en este estudio. De acuerdo a los resultados de CMI obtenidos *in vitro*, se presenta una estimación de los puntos de corte de sensibilidad a gentamicina mediante el método de difusión en agar disco-placa, estableciendo como sensibles las cepas con diámetros de halo de inhibición > 28 mm, con sensibilidad intermedia las cepas cuyos diámetros de halos sean de 18-28 mm, y resistentes las cepas con halos <18 mm.

5. Ante la emergencia en nuestro medio de cepas de *N. gonorrhoeae* con CMI's elevadas para ceftriaxona y/o cefixima, con resistencia simultánea a otros antimicrobianos, recomendamos la realización del estudio de sensibilidad antimicrobiana de rutina mediante el método de difusión en agar disco-placa, a todos los aislamientos de *N. gonorrhoeae*, que incluya todos los antimicrobianos indicados para su tratamiento, así como posibles alternativas, como la gentamicina, y la posterior determinación de la CMI en aquellas cepas de *N. gonorrhoeae* cuyos mm de halo se muestren cercanos a los puntos de corte, con el fin de detectar la aparición de cepas resistentes a estos antimicrobianos.

6. La caracterización molecular de los 212 aislamientos descubrió 50 STs diferentes circulando en el área sanitaria de Bilbao durante los años 2012-2013. Los STs más prevalentes identificados, en orden de mayor a menor frecuencia, son los STs 210, 292, 2400, 2992, 2018, 5533, 5793, 1407 y 387. La persistencia de los STs 292, 1407, 2992 y 7245 a lo largo de los dos años estudiados nos indica que podría tratarse de clones altamente estables en nuestra área.

7. En el presente trabajo se describe, por primera vez en Europa, la asociación de los STs 5049, 4812, 4805 y 4120 con la disminución de la sensibilidad o resistencia a azitromicina.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. 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.
2. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. Vol 1. 9a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 2007.
3. Unemo M, Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R, editors. In Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Gonorrhoea:21–54. Geneva: World Health Organization (WHO);2013.
4. Serra-Pladevall J, Barberá-Gracia MJ, Roig-Carbajosa G, Juvé-Saumell R, Gonzalez-Lopez JJ, Bartolomé-Comas R, et al. *Neisseria gonorrhoeae*: resistencias antimicrobianas y estudio de la dinámica poblacional. Situación en 2011 en Barcelona. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(9):579–83.
5. World Health Organization: Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. Geneva: World Health Organization; 2012.[consultado el 22 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/>
6. Barry PM and Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhea: the impending problem of resistance. Expert Opin. Pharmacother. 2009;10(4):555–77.
7. Department of Health and Human Services CfDCaP. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2010. Atlanta, Georgia: 2011. p: 17-31. [consultado el 15 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/std/stats10/surv2010.pdf>
8. European Centre for Disease Prevention and Control: Sexually Transmitted Infections in Europe 2011. Stockholm: ECDC; 2013. [consultado el 22 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/sexually-transmitted-infections- europe-2011.pdf>
9. Epidemiología Cnd Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 1995-2011. Madrid, 2013 [consultado el 14 Oct 2014]. Disponible en: [https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/VigilanciaITS1995\\_2011.pdf](https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/VigilanciaITS1995_2011.pdf)
10. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. Harrison's principles of internal medicine. Vol 1. 17th ed. New York: McGraw Hill;2008.
11. Zak K, JL Diaz, D Jackson and JE Heckels. Antigenic variation during infection with *Neisseria gonorrhoeae*: detection of antibodies to surface proteins in sera of patients with gonorrhea. J Infect Dis. 1984. 149(2):166–74.

12. Martin IM, 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
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014;63(RR-02): 1-19. [consultado el 20 de Oct 2014]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6302a1.htm>
14. Moreno A, Gutierrez A, Madariaga I, Victoria A, Lizarralde E, Miguel De la Villa F. Perihepatitis asociada a enfermedad pélvica inflamatoria (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis). Utilidad diagnóstica de la tomografía computarizada. *Gac Med Bilbao.* 2011;108(2):49–51
15. UNAIDS world AIDS day report 2011. Geneva:Joint United Nations Programme on HIV/AIDS;2011.
16. Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, Götz HM, Dees J, Thio HB, Thomeer MG, et al. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men. *Clin Infect Dis.*2004;39(7):996–1003.
17. Rönn MM, Ward H. The association between lymphogranuloma venereum and HIV among men who have sex with men: systematic review and metaanalysis. *BMC Infect Dis.* 2011;11:70–8.
18. Martin-Iguacel R, Llibre JM, Nielsen H, Heras E, Matas L, Lugo R, et al. Lymphogranuloma venereum proctocolitis: a silent endemic disease in men who have sex with men in industrialised countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(8):917–25.
19. White J, Ison C. Lymphogranuloma venereum: what does the clinician need to know? *Clin Med.* 2008;8(3):327–30.
20. Black CM, Marrazzo J, Johnson RE, Hook EW 3rd, Jones RB, Green TA, et al. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3757–63.
21. Van Der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington L, Hook E 3rd, 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):1008–16.
22. Association of Public Health Laboratories (APHL). Laboratory diagnostic testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Expert consultation meeting summary report, 13–15 January 2009 Atlanta, GA. Silver Spring, MD, APHL, 2009.

23. Vázquez F, Otero L, Ordás J, Junquera ML, Varela JA. Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(7):392–411.
24. Deguchi T, Maeda S, Tamaki M, Yoshida T, Ishiko H, Ito M, et al. Analysis of the *gyrA* and *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first-pass urine of men with non-gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(5):742–4.
25. Mandell G, Bennett J y Dolin R, editores. *Enfermedades Infecciosas: Principios y prácticas*. Vol.1. 7a ed. Argentina: Ed med Panamericana;2002.
26. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51(No. RR-6).
27. Bosch FX, De Sanjosé S, Lloveras B. La epidemia oculta de las infecciones por el virus del papiloma humano: Características y riesgos. En: Palacio V, editor. *La infección VPH en el área genital: clínica, diagnóstico y tratamiento*. Madrid: 3M, 2000:37–45.
28. Lossick JG. Therapy of urogenital trichomoniasis. En: Honigberg BM, editor. *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer Verlag ;1989:326–41.
29. Buti M, García-Samaniego J, Prieto M, Rodríguez M, Sánchez-Tapias JM, Suárez E, et al. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B (2012). *Gastroenterol Hepatol*. 2012;35(7):512–28.
30. Villano SA, Nelson KE, Vlahov D, Purcell RH, Saah AJ, Thomas DL. Hepatitis A among homosexual men and injection drug users: more evidence for vaccination. *Clin Infect Dis*. 1997;25(3):726–8.
31. World Health Organization. Hepatitis C factsheet no. 164. [consultado el 15 Feb 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
32. Oriel JD. *The scars of Venus: a history of venereology*. Springer-Verlag, London, United Kingdom;1994.
33. Lewis DA. The gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sex Transm Infect*. 2010;86(4):415–21.
34. Young HH, Hill JH, Scott WW. The treatment of infections and infectious diseases with Mercurochrome-220 soluble. *Arch. Surg*. 1925;10(3):885–924.
35. Simmons EE. Value of fever therapy in the arthritides. *Am J Med Sci*. 1937;194:170–8.
36. Uhle CA, Latowsky LW, Knight F. Gonorrhoea urethritis in the male. Treatment with sulfapyridine and sulfathiazole. *JAMA*. 1941;117:247–9.

37. Cokkinis AJ, McElligott GL. Sulfanilamide in gonorrhoea. An analysis of 633 cases. *Lancet* ii. 1938;355–62.
38. Powell AJ, Tomberg J, Deacon AM, Nicholas RA, Davies C. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin- susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an un- expectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J Biol Chem*. 2009;284(2):1202–12.
39. Van Slyke CJ, Wolcott RR, Mahoney JF. The chemotherapy of gonococcal infections. *JAMA*. 1941;116:276–80.
40. Mahoney JF, Ferguson C, Buchholtz M, van Slyke CJ. The use of penicillin sodium in the treatment of sulfonamide-resistant gonorrhoea in men. A preliminary report. *Am J Gonorr Vener Dis*. 1943;27:525–8.
41. Van Slyke CJ, Arnold RC, Buchholtz M. Penicillin therapy in sulfonamide-resistant gonorrhoea in men. *Am J Public Health Nations Health*. 1943;33(12):1392–4.
42. 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.
43. Ashford WA, Golash RG, Henning VG. 1976. Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* ii: 1943;657–8.
44. Faruki H, Kohmescher RN, McKinney WP, Sparling PF. A community-based outbreak of infection with penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase (chromosomally mediated resistance). *N Engl J Med*. 1985;313:607–11.
45. Reyn A, Korner B, Bentzon MW. Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. *Br J Vener Dis*. 1958;34(4):227–39.
46. Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal *tetM* determinant. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;30:664–70.
47. Tapsall JW. 2001. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Supplement 4):S263–8.
48. Judson FN, Ehret JM, Handsfield HH. Comparative study of ceftriaxone and spectinomycin for treatment of pharyngeal and anorectal gonorrhoea. *JAMA*. 1985. 253(10):1417–9.
49. Stolz E, Zwart HG, Michel MF. Activity of eight antimicrobial agents *in vitro* against *N. gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis*. 1975;51:257–64.



50. Ashford WA, Potts DW, Adams HJ, English JC, Johnson SR, Biddle JW, Thornsberry C, Jaffe HW. Spectinomycin-resistant penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet ii. 1981;1035–7.
51. 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 penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. N Engl J Med. 1987;317(5):272–8.
52. Ison CA, Littleton K, Shannon KP, Easmon CS, Phillips I. Spectinomycin resistant gonococci. Br Med J (Clin Res Ed). 1983;287(6408):1827–9.
53. Moran JS. Treating uncomplicated *Neisseria gonorrhoeae* infections: is the anatomic site of infection important? Sex Transm Dis, 1995;22(1):39–47.
54. Gransden WR, Warren CA, Phillips I, Hodges M, Barlow D. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. Lancet. 1990; 335(8680):51.
55. Tanaka M, Nakayama H, Haraoka M, Saika T. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. J Clin Microbiol. 2000;38(2):521–5.
56. Berglund T, Unemo M, Olcén P, Giesecke J, Fredlund H. One year of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Sweden: the prevalence study of antibiotic susceptibility shows relation to the geographic area of exposure. Int J STD AIDS. 2002;13(2):109–14.
57. Patrick D, Shaw C, Rekart ML. *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in British Columbia: an imported phenomenon. Can Common Dis Rep. 1995;21(15):137–9.
58. Su X, Lind I. Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from Denmark from 1995–1998. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(1):117–23.
59. 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.
60. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2007;56:332–6.
61. Kubanova A, Frigo N, Kubanov A, Sidorenko S, Pripitnevich T, Vachnina T, et al. National surveillance of antimicrobial susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 2005–2006 and recommendations of first-line antimicrobial drugs for gonorrhoea treatment in Russia. Sex Transm Infect. 2008;84(4):285–9.

62. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol.* 2012;7(12):1401–22.
63. Bala M, Kakran M, Singh V, Sood S, Ramesh V, Members of WHO GASP SEAR Network. 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;89(Suppl 4):iv28–35.
64. Kirkcaldy RD, Kidd S, Weinstock HS, Papp JR, Bolan GA. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the U.S.A.: the Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP), January 2006–June 2012. *Sex Transm Infect.* 2013;89(Suppl 4):iv5–10.
65. Kubanova A, Frigo N, Kubanov A, Sidorenko S, Lesnaya I, Polevshikova S, Solomka V, Bukanov N, Domeika M, Unemo M. The Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP)—national resistance prevalence in 2007 and 2008, and trends during 2005–2008. *Euro Surveill.* 2010;15(14):pii:19533.
66. Dillon JA, Trecker MA, Thakur SD, Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program Network in Latin America and the Caribbean 1990–2011. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. *Sex Transm Infect.* 2013;89(4):36–41.
67. Dillon JA, Ruben M, Li H, Borthagaray G, Márquez C, Fiorito S, et al. Challenges in the control of gonorrhoea in South America and the Caribbean: monitoring the development of resistance to antibiotics. *Sex Transm Dis.* 2006;33(2):87–95.
68. Starnino S, GASP-LAC Working Group, Galarza P, Carvallo ME, Benzaken AS, Ballesteros AM, et al. Retrospective analysis of antimicrobial susceptibility trends (2000–2009) in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from countries in Latin America and the Caribbean show evolving resistance to ciprofloxacin, azithromycin and decreased susceptibility to ceftriaxone. *Sex Transm Dis.* 2012;39(10):813–21.
69. Cole M, Unemo M, Hoffmann S, Chisholm SA, Ison CA, van de Laar MJ. The European gonococcal antimicrobial surveillance programme, 2009. *Euro Surveill.* 2011;16(42):pii:19995.
70. 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.
71. Chisholm SA, Dave J, Ison CA. 2010. 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.
72. Galarza PG, Abad R, Canigia LF, Buscemi L, Pagano I, Oviedo C, et al. New mutation in 23S rRNA gene associated with high level of azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(4):1652–53.

73. Starnino S, Stefanelli P, *Neisseria gonorrhoeae* Italian Study Group. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1200–4.
74. Katz AR, Komeya AY, Soge OO, Kiaha MI, Lee MV, Wasserman GM, 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):841–43.
75. 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 gonorrhoea? *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):624–25.
76. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010: oral cephalosporins no longer a recommended treatment for gonococcal infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012;61:590–594.
77. Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2013;24:85–92.
78. Newman LM, Moran JS, Workowski KA. Update on the management of gonorrhoea in adults in the United States. *Clin Infect Dis.* 2007;44(3):S84–101.
79. Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhoea: the impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(4):555–77.
80. Ison CA, Mouton JW, Jones K, Fenton KA, Livermore DM. Which cephalosporin for gonorrhoea? *Sex. Transm. Infect.* 2004 ;80(5):386–388.
81. 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.
82. Deguchi T, Yasuda M, Yokoi S, Ishida K, Ito M, Ishihara S, et al. Treatment of uncomplicated gonococcal urethritis by double-dosing of 200 mg cefixime at a 6-h interval. *J Infect Chemother.* 2003;9(1):35–9.
83. Ito M, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Takahashi Y, Ishihara S, et al. Remarkable increase in central Japan in 2001–2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to penicillin, tetracycline, oral cephalosporins, and fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(8):3185–7.
84. Yokoi S, Deguchi T, Ozawa T, Yasuda M, Ito S, Kubota Y, et al. Threat to cefixime treatment for gonorrhoea. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(8):1275–1277.

85. Akasaka S, Muratani T, Yamada Y, Inatomi H, Takahashi K, Matsumoto T. Emergence of cephem- and aztreonam-high-resistant *Neisseria gonorrhoeae* that does not produce beta-lactamase. *J Infect Chemother*. 2001;7(1):49–50.
86. Chisholm SA, Mouton JW, Lewis DA, Nichols T, Ison CA, Livermore DM. Cephalosporin MIC creep among gonococci: time for a pharmacodynamic rethink? *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2141–8.
87. Swedberg G, Fermér C, Sköld O. Point mutations in the dihydropteroate synthase gene causing sulfonamide resistance. *Adv Exp Med Biol*. 1993;338:555–8.
88. Unemo M, Ison CA, Cole M, Spiteri G, van de Laar M, Khotenashvili L. Gonorrhoea and gonococcal antimicrobial resistance surveillance networks in the WHO European Region, including the independent countries of the former Soviet Union. *Sex Transm Infect*. 2013;89(Suppl 4):iv42–46.
89. Lo JY, Ho KM, Leung AO, Tiu FS, Tsang GK, Lo AC, et al. Cefitibuten resistance and treatment failure of *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3564–7.
90. Su X, Jiang F, Qimuge Dai X, Sun H, Ye S. Surveillance of antimicrobial susceptibilities in *Neisseria gonorrhoeae* in Nanjing, China, 1999–2006. *Sex Transm Dis*. 2007;34(12):995–9.
91. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1273–80.
92. Allen VG, Mitterni L, Seah C, Rebbapragada A, Martin IE, Lee C, et al. *Neisseria gonorrhoeae* treatment failure and susceptibility to cefixime in Toronto, Canada. *JAMA*. 2013;309(2):163–170.
93. Ison CA, Hussey J, Sankar KN, Evans J, Alexander S. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Euro Surveill*. 2011;16(14):pii:19833.
94. 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.
95. Unemo M, Golparian D, Stary A, Eigentler A. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(43):pii:19998.
96. 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. Euro Surveill. 2010;15(47):pii:19721.

97. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. Antimicrob. Agents Chemother. 2011;55(7):3538–45.

98. Chen YM, Stevens K, Tideman R, Zaia A, Tomita T, Fairley CK, et al. Failure of ceftriaxone 500 mg to eradicate pharyngeal gonorrhoea, Australia. J Antimicrob Chemother. 2013;68(6):1445–7.

99. Read PJ, Limnios EA, McNulty A, Whiley D, Lahra LM. One confirmed and one suspected case of pharyngeal gonorrhoea treatment failure following 500 mg ceftriaxone in Sydney, Australia. Sex Health. 2013;10(5):460–2.

100. Unemo M, Golparian D, Hestner A. Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden, July 2010. Euro Surveill. 2011;16(6):1–3.

101. Unemo M, Golparian D, Potocnik M, Jeverica S. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. Euro Surveill. 2012;17(25):1–4.

102. Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, Ardanuy C. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. J Antimicrob Chemother. 2012;67(8):1858–60.

103. Shimuta K, Unemo M, Nakayama S, Morita-Ishihara T, Dorin M, Kawahata T, et al. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(11):5225–32.

104. Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F. Guía de terapéutica antimicrobiana. Barcelona: Editorial Antares; 2014.

105. Endiamiani A, Guilarte YN, Tinguely R, Hirzberger L, Selvini S, Lupo A, et al. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Switzerland (1998-2012): emergence of multidrug-resistant clones less susceptible to cephalosporins. BMC Infect Dis. 2014;14:106.

106. Ashford WA, Golash RG, Henning VG. Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet. 1976; 2(7987):657–8.

107. Phillips I. Beta-lactamase producing penicillin-resistant gonococcus. Lancet ii. 1976;2(7987):656–7.

108. Furuya R, Onoye Y, Kanayama A, Saika T, Iyoda T, Tatewaki M, et al. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population. *J. Infect. Chemother.* 2007;13(5):302–4.
109. Saika T, Nishiyama T, Kanayama A, Kobayashi I, Nakayama H, Tanaka M, et al. Comparison of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from the genital tract and pharynx of two gonorrhoea patients. *J Infect Chemother.* 2001;7(3):175–9.
110. Sox TE, Mohammed W, Sparling PF. Transformation-derived *Neisseria gonorrhoeae* plasmids with altered structure and function. *J Bacteriol.* 1979;138(2):510–8.
111. Fermer C, Kristiansen BE, Sköld O, Swedberg G. Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* as defined by site-directed mutagenesis could have its origin in other species. *J Bacteriol.* 1995;177(6):4669–75.
112. Johnson SR, Morse SA. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: genetics and mechanisms of resistance. *Sex Transm Dis.* 1988;15(4):217–24.
113. Elwell LP, Roberts M, Mayer LW, Falkow S. Plasmid-mediated beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977;11(3):528–33.
114. Roberts M, Elwell LP, Falkow S. Molecular characterization of two beta-lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1977;131(2):557–63.
115. Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):769–77.
116. Sparling PF, Sarubbi FA, Blackman E. Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 1975;124(2):740–9.
117. 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):2300–8.
118. 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.

119. Helm RA, Barnhart MM, Seifert HS. *pilQ* missense mutations have diverse effects on PilQ multimer formation, piliation, and pilus function in *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. 2007;189(8):3198–3207.
120. Burdett V. Purification and characterization of Tet(M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. J Biol Chem. 1991;266(5):2872–7.
121. Roberts MC, Knapp JS. Host range of the conjugative 25.2- megadalton tetracycline resistance plasmid from *Neisseria gonorrhoeae* and related species. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32(4):488–91.
122. Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas RA. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rpsJ* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:4327–34.
123. Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P. Spectinomycin resistance in *Neisseria* spp. due to mutations in 16S rRNA. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:1365–6.
124. Iliina EN, Malakhova MV, Bodoev IN, Oparina NY, Filimonova AV, Govorun VM. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Front Microbiol. 2013;4:186.
125. Belland RJ, Morrison SG, Ison C, Huang WM. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluororoquinolone-resistant isolates. Mol Microbiol. 1994;14(2):371–80.
126. 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.
127. Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, et al. Erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral commensal *Neisseria* spp. carry known rRNA methylase genes. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(6):1367–72.
128. Ng LK, Martin I, Liu G, Bryden L. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(9):3020–5.
129. Zarantonelli L, Borthagaray G, Lee EH, Veal W, Shafer WM. Decreased susceptibility to azithromycin and erythromycin mediated by a novel *mtrR* promoter mutation in *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 2001;47(5):651–4.
130. Rouquette-Loughlin CE, Balthazar JT, Shafer WM. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 2005;56(5):856–60.

131. World Health Organization (WHO). Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO; 2012. [consultado el 14 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/>
132. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Response plan to control and manage the threat of multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. Stockholm: ECDC; 2012.
133. Bignell C, Fitzgerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS*. 2011;22(10):541–547.
134. Kirkcaldy RD. Treatment of gonorrhoea in an era of emerging cephalosporin resistance and results of a randomized trial of new potential treatment options, abstr SO8.1. *Sex Transm Infect*. 2013;89:A14–5.
135. Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, Mapanje C, Kanyamula H, Banda B, et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis*. 2010;37(3):169–72.
136. Ross JD, Lewis DA. Cephalosporin resistant *Neisseria gonorrhoeae*: time to consider gentamicin? *Sex Transm Infect*. 2012;88(1):6–8.
137. Chisholm SA, Quaye N, Cole MJ, Fredlund H, Hoffmann S, Jensen JS, et al. An evaluation of gentamicin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):592–5.
138. Dowell D, Kirkcaldy RD. Effectiveness of gentamicin for gonorrhoea treatment: systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2013;89(1049):142–7.
139. 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 various high-level antimicrobial resistance—potential treatment option for gonorrhoea? *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2739–42.
140. Unemo M, Golparian D, Limnios A, Whiley D, Ohnishi M, Lahra MM, et al. *In vitro* activity of ertapenem vs. 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):3603–9.
141. Bachmann LH, Johnson RE, Cheng H, Markowitz L, Papp JR, Palella FJ, et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1827–32.
142. Elias J, Frosch M, Vogel U. *Neisseria*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH Landry ML, Warnock DW, eds. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed.



- Washington, DC: American Society of Microbiology; 2011:559–603.
143. Pace PJ, Catlin BW. Characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated on selective and nonselective media. *Sex Transm Dis.* 1986;13(3):29–39.
144. Thayer JD, Martin JE. Improved selective medium for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public Health Rep.* 1966;81(6):559–62.
145. Faur YC, Weisburd MH, Wilson ME, May PS. A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC medium). I. Formulation and comparisons with standard media. *Health Lab Sci.* 1973;10(2):44–52.
146. Clinical and Laboratory Standards Institute.; M100-S22. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement CLSI, Wayne, Pa. Vol 32. No 3. January 2012
147. Unemo M, Fasth O, Fredlund H, Limnios A, Tapsall J. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1142–51.
148. Tapsall JW, Cheng JK. Rapid identification of pathogenic species of *Neisseria* by carbohydrate degradation tests. Importance of glucose in media used for preparation of inocula. *Br J Vener Dis.* 1981;57(4):249–52.
149. Dillon JR, Carballo M, Pauzé M. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic *Neisseria* species: *Neisseria*-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitex, Gonochek II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GC OMNI Test, and Syva MicroTrak Test. *J Clin Microbiol.* 1988;26(3):493–7.
150. Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT, Gonococcus Antimicrobial Resistance Surveillance Working Group. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(4):218–9.
151. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2011 Stockholm; 2013. [consultado el 15 Oct 2014]. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-27-mar-2013.pdf>
152. Alexander S, Ison C. Evaluation of commercial kits for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Microbiol.* 2005;54(9):827–31.
153. Ilina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, et al. Direct bacterial profiling by matrix- assisted laser desorption-ionization time-

of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *J Mol Diagn*. 2009;11(1):75–86.

154. Ilina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, Svistunova TS, et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *Mol Diagn*. 2009;11(1):75–86.

155. Bachmann LH, Johnson RE, Cheng H, Markowitz L, Papp JR, Palella FJ Jr, et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1827–32.

156. Mimiaga MJ, Helms DJ, Reisner SL, Grasso C, Bertrand T, Mosure DJ, et al. Gonococcal, chlamydia, and syphilis infection positivity among MSM attending a large primary care clinic, Boston, 2003 to 2004. *Sex Transm Dis*. 2009;36(8):507–11.

157. Schachter J, Moncada J, Liska S, Shayevich C, Klausner JD, et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. *Sex Transm Dis*. 2008;35(7):637–42.

158. Alexander S. The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more? *Sex Transm Infect*. 2009;85(3):159–60.

159. Whiley DM, Garland SM, Harnett G, Lum G, Smith DW, Tabrizi SN, et al. Exploring 'best practice' for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Health*. 2008;5(1):17–23.

160. Golparian D, Tabrizi SN, Unemo M. Analytical specificity and sensitivity of the APTIMA Combo 2 and APTIMA GC assays for detection of commensal *Neisseria* species and *Neisseria gonorrhoeae* on the Gen-Probe Panther instrument. *Sex Transm Dis*. 2013;40(2):175–8.

161. Katz AR, Effler PV, Ohye RG, Brouillet B, Lee MV, Whitticar PM. False-positive gonorrhea test results with a nucleic acid amplification test: the impact of low prevalence on positive predictive value. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):814–9.

162. Smith DW, Tapsall JW, Lum G. Guidelines for the use and interpretation of nucleic acid detection tests for *Neisseria gonorrhoeae* in Australia: a position paper on behalf of the Public Health Laboratory Network. *Commun Dis Intell*. 2005;29(4):358–65.

163. NCCLS.\* Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard — Eighth edition. Wayne, PA: NCCLS, 2003. NCCLS document no. M02-A8.

164. The British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) disc diffusion method

(BSAC). [consultado el 15 Mar 2014]. Disponible en: [www.bsac.org.uk](http://www.bsac.org.uk)

165. Dillon J-A R, Starnino S. Manual de laboratorio: identificación y evaluación de la susceptibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* a los antibióticos para el programa de vigilancia de la susceptibilidad de los gonococos a los agentes antimicrobianos en America Latina y el Caribe(GASP-LAC) (2ª ed). University of Saskatchewan: Canada;2011.

166. Liao C, Lai C, Hsu M, Chu F, Wu M, Huang Y, et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(5):457–60

167. O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972;1(4):283–8.

168. Aydin D, Koksalan K, Komec S, Aktas G. Auxo-, sero-, and opa-typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Istanbul, Turkey. *Sex Transm Dis*. 2004;31(10):628–30.

169. O'Rourke M, Ison C.A, Renton AM, Spratt BG. Opa-typing: a high- resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoea. *Mol Microbiol*. 1995;17(5):865–75.

170. Cooke SJ, de la Paz H, La Poh C, Ison CA, Heckels JE. Variation within serovars of *Neisseria gonorrhoeae* detected by structural analysis of outer-membrane protein PIB and by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiology*. 1997;143(Pt 4):1415–22.

171. Unemo M, Olcen P, Albert J, Fredlund H. Comparison of serologic and genetic porB-based typing of *Neisseria gonorrhoeae*: consequences for future characterization. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4141–7.

172. Viscidi RP, Demma JC. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* housekeeping genes. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):197–204.

173. Kushnir AV, Muminov TA, Bayev AI, Khrapov EA, Filipenko ML. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Almaty, Kazakgstan, by VNTR analysis, Opa-typing and NG-MAST. *Infect Genet Evol*. 2012;12(3):570-6.

174. Clinical and Laboratory Standards Institute.; Approved standard- Eleven edition. M02-A11. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI, Wayne, Pa. Vol 32. No 1. January 2012

175. Clinical and Laboratory Standards Institute.; M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically;Ninth edition, CLSI. Vol. 32. No.2.212

176. EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_4.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf).
177. Landis JF, Kock GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
178. Sexually Transmitted Diseases Data & Statistics 2013 Sexually Transmitted Diseases Surveillance National Profile. Gonorrhoea. [consultado el 25 Ene 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/std/stats13/gonorrhoea.htm> A-Z  SEARCH
179. Savage EJ, Marsh K, Duffell S, Ison CA, Zaman A, Hughes G. Rapid increase in gonorrhoea and syphilis diagnoses in England in 2011. *Euro Surveill*. 2012; 17(29):pii:20224.
180. Dodds JP, Nardone A, Mercey DE, Johnson AM. Increase in high risk sexual behaviour among homosexual men, London 1996-8: cross sectional, questionnaire study. *BMJ*. 2000;320(7248):1510–1.
181. Pérez K, Rodes A, Casabona J. Monitoring HIV prevalence and behaviour of men who have sex with men in Barcelona, Spain. *Euro Surveill*. 2002;7(2):19–22.
182. Vall M, Sanz B, Loureiro E, Armengol P. Infecciones de transmisión sexual en Barcelona más allá del 2000. *Med Clin (Barc)*. 2004;122(1):18–20.
183. 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.
184. UK The Collaborative Group for HIV and STI Surveillance: Testing Times. HIV and other Sexually Transmitted Infections in the United Kingdom: 2007. London: Health Protection Agency, Centre for Infections; 2007.
185. 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*. 2015 Feb 27. pii: S0213-005X(15)00066-X.
186. Diaz A, Garriga C, Varela JA, Fernández E, Sanz I, Boronat J, et al. Gonorrhoea diagnoses in a network of STI clinics in Spain during the period 2006–2010: differences by sex and transmission route. *BMC Public Health*. 2013;13:1093. doi:10.1186/1471-2458-13-1093.
187. Folch C, Esteve A, Sanclemente C, Martró E, Lugo R, Molinos S, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus, *Chlamydia trachomatis*, and *Neisseria gonorrhoeae* and risk factors for sexually transmitted infections among immigrant female sex workers in Catalonia, Spain. *Sex Transm Dis*. 2008;35(2):178–83.

188. Mayans M, Villa M, Saravanya M, Loureiro E, Meroño M, Arellano E, et al. Sexually transmitted Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and HIV-1 infections in two at-risk populations in Barcelona: female street prostitutes and STI clinic attendees. *Int J Infect Dis.* 2007;11(2):115–22.
189. Tanaka M, Koga Y, Nakayama H, Kanayama A, Kobayashi I, Saika T, et al. Antibiotic-resistant phenotypes and genotypes of Neisseria gonorrhoeae isolates in Japan: identification of strain clusters with multidrug-resistant phenotypes. *Sex Transm Dis.* 2011;38(9):871–5.
190. Marcus U, Bremer V, Hamouda O, Kramer MH, Freiwald M, Jessen H, et al. Understanding recent increases in the incidence of sexually transmitted infections in men having sex with men: Changes in risk behaviour from risk avoidance to risk reduction. *Sex Trams Dis.* 2006;33(1):11–7.
191. Hook EW, Handsfield HH. Gonococcal infections in the adult. In: Holmes KK, Sparling PF, Stamm WE, et al. eds. *Sexually Transmitted Diseases*, 4th edition. New York: McGraw Hill, Inc.;2008:627–45.
192. Delpech V, Martin IM, Hughes G, Nichols T, James L, Ison CA, Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme Steering Group. Epidemiology and clinical presentation of gonorrhoea in England and Wales: findings from the Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme 2001-2006. *Sex Transm Infect.* 2009;85(5):317–21.
193. Situación epidemiológica de VIH/SIDA y las ITS. Plan del sida e ITS, año 2013, País Vasco [consultado el 10 Feb 2015]. Disponible en: [https://www.euskadi.eus/r85-cksida05/es/contenidos/informacion/sida\\_epidemiologia/es\\_sida/epidemiologia.html](https://www.euskadi.eus/r85-cksida05/es/contenidos/informacion/sida_epidemiologia/es_sida/epidemiologia.html)
194. Área de Vigilancia de VIH y Conductas de Riesgo. Vigilancia Epidemiológica del VIH/sida en España: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Plan Nacional sobre el Sida - S.G. de Promoción de la Salud y Epidemiología / Centro Nacional de Epidemiología - ISCIII. Madrid; Madrid; 2013.
195. Van der Hayden JHA, Catchpole MA, Pager WJ, Stroobant A. Trends in gonorrhoea in nine western European countries, 1991–6. *Sex Transm Inf.* 2000;76(2):110–6.
196. Bhuiyan BU, Rahman M, Miah MR, Nahar S, Islam N, Ahmed M, et al. Antimicrobial susceptibilities and plasmid contents of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from commercial sex workers in Dhaka, Bangladesh: emergence of high-level resistance to ciprofloxacin. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(4):1130–6.
197. Hjelmevoll SO, Golparian D, Dedi L, Skutlaberg DH, Haarr E, Christensen A et al. Phenotypic and genotypic properties of Neisseria gonorrhoeae isolates in Norway in

2009: antimicrobial resistance warrants an immediate change in national management guidelines. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(6):1181–6.

198. Olsen B, Hadad R, Fredlund H, Unemo M. The *Neisseria gonorrhoeae* population in Sweden during 2005-phenotypes, genotypes and antibiotic resistance. *APMIS.* 2008;116(3):181–9.

199. Risley CL, Ward H, Choudhury B, Bishop CJ, Fenton KA, Spratt BG, et al. Geographical and demographic clustering of gonorrhoea in London. *Sex Transm Infect.* 2007;83(6):481–7.

200. Eastick K. Gonococcal antibiotic surveillance in Scotland (GASS): prevalence, patterns and trends in 2009. *Health Protection Scotland Weekly Report.* 2010;44(34).

201. Unemo M, Golparian D, Stary A, Eigentler A. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(43):pii=19998.

202. Cole MJ, Spiteri G, Town K, Unemo M, Hoffmann S, Chisholm SA, et al. Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. *Sex Transm Dis.* 2014;41(12):723–9.

203. Lebedzeu F, Golparian D, Titov L, Pankratava N, Glazkova S, Shimanskaya I, et al. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010–2013. *BMC Infect Dis.* 2015;15:29.

204. Katz AR, Komeya AY, Soge OO, Kiaha MI, Lee MV, Wasserman GM, Maningas EV, 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 .

205. 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.

206. Tan NJ, Rajan VS, Pang R, Sng EH . Gentamicin in the treatment of infections due to penicillinase-producing gonococci. *Br J Vener Dis.* 1980;56(6):394–6.

207. Lule G, Behets FM, Hoffman IF, Dallabetta G, Hamilton HA, Moeng S, et al. STD/HIV control in Malawi and the search for affordable and effective urethritis therapy: A first field evaluation. *Genitourin Med.* 1994;70(6):384–8.

208. Dowell D, Kirkcaldy RD. Effectiveness of gentamicin for gonorrhoea treatment: systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2012;88(8):589–94.

209. Hira SK, Attili VR, Kamanga J, Mkandawire O, Patel JS, Patel MI. Efficacy of gentamicin and kanamycin in the treatment of uncomplicated gonococcal urethritis in Zambia. *Sex Transm Dis.* 1985;12(1):52–4.
210. Sutrisna A, Soebjako O, Wignall FS, Kaul S, Limnios EA, Ray S, et al. Increasing resistance to ciprofloxacin and other antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae* from East Java and Papua, Indonesia, in 2004—implications for treatment. *Int J STD AIDS.* 2006;17(12):810–2.
211. Costello D, Hoffman I, Hobbs M, Maida M, Zimba D, Davis R, et al. Development of an Antimicrobial Susceptibility Surveillance System for *Neisseria gonorrhoeae* in Malawi: Comparison of Methods. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2985–8.
212. Biedenbach DJ, Jones RN. Comparative assessment of E test for testing susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin, tetracycline, ceftriaxone, cefotaxime and ciprofloxacin: investigation using 510 (k) review criteria, recommended by the Food and Drug Administration. *J Clin Microbiol.* 1996;34(12):3214–7.
213. Bala M, Ray K, Gupta SM. Comparison of disc diffusion results with minimum inhibitory concentration (MIC) values for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Med Res.* 2005;122(1):48–51
214. Khaki P, Sharma A, Bhalla P. Comparison of two disc diffusion methods with minimum inhibitory concentration for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria Gonorrhoeae* isolates. *Ann Med Health Sci Res.* 2014;4(3):453–6.
215. Mehaffey PC, Putnam SD, Barrett MS, Jones RN. Evaluation of *in vitro* spectra of activity of azithromycin, clarithromycin and erythromycin tested against strains of *Neisseria gonorrhoeae* by reference agar dilution, disc diffusion and E test methods. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(2):479–81.
216. Guoming L, Qun C, Shengchun W. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* epidemic strains to antibiotics: report of resistant isolates and surveillance in Zhanjiang, China: 1998 to 1999. *Sex Transm Dis.* 2000;2(2):115–8.
217. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill.* 2013;18(3):pii=20358.
218. Kubanova A, Kubanov A, Frigo N, Solomka V, Semina V, Vorobyew D, et al. Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP) – resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during 2009–2012 and NG-MAST genotypes in 2011 and 2012. *BMC Infectious Diseases.* 2014;14:342.

219. Huang CT, Yen MY, Wong WW, Li LH, Lin KY, Liao MH, et al. Characteristics and dissemination of mosaic penicillin-binding protein 2-harboring multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced cephalosporin susceptibility in northern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4893–5.
220. Martin I, Sawatzky P, Allen V, Hoang L, Lefebvre B, Mina N, et al. Emergence and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and cefixime in Canada: 2001–2010. *Sex Transm Dis.* 2012;39(4):316–23.
221. Florindo C, Pereira R, Boura M, Nunes B, Paulino A, Gomes JP et al. Genotypes and antimicrobial-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Portugal (2004–2009). *Sex Transm Infect.* 2010;86(6):449–53.
222. Horn NN, Kresken M, Körber-Irrgang B, Göttig S, Wichelhaus C, Wichelhaus TA. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(5-6):586–91.
223. Hjelmevoll SO, Golparian D, Dedi L, Skutlaberg DH, Haarr E, Christensen A et al. Phenotypic and genotypic properties of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Norway in 2009: antimicrobial resistance warrants an immediate change in national management guidelines. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(6):1181–6.
224. Chisholm SA, Alexander S, Desouza-Thomas L, Maclure-Webster E, Anderson J, Nichols T, et al. Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* clone showing decreased susceptibility to cefixime in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(11):2509–12.
225. Unemo M, Golparian D, Syversen G, Vestheim DF, Moi H. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(47):pii=19721.
226. 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):454–460.
227. Carannante A, Prignano G, Cusini M, Matteelli A, Dal Conte I, Ghisetti V, et al. Cefixime and ceftriaxone susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Italy from 2006 to 2010. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(6):558–64.
228. Pandori M, Barry PM, Wu A, Ren A, Whittington WL, Liska S, et al. Mosaic penicillin-binding protein 2 in *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in 2008 in San Francisco, California. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):4032–4.
229. Tapsall JW, Ray S, Limnios A. Characteristics and population dynamics of mosaic penA allele-containing *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in Sydney, Australia, in 2007–2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):554–6.



230. Lo JY, Ho KM, Lo AC. Surveillance of gonococcal antimicrobial susceptibility resulting in early detection of emerging resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(6):1422–6.

231. Shigemura K, Osawa K, Miura M, Tanaka K, Arakawa S, Shirakawa T, et al. Azithromycin resistance and its mechanism in *Neisseria gonorrhoeae* in Hyogo, Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2695–9.



## **8. ANEXOS**



ANEXO I

**Hoja de recogida de información de pacientes con ITS**

CENTRO \_\_\_\_\_ Nº de historia / paciente: \_\_\_\_\_

**Características sociodemográficas**

1. Sexo:  hombre  mujer  
 travesti / transexual
2. Fecha de nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Día Mes Año
3. Nivel de estudios:
- ninguno  primarios  secundarios  
 superiores  desconocido
4. País de origen:
- España  
 Otros. Especificar: \_\_\_\_\_

**Datos clínicos**

5. Diagnóstico (señalar las que procedan):
- Sífilis primaria  Sífilis secundaria  
 Sífilis latente precoz  Infección gonocócica
6. El diagnóstico se ha realizado como consecuencia de:
- Manifestaciones clínicas  Cribaje  
 Investigación de contactos
7. ¿Se ha realizado confirmación por métodos de laboratorio?
- No  Sí
8. Localización anatómica de la infección (dejar en blanco en el caso de sífilis latente precoz):
- Anorrectal  Orofaringea  Cervical  
 Uretral  Otra: \_\_\_\_\_
9. Fecha de diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Día Mes Año
10. ¿El paciente presenta otra ITS de forma concurrente? :
- No  Sí (Especificar):
- Clamidiasis  Tricomoniasis  
 Condilomas  Herpes genital  
 Hepatitis B  Molluscum  
 Otras: \_\_\_\_\_

11. Situación actual frente a la infección por VIH:
- VIH (+) previo  VIH(+) diagnosticado con motivo de la ITS  
 VIH (-)  VIH (No consta)
12. Tipo de paciente:
- Nuevo  Ya conocido

**Antecedentes personales**

13. Antecedentes de ITS:
- Sí  No  No sabe, no contesta

**Mecanismo de transmisión más probable**

14. Mecanismo de transmisión más probable de la ITS actual (señalar todas las que procedan):
- Relaciones **homosexuales** no protegidas:  
 Anal  Oral  No consta
- Relaciones **heterosexuales** no protegidas  
 Vaginal  Anal  Oral  No consta
- Otras. Especificar \_\_\_\_\_
15. ¿Este episodio de ITS se atribuye a un accidente con el preservativo? :
- Sí  No  No sabe
16. País donde probablemente ocurrió la infección:
- España  
 Otros. Especificar: \_\_\_\_\_

**Perfil de riesgo**

17. Señalar TODAS las que procedan:
- Ejercicio de la prostitución  
 Contacto sexual con prostitución  
 Relación sexual con contacto esporádico  
 Relación sexual con pareja estable  
 Relación sexual con una persona que el paciente sabía que estaba infectada por VIH  
 Relación sexual con pareja estable infectada por VIH
18. Nº aproximado de parejas sexuales en los últimos 12 meses: \_\_\_\_\_

Observaciones: