



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Tesi doctoral**

***Neisseria gonorrhoeae:*  
monitorització de la sensibilitat antimicrobiana,  
estudi de la dinàmica poblacional i  
caracterització molecular de les resistències.**

**Autor: Judit Serra Pladevall**

**Directora i tutora: Antònia Andreu Domingo**

Programa de doctorat en Microbiologia  
Departament de Genètica i de Microbiologia  
Facultat de Biociències  
Universitat Autònoma de Barcelona

2016



Tesi doctoral

***Neisseria gonorrhoeae*:**  
**monitorització de la sensibilitat antimicrobiana,**  
**estudi de la dinàmica poblacional i**  
**caracterització molecular de les resistències.**

Autor:

**Judit Serra Pladevall**

Per optar al grau acadèmic de:

**Doctor**

Treball realitzat al Servei de Microbiologia del Hospital Universitari Vall  
d'Hebron de Barcelona, sota la direcció de:

**Dra. Antònia Andreu Domingo**



Judit Serra



Dra. Antònia Andreu

Barcelona, setembre 2016

*“Hi ha una força motriu més poderosa que el vapor,  
l’electricitat i l’energia atòmica: la voluntat”*

**Albert Einstein**



## Agraïments

---

L'elaboració i redacció d'aquesta tesi no hauria set possible sense el suport incondicional de totes aquestes persones que sempre estan al meu costat i sempre tenen alguna paraula d'ànim, una abraçada o simplement un somriure.

Primer de tot vull agrair a la meva directora de tesi, l'Antònia Andreu. Sense el seu entusiasme, les seves ganes de treballar i ensenyar, la seva persistència i eficiència, segurament avui no estaria on estic. A part del seu paper imprescindible en l'elaboració d'aquesta tesi, també m'ha ajudat molt a créixer professionalment, crec que més del que s'imagina. Tot va començar sent jo Resident de primer any, una noia de 23 anys que començava la residència al Servei de Microbiologia del Vall d'Hebron una mica espantada. Des del primer moment, literalment, perquè la meva primera rotació va ser per la Unitat d'Urocultius i Productes Genitals, em va acollir i em va ensenyar amb ganes i entusiasme. Gràcies per la seva ajuda i per la confiança que ha posat en mi.

També vull agrair a la Mercè Locutura, una persona amb un cor enorme. Malgrat que hem coincidir poc temps al laboratori, ha sorgit un vincle molt especial entre nosaltres. I això és degut a una persona que va ser molt important a la meva vida i amb la que la Mercè també va tenir l'oportunitat de compartir uns anys al seu costat, la meva àvia. Àvia siguis on siguis sé que estaries molt feliç de veure que ho he aconseguit. T'enyoro.

A tot l'equip del Servei de Microbiologia de la Vall d'Hebron, personal tècnic i facultatiu, que directament o indirecta han fet possible que aquest projecte es portés a terme.

Gràcies especials a l'equip de recerca del Servei de Microbiologia. A en Juanjo Gonzàlez, per haver-me ensenyat i donat suport des del principi en la part de biologia molecular. I gràcies a la Núria, la Thais i en Toni. "Xoxetes" tot i que he pogut estar amb vosaltres

# Agraïments

menys del que volia, trobo a faltar els “Salvame Deluxe” de després de dinar. Gràcies pels vostres consells, per estar sempre disposats a ajudar i simplement per ser-hi. Sou unes persones fantàstiques.

A la Nieves Larrosa, una persona també molt important durant els quatre anys de la meua residència, gràcies pels seus bons consells, pels ànims i simplement per ser-hi quan necessitava parlar.

Vull agrair de forma molt sincera als meus nous companys de feina, tot el personal de Microbiologia de Catlab. Em van obrir els braços des del primer moment, fent que treballar al seu costat fos molt fàcil i gratificant. Sobretot vull agrair a la Pepa Pérez, la seva paciència i la seva comprensió. Des del primer moment em va fer costat i em va facilitar que pogués compaginar les dues coses, treballar a Catlab com a microbiòloga i fer la tesi. És una gran persona i una gran jefa.

I finalment, a les persones que sempre m’han demostrat un amor incondicional passés el que passés. El meu marit, una persona carinyosa, amb un cor gegant, amb una paraula maca sempre apunt i simplement una persona amb la que ens complementem. Pep saps que sense tu res d’això hauria set possible. I als meus pares i al meu germà, sense vosaltres segur que avui no seria aquí. Gràcies pel vostre suport i amor incondicional. I també gràcies per aguantar el meu mal humor en els moments difícils.

A tots,

Moltes gràcies.





ASGP-R	Receptor asioliloglucoproteic
CDC	Centre of Diseases Control and Prevention
CEEISCAT	Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i el Sida de Catalunya
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentració mínima inhibidora
CT	Threshold cycle
DHPS	Dihidropteroat sintetasa
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ESCs	Cefalosporines d'espectre estès
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Euro-GASP	European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
HSH	Homes que tenen sexe amb homes
ITS	Infecció de transmissió sexual
LNnt	Lacto-N-neotetraosa terminal
LOS	Lipooligosacàrid
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-flight
MLST	Multilocus sequence typing
NG-MAST	Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing
PBP	Penicillin-binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PMN	Polimorfonuclears
SD	Sensibilitat disminuïda
SNP	Single nucleotide polymorphism
TNF	Factor de necrosi tumoral



<b>1. Introducció.....</b>	<b>16</b>
1.1	Importància de la infecció gonocòccica en Salut Pública com a motivació per aquest estudi.....16
1.2	Història de la infecció causada per <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....17
1.3	Epidemiologia.....18
1.3.1	Europa.....18
1.3.2	Espanya.....22
1.3.3	Catalunya.....23
1.4	Descripció de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....24
1.4.1	Característiques microbiològiques.....24
1.4.2	Estructures de superfície.....25
1.4.3	Patogènia.....27
1.5	Manifestacions clíniques.....29
1.5.1	Infeccions urogenitals.....29
1.5.2	Infeccions extra-genitals.....30
1.5.3	Infeccions en la infància.....31
1.6	Diagnòstic.....33
1.6.1	Presa de mostra.....33
1.6.2	Diagnòstic convencional.....34
1.6.3	Tècniques d'amplificació d'àcids nucleics.....35
1.6.4	Altres eines diagnòstiques.....37
1.7	Epidemiologia molecular.....37
1.8	Sensibilitat antimicrobiana i tractament.....39

1.8.1	Estudi de la sensibilitat antimicrobiana.....	39
1.8.2	Història dels règims de tractament i evolució de la resistència.....	40
1.8.3	Mecanismes de resistència antimicrobiana.....	44
1.9.	Perspectives de futur.....	51
<b>2.</b>	<b>Hipòtesi i objectius.....</b>	<b>58</b>
2.1	Objectiu general.....	58
2.2	Objectius específics.....	58
<b>3.</b>	<b>Resultats.....</b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>Discussió.....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>98</b>
<b>Annex I.....</b>		<b>114</b>
<b>Annex II.....</b>		<b>131</b>

# Sumari figures i quadres

---

<b>Figura 1.</b> Número de casos diagnosticats per any, 2004-2013.....	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b> Número de casos per 100.000 habitants per any, 2004-2013.....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Número de casos per 100.000 habitants, 2013.....	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Comparació dels percentatges de casos per grup d'edat, 2004 (n=29.285) i 2013 (n=43.234).....	<b>20</b>
<b>Figura 5.</b> Percentatge de casos per gènere i categoria de transmissió.....	<b>21</b>
<b>Figura 6.</b> Evolució de la taxa de casos per 100.000 habitants, 2004-2013.....	<b>21</b>
<b>Figura 7.</b> Taxa d'incidència per 100.000 habitants, 2008-2013. Red Nacional de Vigilancia Epidemiològica.....	<b>22</b>
<b>Figura 8.</b> Incidència de la infecció gonocòccica per Comunitats Autònomes. Red Nacional de Vigilancia Epidemiològica.....	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b> Evolució dels casos de gonocòccica en el període 2005-2014. Registre de MDO individualitzada de Catalunya. CEEISCAT.....	<b>24</b>
<b>Figura 10.</b> Etapes en la patogènesis de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 11.</b> Història del descobriment dels antimicrobians, el seu ús i el desenvolupament de resistències.....	<b>41</b>
<b>Figura 12.</b> Sexe i procedència dels pacients.....	<b>104</b>
<b>Figura 13.</b> Tipus de mostra.....	<b>105</b>
<b>Figura 14.</b> Taxa de resistència de cada un dels antibiòtics durant el període estudiat....	<b>105</b>
<b>Figura 15.</b> Evolució de la resistència a la penicil·lina.....	<b>106</b>
<b>Figura 16.</b> Percentatge de soques resistents a penicil·lina productores de betalactamasa.....	<b>107</b>
<b>Figura 17.</b> Distribució de la CMI de ceftriaxona.....	<b>108</b>

## Sumari figures i quadres

---

<b>Figura 18.</b> Distribució de la CMI de cefixima.....	<b>109</b>
<b>Figura 19.</b> Evolució de la CMI <sub>50</sub> i CMI <sub>90</sub> .....	<b>109</b>
<b>Figura 20.</b> Evolució de la resistència a ciprofloxacino.....	<b>111</b>
<b>Figura 21.</b> Evolució de la resistència a azitromicina.....	<b>112</b>
<b>Figura 22.</b> Distribució de la CMI a gentamicina.....	<b>113</b>
<b>Figura 23.</b> Distribució de la CMI de fosfomicina.....	<b>115</b>
<b>Figura 24.</b> Taxa de multiresistència.....	<b>116</b>
<b>Taula 1.</b> Diagnòstic diferencial de la infecció gonocòccica.....	<b>32</b>
<b>Taula 2.</b> Característiques bioquímiques de microorganismes Gram negatiu, oxidasa positiu.....	<b>35</b>
<b>Taula 3.</b> Plataformes aprovades per la FDA i tipus de mostra i requeriments de transport d'aquestes.....	<b>36</b>
<b>Taula 4.</b> Determinants i mecanismes de resistència de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	<b>45</b>
<b>Taula 5.</b> Antígens pel desenvolupament de la vacuna enfront el gonococ.....	<b>55</b>
<b>Taula 6.</b> Dades dels pacients estudiats durant el període 2012-2016.....	<b>104</b>
<b>Taula 7.</b> Evolució de la resistència a la penicil·lina.....	<b>106</b>
<b>Taula 8.</b> Dades de resistència de <i>N. gonorrhoeae</i> del Euro-GASP.....	<b>110</b>





## 1. Introducció

### 1.1. Importància de la infecció gonocòccica en Salut Pública com a motivació per aquest estudi

La gonorrea es la segona infecció de transmissió sexual (ITS) d'etiologia bacteriana més prevalent. Actualment constitueix un important problema de Salut Pública global, no només perquè la seva incidència està augmentant, sinó també perquè *Neisseria gonorrhoeae* ha desenvolupat resistència a tots els antibiòtics utilitzats al llarg dels anys pel seu tractament, per la qual cosa podria convertir-la en una infecció intractable (1).

En els últims anys s'han documentat casos de fracàs terapèutic amb l'actual tractament de primera línia, i última opció terapèutica, les cefalosporines d'ampli espectre (cefixima i ceftriaxona) (2) així com també s'han documentat tres casos de resistència d'alt nivell a aquests antimicrobians (3) (4) (5) (6).

En resposta a aquests fets, en els últims anys, varies guies com les dels Estats Units (7), Regne Unit (8) i Europa (9), han introduït el tractament dual de la infecció gonocòccica, principalment amb ceftriaxona i azitromicina, tractament no disponible en molts països amb pocs recursos. Tot i així, la sensibilitat de *Neisseria gonorrhoeae* a la ceftriaxona està disminuint i la resistència a azitromicina està augmentant. Per tant, aquest tractament dual podria no ser una solució a llarg termini.

La crisi de Salut Pública a la que pot portar la resistència antimicrobiana del gonococ no pot subestimar-se, ja que provocaria un encariment dels règims de tractament, així com un augment dels costos produïts per les complicacions degudes al fracàs terapèutic. Donada l'alta prevalença de la infecció gonocòccica, el freqüent ús incontrolat dels antibiòtics, el control inadequat de la resistència antimicrobiana, els fracassos terapèutics, la insuficient actualització de les guies de tractament en molts països i la gran capacitat de *N. gonorrhoeae* per desenvolupar i mantenir resistència als antibiòtics, el

problema global de la resistència antimicrobiana podria empitjorar en els següents anys (10).

Per tant és necessari establir i mantenir programes de control per tal de monitoritzar la sensibilitat antimicrobiana i així mantenir actualitzades les guies de tractament en les diferents àrees geogràfiques. Per altra banda, entendre els mecanismes fenotípics i genotípics de resistència podria ajudar a preveure l'aparició de noves resistències, anticipar estratègies d'actuació per evitar-les i dissenyar nous antimicrobians.

Adicionalment, els estudis d'epidemiologia molecular també podrien contribuir a entendre millor els patrons de transmissió de la infecció gonocòccica en la població i detectar xarxes sexuals d'alt risc. Així es podrien dissenyar plans d'actuació per intervenir en aquestes xarxes i evitar la disseminació de la infecció.

En aquest estudi es vol monitoritzar la sensibilitat antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* i analitzar la seva epidemiologia molecular en una àrea geogràfica concreta, la ciutat de Barcelona. Barcelona és una ciutat amb 15.832 habitants per km<sup>2</sup>, sent la segona ciutat més poblada d'Espanya després de Madrid. És una ciutat molt cosmopolita, amb molt turisme, tant d'oci com de negocis. Darrerament s'ha convertit en un centre de referència de la vida nocturna a Europa. Una de les principals zones d'oci és el Casc Antic, repartit entre el barri d' El Raval i el barri Gòtic. En els últims anys han proliferat els locals d'ambient gay, sobretot en la zona de l'Eixample denominat "Gaixample". És, per tant, una ciutat amb molt moviment de població i amb la presència de xarxes sexuals d'alt risc sobre les que és important intervenir.

## **1.2. Història de la infecció causada per *Neisseria gonorrhoeae***

La gonorrea és una malaltia antiga sobre la qual ja feia referència l'Antic Testament (Antic Testament; Leviticus 15: 1-3). El segle II, Aelius Galenus, un filòsof i metge romà, va confondre l'exsudat purulent amb semen, i va introduir el terme "flux de semen" per

referir-se a la gonorrea. En anglès, el terme “the clap” va ser introduït el 1378 per referir-se a aquesta malaltia i prové del nom de l’antic barri parisenc, Les Clapiers.

El 1879, Albert Ludwing Sigismund Neisser, un bacteriòleg i metge alemany, va ser la primera persona a descriure el bacteri com a agent causant de la gonorrea i oficialment li va donar el nom de *Neisseria gonorrhoeae*. Leistikow i Löffler la van cultivar per primera vegada al 1882.

## 1.3. Epidemiologia

### 1.3.1. Europa

Segons les dades reportades per l’ “European Centre for Disease Prevention and Control” (11), al 2013 es van notificar 52.995 casos de gonorrea en 28 països europeus, la majoria (61%) van ser notificats al Regne Unit. Globalment, això representa una taxa de 16,9 casos per 100.000 habitant. En les figures 1 i 2 hi ha representats els casos de gonorrea notificats del 2004 al 2013 en aquests 28 països.

Country	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Austria	848	660	171	142	263	143	331	470	402	1148
Belgium			535	585	718	734	752	842	931	1011
Bulgaria	235	181	165	149	178	191	184	197	99	96
Croatia									14	14
Cyprus			8	5	2	7	23	11	6	2
Czech Republic	885	856	1087	1108	809	716	749	714	1142	1402
Denmark	416	445	414	352	409	563	482	501	673	817
Estonia	484	288	280	176	146	126	118	173	215	131
Finland	247	235	231	192	198	237	255	289	312	267
France	99	153	196	217	236	395	534	737	936	1349
Germany										
Greece	177	197	190	201	208	164	312	378	238	219
Hungary	742	851	916	1041	892	872	1170	1369	1487	1526
Iceland	9	19	31	24	25	47	18	32	29	19
Ireland	270	342	431	417	444	434	625	834	1139	1264
Italy	418	427	392	243	221	667	365	356	289	
Latvia	537	694	746	670	500	433	349	545	607	554
Liechtenstein										
Lithuania	482	433	437	471	533	391	315	248	219	190
Luxembourg		0	4	1	18	6	3	2	5	4
Malta			33	52	50	62	48	46	29	61
Netherlands	1656	1603	1778	1830	1969	2411	2815	3576	3998	4171
Norway	264	278	236	238	301	269	412	368	443	506
Poland			395	330	285	402	301	298	733	549
Portugal	28	52	53	74	67	114	89	120	120	116
Romania	2119	1678	1348	815	631	622	479	510	323	341
Slovakia			66	101	152	174	130	212	286	374
Slovenia			34	42	40	30	44	25	45	62
Spain	981	1155	1423	1698	1897	1954	2306	2640	3044	3314
Sweden	579	680	658	642	720	613	847	952	1090	1111
United Kingdom	22 234	19 189	18 801	18 631	16 451	17 653	18 718	23 319	28 787	32 377
<b>EU/EEA total</b>	<b>33710</b>	<b>30416</b>	<b>31059</b>	<b>30447</b>	<b>28363</b>	<b>30430</b>	<b>32774</b>	<b>39764</b>	<b>47641</b>	<b>52995</b>

Figura 1. Número de casos diagnosticats per any, 2004 – 2013 ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)).

Country	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Austria										
Belgium										
Bulgaria	3	2.3	2.1	2	2.4	2.6	2.5	2.7	1.4	1.3
Croatia									0.3	0.3
Cyprus			1.1	0.7	0.3	0.9	2.8	1.3	0.7	0.2
Czech Republic	8.7	8.4	10.6	10.8	7.8	6.9	7.2	6.8	10.9	13.3
Denmark	7.7	8.2	7.6	6.5	7.5	10.2	8.7	9	12.1	14.6
Estonia	35.4	21.2	20.7	13.1	10.9	9.4	8.9	13	16.2	9.9
Finland	4.7	4.5	4.4	3.6	3.7	4.4	4.8	5.4	5.8	4.9
France										
Germany										
Greece	1.6	1.8	1.7	1.8	1.9	1.5	2.8	3.4	2.1	2
Hungary										
Iceland	3.1	6.5	10.3	7.8	7.9	14.7	5.7	10	9.1	5.9
Ireland	6.7	8.3	10.2	9.6	10	9.6	13.7	18.2	24.9	27.5
Italy	0.7	0.7	0.7	0.4	0.4	0.6	0.6	0.6	0.5	
Latvia	23.6	30.8	33.5	30.3	22.8	20	16.5	26.3	29.7	27.4
Liechtenstein										
Lithuania	14.2	12.9	13.3	14.5	16.6	12.3	10	8.1	7.3	6.4
Luxembourg			0.9	0.2	3.7	1.2	0.6	0.4	1	0.7
Malta			8.1	12.8	12.3	15.1	11.6	11.1	6.9	14.5
Netherlands										
Norway	5.8	6	5.1	5.1	6.4	5.6	8.5	7.5	8.9	10
Poland			1	0.9	0.7	1.1	0.8	0.8	1.9	1.4
Portugal	0.3	0.5	0.5	0.7	0.6	1.1	0.8	1.1	1.1	1.1
Romania	9.8	7.8	6.3	3.9	3.1	3	2.4	2.5	1.6	1.7
Slovakia			1.2	1.9	2.8	3.2	2.4	3.9	5.3	6.9
Slovenia			1.7	2.1	2	1.5	2.1	1.2	2.2	3
Spain	2.3	2.7	3.2	3.8	4.2	4.2	5	5.7	6.5	7.1
Sweden	6.5	7.5	7.3	7	7.8	6.6	9.1	10.1	11.5	11.6
United Kingdom	37.2	31.9	31	30.5	26.7	28.5	29.9	37	45.3	50.7
<b>EU/EEA total</b>	<b>11.8</b>	<b>10.5</b>	<b>9</b>	<b>8.7</b>	<b>7.8</b>	<b>8.2</b>	<b>8.7</b>	<b>10.5</b>	<b>12.5</b>	<b>16.9</b>

Figura 2. Número de casos per 100.000 habitants per any, 2004 – 2013 (www.ecdc.europa.eu).

Pel que fa al sexe dels pacients, la proporció entre homes i dones al 2013 va ser de 2,9 enfront 1. El 2013, la taxa més alta (>15/100.000 habitants) es va documentar al Regne Unit seguit de Irlanda i Llatvia. Les taxes més baixes ( $\leq 1/100.000$  habitants) van ser a Croàcia, Xipre i Luxemburg (figura 3).

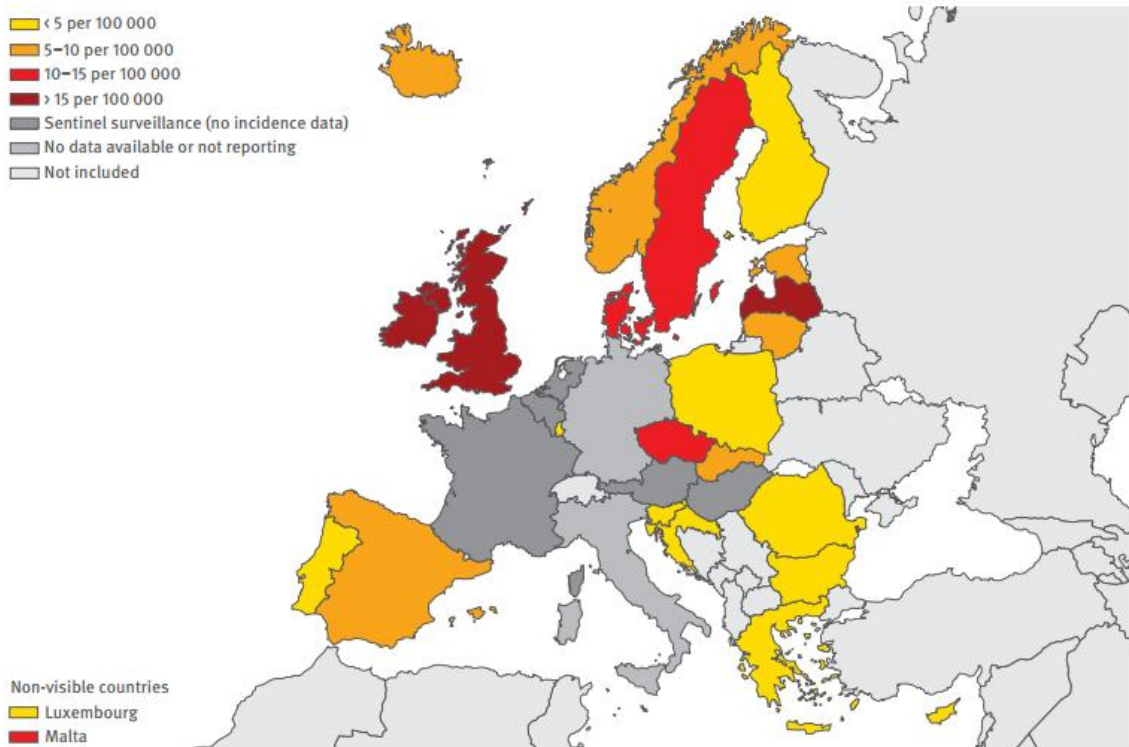


Figura 3. Número de casos per 100.000 habitants, 2013 ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)).

El grup d'edat comprès entre 25-34 anys va ser el de major prevalença, representant el 30% de tots els casos de l'any 2004 i el 35% dels de l'any 2013, seguit pels pacients entre 20-24 anys. En la figura 4 hi ha representat el percentatge de casos per grups d'edat els anys 2004 i 2013.

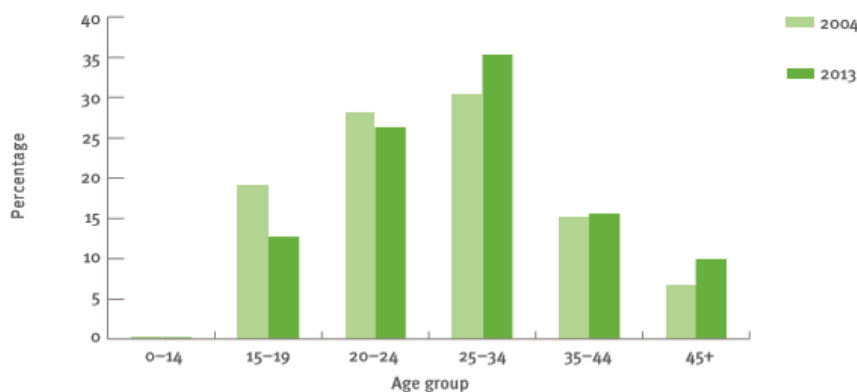


Figura 4. Comparació dels percentatges de casos per grup d'edat, 2004 (n=29.285) i 2013 (n=43.234) ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)).

L'any 2013, la informació sobre la categoria de transmissió estava disponible en 19 països. El 54% del casos van ser documentats en heterosexuals, el 43% en homes que tenen sexe

amb homes (HSH) i un 3% es desconeixia (figura 5). Els casos diagnosticats en HSH van representar el 60% de tots els diagnosticats en homes. El país amb major percentatge de casos diagnosticats en HSH va ser Holanda, seguit de França, Noruega i el Regne Unit.

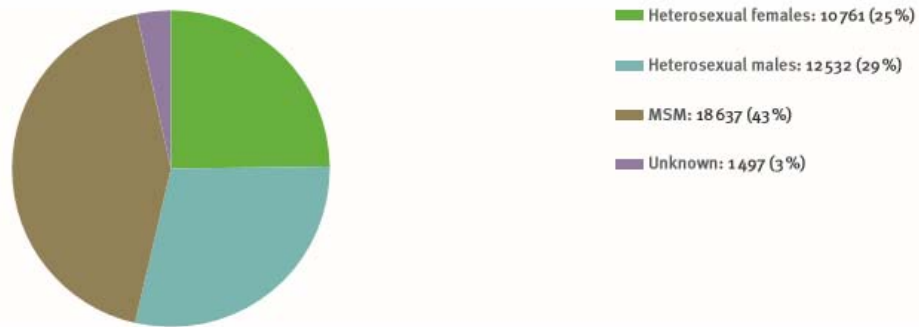


Figura 5. Percentatge de casos per gènere i categoria de transmissió ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)).

Pel que fa a l'evolució, del 2004 al 2013 es van documentar 357.599 casos en 29 països. A la figura 6 s'observa l'evolució per sexe, durant aquests anys. El número de casos va disminuir fins el 2008, per després augmentar un 79% fins el 2013. Aquest augment es va donar tant en homes com en dones. El grup que va presentar un major augment van ser els HSH.

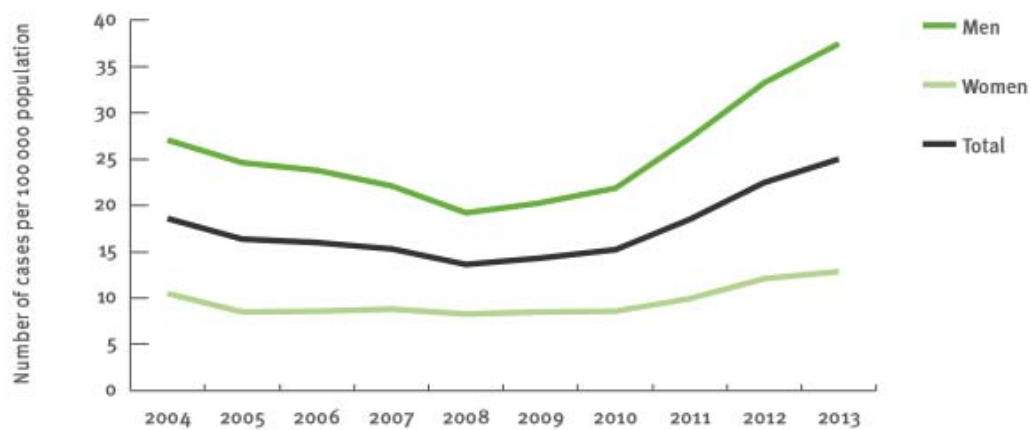


Figura 6. Evolució de la taxa de casos per 100.000 habitants, 2004-2013 ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)).

## 1.3.2. Espanya

Segons les dades de la “Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica” d’Espanya, al 2013 es van declarar a Espanya 3.315 casos de gonocòccia, que representa una incidència de 7,12 casos per 100.000 habitants. Com s’observa en la figura 7, durant el període 2008-2013 hi ha una tendència a l’augment, sent la tendència en els homes paral·lela a la global.

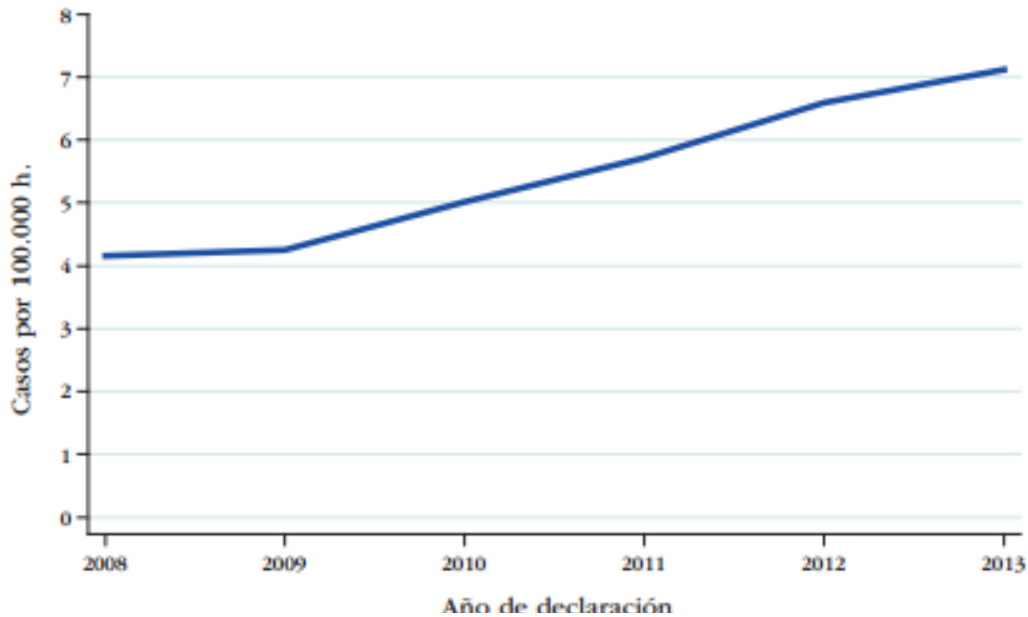


Figura 7. Taxa d’incidència per 100.000 habitants, 2008-2013. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Com s’observa en la figura 8, l’ incidència de casos notificats per comunitats autònomes varia àmpliament, entre el 1,18 i el 13,99 per 100.000 habitants. Les taxes més elevades es van registrar a les Illes Balears (13,99), La Rioja (13,59), Catalunya (12,04), i Madrid (10,94).

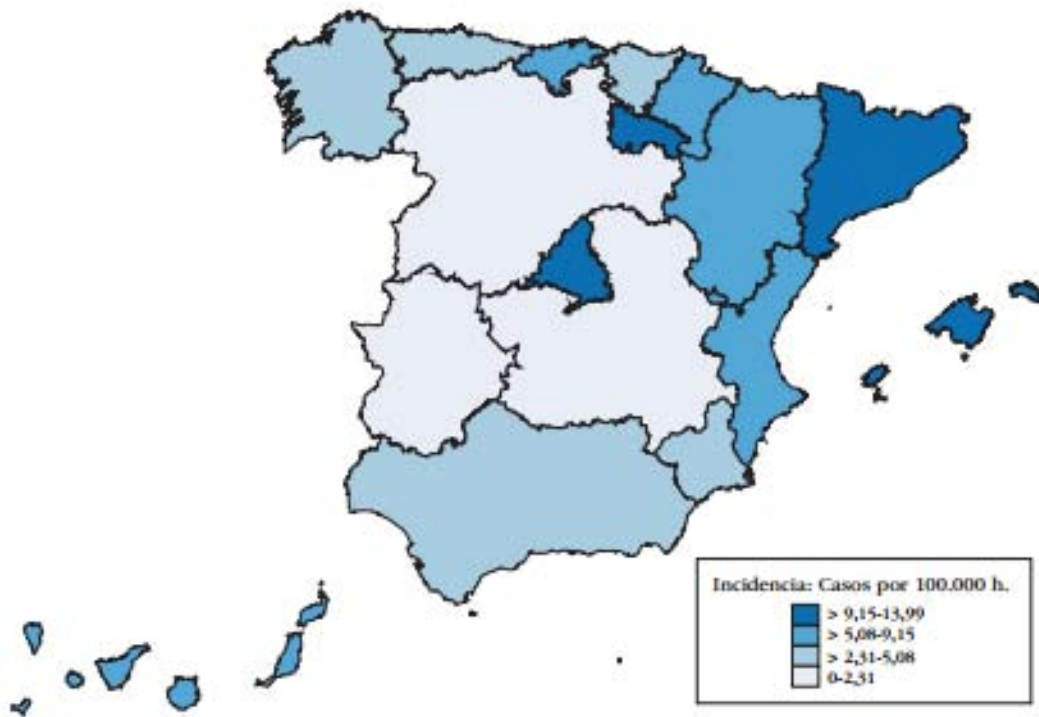


Figura 8. Incidència de la infecció gonocòccica per Comunitats Autònomes. Red Nacional de Vigilancia Epidemiològica.

El 88,5% es van produir en homes i el 40,9% en pacients d'entre 25 i 34 anys.

### 1.3.3. Catalunya

Segons dades del Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i el Sida de Catalunya (CEEISCAT) (13), l'any 2014 es van notificar 1.555 casos de gonocòccia, que representa una taxa global de 21,3 casos per cada 100.000 habitants, taxa superior a la dels països de la Unió Europea , que va ser de 15,3 casos per cada 100.000 habitants. El 85% dels 1.555 casos es van diagnosticar en homes i el 15% en dones, amb taxes de 37,0 i 6,2 casos per cada 100.000 habitants, respectivament (figura 9).

En el període 2005-2014 la taxa global va augmentar un 414%, passant de 4,2 casos per 100.000 habitants al 2005, a 21,3 al 2014. Entre el 2013 i el 2014 la taxa global de gonocòccia va incrementar un 60%, tant en homes com en dones.



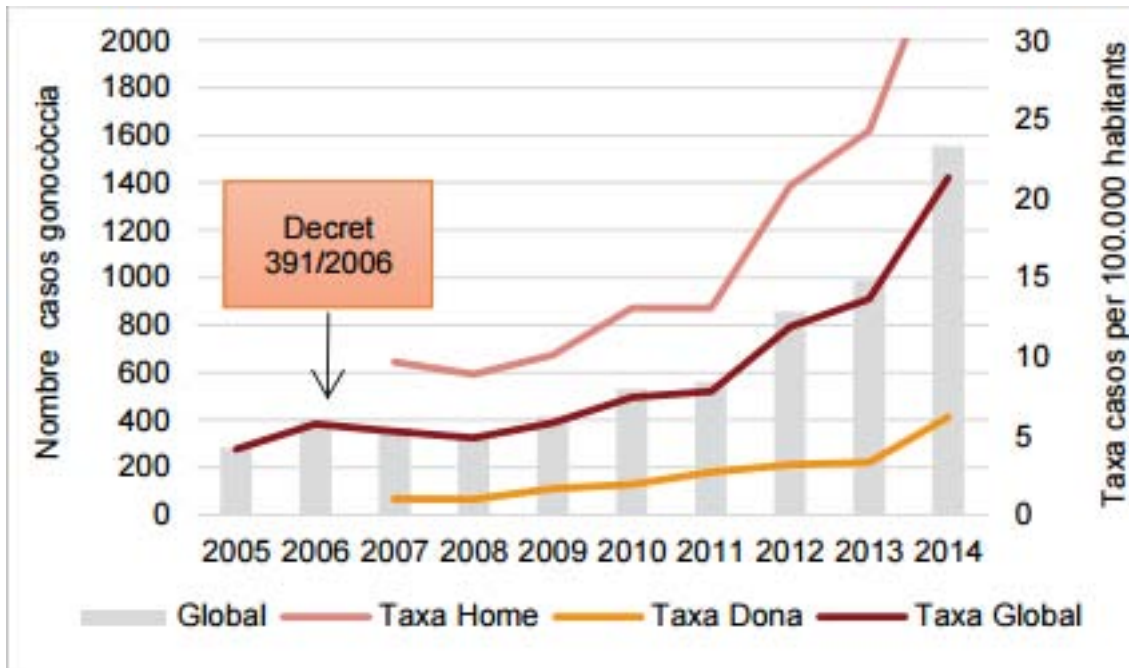


Figura 9. Evolució dels casos de gonocòccia en el període 2005- 2014. Registre de MDO individualitzada de Catalunya. CEEISCAT.

La mitjana d'edat va ser de 32 anys. Un 26% dels casos es tractava de persones nascudes fora de l'Estat espanyol. Del total (409), el 51% corresponien a persones originàries de països de l'Amèrica llatina i el Carib.

La majoria van ser HSH (46%), seguits dels homes homosexuals i dones homosexuals (24% i 15%, respectivament). La proporció de casos que van presentar una coinfecció amb el VIH va ser del 19%, que va arribar al 39% en els HSH.

## 1.4. Descripció de *Neisseria gonorrhoeae*

### 1.4.1. Característiques microbiològiques

Juntament amb 18 espècies més, *N. gonorrhoeae* pertany al gènere *Neisseria*. La majoria de les espècies d'aquest gènere es consideren bacteris comensals de l'ésser humà i presenten taxes d'infecció insignificants.

*Neisseria gonorrhoeae* és un coc Gram negatiu que normalment s' agrupa en parelles en forma de "gra de cafè". És un microorganisme aerobi o anaerobi facultatiu, immòbil, no capsulat i que no produeix espores. Produeix catalasa, un enzim que catalitza la descomposició del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) a oxigen ( $O_2$ ), i oxida de forma ràpida la dimetilparafenilè diamina a tetrametilparafenilè diamina.

Les condicions òptimes de creixement és una temperatura de 35 -37 °C i una concentració de  $CO_2$  del 5%. Té uns requeriments nutritius complexes, ja que per créixer necessita vitamines, aminoàcids, ferro i altres factors.

## 1.4.2. Estructures de superfície

Són estructures que estan relacionades amb l'adherència, la penetració tissular i cel·lular, la citotoxicitat i l'evasió del sistema immunitari de l'hoste (14) (15).

- **Pili o fimbries de tipus IV**

Són estructures proteiques formades per subunitats repetides (pilina). Travessen la membrana externa del microorganisme a través d'una proteïna coneguda com PilQ. La pilina conté regions amb una alta similitud antigènica entre soques i regions amb alta variabilitat antigènica. Els gonococs recentment aïllats formen colònies de tipus  $P^+$  i  $P^{++}$  que contenen múltiples pilis, però després de 20-24 hores de creixement *in vitro* té lloc el que s'anomena variació de fase, i perden els pilis (colònies  $P^-$ ). Els gonococs amb pilis s'uneixen amb més facilitat a les superfícies de les mucoses humanes, pel que són més virulents. L'expressió dels pilis depèn del complex del gen *pil*. Els pilis, a part de mediar l'adhesió, confereixen resistència a la destrucció del bacteri per part dels neutròfils.

- **Membrana externa**

Com tots els microorganismes Gram negatiu, el gonococ posseeix una envoltura cel·lular formada per tres capes: la membrana citoplasmàtica, la paret cel·lular

formada per peptidoglucà i una membrana externa formada per el lipooligosacàrid (LOS), fosfolípids i vàries proteïnes.

El LOS es compon del lípid A i un nucli oligosacàrid el qual, a diferència del polisacàrid de la majoria dels bacteris Gram negatiu, no conté cadenes laterals d'antigen O. La sialilació dels glúcids del nucli del LOS protegeix els epítops tant del LOS com de la porina i això confereix resistència enfront els anticossos bactericides. A més els glúcids del nucli pateixen variacions antigèniques d'alta freqüència que poden contribuir a la patogènia de la infecció, inclosa la resistència als anticossos anti-LOS presents en el sèrum i a la invasió de les cèl·lules epitelials.

- **Porina**

Una de les proteïnes de la membrana externa és la porina, la qual té un pes molecular de 32-36 kD i forma canals que permeten als soluts aquosos travessar la membrana externa (hidròfoba). La porina és el producte d'un gen denominat *porB*. Existeixen dos classes de porines, PorB1A i PorB1B, cada una d'elles amb serovarietats diferents, les quals són la base del sistema de serotipificació gonocòccica. Les soques que expressen PorB1A s'associen a la resistència del gonococ a l'efecte bactericida del sèrum humà i, com a conseqüència, a la major facilitat per causar bacterièmia. Es creu que la porina PorB1A afavoreix la invasió de les cèl·lules epitelials. La porina és una de les principals dianes pel desenvolupament de la vacuna antigonocòccica.

- **Proteïna Opa**

Les proteïnes Opa, amb pes molecular de 20-28 kD, també es troben inserides en la membrana externa del gonococ. Cada una d'elles conté dues regions hipervariables. Una mateixa soca pot expressar de 0 a 11 variants d' Opa, degut a modificacions causades per variacions en el DNA dels gens *opa*, que provoquen canvis en el marc de la traducció. Moltes proteïnes Opa augmenten l'adherència entre els propis gonococs i a diverses cèl·lules eucariotes, entre elles als fagòcits.

- **Proteïna modificable per reducció (Rmp)**

Té un pes molecular de 30-31 kD i una estreta relació amb la porina i el LOS. Exhibeix escassa variació antigènica entre soques. Rmp pot estimular els anticossos bloquejants, els quals redueixen l'activitat bactericida del sèrum enfront *N. gonorrhoeae*, la qual cosa pot potenciar la infecció després de l'exposició sexual.

### 1.4.3. Patogènia

*N. gonorrhoeae* és un patògen primari, exclusivament humà, i que causa principalment uretritis en els homes i cervicitis en les dones. A diferència de *N. meningitidis*, que es transmet a través de gotes del tracte respiratori, la via de transmissió del gonococ limita la població de risc, ja que és necessari un contacte directe. Tot i així, després d'un contacte sexual amb una persona infectada, el risc de desenvolupar infecció en les dones és superior que en els homes (16). La diana principal de la infecció són les mucoses urogenitals, tot i que pot infectar altres llocs anatòmics, com el recte, la orofaringe i la conjuntiva. La infecció gonocòccica sol ser una infecció localitzada i dona lloc a una intensa resposta inflamatòria que provoca una secreció purulenta en els homes, la qual és molt característica de la gonorrea (figura 10). En les dones, el diferent origen embrionari del tracte urogenital femení fa que el mode d'infecció sigui diferent i normalment asimptomàtic.

# Introducció

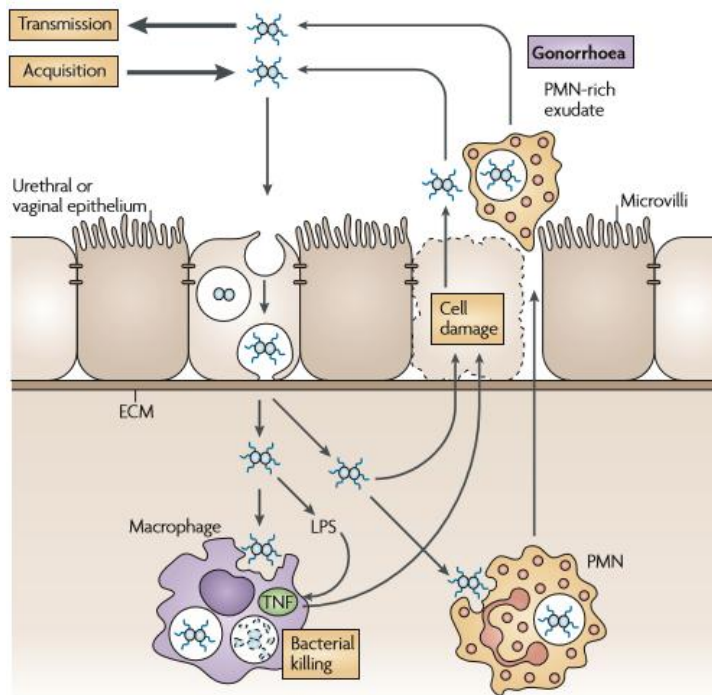


Figura 10. Etapes en la patogènesis de *N. gonorrhoeae*. L'adquisició del microorganisme es produeix per contacte sexual, el qual un cop en el tracte urogenital interacciona amb les cèl·lules epitelials no ciliades. Tot i que els mecanismes moleculars involucrats són diferents en homes i dones, la infecció sol produir inflamació i augment de leucòcits polimorfonuclears (PMN). El factor de necrosi tumoral (TNF) produït pels macròfags, així com també certs productes del gonococ, provoquen dany a les cèl·lules epitelials superficials.

En els homes l'interacció inicial es produeix entre els pilis del gonococ i l'epiteli uretral gràcies a la unió del receptor asioliloglucoproteic (ASGP-R) al LOS del gonococ. L'endocitosis es produeix per processos dependents d'actina i clatrina. L'epítip del LOS necessari per aquesta unió és el lacto-N-neotetraosa terminal (LNnt), el qual pot actuar d'acceptor d'àcid siàlic. La presència d'àcid siàlic en el LOS per una banda confereix resistència a l'acció bactericida del sèrum humà però també altera la capacitat dels gonococs per envair les cèl·lules epitelials uretrals.

Els assajos *in vitro* i l'anàlisi microscòpic de l'exsudat uretral en homes indiquen que els gonococs poden entrar a les cèl·lules epitelials uretrals per després ser alliberats a la uretra. La infecció experimental en homes ha demostrat que altes concentracions de quimiocines (IL-8), citocines (IL-6) i de factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es troben en l'exsudat uretral a mesura que progressa la infecció. Estudis recents han demostrat que el LOS del gonococ desencadena la secreció de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8. Per tant, l'alliberació de citocines i quimiocines des de l'epiteli uretral pot iniciar la resposta inflamatòria associada a la uretritis gonocòccica a l'activar el flux d'entrada de PMN.

En el cas de les dones, a diferència de la resposta inflamatòria evident generada en la uretra masculina, el 50-80% de les infeccions de vies inferiors són asimptomàtiques. L'anàlisi de les secrecions cervicals de dones amb infecció no complicada, demostra que no es genera resposta d'anticossos, la qual cosa concorda amb la capacitat del gonococ per evadir el sistema immunitari de l'hoste. El principal receptor per l'adherència i invasió del gonococ a l'ectocèrvix i endocèrvix és el CR3, al qual s'hi uneix a través del pili. Aquesta unió dona lloc a una cascada de senyalització complexa.

La capacitat del gonococ per ascendir cap a les vies genitals superiors pot ser deguda a la motilitat espasmòdica del microorganisme juntament amb canvis hormonals, la qual cosa influeix en l'expressió de proteïnes de la via alternativa del complement i de molècules que actuen com a receptors del gonococ a l'interior de les vies genitals femenines.

## 1.5 Manifestacions clíniques

La gonorrea és una infecció freqüent que es transmet pràcticament de forma exclusiva per contacte sexual o perinatal, afectant sobretot les mucoses de la uretra i del coll uterí, i amb menor freqüència del recte, orofaringe i conjuntiva.

### 1.5.1. Infeccions urogenitals

- **Uretritis**

En la infecció genital masculina, la uretritis aguda és la manifestació predominant. Els principals signes i/o símptomes són l'exsudat uretral i la disúria, normalment sense pol·laciúria ni tenesme vesical. Durant les primeres hores de la infecció, l'exsudat sol ser escàs i mucoide, però després d'un o dos dies es torna purulent de forma evident. El període d'incubació sol ser de 2 a 5 dies, encara que pot oscil·lar entre 1 i 10. Tot i així la simptomatologia pot variar en funció de factors tant de l'hoste com del microorganisme. Per exemple, algunes serovarietats PorB1A s'associen més freqüentment a les infeccions

asimptomàtiques en homes. Es calcula que la prevalença de la gonorrea urogenital asimptomàtica en homes en la població general és del 10%.

Les complicacions de la infecció ascendent en homes son poc freqüents, sent algunes d'elles l'epididimitis aguda; limfangitis peniana; abscess periuretral; prostatitis aguda; vesiculitis seminal i infeccions de les glàndules de Tyson i de Cooper.

- **Cervicitis**

En les dones, la infecció primària afecta sobretot l'endocèrvix, amb infecció uretral concomitant en un 70 – 90% dels casos. Després d'un període d'incubació de 8 a 10 dies, es pot produir un exsudat cervicovaginal moderat, sagnat vaginal i/o dolor abdominal o pèlvic. La infecció de l'epiteli escamós vaginal en dones postpubertals és infreqüent, i en dones histerectomitzades, la uretra és la localització més freqüentment afectada.

Entre el 50-95% de les infeccions gonocòcciques en les dones poden ser asimptomàtiques (17), i la no detecció o el tractament inadequat poden provocar complicacions ascendents. Aquestes complicacions es produeixen aproximadament en un 10-20% dels casos, i poden incloure endometritis, malaltia pèlvica inflamatoria, abscess tubàric i infertilitat. A més és un cofactor per l'avort espontani, corioamnionitis, ruptura prematura de membranes, part prematur i afectacions fetals.

La gonorrea pot facilitar la transmissió d'altres infeccions de transmissió sexual, incloent el VIH.

## **1.5.2. Infeccions extra-genitals**

- **Infeccions anorectals**

Més del 50% de les infeccions rectals en homes i dones poden ser asimptomàtiques. La prevalença és més alta en HSH. Els símptomes inclouen pruit anal, dolor rectal, exsudat purulent i tenesme rectal. Les infeccions asimptomàtiques no tractades poden donar lloc a proctitis simptomàtiques (18).

- **Infeccions faríngies**

Al voltant del 90% de les infeccions faríngies poden ser asimptomàtiques i aproximadament el 20% de les dones amb gonorrea cervical estan coinfectades amb gonorrea faríngia. Aquesta infecció també és comú en HSH i pacients VIH positius. Alguns símptomes inclouen eritema orofaríngic o exsudat i limfadenopaties cervicals.

- **Infecció disseminada**

És una infecció poc freqüent que afecta entre el 0,4% i el 3% dels pacients amb gonorrea (17), però és la causa més freqüent d'artritis infecciosa en pacients sexualment actius prèviament sans. Les lesions cutànies hi són presents en el 75% dels pacients amb bacterièmia, incloent petèquies, màcules, pàpules i vesícules. Al inici del quadre, alguns pacients presenten artropaties asimètriques o poli-artràlgia. Les articulacions més freqüentment afectades són els canells, els turmells, les mans i els peus. Molt rarament la malaltia pot evolucionar a perihepatitis, meningitis o endocarditis (18).

### 1.5.3. Infeccions en la infància

La infecció neonatal es pot produir degut a l'exposició a través del canal del part. Sèpsia, conjuntivitis, meningitis i artritis són les complicacions més freqüents (19). Altres manifestacions poden ser faringitis, rinitis, vaginitis, uretritis i rarament pneumònia.

- ***Oftalmia neonatorum***

La conjuntivitis gonocòccica té un període d'incubació d' aproximadament sis dies. Al voltant del 30% dels casos són causats per *C. trachomatis*, tot i que la gonorrea produeix entre 2 i 3 casos per cada 10.000 naixements. El tractament és indispensable per prevenir la perforació ocular i ceguesa.



La infecció en nois/es pre-adolescents és indicatiu d'abusos sexuals. La manifestació clínica més freqüent en les nenes és la vaginitis, i tot i que la infecció faríngia i rectal poden coexistir, normalment són asimptomàtiques.

En la taula 1 es mostra el diagnòstic diferencial de la infecció gonocòccica.

Diagnosis	Causes
Cervicitis	Bacterial vaginosis <i>Chlamydia trachomatis</i> infection Frequent douching or exposure to another irritant Genital herpes simplex virus infection <i>Mycoplasma genitalium</i> infection <i>Trichomonas vaginalis</i> infection
Neonatal conjunctivitis	<i>C. trachomatis</i> infection <i>Moraxella catarrhalis</i> infection Other <i>Neisseria</i> species infection
Urethritis (nongonococcal)	Adenovirus <i>C. trachomatis</i> infection (15 to 40 percent) Enteric bacteria (associated with insertive anal intercourse) Genital herpes simplex virus <i>M. genitalium</i> infection (15 to 25 percent) Nonchlamydial nongonococcal urethritis <i>T. vaginalis</i> infection If urethritis persists after treatment, consider doxycycline-resistant <i>Ureaplasma urealyticum</i> or <i>M. genitalium</i> infection If urethritis still persists, consider chronic nonbacterial prostatitis or chronic pelvic pain syndrome
Vaginal discharge	Common infections Candidiasis Cervicitis <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>T. vaginalis</i> Less common infections <i>M. genitalium</i> <i>Mobiluncus</i> species <i>Prevotella</i> species <i>U. urealyticum</i>

Taula 1. Diagnòstic diferencial de la infecció gonocòccica .

## 1.6. Diagnòstic

### 1.6.1. Presa de mostra

La recollida de mostra dependrà de la clínica i les pràctiques sexuals del pacient. En tots els casos s'hauria de recollir una mostra del tracte genital, i si el pacient té història de contactes sexual orogenitals o anogenitals, també s'hauria de recollir mostres de la orofaringe o del canal anal. Si hi ha sospita d'infecció sistèmica, també s'hauria de realitzar hemocultiu (15).

Segons les últimes recomanacions del Centre of Diseases Control and Prevention (CDC) (20), en les dones la mostra genital més recomanable pel diagnòstic de gonorrea mitjançant TAANs és l'escovilló vaginal, ja que presenta la mateixa sensibilitat i especificitat que l'endocervical i permet l'auto-presa de mostra. En les dones que per la seva simptomatologia es requereix examen pèlvic, l'exsudat endocervical recollit pel clínic és la mostra més indicada. En les dones, la sensibilitat de la detecció d'àcids nucleics en el primer raig d'orina és un 10% inferior que en l'escovilló vaginal o endocervical. En el homes l'orina de primer raig és el tipus de mostra recomanada i és equivalent a l'escovilló uretral.

En el cas de recollir vàries mostres d'una mateixa localització anatòmica, els escovillons destinats al cultiu s'han de recollir primer per tal d'obtenir la major càrrega bacteriana. Els escovillons utilitzats pel cultiu han de ser de plàstics amb puntes de raïó, Dacró o alginat càlcic, ja que els escovillons de fusta amb la punta de cotó poden inhibir el creixement del microorganisme.

Els escovillons s'han d'introduir 2-3 cm en la uretra masculina o 1-2 cm en el canal endocervical i posteriorment rotar 2 o 3 cops.

Actualment hi ha comercialitzats varis isòtops amb medi de transport que mantenen la viabilitat del microorganisme fins al seu processament. Les condicions de transport poden variar en funció de la localització i el clima, per la qual cosa una validació local de les condicions de transport serien necessàries pel correcte processament de la mostra.

En el nostre medi s'ha observat que la refrigeració de les mostres clíniques augmenta la viabilitat del gonococ i que també l'augmenta, encara que en menys mesura, la utilització d'un medi de transport líquid enlloc del tradicional semi-sòlid (21).

## 1.6.2. Diagnòstic convencional

Degut a l'alta especificitat (>99%) i sensibilitat (95%), l'observació de leucòcits PMN amb diplococs Gram negatiu intracel·lulars en la tinció de Gram de l'exsudat uretral, es pot considerar diagnòstic d'uretritis gonocòccica simptomàtica. Tot i així, una tinció de Gram negativa no serveix per descartar infecció en homes asimptomàtics. Per altra banda, la tinció de Gram en mostres endocervicals, faríngies o rectals no és útil degut a la falta de sensibilitat i especificitat.

Degut a l'alta sensibilitat del gonococ a les condicions ambientals, els medis de cultiu s'han d'inocular tant aviat com sigui possible i incubar-se immediatament a 35-37°C en una atmosfera amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Perquè *Neisseria gonorrhoeae* té alts requeriments nutritius, pel seu cultiu s'utilitzen medis enriquits, i en el cas de mostres no estèrils, s'utilitzen medis selectius com Thayer-Martin, Martin-Lewis o New York City, que contenen agents antimicrobians (vancomicina, colistina i nistatina o altres antifúngics) que inhibeixen el creixement d'altres bacteris o fongs.

El gonococ pot créixer formant colònies amb diferents morfologies. Un cop aïllat el microorganisme, la identificació presumptiva es realitza mitjançant la tinció de Gram (diplococs Gram negatiu), la prova de la citocrom oxidasa i la catalasa. Tot i així, el diagnòstic definitiu requereix test bioquímics addicionals (taula 2).

Species	Acid from					Superoxol	Reduction of nitrate	Polysaccharide from sucrose	Tributylin hydrolysis
	Glucose	Maltose	Lactose	Sucrose	Fructose				
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>N. cinerea</i> <sup>*</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>N. subflava</i> <sup>†</sup>	+	+	-	V	V	+	-	V	-
<i>N. sicca</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>N. mucosa</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>N. flavescens</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>N. elongata</i> <sup>‡</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Branhamella catarrhalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>Kingella denitrificans</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-

**Abbreviations:** + = strains typically positive but genetic mutants might be negative; - = negative; V = variable.

<sup>\*</sup> Certain strains grow on selective media for the isolation of *N. gonorrhoeae*.

<sup>†</sup> Includes biovars subflava, flava, and perflava. *N. subflava* biovar perflava strains produce acid from sucrose and fructose and produce polysaccharide from sucrose;

*N. subflava* biovar flava strains produce acid from fructose; *N. subflava* biovar flava and *N. subflava* biovar subflava do not produce polysaccharide.

<sup>‡</sup> Rod or coccobacillus.

Taula 2. Característiques bioquímiques de microorganismes Gram negatiu, oxidasa positiu.

Actualment, l'espectrometria de masses és una tècnica proteòmica que permet identificar el gonococ en molt menys temps, en funció de la plataforma utilitzada.

El cultiu de *N. gonorrhoeae* és econòmic i suficientment específic i sensible si les condicions de recollida i transport són les adequades. Tot i així no és ideal pel diagnòstic de rutina degut als requeriments estrictes de recollida i transport, i que el diagnòstic definitiu requereix varis dies. El principal avantatge és que permet l'estudi de la sensibilitat antimicrobiana així com la caracterització genètica si és necessària.

### 1.6.3. Tècniques d'amplificació d'àcids nucleics

Durant molt temps el cultiu ha estat el *Gold Standard* pel diagnòstic de la infecció gonocòccica. Tot i que molts laboratoris segueixen realitzant-lo, varis estudis han demostrat que les TAANs són més sensibles i robustes (22) (23) (24) (25) (26). Aquestes tècniques posseeixen un seguit d'avantatges respecte el cultiu. La primera és que el transport i conservació de les mostres és més senzill ja que no necessiten que el microorganisme estigui viable pel diagnòstic. La segona és que són tècniques que es poden automatitzar, el temps de resposta és molt inferior i permeten la detecció simultània de varies dianes en una sola reacció. La tercera és que gràcies a l'alta sensibilitat, es poden utilitzar en mostres no invasives com l'orina o l'exsudat vaginal. Per totes aquestes raons, la CDC actualment recomana aquestes tècniques pel diagnòstic de

# Introducció

les infeccions tant simptomàtiques com asimptomàtiques. Des del maig de 2013, existeixen 5 plataformes de TAANs aprovades per la FDA (taula 3).

Els diferents tests comercialitzats difereixen els uns dels altres pel mètode d'amplificació i les seqüències utilitzades com a diana.

FDA-cleared NAAT	FDA-cleared specimen types	Specimen transport and storage conditions
Abbott RealTime CT/NG (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL)	Asymptomatic women: clinician-collected vaginal swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, and urine. Asymptomatic men: urine. Symptomatic women: endocervical swab, clinician-collected vaginal swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, and urine. Symptomatic men: urethral swab and urine.	14 days at 2°-30°C 90 days at -10°C or lower Thaw frozen specimens at 2°-30°C Specimens must not undergo more than four freeze/thaw cycles
Aptima COMBO 2 assay Aptima CT assay Aptima GC assay (Hologic/Gen-Probe Inc., San Diego, CA)	Asymptomatic women: endocervical swab, clinician-collected vaginal swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, gynecologic specimens collected in PreservCyt solution and urine. Asymptomatic men: urethral swab and urine. Symptomatic women: endocervical swab, clinician-collected vaginal swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, gynecologic specimens collected in PreservCyt solution and urine. Symptomatic men: urethral swab and urine.	24 hours at 2°-30°C (urine specimen in primary cup) 30 days at 2°-30°C (urine specimen in Aptima urine transport tube) 60 days at 2°-30°C (swab in Aptima swab transport tube) 12 months at -20° to -70°C (urine specimen and swab specimens in respective Aptima transport tubes)
BD ProbeTec ET CT/GC Amplified DNA assay (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD)	Asymptomatic women: endocervical swab and urine. Asymptomatic men: urethral swab and urine. Symptomatic women: endocervical swab and urine. Symptomatic men: urethral swab and urine.	30 hours at 2°-30°C (urine specimen in primary cup) 7 days at 2°-8°C (urine specimen in primary cup) 30 days at 2°-30°C (urine specimen in urine processing tube) 60 days at -20°C or lower (neat urine specimen or urine in urine processing tube) 6 days at 2°-27°C (swab specimens) 30 days at 2°-8°C (swab specimens)
BD ProbeTec Qx CT Amplified DNA assay BD ProbeTec Qx GC Amplified DNA assay (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD)	Asymptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, gynecologic specimens collected in BDSurePath or PreservCyt solution and urine. Asymptomatic men: urethral swab and urine. Symptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, gynecologic specimens collected in BDSurePath or PreservCyt solution and urine. Symptomatic men: urethral swab and urine.	30 hours at 2°-30°C (urine specimen in primary cup). 7 days at 2°-8°C (urine specimen in primary cup) 30 days at 2°-30°C (urine specimen in urine processing tube) 180 days at -20°C or lower (neat urine specimen or urine in urine processing tube) 30 days at 2°-30°C (endocervical and urethral swab specimens) 180 days at -20°C or lower (endocervical and urethral swab specimens) 14 days at 2°-30°C (dry vaginal swab specimens) 30 days at 2°-30°C (expressed vaginal swab specimens) 180 days at -20°C or lower (dry or expressed vaginal swab specimens)
Xpert CT/NG assay (Cepheid, Sunnyvale, CA)	Asymptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, and urine. Asymptomatic men: urine. Symptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, and urine. Symptomatic men: urine.	24 hours at room temperature (female urine specimen in primary cup) 3 days at room temperature (male urine specimen in primary cup) 8 days at 4°C (female and male urine specimen in primary cup) 3 days at 15°-30°C (female urine specimen in Xpert CT/NG Urine Transport Reagent tube) 45 days at 2°-15°C (female urine specimen in Xpert CT/NG Urine Transport Reagent tube) 45 days at 2°-30°C (male urine specimen in Xpert CT/NG Urine Transport Reagent tube) 45 days at 2°-30°C (swab in Xpert CT/NG Swab Transport Reagent tube)
cobas CT/NG test (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)	Asymptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, clinician-collected vaginal swab, gynecologic specimens collected in PreservCyt solution and urine. Asymptomatic men: urine. Symptomatic women: endocervical swab, patient-collected vaginal swab in a clinical setting, clinician-collected vaginal swab, gynecologic specimens collected in PreservCyt solution and urine. Symptomatic men: urine.	≤ 1 yr at 2°-30°C (swab or urine specimen in cobas PCR media) 24 hrs at 2°-30°C (Neat male urine specimen prior to addition to cobas PCR media) Cervical specimens collected in PreservCyt Solution may be stored at 2°-30°C for up to 12 months. Aliquots (≥1 mL) of cervical specimens collected in PreservCyt Solution may be stored in 13 mL round-based Sarstedt tubes for up to 4 weeks at 2°-30°C.

Taula 3. Plataformes aprovades per la FDA i tipus de mostra i requeriments de transport d'aquestes.

## 1.6.4. Altres tècniques diagnòstiques

- **Detecció d'antigen**

L'únic test comercialitzat és el Binax NOW Gonorrhea Test (Binex, Inc., Portland, Maine). Es tracta d'una cromatografia que es pot utilitzar amb orina, exsudats vaginals i endocervicals. Es calcula que té una sensibilitat i una especificitat del voltant del 95% i un límit de detecció de  $10^4$  UFC/mL d'orina (15). Avui dia és molt poc utilitzat.

- **Test d'hibridació d'àcids nucleics**

Existeixen dos assajos aprovats per la FDA per la detecció de *C. trachomatis* o *N. gonorrhoeae* (Hologic/Gen-Probe PACE 2 i Digene Hybrid Capture II). Tot dos permeten la detecció dels dos microorganismes en una mateixa mostra.

- **Immuno-florescència directa (IFD)**

S'utilitzen anticossos monoclonals que reconeixen epítops de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*. Després de la tinció, la preparació s'observa amb microscopi de fluorescència. Tot i així, moltes soques de gonococ no es tenyeixen amb aquest reactiu, de manera que degut a la falta de sensibilitat no és aconsellable pel diagnòstic directe de la gonorrea.

## 1.7. Tècniques d'epidemiologia molecular

La propagació a nivell internacional de soques de *N. gonorrhoeae* multiresistents requereix la introducció de mètodes de tipificació molecular en els programes nacionals de control, els quals ajuden a comprendre l'epidemiologia i la dinàmica poblacional. A més, l'estudi de la genètica poblacional és important per entendre la història evolutiva del microorganisme.

L'elecció de la metodologia més òptima segueix sent un problema. Actualment existeixen diverses metodologies:

- **Tipificació del gen *porB***

Es realitza mitjançant l'anàlisi comparatiu de la seqüència de nucleòtids d'aquest gen. Aquesta tècnica posseeix un alt poder discriminatori i presenta les dades en un format comparable amb les dades de serotipificació (27). Tot i així la seqüenciació de tot el gen *por* és un procés laboriós i la major part de les mutacions d'aquest gen es poden detectar seqüenciant un fragment intern, que és en el que es base la tècnica del NG-MAST.

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

Actualment es considera una de les tècniques més útils. Aquesta tècnica consisteix en seqüenciar fragments interns de dos gens hipervariables, *porB* i *tbpB*, els quals codifiquen per antigens de superfície i per tant estan sota selecció positiva. Existeix una base de dades on-line ([www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net)) la qual permet realitzar un anàlisi comparatiu amb aïllaments de diferents regions del món, i a més és una eina eficient per estimar la variabilitat genètica d'una població i detectar xarxes de transmissió. A més a més, varis estudis, un d'ells inclòs en aquesta tesi, han establert una associació entre seqüenciotips (STs) de NG-MAST i determinats perfils de resistència (2) (28) (29).

- **MLST (Multilocus sequence typing)**

És una altra eina, la base de la qual és l'oposada al NG-MAST, ja que consisteix en l'anàlisi de gens conservats. Caracteritzats per la lenta acumulació de mutacions, aquests gens reflecteixen l'evolució natural de la població microbiana.

Sovint, l'eficàcia dels programes de vigilància de *N. gonorrhoeae* depèn dels mètodes utilitzats per a la identificació i la tipificació dels aïllats clínics. No obstant això, tenint en compte la varietat de sistemes de tipificació i la falta d'experiència en la seva aplicació,

encara no s'ha determinat quin seria el mètode més objectiu, que utilitzat per tothom com a mètode únic permetés establir les relacions entre les diferents soques.

Existeixen varis estudis per determinar el poder discriminatori de cada un dels mètodes. Per exemple, Ilna et al. (27) van avaluar diferents tècniques de tipificació, incloent el *porB*, NG-MAST, MLST i la serotipificació, amb soques de gonococ aïllades en diferents regions de Rússia, geogràficament no relacionades. Segons les seves dades, el poder discriminatori de la serotipificació tradicional va ser de 0,82, valor inferior al 0,90 desitjable per sistemes de tipificació efectius (30). Pel que fa a les tècniques basades en àcids nucleics, el poder discriminatori va ser bastant superior, de manera que tant el tipatge del gen *por* com NG-MAST, tenien un valor superior a 0,95, valor recomanat per la “European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (ESCMID) pels nous mètodes de tipificació molecular (31). Tot i que el poder discriminatori del MLST va ser lleugerament inferior (0,91), la base de dades pública del MLST (<http://pubmlst.org/neisseria>) permet comparar les poblacions de gonococ a nivell mundial. Aquest grup conclou que els mètodes basats en la variabilitat dels àcids nucleics són més adequats per la tipificació molecular. Concretament el NG-MAST sembla ser el més útil pel monitoratge a curt termini de patrons de transmissió i és el més adequat per la investigació de brots locals.

En un altre estudi, Bilek et al. (32), van estudiar l'utilitat del NG-MAST com a eina per l'estudi de contactes. Conclouen que aquesta tècnica és la més adequada, comparada amb la tipificació del gen *opa*, ja que el percentatge de concordança és superior, la tècnica més robusta i fàcil de realitzar i a més les dades més precises i sense ambigüitats.

## **1.8. Sensibilitat antimicrobiana i tractament**

### **1.8.1. Estudi de la sensibilitat antimicrobiana**

El mètode de la dilució quantitativa en agar per determinar la concentració mínima inhibidora (CMI) és el *Gold standard*, tot i així, és una tècnica laboriosa i poc idònia per



l'estudi de rutina de la sensibilitat antimicrobiana. D'aquesta manera, el mètode del E-test per la determinació de la CMI és comparable al mètode de dilució en agar i s'utilitza freqüentment. El mètode de disc difusió només es recomana quan la CMI no es pot determinar degut a la falta de recursos, i qualsevol perfil sospitós de resistència s'ha de comprovar utilitzant algun dels dos mètodes anteriors.

Pel que fa a la interpretació de l'antibiograma, els punts de tall serveixen per traduir dades numèriques (diàmetres de l'halo d'inhibició o concentració mínima inhibidora (CMI)) en categories clíniques que indiquen la probabilitat de resposta d'un microorganisme davant d'un antibiòtic concret a la dosi recomanada per aquella localització. Existeixen diferents societats que estableixen els punts de tall tenint en compte diferents factors, com la distribució de les CMIs, la presència o l'absència de mecanismes de resistència coneguts, factors de farmacocinètica i farmacodinàmica (pK/pD) i correlació amb la clínica. Les principals són el "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) (33) i "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) (34). Els punts de tall d'ambdues per *Neisseria gonorrhoeae* no coincideixen per alguns dels antibiòtics usats pel seu tractament.

## 1.8.2. Història dels règims de tractament i evolució de la resistència

Durant l'era preantibiòtica, el tractament de la gonorrea consistia en l'abstinència sexual i diferents tipus de bàlsams, irrigacions uretrals, compostos químics i hipertèrmia. A finals del segle XIX, es van començar a utilitzar compostos antibacterians més específics i compostos metàl·lics, com compostos d'arsènic, antimoni, bismut, or, plata i mercuri.

A principis del segle XX, es va començar a introduir l'ús dels antibiòtics pel tractament de la gonorrea. En la figura 11 (10) es resumeix la història del descobriment dels antimicrobians així com l'evolució de les resistències, incloent els determinants genètics i els canvis dels règims de tractaments.

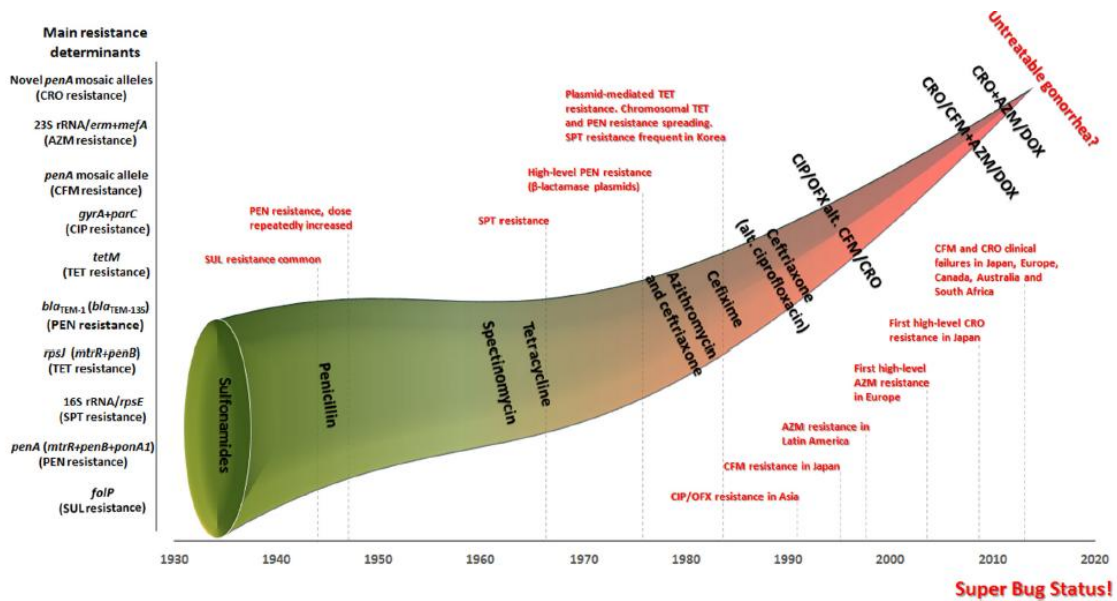


Figura 11. Història del descobriment dels antimicrobians, el seu ús i el desenvolupament de resistències .

- **Sulfonamides:** van ser els primers antimicrobians utilitzats pel tractament de la gonorrea. La sulfanilamida inicialment curava entre el 80 i 90% dels casos, i quan hi havia fracàs terapèutic s'utilitzava la sulfapiridina. Posteriorment es va utilitzar el sulfatiazol, que presentava la mateixa efectivitat que la sulfapiridina però era més ben tolerat. Desafortunadament a finals dels anys 40, el 90% dels aïllats presentaven resistència *in vitro*. Tot i així, el sulfametoxazol en combinació amb trimetoprim es va continuar utilitzant durant dècades en països amb pocs recursos.
- **Penicil·lina:** El 1928, Alexander Fleming va descobrir accidentalment un compost produït per un fong que podia lisar estafilococs i altres bacteris. Aquest compost es va anomenar penicil·lina. El 1943 es va observar que la penicil·lina era efectiva pel tractament de l'uretritis gonocòccica. Ràpidament aquest antimicrobià va substituir a les sulfonamides com a tractament de primera línia per la gonorrea. Curava més del 95% dels casos amb dosis de 45 mg. Tot i així, al llarg del temps, les CMI's van anar augmentant degut a l'acumulació de determinants genètics de resistència, i les dosis es van anar augmentant progressivament. De manera que al 1946 es van documentar quatre casos de resistència a altes dosis de penicil·lina (entre 0,6 i 1,6 milions d'unitats). La proporció de casos resistents a penicil·lina

van anar incrementant durant les dues dècades següents, però tot i així es va seguir utilitzant durant dècades. El 1976 es van detectar soques productores de dos tipus de betalactamases plasmídiques a tot el món, però va ser quan es van detectar soques resistents per mecanismes cromosòmics quan la penicil·lina va deixar d'utilitzar-se com a tractament de primera línia. Actualment, les soques resistents a penicil·lina per mecanismes plasmídics i/o cromosòmics són freqüents a nivell global.

- **Tetraciclina:** s'utilitzava sobretot en pacients al·lèrgics a la penicil·lina. Tot i així les CMI's van augmentar al llarg del temps degut a mecanismes cromosòmics de resistència. La detecció, a mitjans dels anys 80, de soques amb el determinant plasmídic *tetM*, que codifica resistència d'alt nivell, va comportar l'eliminació de la tetraciclina de les guies de tractament dels Estats Units i altres països.
- **Espectinomicina:** A principis dels anys 60 aquest antimicrobià es va sintetitzar i comercialitzar com a tractament específic de la gonorrea. Aquest compost és un aminociclitol estretament relacionat amb els aminoglicòsids. Amb l'aparició de la resistència plasmídica a la penicil·lina, l'espectinomicina es va començar a utilitzar pel tractament d'aquests casos. Tot i així a principis dels 1980s es van començar a detectar casos amb resistència a aquest compost a tot el món, de manera que va deixar d'utilitzar-se com a tractament empíric de primera línia. Actualment la taxa de resistències a l'espectinomicina és molt baixa però no està disponible en la majoria de països. A més aquest antimicrobià no és adequat pel tractament de la gonorrea faríngia, ja que la seva eficàcia és del voltant del 80%.
- **Quinolones:** Les fluorquinolones, sobretot ciprofloxacino, van ser àmpliament utilitzades pel tractament de la gonorrea des de finals dels 1980s. Inicialment s'utilitzaven dosis baixes, de 250 mg, però a principis dels anys 90 ja es van començar a documentar casos de fracàs terapèutic. Per aquesta raó es va augmentar la dosis a 500 mg, però ràpidament es van detectar soques resistents. En alguns països asiàtics, les fluorquinolones van deixar de recomanar-se com a

tractament de primera línia a mitjans dels anys 90. Les soques resistents a ciprofloxacino es van disseminar ràpidament a nivell mundial. El 2007 les fluorquinolones van deixar de ser el tractament recomanat per les guies del CDC, així com també per les guies europees. Actualment la taxa de resistència d'alt nivell a les fluorquinolones és alt a nivell mundial.

- **Macròlids:** Dades clíniques i *in vitro* van demostrar que l'eritromicina no era prou efectiva pel tractament de la gonorrea. Comparada amb l'eritromicina, l'azitromicina té una activitat superior contra el gonococ. Tot i així a finals dels 1990s, es van documentar casos amb sensibilitat disminuïda (SD) i resistència a azitromicina a Amèrica llatina, on l'azitromicina era freqüentment utilitzada pel tractament de ITS bacterianes. La resistència a aquest antibiòtic es va disseminar ràpidament i soques amb resistència d'alt nivell (CMI 256 mg/L) es van aïllar a Escòcia (35), Anglaterra (36), Argentina (37), Itàlia (38), Estats Units (39) i Suècia (40). Actualment aquest antibiòtic no es recomana pel tractament empíric en monoteràpia, però sí que és un dels dos antimicrobians utilitzats en la teràpia dual de la gonorrea.
- **Cefalosporines:** Les cefalosporines recomanades pel tractament de la gonorrea són les de tercera generació, ceftriaxona intramuscular i cefixima oral. Tot i així altres cefalosporines orals, com cefditorè, cefuroxima, cefpodoxima i ceftibutè, s'han utilitzat en països on la cefixima no està disponible. Durant les darreres dues dècades, la sensibilitat a les cefalosporines d'espectre estès (ESCs) ha anat disminuint (41) (42) (43) i s'han documentat casos de fracàs terapèutic a tot el món (44) (3) (45) (4) (46). Concretament a Japó, la ceftriaxona no s'utilitzava pel tractament de la gonorrea, sinó que durant la dècada dels anys 90 es van utilitzar diverses cefalosporines orals, moltes d'elles amb dosis subòptimes. Quan es va introduir la cefixima oral, normalment s'utilitzava una dosi de 300 mg, en comptes dels 400 mg utilitzats internacionalment (47), es va introduir el tractament dual per la gonorrea anogenital i faríngia no complicada. Aquestes guies recomanen la ceftriaxona intramuscular (250 mg (7) o 500 mg (8) (9) (50))

juntament amb azitromicina oral (1 g (8) (7) (50) o 2 g (9)). L'objectiu del tractament dual és evitar la selecció de soques amb sensibilitat disminuïda a les cefalosporines, ja que el gonococ, igual que altres bacteris, té dificultat per desenvolupar resistències a dues classes diferents d'antimicrobians, i així es crea una barrera farmacològica que evita el desenvolupament de resistències a un dels components del tractament dual (51).

### 1.8.3. Mecanismes de resistència antimicrobiana

*Neisseria gonorrhoeae* pot desenvolupar resistència als antibiòtics mitjançant tots els mecanismes fisiològics coneguts: a) modificació o destrucció de la molècula antimicrobiana a través d'un procés enzimàtic; b) modificació de la diana terapèutica que dóna lloc a una reducció de l'afinitat als antimicrobians; c) disminució de l'entrada de l'antibiòtic a l'interior de la cèl·lula, i d) augment de l'expulsió cap a l'exterior de la cèl·lula.

La majoria de determinants genètics que donen resistència antimicrobiana són cromosòmics, excepte els gens *bla*<sub>TEM</sub> i *tetM* que són de localització plasmídica.

Alguns determinants de resistència per sí sols poden donar lloc a alts nivells de resistència tant *in vitro* com *in vivo*. Tot i així, en altres ocasions cal que s'acumulin diferents determinants perquè el fenotip de resistència tingui significat clínic. En la taula 4 es resumeixen els diferents mecanismes i determinants de resistència a les diferents famílies d'antimicrobians.

Antimicrobial class	Resistance determinants/mechanisms
Sulfonamides	Oversynthesis of <i>p</i> -aminobenzoic acid, which dilutes the sulfonamide. Mutations in <i>folP</i> (encoding the sulfonamide target DHPS) reduce target affinity. The <i>folP</i> mutations comprise SNPs or a mosaic <i>folP</i> gene containing sequences from commensal <i>Neisseria</i> spp.
Penicillins (e.g., penicillin G and ampicillin)	Mutations in <i>penA</i> (encoding the main lethal target PBP2). Traditionally, the mutations were the single amino acid insertion D345 in PBP2 and 4 to 8 concomitant mutations in the PBP2 carboxyl-terminal region, decreasing the PBP2 acylation rate and reducing susceptibility ~6- to 8-fold. In the last decade, many mosaic <i>penA</i> alleles with up to 70 amino acid alterations, also reducing PBP2 acylation, were described. Mutations in <i>mtrR</i> , in the promoter (mainly a single nucleotide [A] deletion in the 13-bp inverted repeat sequence) or coding sequence (commonly a G45D substitution), result in overexpression of and increased efflux from the MtrCDE efflux pump. See the text for rarer mutations resulting in increased MtrCDE efflux. <i>porB1b</i> SNPs, e.g., encoding G120K and G120D/A121D mutations in loop 3 of PorB1b, reduce influx ( <i>penB</i> resistance determinants). Interestingly, the <i>penB</i> phenotype is apparent only in strains with the <i>mtrR</i> resistance determinant. A SNP in <i>pilQ</i> (encoding the pore-forming secretin PilQ of the type IV pili), i.e., E666K, reduces influx. Note that this SNP has been found only in the laboratory and is unlikely to be present in clinical isolates, because it disrupts type IV pilus formation, which is essential for pathogenesis. A SNP in <i>ponA</i> (encoding the second penicillin target, PBP1), i.e., " <i>ponA1</i> determinant" (L421P), reduces penicillin acylation of PBP1 ~2- to 4-fold. "Factor X," an unknown, nontransformable determinant, increases penicillin MICs ~3- to 6-fold. Penicillinase (TEM-1 or TEM-135)-encoding plasmids, i.e., Asian, African, Toronto, Rio, Nimes, New Zealand, and Johannesburg plasmids, hydrolyze the cyclic amide bond of the $\beta$ -lactam ring and render the penicillin inactive.
Tetracyclines (e.g., tetracycline and doxycycline)	A SNP in <i>rpsJ</i> (encoding ribosomal protein S10), i.e., V57M, reduces the affinity of tetracycline for the 30S ribosomal target. <i>mtrR</i> mutations (see above). <i>penB</i> mutations (see above). A SNP in <i>pilQ</i> (see above). TetM-encoding plasmids, i.e., American and Dutch plasmids. Evolved derivatives have been described in Uruguay and South Africa. TetM, resembling elongation factor G, binds to the 30S ribosomal subunit and blocks tetracycline target binding.
Spectinomycin	A 16S rRNA SNP, i.e., C1192U, in the spectinomycin-binding region of helix 34, reduces the affinity of the drug for the ribosomal target. Mutations in <i>rpsE</i> (encoding the 30S ribosomal protein S5), i.e., the T24P mutation and deletions of V25 and K26E, disrupt the binding of spectinomycin to the ribosomal target.
Quinolones (e.g., ciprofloxacin and ofloxacin)	<i>gyrA</i> SNPs, e.g., S91F, D95N, and D95G, in the QRDR, reduce quinolone binding to DNA gyrase. <i>parC</i> SNPs, e.g., D86N, S88P, and E91K, in the QRDR, reduce quinolone binding to topoisomerase IV. Many additional mutations in the QRDR of <i>gyrA</i> and <i>parC</i> have been described. An overexpressed NorM efflux pump also slightly enhances quinolone MICs.
Macrolides (e.g., erythromycin and azithromycin)	23S rRNA SNPs, i.e., C2611T and A2059G (in 1 to 4 alleles), result in a 23S rRNA target (peptidyltransferase loop of domain V) with a reduced affinity for the 50S ribosomal macrolide target. <i>mtrR</i> mutations (see above). <i>erm</i> genes ( <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , and <i>ermF</i> ), encoding rRNA methylases that methylate nucleotides in the 23S rRNA target, block the binding of macrolides. MacAB efflux pump: its overexpression increases the MICs of macrolides. <i>mef</i> -encoded efflux pump exports macrolides out of the bacterial cell and increases the MICs of macrolides.
Cephalosporins (e.g., ceftibuten, cefpodoxime, cefixime, cefotaxime, and ceftriaxone)	Mosaic <i>penA</i> alleles encoding mosaic PBP2s with a decreased PBP2 acylation rate. These proteins have up to 70 amino acid alterations and are derived from horizontal transfer of partial <i>penA</i> genes from mainly commensal <i>Neisseria</i> spp. Mutations in mosaic PBP2s verified to contribute to resistance are A311V, I312M, V316T, V316P, T483S, A501P, A501V, N512Y, and G545S. The resistance mutations need other epistatic mutations in the mosaic <i>penA</i> allele. <i>penA</i> SNPs, i.e., A501V and A501T, in nonmosaic alleles can also enhance cephalosporin MICs. Some additional SNPs (G542S, P551S, and P551L) were statistically associated with enhanced cephalosporin MICs, but their effects remain to be proven with, e.g., site-directed <i>penA</i> mutants in isogenic backgrounds. <i>mtrR</i> mutations (see above). <i>penB</i> mutations (see above). "Factor X," an unknown, nontransformable determinant (see above).

Taula 4. Determinants i mecanismes de resistència de *N. gonorrhoeae*.

Un exemple clar de la capacitat del gonococ per adquirir material genètic extern, és l'adquisició de gens de resistència per transferència horitzontal a partir de neissèries sapròfites de la orofaringe, les quals es coneix que poden actuar com a reservori de gens de resistència. En la gonorrea faríngia, la qual en la majoria de casos és asimptomàtica, el gonococ pot conviure amb neissèries comensals durant llargs períodes de temps, i és durant aquest temps que el gonococ pot adquirir gens de resistència per un procés de transformació. Aquests gens de resistència també es poden transmetre entre diferents

soques de gonococ tant per transformació com per conjugació. La taxa de transformació cromosòmica en el gonococ pot ser alta ( $10^{-2}/\mu\text{g DNA}/10^8$  UFC), en canvi la taxa de transformació plasmídica és baixa ( $10^{-6}/\mu\text{g DNA}/10^8$  UFC).

En el cas de *Neisseria gonorrhoeae*, la major part de mecanismes de resistència no provoquen una disminució del fitness biològic del bacteri, probablement degut a mutacions compensatòries, i això dóna lloc a la persistència de soques multiresistents, fins i tot en absència de pressió antibiòtica.

- **Resistència a les sulfonamides:** aquesta família d'antibiòtics inhibeixen la síntesis de l'àcid fòlic bloquejant l'enzim dihidropteroat sintetasa (DHPS). La resistència és deguda a alteracions del gen *folP*, el qual codifica la DHPS, de manera que disminueix l'afinitat entre les sulfonamides i la seva diana terapèutica.
- **Resistència a la penicil·lina:** els antibiòtics beta-lactàmics inhibeixen la síntesis del peptidoglucà mitjançant l'unió de l'anell beta-lactàmic a les PBPs (penicillin-binding proteins), donant lloc a una activitat bactericida.
  - Resistència plasmídica: confereixen resistència d'alt nivell a la penicil·lina. Són plàsmids que contenen el gen *bla<sub>TEM-1</sub>* que codifica per una beta-lactamasa de tipus TEM-1. Aquest enzim hidrolitza l'anell beta-lactàmic i inactiva l'antibiòtic. Fins l'actualitat no s'han descrit beta-lactamases d'espectre estès en el gonococ.
  - Resistència cromosòmica: aquest tipus de resistència és degut a mutacions a la diana de la penicil·lina, les PBPs. Tradicionalment, en els gonococs resistents a la penicil·lina, hi ha entre 5 i 9 mutacions en el gen *penA* (que codifica la PBP2, la principal diana dels beta-lactàmics), el que disminueix la sensibilitat a la penicil·lina de 6 a 8 vegades. Aquestes mutacions al *penA* són degudes a l'adquisició, mitjançant transformació, de seqüències procedents de neissèries comensals que posseeixen una PBP2 modificada.

En les últimes dècades s'han descrit varis gens *penA* en mosaic que contenen entre 60 i 70 canvis d'aminoàcids i que poden donar lloc a resistència tant a les penicil·lines com a les cefalosporines.

Tot i que les mutacions en el *penA* són el principal mecanisme de resistència, existeixen altres gens involucrats. Per exemple, *ponA* que codifica la PBP1. La principal mutació és una mutació no sinònima (al·lel *ponA1*) que disminueix entre 3 i 4 vegades el grau acilació de la PBP1.

- Altres mecanismes cromosòmics: les CMI's a penicil·lina també poden incrementar degut a mutacions específiques en el gen *mtrR* que dóna lloc a una sobreexpressió de la bomba d'expulsió MtrC-D-E. Per altra banda aquest increment també pot ser degut a mutacions en el gen *penB* que provoca alteracions en la porina PorB1b, el que disminueix la penetració de la penicil·lina a la cèl·lula.

- **Resistència a la tetraciclina:** les tetraciclines inhibeixen la síntesis de proteïnes bloquejant l'unió de l'aminoacil-tRNA al ribosoma, principalment unint-se a la subunitat 30S del ribosoma. Presenten activitat bacteriostàtica.

- Resistència plasmídica: la resistència d'alt nivell mediada per plàsmids (CMI  $\geq 16$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) és deguda al gen *tetM*. TetM s'uneix al ribosoma desplaçant la molècula antimicrobiana, i això és degut a la seva similitud al factor d'elongació G (EF-G), involucrat en la síntesis de proteïnes, i a més tetM té activitat GTPasa.

- Resistència cromosòmica: és deguda a mutacions que modifiquen l'estructura de la proteïna ribosomal (al·lel *rpsJ*), la qual actua juntament amb altres determinants que augmenten l'expulsió (*mtrR*) i disminueixen la penetració (*penB*) de la tetraciclina.

- **Resistència a l'espectinomicina:** aquest antibiòtic amb activitat bacteriostàtica s'uneix a la subunitat ribosomal 30S, concretament al 16S rRNA, i inhibeix la translació de la proteïna.

Pel gonococ, la resistència d'alt nivell a l'espectinomicina (CMI  $>1024$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) és deguda a un SNP en la regió d'unió del 16S rRNA i també a una delecció Val25 i mutació K26E en el 30S ribosomal.



- **Resistència a les quinolones:** aquesta família d'antibiòtics amb activitat bactericida, actua inhibint la DNA girasa i la topoisomerasa IV, enzims essencials pel metabolisme del DNA. La DNA girasa està formada per dues subunitats GyrA i dues GyrB, i en el gonococ la resistència a aquests antibiòtics és deguda a mutacions en el gen *gyrA*. La topoisomerasa IV és un tetràmer format per dues subunitats ParC i dues ParE. Aquest enzim també es pot inhibir per acció de les quinolones, tot i que la concentració d'antibiòtic necessària és superior que la necessària per inhibir la DNA girasa. Mutacions només en *gyrA* poden conferir resistència de baix nivell o intermig, però per desenvolupar resistència d'alt nivell són necessàries mutacions concomitants en *parC*.
- **Resistència als macròlids:** el macròlids són antibiòtics bacteriostàtics que inhibeixen la síntesis proteica unint-se a la subunitat 50S del ribosoma. La resistència a aquests antimicrobians és el resultat de modificacions en el 23S rRNA, ja sigui per metilació o per mutacions específiques, i/o per sobreexpressió del sistema d'expulsió. Els gens que codifiquen les rRNA metilases (gens *erm*) poden estar lligats a transposons conjugatius, i alguns d'aquests gens *erm* van ser identificats en soques de gonococ a principis dels anys 1990s. En *N. gonorrhoeae* els gens *erm* poden conferir resistència d'alt nivell a eritromicina (CMI de 4 a 16 µg/mL) i resistència de baix nivell a azitromicina (CMI de 1 a 4 µg/mL). Mutacions específiques en el 23S rRNA també poden conferir resistència de baix nivell (mutació C2611T) i d'alt nivell (mutació A2059G) a eritromicina i azitromicina. La sobreexpressió de sistemes d'expulsió, particularment la bomba MtrC-D-E, també pot afectar la CMI dels macròlids.
- **Resistència a les cefalosporines:** és deguda principalment a mutacions que modifiquen les PBPs, però també deguda a un increment de l'expulsió o una disminució de la penetració de les cefalosporines a l'interior de la cèl·lula. El principal determinant de resistència a les cefalosporines en el gonococ són alteracions específiques en el gen *penA* que codifica la PBP2, la principal diana de les cefalosporines. El més freqüentment descrit en soques de gonococ resistents a les cefalosporines és el gen *penA* en mosaic, que conté entre 60 i 70 canvis

d'aminoàcids. Aquest al·lel *penA* en mosaic es creu que es va desenvolupar per transformació i recombinació amb altres gens *penA* procedents de neissèries comensals de l'orofaringe, com *Neisseria perflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria cinerea* i *Neisseria flavescens*. L'adquisició d'al·lells en mosaic incrementen les CMI de la cefixima més que les de la ceftriaxona. En soques resistents a cefixima amb l'al·lel *penA* en mosaic, s'han detectat tres alteracions aminoacídiques específiques (G545S, I312M i V316T). Aquestes tres mutacions augmenten la CMI només en presència de mutacions addicionals en el mosaic *penA* les quals per sí soles no tenen cap efecte. Es creu que aquestes tres mutacions poden actuar com a "estabilitzants" ja que restablirien l'activitat transpeptidasa essencial per la viabilitat del gonococ. La introducció de la mutació A501V en soques amb l'al·lel en mosaic, augmenta les CMI de ceftriaxona i cefixima entre 2 i 4 vegades. Algunes alteracions puntuals en la PBP2, com G542S, P551S i P551L, també s'han associat estadísticament amb CMI elevades a ceftriaxona.

Pel que fa a les tres soques amb resistència d'alt nivell a totes les cefalosporines, la primera va ser a Japó (3) i la soca presentava un nou al·lel *penA* en mosaic que contenia 12 canvis d'aminoàcids en comparació a l'al·lel X, el qual era el que fins llavors s'havia associat a resistència a cefixima i a casos de fracàs terapèutic. D'aquestes 12 mutacions, tres mutacions (A311V, V316P, i T483S) eren les que augmentaven significativament les CMI de cefixima i ceftriaxona. Ala311 i Val316 estan situades a la  $\alpha 2$  hèlix de la PBP2, i mutacions en aquests dos aminoàcids poden modificar l'estructura de la proteïna i disminuir l'estat d'acilació de les cefalosporines. A més la pèrdua del grup metil de la Thr en la posició 483 també pot afectar l'acilació de l'antibiòtic.

Les soques resistents aïllades a França (4) i Espanya (5) contenen l'al·lel en mosaic XXXIV amb una alteració addicional A501P. Aquesta mutació s'ha demostrat que canvia l'estructura secundària de la PBP2 i impedeix la unió de la ceftriaxona i la cefixima a la PBP2.

Tot i que el principal mecanisme de resistència són les alteracions en la diana terapèutica, l'augment de l'expulsió i la disminució de la penetració de les

cefalosporines a través dels determinants *mtrR* i *penB*, respectivament, augmenten les CMI's tant de ceftriaxona com de cefixima, encara que s'ha vist que l'efecte és superior en el cas de la ceftriaxona.

Per altra banda, mutacions en *ponA* i *pilQ* (determinants de resistència a la penicil·lina), no sembla que afectin les CMI's de les cefalosporines.

Fins aquí s'han comentat els determinants de resistència específics per cada família d'antibiòtics, però existeixen altres mecanismes que poden afectar les CMI's de diverses famílies d'antibiòtics, independentment del seu mecanisme d'acció. Són els sistemes d'expulsió i les porines.

Pel que fa als primers, al llarg dels anys s'han descrit en bacteris diverses bombes d'expulsió, les quals s'agrupen en funció de la seva composició i estructura: a) família MF (major facilitator); b) família SMR (small multidrug resistance); c) família RND (resistance-nodulation-cell division); d) família MATE (multidrug and toxic compound extrusion) i e) família ABC (ATP-binding cassette).

En el gonococ s'han identificat 4 sistemes d'expulsió (MtrC-D-E, MacAB, NorM i FarAB) que pertanyen a les famílies RND, ABC, MATE i MF, respectivament. La bomba MtrC-D-E pot expulsar diferents antimicrobians hidrofòbics, com macròlids, beta-lactàmics, ciprofloxacino i tetraciclina. La bomba NorM exporta fluorquinolones i la MacAB macròlids.

La bomba MtrC-D-E és una de les més estudiades. Les soques de gonococ amb resistència mitja a diferents compostos hidrofòbics solen presentar mutacions en el domini d'unió al DNA del gen *mtrR*. Però en les soques amb resistència d'alt nivell, s'ha vist que el més freqüent és una delecció d'una adenina en una zona repetitiva invertida de 13 parells de bases en la regió del promotor del *mtrR*.

Pel que fa a la penetració dels antimicrobians a l'interior de la cèl·lula, les soques de gonococ que expressen PorB1b són més sensibles a la penicil·lina i tetraciclina, i canvis d'aminoàcids en el loop 3 de la PorB1b disminueixen la sensibilitat del gonococ a penicil·lina, tetraciclina i cefalosporines. Curiosament, la penicil·lina i la ceftriaxona s'afecten més que la cefixima, la qual cosa suggereix que la cefixima no difon a l'espai periplàsmic a través de PorB1b o que la difusió no es veu alterada per mutacions en *penB*.

Tot i així aquest determinant de resistència necessita l'acció sinèrgica amb altres determinants per tal d'expressar fenotípicament l'augment de les CMIs.

En general les soques bacterianes que presenten resistència antimicrobiana tenen un avantatge tant *in vitro* com *in vivo*, ja que perviuen en presència de l'antibiòtic al que són resistents. Però contràriament, en absència de l'antibiòtic el rendiment biològic (fitness) d'aquestes soques és inferior al de les soques sensibles. Tot i així, hi ha mutacions estabilitzadores o compensatòries que restableixen el fitness mantenint la resistència antimicrobiana. Concretament en el gonococ, no necessàriament els mecanismes de resistència provoquen una disminució del rendiment biològic del bacteri, i això es fa evident quan es segueixen detectant soques multiresistents inclús sense pressió antibiòtica, ja que són antibiòtics que ja fa anys que no s'utilitzen pel tractament de la gonorrea.

## 1.9. Perspectives de futur

El tractament ràpid i adequat dels pacients amb gonorrea així com de les seves parelles sexuals és una prioritat. Un retard en el seu inici pot donar lloc a la disseminació de la infecció, sobretot en grups amb conductes sexuals de risc. Remarcant que moltes de les infeccions gonocòcciques es donen en països amb recursos limitats. És important que el tractament empíric curi com a mínim el 95% dels casos.

Per aquestes raons, és fonamental monitoritzar la sensibilitat antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* a través de programes de vigilància a nivell local, nacional i mundial. Actualment en els països amb recursos, les tècniques d'amplificació d'àcids nucleics han desplaçat el cultiu pel diagnòstic de la infecció gonocòccica. Aquestes tècniques fins l'actualitat no permeten realitzar estudis de sensibilitat antimicrobiana, la qual cosa ha creat dificultats a l'hora d'identificar la magnitud del problema de les resistències d'aquest microorganisme en algunes parts del món (52). Per poder determinar la sensibilitat antimicrobiana, el cultiu continua sent necessari, tot i els inconvenients ja senyalat en el punt 1.6.2. Per tant cal destinar esforços en mantenir el cultiu convencional, sobretot en centres de referència.

Actualment no hi ha TAANs comercialitzats que permetin realitzar a l'hora la detecció i l'estudi de sensibilitat de *N. gonorrhoeae*. Tot i així, s'han desenvolupat assajos moleculars en alguns laboratoris que permeten la detecció de determinants plasmídics i cromosòmics de resistència a penicil·lina, tetraciclina, macròlids, fluorquinolones i cefalosporines. Lamentablement, la sensibilitat i especificitat d'aquests tests són baixes. A més, la correlació entre aquests determinants genètics, les CMIs i l'eficàcia del tractament, és dèbil. En aquestes circumstàncies es fa difícil utilitzar marcadors genètics per guiar el tractament de la gonorrea. Per tant és necessari que companyies de diagnòstic inverteixin més esforços en el desenvolupament i avaluació de les TAANs per la detecció de determinants de resistència, sobretot en entorns amb pocs recursos on no hi ha suficients diners ni personal prou entrenat per realitzar l'estudi fenotípic de la sensibilitat antimicrobiana.

Tot i que el tractament dual utilitzat actualment és efectiu, aquest no és accessible a determinats entorns amb pocs recursos i a més ja s'han detectat soques amb resistència d'alt nivell tant a ceftriaxona com a azitromicina. Per tant, és necessari desenvolupar nous antimicrobians o altres substàncies terapèutiques.

La recerca i desenvolupament de fàrmacs és cara i laboriosa. El cost mig d'un nou fàrmac es calcula entre 800 i 1.700 milions de dòlars. Actualment hi ha molt pocs agents antibacterians en desenvolupament i 8 de les 15 principals indústries farmacèutiques que desenvolupaven antibiòtics han abandonat aquest camp d'investigació. Per tant cal impulsar el desenvolupament de noves molècules o buscar altres antimicrobians que puguin tenir efecte sinèrgic.

Un estudi randomitzat multicèntric va avaluar l'eficàcia de la gentamicina (240 mg/24 hores intramuscular) més azitromicina (2 g/24 hores oral) i gemifloxacino (320 mg/24 hores oral) més azitromicina (2 g/24 hores oral) per la gonorrea no complicada. La curació microbiològica va ser del 100% per gentamicina-azitromicina i del 99,5% per gemifloxacino-azitromicina. Tot i així es van documentar reaccions adverses en els dos casos (53).

L'espectinomicina és efectiu pel tractament de la gonorrea anogenital però en canvi l'eficàcia per les infeccions faríngies és baixa, i en molts països no està disponible. Tot i així la sensibilitat *in vitro* és molt alta a nivell mundial, i es creu que la disseminació de soques resistents als anys 1980s hauria pogut ser causada per un ús incontrolat d'aquest antibiòtic i/o per la ràpida transmissió de les soques resistents. De manera que potser l'espectinomicina s'està subestimant com a opció de tractament, sobretot en el tractament combinat amb azitromicina.

Altres antimicrobians que s'estan plantejant com a futur tractament empíric són l'ertapenem intravenós, la fosfomicina oral i la gentamicina intramuscular. Tot i així falten estudis randomitzats que permetin establir una bona correlació entre les CMI i l'eficàcia clínica i estudiar paràmetres PK/PD (54). Per tant de moment són opcions a valorar pels casos de soques resistents a la ceftriaxona o pels casos d'al·lèrgia a les cefalosporines.

També s'estan estudiant noves molècules derivades d'antics antimicrobians. Per exemple algunes fluorquinolones com avarofloxacin (JNJ-Q2), sitafloxacin i delafloxacin (55) (56). La eravaciclina (TP-434) i la tigeciclina, de la família de les tetraciclines, també semblen efectives contra el gonococ (57) (58).

La dalbavancina i dos nous carbapenems (SM-295291 i SM-369926) han demostrat una gran activitat contra un número limitat de soques de gonococ (59) (60). I finalment dos macròlids bicíclics, la moditromicina (EDP-420) i EDP-322 presenten bona activitat enfront soques resistents a azitromicina i cefalosporines i enfront soques multiresistents. Lamentablement no hi ha dades d'eficàcia clínica per cap d'aquests nous antimicrobians.

Un nou fluorcetàlid que està en una fase més avançada de desenvolupament és la solitromicina (família dels macròlids) i ha demostrat alta activitat enfront soques resistents a azitromicina i cefalosporines i soques multiresistents (62). Tot i així soques amb resistència d'alt nivell a azitromicina han demostrat també resistència tant a solitromicina com als dos macròlids bicíclics anteriorment comentats. Solitromicina presenta bona absorció oral i assoleix nivells plasmàtics i concentracions intracel·lulars altes. A més, el seu efecte post-antibiòtic és perllongat.

En els últims anys s'han desenvolupat alguns compostos que utilitzen noves dianes o estratègies, i de moment mostren una activitat *in vitro* potent enfront de soques de gonococ. Com a exemples mencionar un inhibidor de la síntesis de proteïnes anomenat

pleuromutilina BC-3781; inhibidors de l'enzim LpxC; i dos nous inhibidors de la topoisomerasa (VXc-486 i ETX0914).

Degut a la complexitat del desenvolupament de nous antimicrobians, al temps i als recursos necessaris i a la facilitat en que *Neisseria gonorrhoeae* desenvolupa resistència, cal destinar esforços en el desenvolupament de vacunes.

Quatre dècades endarrere el desenvolupament de vacunes pel gonococ era un camp d'investigació molt actiu. Concretament es van dur a terme dos assajos que van fracassar. El primer era una vacuna parenteral que utilitzava la cèl·lula sencera inactivada per calor, l'assaig es va dur a terme a Canadà però no va donar protecció. En l'altre, s'estudiava una vacuna intradèrmica a base de pilina purificada, però tampoc va conferir protecció, degut a l'alta variabilitat antigènica del pili.

Amb el temps l'investigació destinada a aquest camp va anar minvant i molts investigadors van centrar els esforços en estudiar les bases genètiques de la variabilitat antigènica del gonococ. Gràcies a tècniques de biologia molecular es van identificar moltes molècules de superfície que podrien ser candidats pel desenvolupament de noves vacunes (veure taula 5) (63). Molts d'aquests antigens s'expressen d'una forma constant i conservada, i pels que ho fan d'una manera semiconservada, s'han identificat regions funcionals conservades enfront de les quals es pot dirigir la resposta immunitària.

Functional class	Description	Reference number
<b>Colonization</b>		
PilC	Pilus-associated adhesin; phase variable expression, variable and conserved regions	4
PilQ	Outer membrane channel through which pili are extruded; stable expression and antibodies against meningococcal PilQ are bactericidal	5
PorB	Major porin, two serogroups (PorB1A and PorB1B), stable expression; involved in gonococcal invasion of cervical cells through the C3R integrin; PorB1A molecules directly mediate uptake through the SREC-1 receptor	6 7
Opa proteins	Phase variable; 8–10 antigenically distinct Opa proteins per strain; peptide antigens may be used to avoid immunosuppressive domains; a cyclic peptide corresponding to the semivariable (SV) loop recognises Opa proteins with as many as 6–8 amino acid differences in this loop	26
OmpA	Surface-exposed, stably expressed, highly conserved. Mediates invasion of cervical and endometrial cells	27
<b>Nutrient acquisition</b>		
TbpA, TbpB	Transferrin receptor; TbpA and TbpB are highly and semiconserved, respectively. Purified TbpA or TbpB induce bactericidal antibodies in mice that block growth in the presence of Tf as a sole iron source	28
LbpA, LpbB	Lactoferrin receptor; antibodies against <i>N meningitidis</i> homologues are bactericidal	13
TdfI	Iron-induced zinc transporter; antibodies against the meningococcal homologue (ZnuD) are bactericidal	29 30
<b>Evasion of innate defenses</b>		
MtrE	Surface-exposed channel of the MtrC-MtrD-MtrE and FarA-FarB-MtrE active efflux pumps; stable expression and highly conserved; antibodies to recombinant MtrE are bactericidal	(AJ DeRocco and AE Jerse, unpublished data)
Lst	$\alpha$ 2,3 sialyltransferase; catalyses the addition of host-derived sialic acid to the LNT species of LOS; protects gonococci from complement, non-opsonic uptake by neutrophils and antimicrobial peptides. Antibodies to purified Lst reduce sialylation	16 17
PorB	In serum resistant strains, PorB binds soluble negative regulators of the complement cascade (C4b-binding protein, factor H) to down-regulate complement activation at the gonococcal surface	31
<b>Other</b>		
2C7 epitope	Bactericidal LOS epitope; phase variable but expressed by >95% of isolates. Antibodies to a 2C7 peptide mimetic are bactericidal and opsonophagocytic and active and passive protection was demonstrated in mice	20 32
AniA	Nitrite reductase; surface-exposed, conserved; induced by low O <sub>2</sub> tension and the presence of nitrite. Required for anaerobic growth and biofilm formation; plays a role in serum resistance. A truncated AniA protein that lacked the glycosylated C-terminus induced antibodies that inhibited nitrite reductase activity	8–10
OpcA	Stably expressed in <i>N gonorrhoeae</i> . OMV from <i>N meningitidis</i> with a phase-locked 'on' <i>opcA</i> gene is a candidate meningococcal vaccine	33 34
NspA	Stably expressed, highly conserved. Meningococcal NspA is protective in mouse model of meningococcal infection	35
Outer membranes	Can be engineered to stabilise the expression of phase variable or regulated antigens and increase the diversity of antigenic variants present. An outer membrane preparation was protective against <i>N gonorrhoeae</i> in a mouse model	3

Taula 5. Antígens pel desenvolupament de la vacuna enfront el gonococ.

Es divideixen en quatre grups:

- Molècules de superfície implicades en la colonització del gonococ. Són el PilC, el PilQ i el PorB. En el cas del PorB, tot i que la part exposada a la superfície és heterogènia entre diferents soques, hi ha dominis conservats enfront als que es podria dirigir el sistema immunitari.
- Sistemes d'adquisició de nutrients. Trobem el receptor de la transferrina (TbpA i TbpB) o de la lactoferrina (LbpA i LpbB). La immunització intranasal de ratolins amb les proteïnes TbpA i TbpB fusionades amb la subunitat B de la toxina del còlera, indueix la producció de títols alts d'anticossos IgG i IgA que inhibeixen el creixement del gonococ en medis que contenen la transferrina com a única font de ferro.
- Sistemes d'evasió de la resposta immunitària innata. El gonococ expulsa compostos hidrofòbics (àcids grassos, lípids de cadena llarga, antimicrobians



peptídics, sals biliars...) a través de les bombes d'expulsió MtrC-D-E o FarA-FarB-MtrE. El component MtrE d'aquests bombes té dos dominis de superfície que es podrien utilitzar com a diana. Un altre factor de superfície que protegeix el gonococ enfront el sistema innat és la  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase (Lst). Anticossos enfront aquesta proteïna redueixen el nivell de sialilació del LOS i això podria augmentar la sensibilitat del gonococ a l'acció dels neutròfils i el sistema de complement.

- Altres dianes. Com la nitrit reductasa (AniA) necessària per la formació del biofilm. Aquest enzim és necessari perquè el gonococ pugui créixer en condicions anaeròbies. Anticossos específics enfront d'aquesta proteïna es van detectar en el sèrum de pacients amb malaltia pèlvica inflamatòria i infecció disseminada. Jennings et al. van demostrar que anticossos enfront AniA recombinant inhibeixen l'activitat nitrit reductasa (64).

Actualment l'única vacuna enfront ITS és la del Virus del Papil·loma humà (VPH), per la qual cosa falta molta informació sobre les diferents vies d'immunització que indueixen la resposta de les mucoses així com sobre adjuvants que puguin augmentar la resposta immunitària a nivell del tracte genital. Altres qüestions són la influència del sexe dels pacients així com la coinfecció amb altres ITS en l'eficàcia de les vacunes.



## **2. Hipòtesi i objectius**

Actualment la gonorrea és un problema de Salut Pública, tant per l'augment de la seva incidència com per la capacitat de *Neisseria gonorrhoeae* per desenvolupar resistències als antimicrobians. És necessari realitzar un diagnòstic precoç, detectar de forma ràpida l'aparició de resistències i determinar els patrons de transmissió de la infecció, per poder realitzar un tractament efectiu i evitar-ne la disseminació.

### **2.1. Objectiu general**

L'objectiu general d'aquesta tesi és el d'analitzar el rendiment de les principals eines diagnòstiques microbiològiques i monitoritzar la sensibilitat antimicrobiana i la dinàmica poblacional de *Neisseria gonorrhoeae* en una àrea geogràfica concreta, la ciutat de Barcelona.

Amb aquest objectiu s'han dissenyat i realitzat diversos estudis que donen resposta als següents objectius específics.

### **2.2. Objectius específics**

#### **Objectiu específic 1: Tècniques diagnòstiques**

- Comparar el rendiment del cultiu convencional i de les tècniques d'amplificació d'àcids nucleics, com a eines pel diagnòstic microbiològic de la infecció gonocòccica.

## **Objectiu específic 2: Monitorització de les resistències antimicrobianes**

- Determinar la sensibilitat antimicrobiana de les soques de *Neisseria gonorrhoeae* aïllades a Barcelona durant el període 2012-2016.
- Estudiar els mecanismes moleculars (mutacions en *penA*, *ponA*, *mtrR* i *porB*) implicats en la resistència a les cefalosporines de tercera generació.
- Comparar els patrons de tipificació molecular (sequenciotips de NG-MAST) entre les soques amb sensibilitat disminuïda a les cefalosporines i les soques sensibles.

## **Objectiu específic 3: Dinàmica poblacional**

- Comparar els patrons de resistència antimicrobiana entre les soques provinents d'homes que tenen sexe amb homes i de pacients heterosexuales.
- Analitzar les diferències en l'estructura poblacional dels gonococs en funció de l'orientació sexual dels pacients.

Fruit d'aquests estudis s'han publicat tres articles que formen el cos d'aquesta tesi i que componen un tot doctrinal que avarca, interrelaciona i complementa tots els objectius abans esmentats.

A més a més, i també fruit d'aquests treballs, han estat 3 articles més que per diferents motius no s'han inclòs (Annex I) i de 8 comunicacions a congressos: 5 internacionals i 3 nacionals (Annex II).



## 3. Resultats

Les publicacions que componen aquesta tesi són les tres que es troben a continuació.

### **Publicació 1: Comparació entre el cultiu convencional i les tècniques s'amplificació d'àcids nucleics, pel diagnòstic microbiològic de la infecció gonocòccica.**

**Serra-Pladevall J, Caballero E, Roig G, Juvé R, Barbera MJ, Andreu A.**

Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 Dec;83(4):341-3.

DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.005

**Introducció:** La gonorrea és un problema important de Salut Pública. Un diagnòstic ràpid és necessari. L'objectiu d'aquest estudi va ser comparar el rendiment diagnòstic del cultiu amb el de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en la infecció gonocòccica.

**Material i mètodes:** Aquest estudi compara els resultats de detecció de *Neisseria gonorrhoeae* per cultiu i per PCR, de juliol a desembre del 2012. El diagnòstic molecular es va dur a terme amb una PCR a temps real utilitzant el kit Versant CT/GC DNA 1.0 assay.

**Resultats:** De les 768 mostres estudiades, 96,9% dels resultats van ser concordants. Un 3,1% van ser discordants, sent la PCR positiva i el cultiu negatiu en 21 casos i la PCR negativa i el cultiu positiu en 3. La sensibilitat, l'especificitat, el valor predictiu positiu i el valor predictiu negatiu del cultiu van ser de 86,2%, 99,8%, 99,2%, i 96,7%; i de la PCR de 98,7%, 100%, 100% i 99,7%, respectivament.

**Conclusions:** En laboratoris on es monitoritza la sensibilitat antimicrobiana del gonococ, una estratègia efectiva seria realitzar cultiu i PCR en pacients simptomàtics.

### **Publicació 2: Sensibilitat antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* a Barcelona: mutacions en *penA*, *ponA*, *mtrR* i *porB* i sequenciotips de NG-MAST associats a la sensibilitat disminuïda a les cefalosporines.**

Serra-Pladevall J, Barberá MJ, Rodríguez S, Bartolomé-Comas R, Roig G, Juvé R, Andreu A.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35: 1549 – 1556.

DOI: 10.1007/s10096-016-2696-7

**Objectius:** Els objectius d'aquest estudi van ser determinar la sensibilitat de *Neisseria gonorrhoeae* en la nostra àrea, analitzar els mecanismes moleculars que donen lloc a la resistència a les cefalosporines i realitzar la tipificació molecular de les soques de gonococ.

**Material i mètodes:** La sensibilitat antimicrobiana es va determinar mitjançant l'E-test. Es van estudiar els gens *penA*, *mtrR*, *penB* i *ponA*. La tipificació molecular es va realitzar amb la tècnica de *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing.

**Resultats:** De les 329 soques analitzades l'any 2013, cap va presentar resistència d'alt nivell a les cefalosporines, però el 8,2% va presentar resistència a cefixima (CMI >0,125 µg/mL) i el 0,6% a ceftriaxona (CMI >0,125 µg/mL). La resistència a azitromicina va ser del 4,3% i a ciprofloxacino del 49,2%. De les 48 soques amb una CMI ≥0,125 µg/mL a cefixima, el 58,3% contenen el patró en mosaic XXXIV en el gen *penA*, el 98% tenien la substitució Leu→Pro a la posició 421 del gen *ponA*, el 100% d'aquestes soques tenien canvi d'aminoàcid en les posicions 101 i 102 de la porina PorB1b, i el 87,5% presentaven la delecció d'una adenina en la regió del promotor de la bomba d'expulsió MtrC-D-E. Es va observar una diferència significativa pels quatre gens estudiats entre les soques amb sensibilitat disminuïda a les cefalosporines i les sensibles. D'aquestes 48 soques, el 43,8% pertanyien al genogrup G1407 i el 27,1% al G2400.



## Resultats

Es va observar una associació estadísticament significativa entre el G1407 i les soques amb sensibilitat disminuïda i entre el G2992 i les soques sensibles, i també entre el G1407 i el patró mosaic XXXIV i G2400 i la substitució A501T del *penA*.

**Conclusions:** La taxa de resistència de *Neisseria gonorrhoeae* en la nostra àrea és superior a la mitja d'Europa. S'ha detectat l'emergència del genogrup G2400, el qual podria ser una font de resistència antimicrobiana.

### **Publicació 3: Diferències en l'estructura poblacional i els patrons de resistència de *Neisseria gonorrhoeae* entre homes que tenen sexe amb homes i pacients heterosexuais.**

J. Serra-Pladevall, M. J. Barberá, A. E. Callarisa, R. Bartolomé-Comas, A. Andreu

Epidemiology and Infection 2016 (en procés d'edició).

**Introducció:** Aquest estudi compara la sensibilitat antimicrobiana i els genotips de soques de *Neisseria gonorrhoeae* aïllades de homes que tenen sexe amb homes i d'heterosexuais.

**Resultats:** Es van caracteritzar 111 soques de 107 pacients, de les quals 57 soques procedien de 54 pacients heterosexuais i 54 soques de 53 homosexuals. La taxa de resistència va ser superior en les soques aïllades de pacients heterosexuais, sent la cefixima ( $p=0.0159$ ) i ciprofloxacino ( $p=0.002$ ) significativament superior. La tipificació mitjançant *N. gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing (NG-MAST) va demostrar que els sequenciotips (ST) i genogrups (G) més prevalents van ser ST2400, ST2992, i ST5793; i G1407, G2992, i G2400, respectivament. Es va observar una associació estadísticament significativa entre els pacients homosexuals i els genogrups G2400 ( $p=0.0005$ ) i G2992 ( $p=0.0488$ ), i entre els heterosexuais i el genogrup G1407 ( $p=0.0002$ ).

**Conclusions:** El nostre estudi demostra que entre els pacients amb diferent orientació sexual circulen diferents poblacions de gonococ. Es detecta una alta prevalença del G2400 entre els pacients homosexuals, un fet no descrit prèviament segons els nostres coneixements.



## 4. Discussió

Tot i que durant molts anys el cultiu ha estat la tècnica de referència pel diagnòstic de la infecció gonocòccica, en els últims anys les tècniques d'amplificació d'àcids nucleics, degut als avantatges ja comentats, l'han anat desplaçant (23) (22) (24) (25) (26). Tot i així, i sobretot en centres de referència, el cultiu convencional es segueix realitzant per poder monitoritzar la sensibilitat antimicrobiana i la dinàmica poblacional de *Neisseria gonorrhoeae*.

En aquest primer estudi, es va comparar el rendiment diagnòstic de la PCR amb el kit comercial Versant CT/GC DNA 1.0 (Siemens Healthcare Diagnostics, USA) enfront del cultiu bacteriològic convencional. La concordança entre ambdues tècniques va ser del 96,9% amb només un 3,1% de casos discordants. El 87,5% dels discordants van ser deguts a la falta de sensibilitat del cultiu, és a dir, 21 casos en què per PCR es va detectar *N. gonorrhoeae* però no va créixer en el cultiu. D'aquests 21 casos només sis pacients tenien símptomes (2 proctitis i 4 uretritis). En tres d'aquests sis casos, la PCR va amplificar en un CT inferior a 30, mentre que en els altres tres en un CT superior a 30. En cap dels casos amb PCR positiva i cultiu negatiu va ser possible establir una relació entre la simptomatologia del pacient i el cicle d'amplificació de la PCR.

Pel que fa als tres casos amb PCR negativa i cultiu positiu, un va ser un fals negatiu del kit Versant, ja que posteriorment la PCR va resultar positiva pel sistema GeneXpert (Cepheid, USA). Es tractava d'un pacient amb clínica d'uretritis exsudativa.

El segon cas també era un pacient amb símptomes d'uretritis que va presentar una PCR negativa tant a *N. gonorrhoeae* com a *C. trachomatis*, en canvi en la tinció de Gram es van observar diplococs Gram negatiu intracel·lulars i en el cultiu va créixer el gonococ. Aquest cas podria tractar-se d'un fals negatiu de la PCR o d'un fals positiu del cultiu. No es va poder arribar a cap conclusió, ja que al tractar-se d'un estudi retrospectiu, no es van poder realitzar altres PCRs per confirmar la presència de *N. gonorrhoeae* o detectar *N. meningitidis*. S'han documentat casos de uretritis per meningococ des dels anys 1930s

(65) (66) (67), però l'incidència va començar a augmentar a partir dels anys 1970s degut als canvis de conducta sexual, específicament a l'augment de la pràctica del sexe oral. Des de llavors s'han notificat casos d'uretritis, epididimitis, proctitis, cervicitis i malaltia pèlvica inflamatòria causats per aquest microorganisme (68) (69) (70) (71) (72).

El tercer cas era un pacient asimptomàtic que seguint el protocol d'estudi de contactes, se li va practicar un frotis faringi. La mostra va ser negativa per PCR i positiva per cultiu. Es va concloure que podia tractar-se d'un fals positiu del cultiu, en el que probablement una neissèria sapròfita es va identificar erròniament com a *Neisseria gonorrhoeae*. En el moment en que es va realitzar l'estudi, l'identificació de les possibles colònies de gonococ es realitzava mitjançant la tinció de Gram, proves bioquímiques i aglutinació amb partícules de làtex. En estudis posteriors utilitzant el sistema MALDI-TOF (Vitek MS, BioMérieux), aquest grup va observar que les tècniques d'identificació abans esmentades poden donar lloc a falsos positius. En canvi, en dos estudis en què es va estudiar la utilitat de l'espectrometria de masses per identificar *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis*, es van obtenir resultats molt bons, ja que en el primer el 100% de les soques van ser identificades correctament (73) i en el segon l'identificació va ser la correcta en 92 de les 93 soques estudiades (74).

Els resultats d'aquest estudi són similars als publicats per Marangoni et al. (75), en un estudi en el que van comparar el rendiment diagnòstic de Versant CT/GC DNA 1.0 (Siemens Healthcare Diagnostics, USA) en mostres d'orina amb el cultiu convencional de mostres genitals. Mentre que en el nostre estudi la sensibilitat i especificitat del cultiu va ser del 86,2% i 99,8%, respectivament, en l'estudi de Maragani et al. va ser del 89,2% i 100%. Pel que fa a la PCR, en aquest estudi vam obtenir una sensibilitat del 98,7% i una especificitat del 100%, comparades amb el 100% i 99,4% respectivament, del de Maragani et al. La relativa baixa sensibilitat de Versant en el nostre treball és intrigant, ja que el límit de detecció d'aquesta tècnica, determinat per Maragani et al. (76), és molt baix (1 còpia de DNA/mL). En canvi, la sensibilitat del cultiu en aquest estudi és superior al documentat per Van Dyck et al. (77) i Luijt et al. (78), que aporten valors del 61,8% i 68,2%, respectivament. Aquestes diferències podrien ser degudes a les diferents poblacions estudiades. Mentre que en aquest estudi es tracta bàsicament de pacients atesos en una

clínica especialitzada en infeccions de transmissió sexual, la població de Luijt et al. eren pacients no seleccionats. Com és conegut, la sensibilitat del cultiu depèn de varis factors, com les condicions de transport i processament de la mostra, la localització de la infecció, la simptomatologia del pacient, el sexe i el tractament antibiòtic previ, factors que podrien justificar les diferències entre estudis.

En conclusió, els resultats d'aquest estudi mostren una bona concordança entre la PCR i el cultiu convencional de *N. gonorrhoeae*, en la població estudiada. La majoria de discrepàncies (87,5%) foren degudes a la limitada sensibilitat del cultiu, al ser *N. gonorrhoeae* molt sensible a les condicions ambientals i al tractament antibiòtic previ a la presa de la mostra. Així, el diagnòstic molecular per PCR esdevé la eina més fiable pel diagnòstic de rutina de la majoria d'infeccions gonocòcciques tant simptomàtiques com asimptomàtiques. En els laboratoris on es monitoritza la sensibilitat antimicrobiana una aproximació eficient podria ser realitzar PCR a tots els pacients i a més a més cultiu als pacients simptomàtics i als contactes de malalts diagnosticats d'infecció gonocòccia.

A més d'una major sensibilitat, la tècnica de PCR té l'avantatge addicional de ser ràpida i de tenir la capacitat de detectar simultàniament *Chlamydia trachomatis* i altres agents de transmissió sexual.

Tal com s'ha comentat en la introducció d'aquesta tesis, el gonococ ha demostrat una gran capacitat per desenvolupar resistència a tots els antimicrobians utilitzats al llarg de la història pel seu tractament. Degut a aquest fet, en les últimes dècades, vàries guies de tractament tant d'Europa (9) com dels Estats Units (7), Regne Unit (8) i Canadà (50), han introduït el tractament dual per la gonorrea anogenital i faríngia no complicada. Aquestes guies recomanen la ceftriaxona intramuscular (250 mg (7) o 500 mg (9) (8) (50)) juntament amb azitromicina oral (1 g (8) (7) (50) o 2 g (9)).

Per tal de mantenir les guies actualitzades i detectar de forma precoç l'aparició de soques multiresistents, és necessari monitoritzar la sensibilitat antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* tant a nivell local, com nacional i internacional. Per la qual cosa el segon objectiu específic d'aquesta Tesi és, per una banda determinar la sensibilitat antimicrobiana de les soques de *Neisseria gonorrhoeae* aïllades a Barcelona durant el període 2012-2016, i per l'altra, estudiar els mecanismes moleculars implicats en la resistència a les cefalosporines de tercera generació.

Per determinar la sensibilitat antimicrobiana, durant el període d'estudi, en el Laboratori de Microbiologia del Hospital Universitari Vall d'Hebron es van estudiar totes les soques de gonococ aïllades de pacients atesos al propi hospital, a la Unitat de Infeccions de Transmissió Sexual de Drassanes i a tota l'Atenció Primària de Barcelona, xarxa que inclou 138 Centres d'Atenció Primària i 30 Centres d'Atenció a la Salut Sexual i Reproductiva (ASSIR).

La metodologia referent al cultiu i a la determinació de la sensibilitat es troben descrits en el segon article que compona aquesta tesis.

Entre el 1 d'agost del 2012 i el 31 de juliol del 2016, es van estudiar 1355 soques procedents de 1311 pacients. En la taula 6 es mostra el sexe i la procedència dels pacients, així com el tipus de mostra.

	2012		2013		2014		2015		2016		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Nº d'aïllaments</b>	143		329		341		339		203		1355	
<b>Pacients</b>	139		321		326		328		197		1311	
<b>Sexe dels pacients</b>												
<b>Homes</b>	130	93,5	303	94,4	306	93,9	320	97,6	188	95,4	1247	95,1
<b>Dones</b>	9	6,5	18	5,6	18	5,5	8	2,4	9	4,6	62	4,7
<b>Desconegut</b>					2	0,6					2	0,2
<b>Procedència dels pacients</b>												
<b>HUVH</b>			17	5,3	18	5,5	19	5,8	14	7,1	68	5,8
<b>Unitat de ITS de Drassanes</b>			214	66,7	232	71,2	209	63,7	120	60,9	775	66,1
<b>Atenció primària</b>			90	28,0	76	23,3	100	30,5	63	32,0	329	28,1
<b>Tipus de mostra</b>												
<b>Uretral / Balanoprepucial</b>			261	79,3	245	71,8	274	80,8	169	83,3	949	78,3
<b>Rectal</b>			38	11,6	53	15,5	48	14,2	23	11,3	162	13,4
<b>Endocervical / Vaginal</b>			16	4,9	11	3,2	10	2,9	8	3,9	45	3,7
<b>Faringi</b>			10	3,0	11	3,2	7	2,1	2	1,0	30	2,5
<b>Altres</b>			4	1,2	21	6,2	0	0,0	1	0,5	26	2,1

Taula 6. Dades dels pacients estudiats durant el període 2012-2016.

El 95% dels pacients van ser homes i més del 65% d'aquests van ser atesos a l'Unitat de Malalties de Transmissió Sexual de Drassanes.

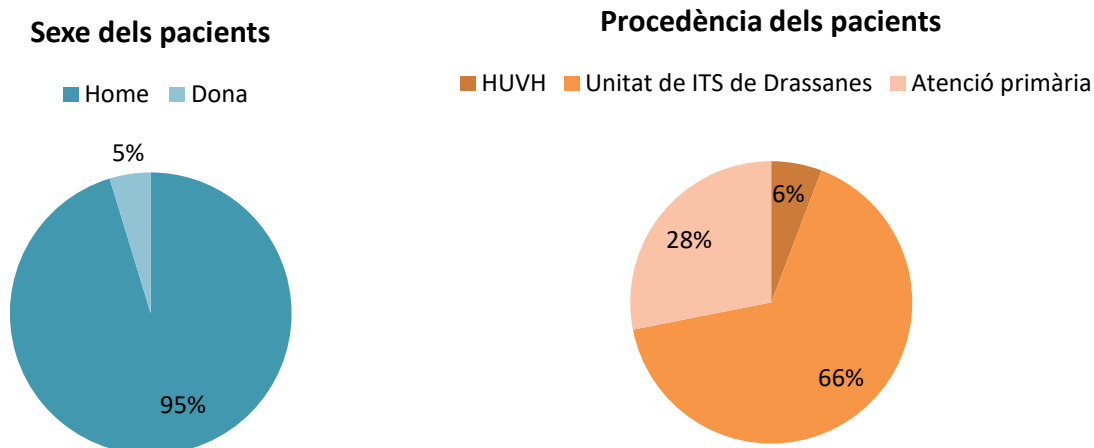


Figura 12. Sexe i procedència dels pacients.



Pel que fa a la localització de les mostres, al voltant del 80% van ser uretrals i més del 10% frotis rectal.

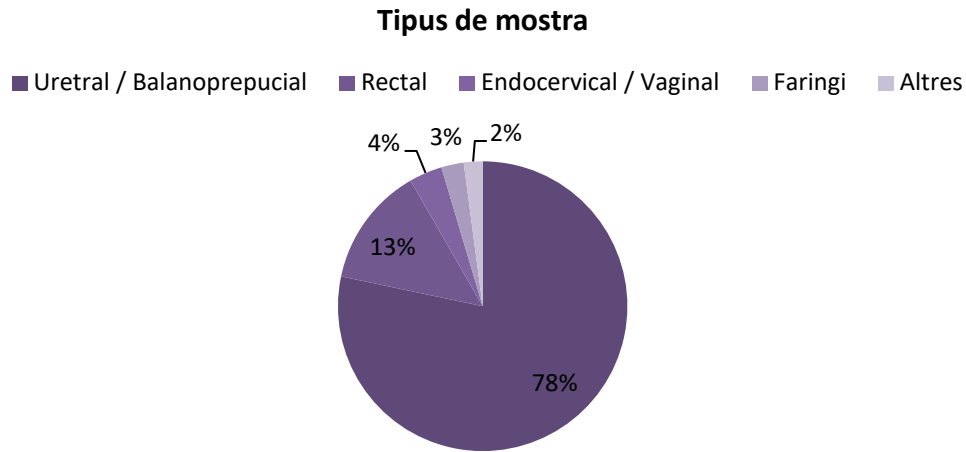


Figura 13. Tipus de mostra.

Durant tot aquest període es va estudiar la sensibilitat a la penicil·lina, ceftriaxona, cefixima, ciprofloxacino, azitromicina i espectinomicina. A partir del 2013 també es va determinar la CMI de gentamicina com a possible alternativa de tractament i a partir del 2015 la CMI de fosfomicina.

En la figura següent es representa el percentatge de resistència de cadascun dels antibiòtics estudiats durant tot el període.

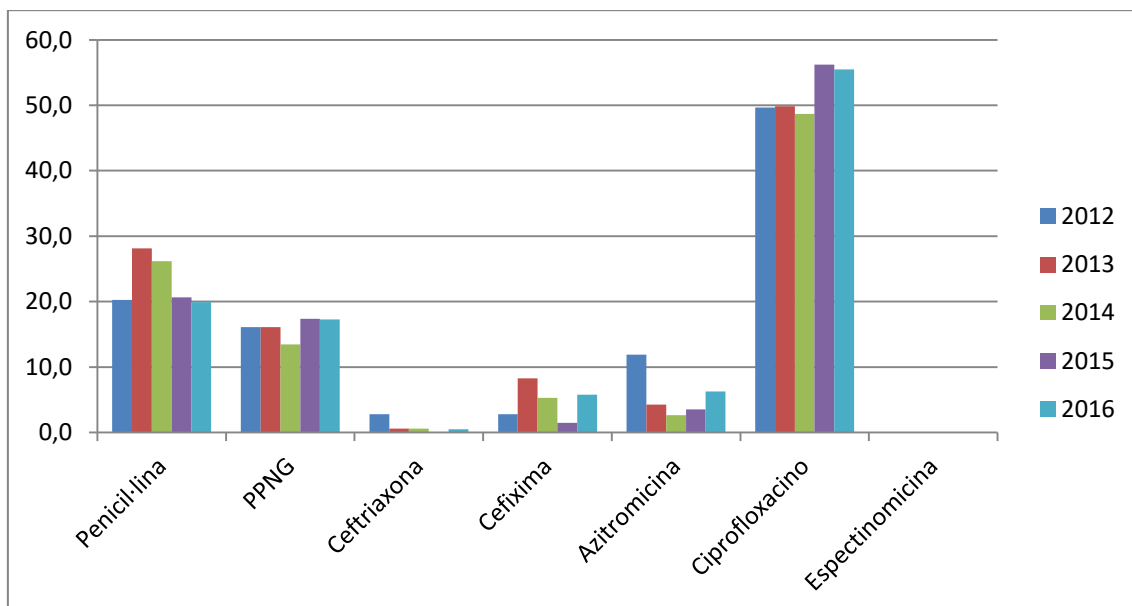


Figura 14. Taxa de resistència de cada un dels antibiòtics durant el període estudiat.

## a) Sensibilitat als beta-lactàmics:

L'evolució de la sensibilitat a la penicil·lina, així com el percentatge de soques resistents a aquest antibiòtic productores de betalactamasa (PPNG), està representat en la taula 7 així com en les figures 15 i 16.

	Penicil·lina						PPNG	
	Sensible		Intermig		Resistent		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>2012</b>	50	35,0	64	44,8	29	20,3	23	16,1
<b>2013</b>	27	8,3	208	63,6	92	28,1	53	16,1
<b>2014</b>	11	3,2	240	70,6	89	26,2	46	13,5
<b>2015</b>	38	11,2	231	68,1	70	20,6	59	17,4
<b>2016</b>	12	6,3	141	73,8	38	19,9	33	17,3

Taula 7. Evolució de la resistència a la penicil·lina.

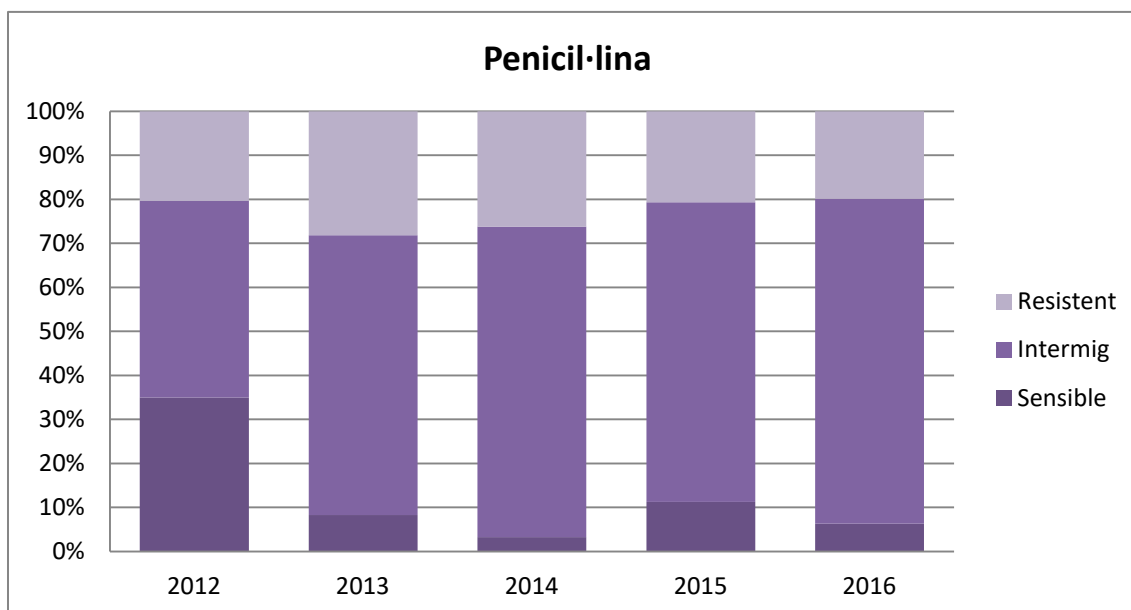


Figura 15. Evolució de la resistència a la penicil·lina.

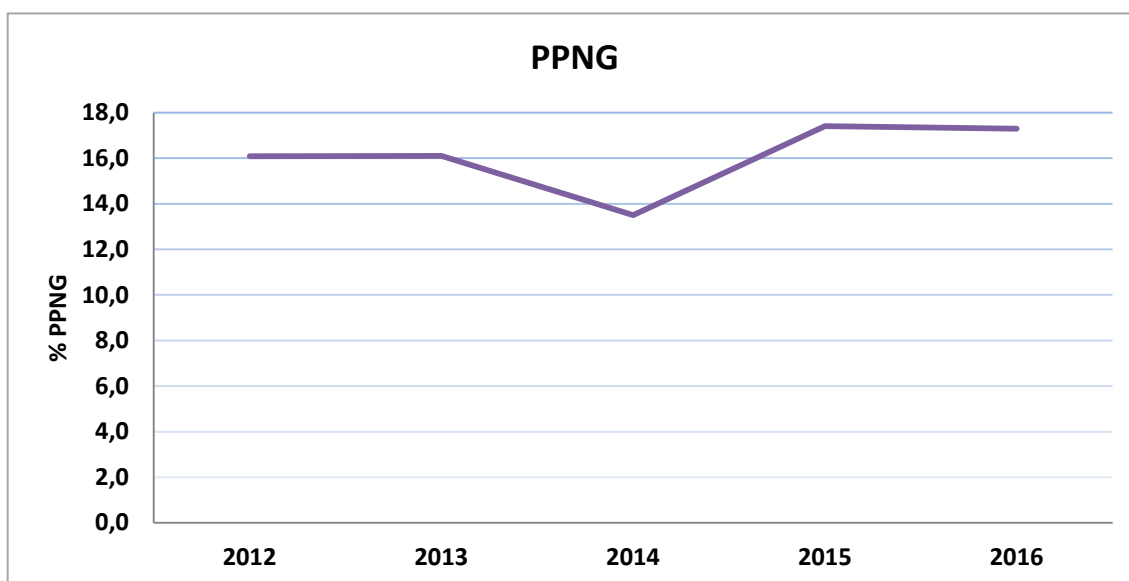


Figura 16. Percentatge de soques resistents a penicil·lina productores de betalactamasa.

Ja que el tractament empíric hauria de curar com a mínim el 95% dels casos, la penicil·lina en el nostre entorn ja fa anys que no és una opció degut a que més del 20% de les soques presenten resistència.

Com es pot veure en la figura 16, al voltant del 15-17% de les soques resistents ho són per acció d'una betalactamasa, valor lleugerament superior al documentat a la mitja de països europeus que participen en l'"European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP)" (79) (49). En el gonococ s'ha descrit la resistència plasmídica a penicil·lina degut a la presència del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> que codifica per una beta-lactamasa de tipus TEM-1. La resta de soques que presenten resistència (CMI >1 µg/mL) així com les soques amb sensibilitat intermitja (CMI entre 0.06 i 1 µg/mL), ho són degut a mecanismes cromosòmics, com pot ser per alteració de les PBPs (mutacions en gens *penA* i *ponA*), mutacions específiques en el gen *mtrR* que dóna lloc a una sobreexpressió de la bomba d'expulsió MtrC-D-E o per mutacions en el gen *penB* que provoca alteracions en la porina PorB1b, o per una acumulació de varis d'aquests mecanismes.

Pel que fa a les cefalosporines d'ampli espectre, en el cas de la ceftriaxona, el 2012 quatre soques (2,8%) van presentar resistència a aquest antibiòtic (CMI >0,125 µg/mL), el 2013 i 2014 només dos aïllaments (0,6%), el 2015 no se'n va detectar cap i durant la primera meitat del 2016 s'ha aïllat una soca resistent (0,5%).

Respecte la cefixima, el 2012 es van detectar 4 soques (2,8%) resistents (CMI >0,125 µg/mL), el 2013 se'n van detectar 27 (8,3%), el 2014 18 soques (5,3%) van ser resistents, el 2015 5 soques (1,5%) i el 2016 se n'han detectat 11 (5,8%).

En les figures 17 i 18 es representa la distribució de les CMIs tant per ceftriaxona i cefixima.

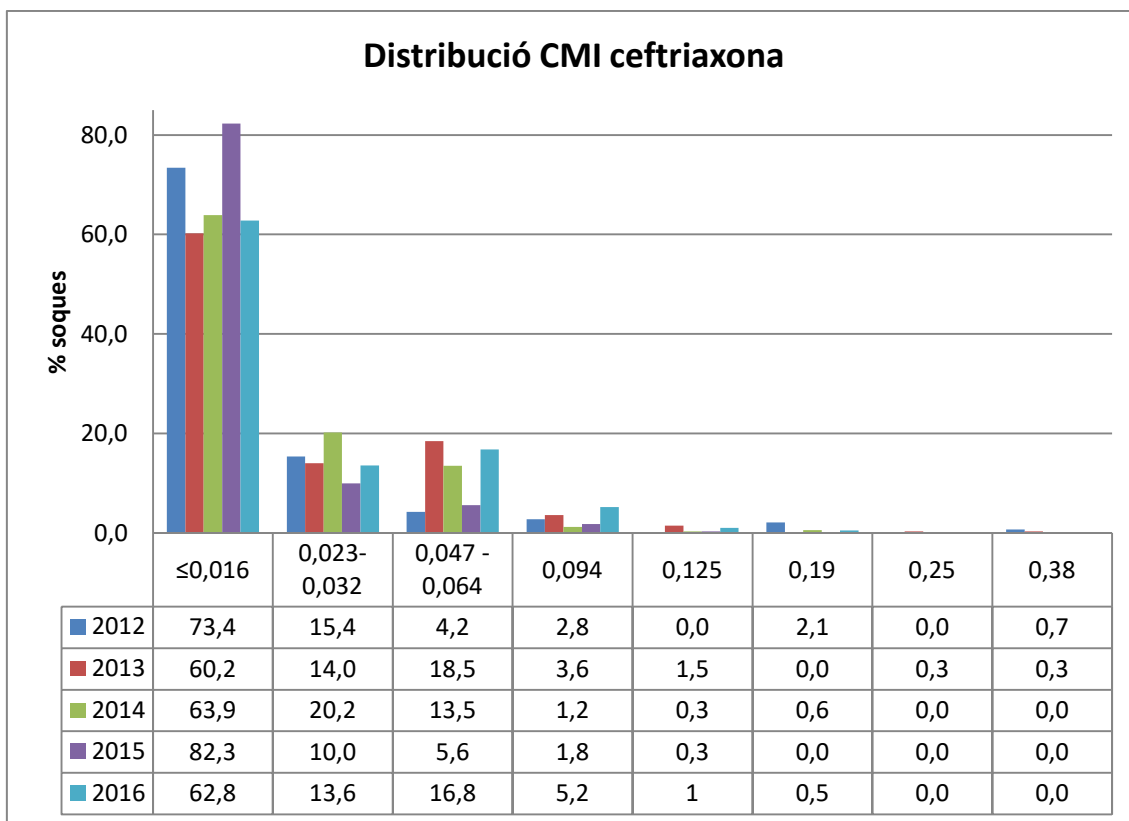


Figura 17. Distribució de les CMIs de ceftriaxona.

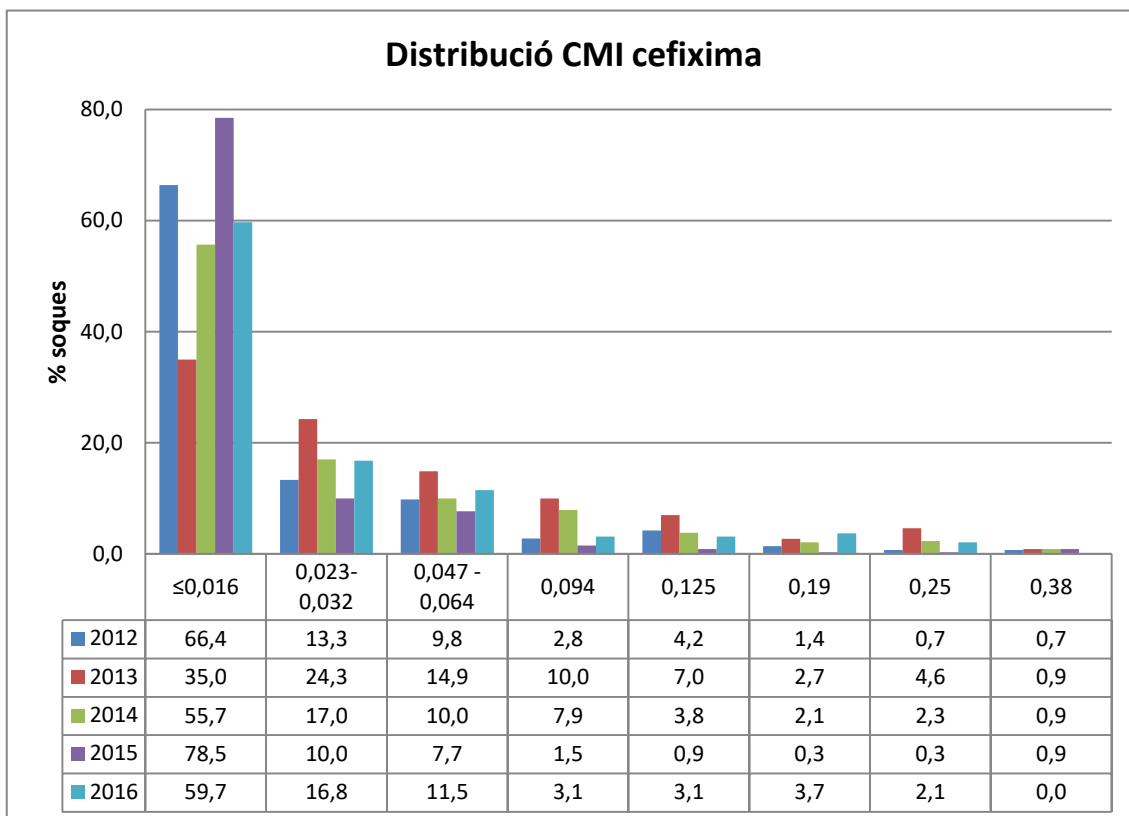


Figura 18. Distribució de les CMI de cefixima.

I en la següent figura es representa l'evolució de la CMI<sub>50</sub> i CMI<sub>90</sub> de ceftriaxona i cefixima al llarg d'aquests 5 anys.

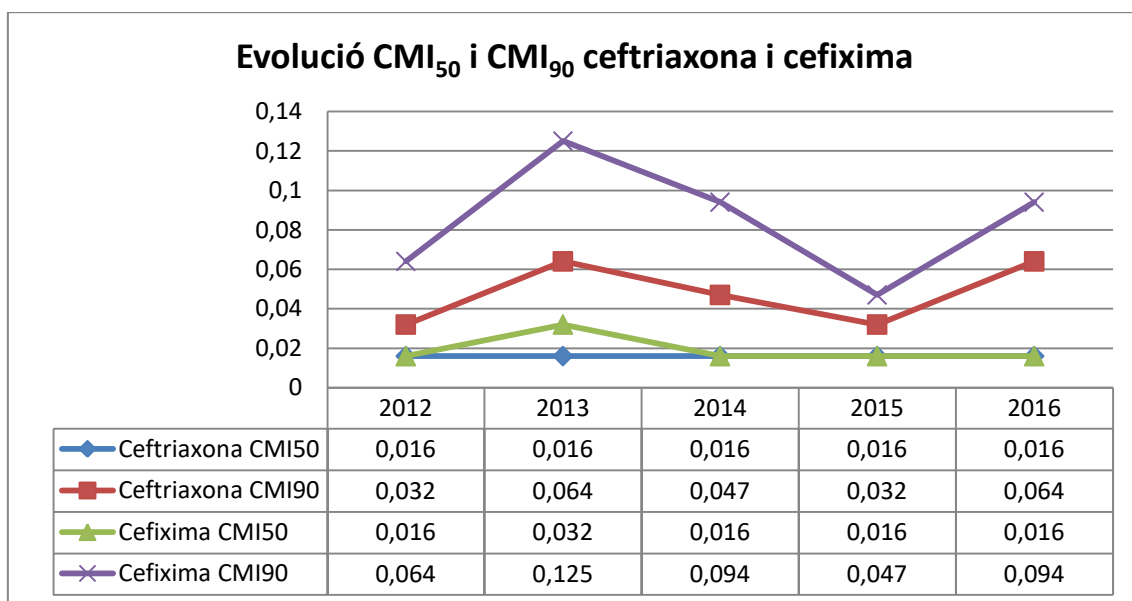


Figura 19. Evolució de les CMI<sub>50</sub> i CMI<sub>90</sub>.

Tal com s'observa en les figures anteriors, la taxa de resistència a la ceftriaxona durant els 5 anys d'estudi s'ha mantingut baixa, observant un pic de la CMI<sub>90</sub> l'any 2013 però posteriorment va tornar a disminuir fins el 2015. En contrast, els valors de CMI<sub>50</sub> i CMI<sub>90</sub> de cefixima són en general superiors als de ceftriaxona durant els 5 anys d'estudi, observant-se també el 2013 un pic tant de la CMI<sub>50</sub> com CMI<sub>90</sub>. És important observar que durant la primera meitat de l'any 2016 el percentatge de soques resistents a cefixima ha tornat a augmentar i els valors de CMI<sub>90</sub> tant de cefixima com de ceftriaxona també han augmentat.

Com s'observa en les figures 17 i 18, entre els anys 2013 i 2015 el percentatge de soques amb CMI  $\leq 0,016 \mu\text{g/mL}$  a ceftriaxona i cefixima va augmentar progressivament, però el 2016 aquest percentatge disminueix, augmentant la proporció de soques amb CMIs més elevades.

Amb les dades aportades per diferents països europeus, l'"European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)" publica anualment a l'"European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme" (Euro-GASP), les dades de sensibilitat antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoea*. Les següents dades són les publicades durant els anys 2009-2013 (80) (81) (82) (79) (49).

Any	Països participants	Nº soques	R cefixima*	R ceftriaxona*	R ciprofloxacino	R azitromicina	PPNG	R espectinomina
2009	17	1366	5,1%	0	63%	13%	13%	0
2010	21	1766	9,0%	0	52,7%	7,2%	8,6%	0
2011	21	1902	7,6%	10 <sup>a</sup>	48,7%	5,3%	10,4%	0
2012	20	1927	3,9%	3 <sup>b</sup>	50,1%	4,5%	13%	0
2013	21	1994	4,7%	7 <sup>c</sup>	52,9%	5,4%	12,9%	0

Taula 8. Dades de resistència de *Neisseria gonorrhoeae* del Euro-GASP. \*CMI  $>0,125\mu\text{g/ml}$ ; <sup>a</sup>Alemanya i Àustria; <sup>b</sup> Alemanya, Irlanda i Eslovènia; <sup>c</sup> **Sis a Espanya** i una a Alemanya.

Concretament, Espanya els anys 2012 i 2013 va reportar una taxa de resistència a cefixima superior al 5%, específicament el 2012 va ser superior al 15%. De les 7 soques detectades l'any 2013 amb resistència a la ceftriaxona, 6 van ser aïllades a Espanya.

### b) Sensibilitat a ciprofloxacino:

En la següent figura es representa l'evolució de la resistència a ciprofloxacino.

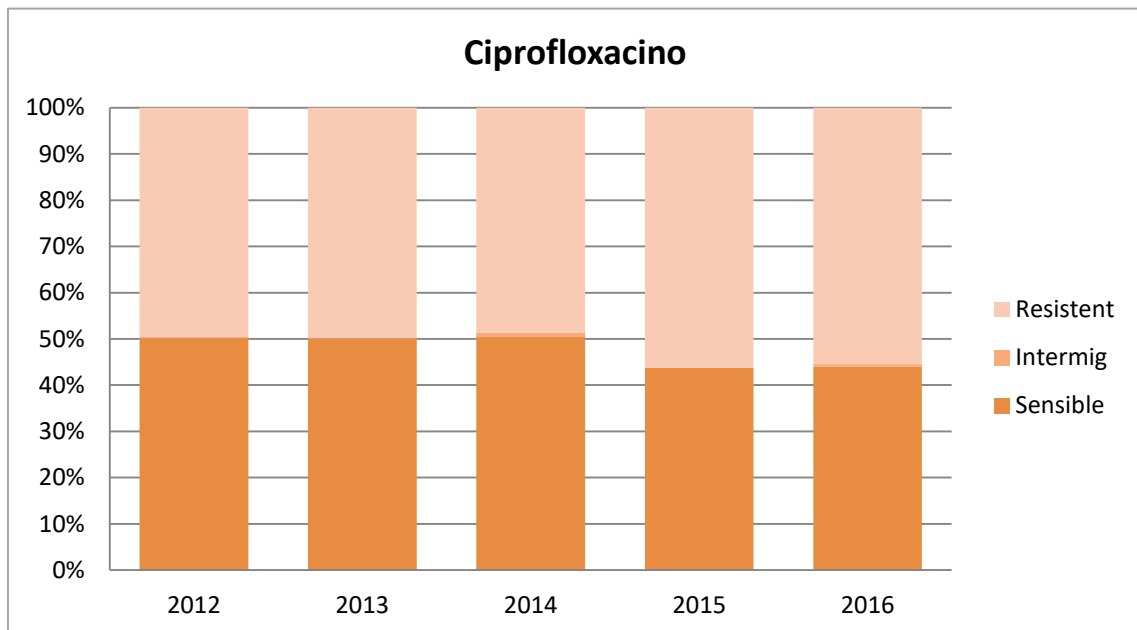


Figura 20. Evolució de la resistència a ciprofloxacino.

Tal com s'observa, al llarg dels cinc anys de l'estudi la resistència a ciprofloxacino s'ha mantingut al voltant del 50%, de manera que aquest antimicrobià no es pot considerar com a opció de tractament empíric en el nostre entorn. Aquestes dades concorden amb les publicades per la ECDC, en que el percentatge de resistència el 2012 va ser del 50,1% i el 2013 del 52,9%.

### c) Sensibilitat a azitromicina:

En la següent figura es representa l'evolució de la sensibilitat a l'azitromicina durant els anys 2012-2016.

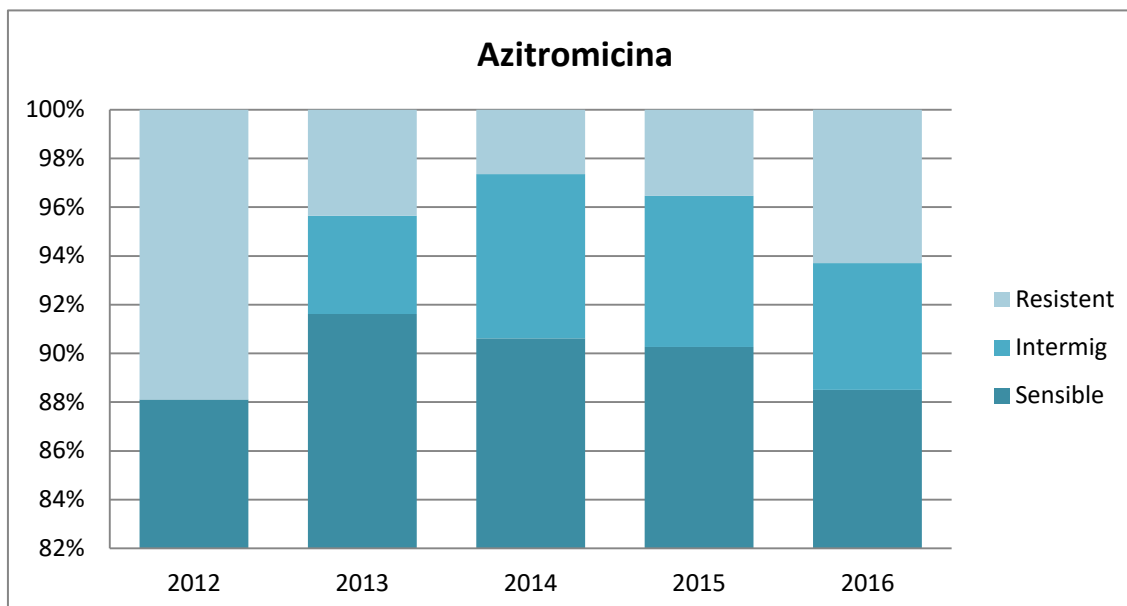


Figura 21. Evolució de la resistència a azitromicina.

Tal com s'observa, l'any 2012 el percentatge de resistència era del 11,9%. Tot i així cal tenir en compte que aquest any la sensibilitat a aquest antibiòtic s'estudiava utilitzant el mètode disc-difusió, de manera que es van considerar sensibles les soques amb halos  $\geq 27$  mm, intermig els halos entre 26-24 mm i resistents les soques amb halos  $< 24$  mm. Aquest mètode no és el recomanat per l'estudi de la resistència de *Neisseria gonorrhoeae*, de manera que les dades referents a aquest període cal analitzar-los amb precaució. Al 2013 el 4,3% van ser resistents (CMI  $> 0,5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), al 2014 va haver-hi una lleu disminució de la resistència (2,8%), però seguidament va tornar augmentar amb un 3,5% al 2015 i 5,3% al 2016.

La CMI<sub>50</sub> d'azitromicina es va mantenir constant durant els anys 2013-2016 amb un valor de 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , i la CMI<sub>90</sub> es va mantenir amb un valor de 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del 2013 al 2015, però al 2016 ha augmentat a 0,38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A més, és important remarcar que 6 de les 12 soques resistents durant la primera meitat del 2016, han presentat resistència d'alt nivell a aquest antibiòtic (CMI  $\geq 256$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), no havent-se detectat soques amb alt nivell de resistència durant els anys anteriors. Aquestes sis soques també presentaven resistència a penicil·lina (CMI  $> 32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i a ciprofloxacino.



A nivell mundial s'han detectat casos de fracàs terapèutic amb azitromicina (83) (84) (85) i també s'han aïllat soques de gonococ amb resistència d'alt nivell (CMI  $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$ ) a Escòcia (35), Regne Unit (36), Irlanda (86), Itàlia (38), Suècia (40), Estats Units (39), Argentina (37) i Austràlia (87).

### d) Sensibilitat a espectinomicina:

En tot el període d'estudi no es va detectar cap soca resistent a l'espectinomicina, sent el 100% sensibles (CMI  $\leq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ).

### e) Sensibilitat a la gentamicina:

S'ha estudiat la sensibilitat a la gentamicina com a possible alternativa terapèutica. Ja que no s'han establert punts de tall de la gentamicina pel gonococ, en la figura següent es mostra la distribució de les CMIs d'aquest antibiòtic:

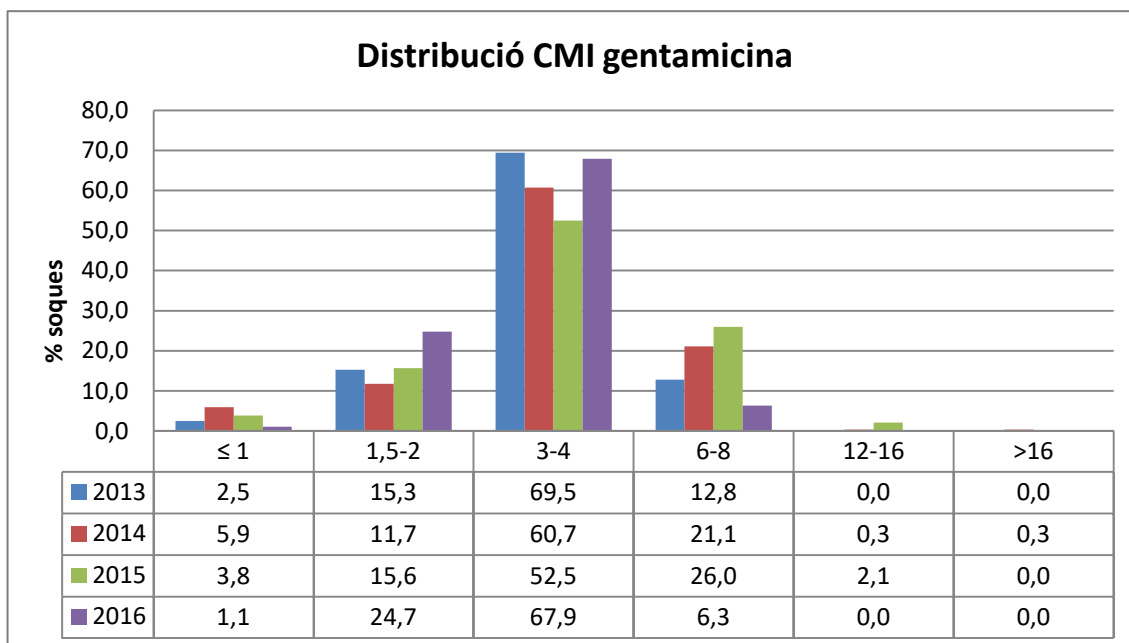


Figura 22. Distribució de les CMIs de gentamicina.

Entre el 2013 i el 2016, es va estudiar la sensibilitat a la gentamicina en un total de 1191 soques. Els valors de CMI estaven compresos entre 0,19  $\mu\text{g/mL}$  i 24  $\mu\text{g/mL}$ , amb més del

99% de soques en el rang 0,25-8 µg/mL . Només vuit soques van presentar una CMI de 12 µg/mL i una sola soca un valor de 24 µg/mL. Com s'observa en la figura 22, més del 60% de les soques tenen una CMI en el rang de 3 a 4 µg/mL. La CMI<sub>50</sub> va ser de 4 µg/mL durant els anys 2013 i 2014, i va disminuir a 3 µg/mL el 2015 i 2016. La CMI<sub>90</sub> va ser de 6 µg/mL els anys 2013 i 2014 i va disminuir a 4 µg/mL el 2015 i 2016.

Del 2013 al 2015 es va observar una disminució del percentatge de soques amb CMIs de 3-4 µg/mL a expenses d'un augment de les soques amb CMIs de 6-8 µg/mL. En canvi, al 2016 s'ha observat un augment del percentatge de soques amb CMIs de 3-4 µg/mL i una disminució important de les CMIs 6-8 µg/mL.

A Malawi i des del 1993, la gentamicina constitueix el tractament de primera línia per la uretritis, ja que presenta una alta eficàcia, és més econòmica que altres opcions de tractament i es pot administrar en dosis única intramuscular de 240 mg (88). Aquest tractament s'ha utilitzat a Malawi durant anys amb percentatges de curació ≥ 95% (89), tot i que s'han reportat casos de fracàs terapèutic (90).

Actualment els aminoglicòsids s'estan reconsiderant com alternativa de tractament per la gonorrea (91). Tot i així fan falta més estudis ja que les dades sobre la prevalença de la resistència del gonococ a la gentamicina són molt limitades i a més no hi ha valors de tall de CMI per establir les categories de sensibilitat. Per altra banda, no s'ha establert la correlació entre els valors de CMI i l'eficàcia clínica en el tractament de la uretritis.

Finalment, es fa difícil comparar els valors de CMI entre diferents estudis, ja que s'ha vist que els valors poden variar en funció de la metodologia utilitzada, per exemple els valors determinats mitjançant el mètode de dilució en agar solen ser superiors als valors determinats mitjançant l'E-test (88).

### **f) Sensibilitat a la fosfomicina:**

Del 1 de gener del 2015 al 30 de juny del 2016 es va estudiar la sensibilitat a la fosfomicina de 525 soques. Els valors de CMI estaven compresos entre 0,12 µg/mL i 64 µg/mL amb el 98% de soques compreses entre 3-32 µg/mL. En la figura següent es mostra la distribució de la CMI d'aquest antibiòtic.

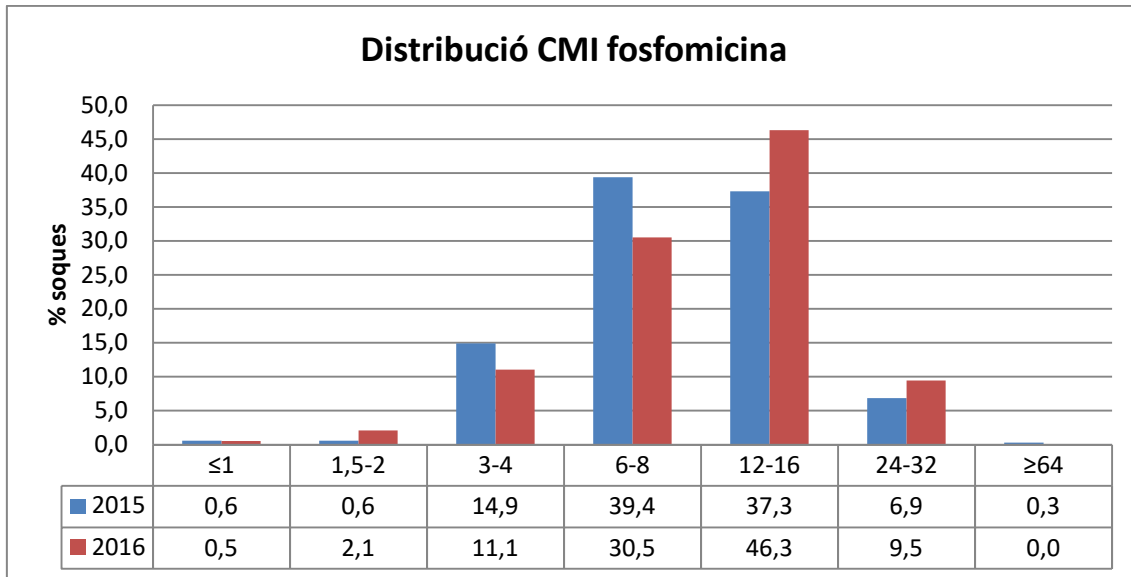


Figura 23. Distribució de la CMI de fosfomicina.

El 36% de les soques aïllades durant aquest període van presentar una CMI de 6-8 µg/mL i el 40% uns valors de 12-16 µg/mL. La CMI<sub>50</sub> va ser de 8 µg/mL el 2015 i 12 µg/mL al 2016. La CMI<sub>90</sub> va ser de 16 µg/mL els dos anys.

La fosfomicina va ser descoberta l'any 1969 i prové del gènere *Streptomyces*. Durant els anys 70 ja es van realitzar petits estudis clínics per determinar la seva eficàcia en tractament d'infeccions gonocòcciques. Aquests estudis utilitzaven diferents dosis i diferents vies d'administració. Els resultats van ser variables, però en general van demostrar més eficàcia quan es tractava amb dosis més altes o en dosis múltiples (92).

Degut a la falta d'experiència, ni el CLSI ni l'EUCAST han establert punts de tall de la fosfomicina enfront el gonococ. Probablement caldria realitzar més estudis de pK/pD, ja que la penetració d'aquest antibiòtic al teixit prostàtic pot ser un punt limitant a l'hora de preveure l'eficàcia clínica i microbiològica. Tot i així, un estudi recent ha demostrat una concentració superior a 4 µg/g al teixit prostàtic no inflammat, després de l'administració d'una dosis única de 3g de fosfomicina (93).

Segons els nostres coneixements, hi ha pocs estudis que hagin estudiat la sensibilitat *in vitro* de la fosfomicina enfront de *Neisseria gonorrhoeae* (94) (95). En un estudi recent, publicat per Hauser et al. (96), es va estudiar la sensibilitat de fosfomicina de 89 soques

de gonococ mitjançant l'E-test. Els nostres resultats són molt similar als seus, ja que en aquest estudi la CMI<sub>50</sub> també va ser de 8 µg/mL i la CMI<sub>90</sub> de 16 µg/mL i els rang de CMIs va ser de ≤1 a 32 µg/mL.

Recentment també s'ha publicat un estudi que avalua l'eficàcia clínica de la fosfomicina trometamol 3 g per via oral en el tractament de l' uretritis gonocòccica no complicada (97). En aquest estudi es compara el tractament amb fosfomicina amb el tractament actual de la gonorrea (ceftriaxona 250 mg més azitromicina 1 g), i les taxes de curació clínica i microbiològica van ser similar en els dos grups, 96,8% i 95,3% respectivament.

### g) Multiresistència:

Del 1 de gener del 2013 al 30 de juny del 2016, el 19% de les 1199 soques estudiades van presentar resistència a ciprofloxacino (CMI >0,06 µg/mL) i penicil·lina (CMI >1 µg/mL).

En la figura 24 es representa el percentatge de multiresistència d'aquestes soques durant els anys 2013-2016 i el total d'aquestes.

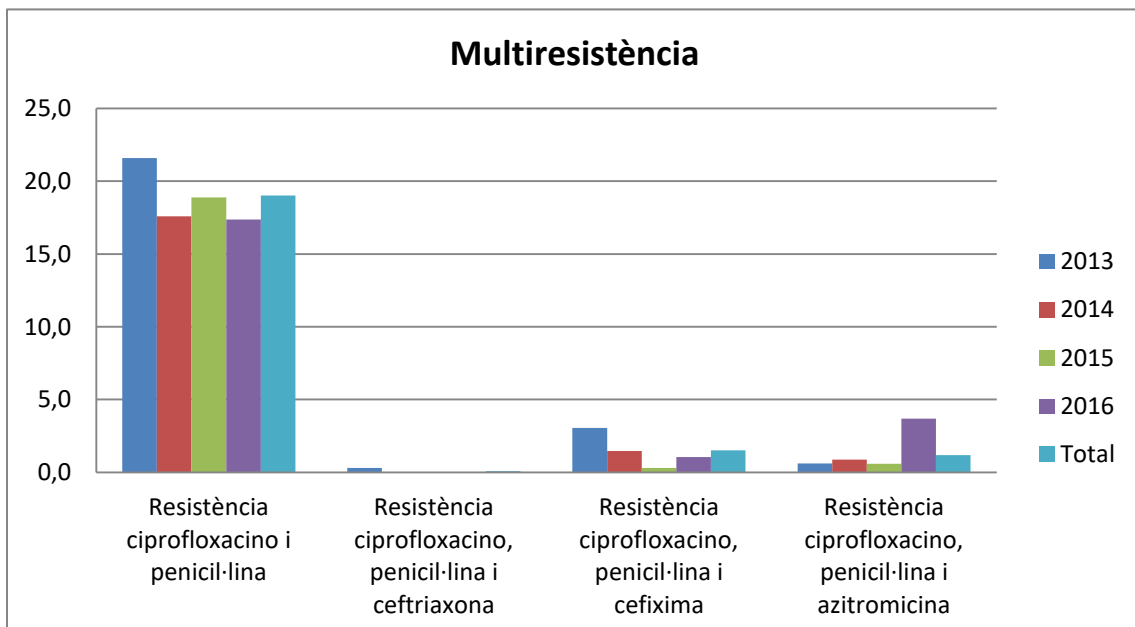


Figura 24. Taxa de multiresistència.

Només un soca el 2013 va presentar resistència a ciprofloxacino, penicil·lina i ceftriaxona. El 1,5% del total dels gonococs d'aquest període van presentar resistència a ciprofloxacino, penicil·lina i cefixima, i tal com s'observa en la figura 24, aquest percentatge va ser superior l'any 2013 (3%), va disminuir el 2014 (1,5%) i 2015 (0,3%) i ha tornat a augmentar lleugerament el 2016 (1,1%).

El 1,2% del total de les soques van presentar resistència a ciprofloxacino, penicil·lina i azitromicina, observant-se un pic important l'any 2016 (3,7%).

Per altra banda, el segon objectiu específic incloïa l'estudi dels mecanismes moleculars implicats en la resistència a les cefalosporines de tercera generació i la comparació els patrons de tipificació molecular de les soques amb sensibilitat disminuïda a les cefalosporines amb els de les soques sensibles.

Tal com queda reflectit en el segon article que compona aquesta tesi, es van caracteritzar 48 soques, 27 de les quals eren resistents a cefixima (CMI > 0,125 µg/mL) i 21 presentaven sensibilitat disminuïda a aquest antibiòtic (CMI 0,125 µg/mL), les quals es van comparar amb 40 soques sensibles que presentaven diferents rangs de CMI. Els resultats de la caracterització dels gens *penA*, *ponA*, *penB* i *mtrR* de les 88 soques es detallen a la taula 2 del segon article. També es va realitzar la tipificació d'aquestes 88 soques mitjançant NG-MAST, els resultats de la qual estan reflectits en la taula 3 d'aquest mateix article.

Aquest estudi reafirma que els mecanismes moleculars implicats en la disminució de la sensibilitat a les cefalosporines d'ampli espectre són els ja descrits prèviament en altres estudis. La principal aportació d'aquest treball és que demostra que la població de gonococ que presenta sensibilitat disminuïda a les cefalosporines és molt diferent a la població sensible, i que s'ha detectat, entre la població estudiada, l'emergència del genogrup G2400, que a l'igual que el G1407, podria desenvolupar més fàcilment resistència antimicrobiana.

El factor més important en el desenvolupament de resistència a les cefalosporines en el gonococ, són els canvis en el gen *penA*. L'adquisició d'al·lels en mosaic d'aquest gen, així com també d'al·lels sense estructura en mosaic però amb la posició A501 mutada,

provoca l'elevació de les CMI de les cefalosporines (47) (3) (4) (5). Per exemple, la soca extremadament resistent aïllada a França al 2010, així com les dues aïllades a Catalunya al 2011 (4) (5) contenen l'al·lel en mosaic XXXIV amb la mutació addicional A501P. En el nostre estudi, 28 de les 48 soques amb sensibilitat disminuïda també presentaven l'al·lel en mosaic XXXIV, el qual s'ha relacionat prèviament amb el clon MLST ST1901/NG-MAST ST1407, un dels més prevalents a Europa i que està associat a la disminució de sensibilitat a aquests antibiòtics (98). A diferència de la soca francesa i les catalanes abans esmentades, cap de les soques del nostre estudi que presentaven l'al·lel XXXIV va presentar també una mutació en A501. Les 19 soques restants amb SD a les cefalosporines contenen l'al·lel sense estructura en mosaic XXXVI, i d'aquestes, 14 presentaven la mutació A501T.

Tot i que la majoria de soques amb SD del nostre estudi presentaven mutacions en el gen *ponA*, es creu que aquest està implicat en el desenvolupament de resistència d'alt nivell a la penicil·lina en soques que també presenten mutacions en *penA*, *mtrR* i *penB*, però en canvi sembla que no està implicat en l'elevació de les CMI de les cefalosporines (47) (99) (100).

Un altre mecanisme implicat en el desenvolupament de resistències en *Neisseria gonorrhoeae*, són els canvis en la porina (porB1b), codificada pel gen *penB*, la qual provoca una disminució de la permeabilitat de la paret cel·lular, i per tant una disminució de la concentració intracel·lular de l'antibiòtic. En la nostra sèrie, 47 de les 48 soques amb SD van presentar canvi d'aminoàcid en les posicions G101 i A102, localitzades en el loop 3 de la proteïna. Aquestes mutacions s'han associat a soques de gonococ amb SD a les cefalosporines (99) (101) (102) i també s'han descrit en les soques extremadament resistents de Japó (3), França (4) i Catalunya (5). Tot i així, aquestes dues mutacions necessiten sinèrgia amb els altres determinants estudiats, per poder augmentar la CMI de les cefalosporines.

Finalment, una mutació específica en el promotor o en la regió codificant del *mtrR*, provoca un augment important en l'expressió de la bomba d'expulsió MtrC-D-E, la qual expulsa cap a l'exterior de la cèl·lula les cefalosporines, particularment la ceftriaxona (47). El determinant més clarament associat a l'augment de la CMI de les cefalosporines és la delecció d'una adenina en un fragment invertit de 13 parells de bases de la regió del

promotor, la qual es va detectar en 42 de les 48 soques. Canvis d'aminoàcids en la regió del repressor MtrR, concretament en les posicions A39, R44, G45 i H105, també poden contribuir en l'augment de la CMI (103) (104). En la nostra sèrie, el perfil més comú va ser la delecció de l'adenina i la mutació H105Y, prèviament descrit per Thakur et al. (101). La delecció es creu que pot impedir la unió del repressor a la zona del promotor de MtrC-D-E, i la substitució H105Y podria inhibir la dimerització del MtrR.

Després d'analitzar els diferents determinants de resistència, es va trobar una relació estadísticament significativa entre l'augment de les CMIs a les cefalosporines i l'al·lel en mosaic XXXIV ( $p=0,0001$ ), la substitució A501T en *penA* ( $p=0,0003$ ), la substitució L421P en *ponA* ( $p=0,0001$ ) i la delecció de l'adenina en *mtrR* ( $p=0,0001$ ).

El genogrup més prevalent entre les soques amb SD a les cefalosporines va ser el G1407, seguit del G2400. Segons les dades publicades per Chisholm et al. al 2010 (98), el G1407 va ser el genogrup més prevalent (23%) entre les soques de gonococ aïllades en els 21 països europeus participants en "European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme". El NG-MAST ST1407, juntament amb el MLST ST7363, van ser els responsables de tots els casos confirmats de fracàs terapèutic amb cefixima, així com també de tres del cinc casos de fracàs amb ceftriaxona.

Els nostres resultats concorden amb el fet que G1407 és un clon altament prevalent, i que com s'ha observat amb altres estudis (47) (46) (98) (105) (106) (107) (108), està associat a SD a les cefalosporines i a l'al·lel en mosaic XXXIV. És important subratllar el fet que en el nostre estudi el G1407 és significativament més prevalent entre les soques amb SD que entre les soques sensibles ( $P<0,0001$ ). Una altra troballa important és que el G2400 és el segon en prevalença entre les soques amb SD (27,1%) i el més prevalent en el grup de les soques sensibles (18,4%), representant el 23,3% del total de les soques estudiades. A més el G2400 es va associar amb la mutació A501T de l'al·lel XXXVI ( $p=0,0001$ ) i amb una elevació de la CMI de cefixima. Tot i que aquest genogrup ja s'ha descrit prèviament, segons els nostres coneixements, és el primer estudi en el que s'observa una alta prevalença del mateix en soques amb SD i una clara associació amb la substitució A501T del gen *penA*.

En conclusió, aquest estudi posa de manifest la clara associació entre el clon altament prevalent G1407 i la capacitat per desenvolupar resistències. I el més important, també posa de manifest l'aparició d'un nou clon, G2400, el qual també podria ser una font de resistència antimicrobiana.



La identificació i la caracterització de les xarxes sexual així com també dels patrons de transmissió de la gonorrea, és útil a l'hora de dissenyar estratègies d'actuació dirigides als grups de major risc o a la població que més contribueix a la disseminació de la malaltia, com és el col·lectiu homosexual (109) (13).

En el tercer article que compona aquesta tesi s'analitzen les diferències de sensibilitat antimicrobiana així com la distribució epidemiològica de 119 soques de *Neisseria gonorrhoeae* aïllades de pacients amb diferent orientació sexual, entre els quals s'han trobat algunes diferències significatives. El grup de pacients heterosexuales es van infectar amb soques de gonococ més resistents a ciprofloxacino i cefixima que les soques aïllades en pacients homosexuals. A més a més, aquest estudi demostra la circulació de diferents soques entre els pacients homosexuals i heterosexuales. Així els homosexuals varen ser infectats més freqüentment per soques dels genogrups G2992 i G2400, mentre que els heterosexuales per soques del genogrup G1407.

El genogrup G1407 és el més prevalent a Europa i s'ha associat a casos de fracàs terapèutic a França (4), Espanya (5), Eslovènia (110), Noruega (105), Àustria (46) i Regne Unit (44). El fet de que en el nostre estudi aquest genogrup sigui el més prevalent entre els pacients heterosexuales, els quals a l'hora s'infecten amb soques més resistents, reforça els resultats trobats per aquest mateix grup en la segona publicació d'aquesta tesi (2), i ja comentats prèviament.

Una possible explicació del per què els pacients heterosexuales en el nostre entorn s'infecten amb soques més resistents que els homosexuals, seria la de l'existència d'un clúster de soques G1407 circulant entre aquest grup de població, genogrup que desenvolupa resistència amb més freqüència que altres genogrups.

Hi ha pocs estudis a Europa que hagin analitzat la distribució de *Neisseria gonorrhoeae* en poblacions amb diferent orientació sexual (111) (112) (113) (114) (115), i la majoria d'aquests estan realitzats al Regne Unit (112) i Holanda (111) (114) (115), de manera que segons el nostre coneixement no n'hi ha cap realitzat en tot el sur d'Europa.

Choudhury et al. (112), el 2004 van utilitzar el mètode NG-MAST per descriure, a Londres, la circulació de diferents soques de gonococ entre les xarxes sexuals d'homosexuals i

heterosexuals. Aquets autors van descriure 21 clústers (STs descrits en 20 o més pacients), 7 dels quals, eren pràcticament exclusius de pacients del sexe masculí ( $\geq 77\%$  homosexuals). El 94% dels 14 clústers restants provenien de pacients heterosexuals. El ST225 i ST359 es van associar amb pacients homosexuals.

En el nostre estudi, el ST359 està inclòs en el genogrup G2992, pel qual s'ha trobat, com en el treball esmentat, una relació estadísticament significativa amb la població homosexual. En canvi, i a diferència de Choudhury et al., els resultats del nostre treball demostren que el G225 és més prevalent entre els pacients heterosexuals.

Per altra banda, els nostres resultats no són fàcilment comparables amb els dels estudis realitzats a Holanda, ja que cadascun d'ells utilitza tècniques de tipificació diferents. Tot i així, Van Duynhoven et al. (115) analitzen mitjançant serotipificació les soques de gonococ aïllades al 1994, i també troben que la població de *Neisseria gonorrhoeae* varia en funció del comportament sexual dels pacients, sent els serotipus IB2, IB6 i IA5 més prevalents entre els pacients homosexuals i els IB1 i IB3 entre els heterosexuals. De manera similar, Kolader et al. (114), en un estudi realitzat entre el 2002 i el 2003, mitjançant la tipificació dels gens *por* i *opa*, descriuen 11 clústers principals (amb 20 o més pacients amb el mateix patró por-opa), set dels quals procedeixen predominantment de pacients homosexuals, 3 clústers exclusivament d'heterosexuals, i un clúster mixta (46% homosexuals i 54% heterosexuals).

Finalment, Chisholm et al. (98), mitjançant NG-MAST, van genotipar 1.066 gonococs del "European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme", aïllats entre 2009 i 2010 en 21 països europeus. Van descriure 406 STs diferents, dels quals el ST1407 va ser el més prevalent tant a nivell global com entre les 100 soques procedents d'Espanya, en canvi en el nostre estudi aquest ST va ser el quart en prevalença. El ST2992 va ser el segon en prevalença, tant en l'estudi de Chisholm et al. com en el nostre, mentre que el ST225 ells el van trobar en tercer lloc, però només dues soques del nostre estudi van pertànyer a aquest ST. Per contra, el ST2400 va ser el més prevalent entre els nostres gonococs (8,3%) mentre que Chisholm et al. el van descriure només en el 0,7% de les soques. També s'observen diferències important en la prevalença dels diferents genogrups, tot i que els

dos estudis coincideixen en que el G1407 és el més prevalent. A més els dos treballs observen una relació estadísticament significativa entre els pacients homosexuals i el genogrup G2992, però per contra ells associen el G1407 a aquests grup de pacients mentre que en el nostre estudi s'ha trobat una relació significativa entre aquest genogrup i els pacients heterossexuals.

Per tant, aquests fets posen de manifest les importants diferències en la distribució geogràfica de les soques de *Neisseria gonorrhoeae*, tant quan s'analitza la població global com quan es realitza en poblacions específiques. Per la qual cosa no és possible extrapolar els resultats a altres poblacions i caldria realitzar estudis epidemiològics a nivell local. També emfatitza la necessitat de monitoritzar la resistència antimicrobiana d'aquest microorganisme en les diferents poblacions, per tal de mantenir les guies de tractament actualitzades, i en el cas de que s'observessin diferències importants entre les diferents poblacions, el tractament empíric es podria dirigir en funció del tipus de població que es tractés.

Amb l'objectiu de detectar i controlar nous focus de transmissió, seria útil realitzar estudis prospectius que analitzessin les poblacions de gonococs mitjançant NG-MAST. Això permetria distingir soques que han estat presents entre la població durant llargs períodes de temps (transmissió endèmica), de soques que formen part de nous clústers que podrien donar lloc a brots locals, fet que requeriria intervencions per part de Salut Pública.

En aquest sentit, el nostre estudi posa de manifest l'alta prevalença del genogrup G2400 entre la població homosexual de Barcelona, fet no descrit prèviament.

En conclusió, aquest últim estudi demostra l'alta prevalença dels genogrups G1407, G2992 i G2400 en el nostre entorn. A més a més posa de manifest els diferents patrons de resistència antimicrobiana i la diferent distribució de les soques de gonococ entre pacients amb diferent conducta sexual. Els gonococs que infecten als pacients heterossexuals són més resistents a ciprofloxacino i a cefixima i estan associats amb el

genogrup G1407, mentre que els que infecten als homosexuals són més sensibles a aquests antibiòtics i estan associats als genogrups G2992 i G2400.

La principal limitació dels treballs que componen aquesta Tesi és que les soques procedeixen d'una àrea geogràfica concreta i que per tant els resultats només són representatius d'aquesta zona i no es poden generalitzar. Una altra limitació és que la població estudiada es majoritàriament homes que fan sexe amb homes, atesos a la Unitat de ITS de Drassanes i per tant no és una mostra aleatòria de la població general. Tot i així, s'ha de tenir en compte que en el nostre medi la gonorrea afecta sobretot als homes i de manera especial als homes que fan sexe amb homes, com ho demostra el fet que dels 1.555 cassos de gonocòccia declarats a Catalunya al 2014, el 46% varen ser aïllats en HSH, el 24% en homes heterossexuals i només el 15% en dones. A més, d'aquests 1.555, 697, és a dir el 45%, varen ser notificats pel Servei de Microbiologia de l'Hospital Vall d'Hebron. De manera que la mostra estudiada en aquests treballs és bastant representativa.



## 5. Conclusions

**Conclusions de l'estudi de comparació entre el cultiu convencional i les tècniques s'amplificació d'àcids nucleics, pel diagnòstic microbiològic de la infecció gonocòccica.**

- A.** La concordança entre el cultiu i la PCR va ser del 96,9%, amb només un 3,1% dels casos discordants. Gairebé el 90% dels discordants van ser deguts a la falta de sensibilitat del cultiu.
  
- B.** La falta d'especificitat del cultiu va ser deguda a errors en la identificació de *Neisseria gonorrhoeae* mitjançant proves bioquímiques. Aquest problema s'ha solucionat amb la introducció de l'espectrometria de masses, la qual permet identificar correctament *Neisseria gonorrhoeae*.
  
- C.** Les tècniques d'amplificació d'àcids nucleics presenten una alta sensibilitat i especificitat. A més són tècniques automatitzades, robustes i ràpides que permeten realitzar un diagnòstic en poques hores.
  
- D.** El cultiu segueix sent necessari ja que permet aïllar el microorganisme viable i realitzar estudis de sensibilitat antimicrobiana i epidemiologia molecular.
  
- E.** Una aproximació eficient seria realitzar la PCR pel diagnòstic de rutina i exclusivament en laboratoris de referència, efectuar paral·lelament el cultiu als pacients simptomàtics.

**Conclusions de l'estudi de la sensibilitat antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* a Barcelona: mutacions en *penA*, *ponA*, *mtrR* i *porB* i sequenciotips de NG-MAST associats a la sensibilitat disminuïda a les cefalosporines.**

- A.** El percentatge de soques amb sensibilitat intermitja o resistència a la penicil·lina va oscilar entre el 65% al 2012 i el 93,7% al 2016. Al voltant del 50% dels gonococs són resistents a ciprofloxacino.
- B.** La resistència a ceftriaxona es manté baixa al llarg dels cinc anys, amb més del 60% de les soques amb CMI  $\leq 0,016$   $\mu\text{g/mL}$ . El percentatge de resistència a cefixima és superior al de ceftriaxona, observant-se un pic important l'any 2013 que després va disminuir fins al 2015, per tornar a augmentar al 2016.
- C.** La taxa de resistència a azitromicina al llarg del cinc anys és d'aproximadament el 5%, però al 2016 també s'observa un augment important.
- D.** La CMI de gentamicina al llarg d'aquests anys es manté baixa, amb més del 60% de les soques amb CMI entre 3 i 4  $\mu\text{g/mL}$ . El mateix passa amb la fosfomicina, ja que el 90% de les soques tenen CMI compreses entre 3 i 16  $\mu\text{g/mL}$ . Per tant són possibles alternatives terapèutiques, tot i que fan falta més estudis.
- E.** El factor més important pel desenvolupament de resistència a les cefalosporines són els canvis en el gen *penA*. El 58,3% de les soques amb SD presenten el patró en mosaic XXXIV. La resta presenten el patró no mosaic XXXVI però el 74% tenen una substitució en la posició A501.

## **Conclusions**

---

- F.** El genogrup G1407 és significativament més prevalent entre les soques amb SD a les cefalosporines que entre les sensibles ( $p < 0,0001$ ). El G2400 és el segon més prevalent entre les soques amb SD i presenta una associació estadísticament significativa amb la mutació A501T de l'al·lel XXXVI ( $p = 0,0001$ ).



**Conclusions de l'estudi sobre les diferències en l'estructura poblacional i els patrons de resistència de *Neisseria gonorrhoeae* entre homes que tenen sexe amb homes i pacients heterosexuales.**

- A. Els genogrups més prevalents en el nostre entorn son els G1407, G2992 i G2400.
- B. Es detecta una alta prevalença del G2400 entre la població homosexual, fet que segons el nostre coneixement no s'ha descrit prèviament.
- C. Existeixen importants diferències en l'estructura poblacional dels gonococs entre pacients homosexuals i heterosexuales. De manera que els HSH s'infectaven més freqüentment amb soques dels genogrups G2992 i G2400, i els heterosexuales del G1407. A més els pacients heterosexuales es van infectar amb soques més resistents a cefixima i ciprofloxacino que els homosexuals. Aquests fets podrien ser deguts a la presència d'un clúster de G1407 circulant entre la població heterosexual.



## 6. Bibliografia

1. World Health Organization. Emergence of multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Threat of global rise in untreatable sexually transmitted infections. [Internet]. 2012. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70603/1/WHO\\_RHR\\_11.14\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70603/1/WHO_RHR_11.14_eng.pdf)
2. Serra-Pladevall J, Barberá MJ, Rodríguez S, Bartolomé-Comas R, Roig G, Juvé R, et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Barcelona: *penA*, *ponA*, *mtrR*, and *porB* mutations and NG-MAST sequence types associated with decreased susceptibility to cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Sep;35(9):1549–56.
3. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul 1;55(7):3538–45.
4. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-Level Cefixime- and Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: Novel *penA* Mosaic Allele in a Successful International Clone Causes Treatment Failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar 1;56(3):1273–80.
5. Camara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Aug 1;67(8):1858–60.
6. Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2012 Apr;30(4):218–9.

## Bibliografia

---

7. Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010: Oral Cephalosporins No Longer a Recommended Treatment for Gonococcal Infections [Internet]. [cited 2016 Sep 8]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6131a3.htm>
8. Bignell C, FitzGerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS*. 2011 Oct 1;22(10):541–7.
9. Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*. 2013 Feb 1;24(2):85–92.
10. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul;27(3):587–613.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 2013. [Internet]. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/sexual-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2013.pdf>
12. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2013.
13. Casabona J. Informe epidemiològic CEEISCAT [Internet]. Agència de Salut Pública de Catalunya; [cited 2016 Jun 27]. Report No.: Document tècnica número 22. Available from: [http://www.ceeiscat.cat/documents/sives2015\\_CAT.pdf](http://www.ceeiscat.cat/documents/sives2015_CAT.pdf)
14. Bennet J. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. Vol. 1. Barcelona: Elsevier, España; 2016.
15. Murray P. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Whashington: ASM Press; 2007.
16. Virji M. Pathogenic *neisseriae*: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Apr;7(4):274–86.

17. Hook E, Handsfield H. Gonococcal infections in the adult. In: Sexually Transmitted Diseases. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2008.
18. Diagnosis and Management of Gonococcal Infections - American Family Physician [Internet]. [cited 2016 Sep 8]. Available from: <http://www.aafp.org/afp/2012/1115/p931.html>
19. Workowski KA, Berman S, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep Cent Dis Control. 2010 Dec 17;59(RR-12):1–110.
20. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*—2014. MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm ReportsCenters Dis Control. 2014;63:1.
21. Gulin C. Viabilidad de *Neisseria gonorrhoeae*. ¿Refrigerar o no las muestras durante su transporte al laboratorio? XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2015; Sevilla.
22. Crotchfelt KA, Welsh LE, DeBonville D, Rosenstraus M, Quinn TC. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by a coamplification PCR assay. J Clin Microbiol. 1997 Jun;35(6):1536–40.
23. Carroll KC, Aldeen WE, Morrison M, Anderson R, Lee D, Mottice S. Evaluation of the Abbott LCx Ligase Chain Reaction Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine and Genital Swab Specimens from a Sexually Transmitted Disease Clinic Population. J Clin Microbiol. 1998 Jun;36(6):1630–3.
24. Martin DH, Cammarata C, Van Der Pol B, Jones RB, Quinn TC, Gaydos CA, et al. Multicenter Evaluation of AMPLICOR and Automated COBAS AMPLICOR CT/NG Tests for *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol. 2000 Oct;38(10):3544–9.
25. Van Der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington L, Hook E, Lenderman C, Quinn T, et al. Multicenter Evaluation of the BDProbeTec ET System for Detection of *Chlamydia*

- trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine Specimens, Female Endocervical Swabs, and Male Urethral Swabs. J Clin Microbiol. 2001 Mar;39(3):1008–16.
26. van Doornum GJJ, Schouls LM, Pijl A, Cairo I, Buimer M, Bruisten S. Comparison between the LCx Probe System and the COBAS AMPLICOR System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections in Patients Attending a Clinic for Treatment of Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, The Netherlands. J Clin Microbiol. 2001 Mar;39(3):829–35.
27. Ilina EN, Oparina NY, Shitikov EA, Borovskaya AD, Govorun VM. Molecular Surveillance of Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Russia. J Clin Microbiol. 2010 Oct 1;48(10):3681–9.
28. Monfort L, Caro V, Devaux Z, Delannoy A-S, Brisse S, Sednaoui P. First *Neisseria gonorrhoeae* Genotyping Analysis in France: Identification of a Strain Cluster with Reduced Susceptibility to Ceftriaxone. J Clin Microbiol. 2009 Nov;47(11):3540–5.
29. Palmer HM, Young H, Graham C, Dave J. Prediction of antibiotic resistance using *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing. Sex Transm Infect. 2008 Aug;84(4):280–4.
30. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465–6.
31. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2007 Oct;13 Suppl 3:1–46.
32. Bilek N, Martin IM, Bell G, Kinghorn GR, Ison CA, Spratt BG. Concordance between *Neisseria gonorrhoeae* Genotypes Recovered from Known Sexual Contacts. J Clin Microbiol. 2007 Nov;45(11):3564–7.

33. CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Twenty-Second Informational Supplement, 32: 100 - 102 [Internet]. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>
34. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1: 50 - 53 [Internet]. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf)
35. Palmer HM, Young H, Winter A, Dave J. Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. J Antimicrob Chemother. 2008 Sep 1;62(3):490–4.
36. Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-Level Azithromycin Resistance Occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a Result of a Single Point Mutation in the 23S rRNA Genes. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Sep;54(9):3812–6.
37. 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 Apr;54(4):1652–3.
38. Starnino S, Stefanelli P, Group on behalf of the *Neisseria gonorrhoeae* IS. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. J Antimicrob Chemother. 2009 Jun 1;63(6):1200–4.
39. Katz AR, Komeya AY, Soge OO, Kiaha MI, Lee MVC, 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 Mar 15;54(6):841–3.
40. Unemo M, Golparian D, Hellmark B. First Three *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with High-Level Resistance to Azithromycin in Sweden: a Threat to Currently Available Dual-Antimicrobial Regimens for Treatment of Gonorrhea? Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jan;58(1):624–5.

41. Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhoea: The impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother*. 2009 Mar;10(4):555–77.
42. Bolan GA, Sparling PF, Wasserheit JN. The emerging threat of untreatable gonococcal infection. *N Engl J Med*. 2012 Feb 9;366(6):485–7.
43. Cole MJ, Spiteri G, Chisholm SA, Hoffmann S, Ison CA, Unemo M, et al. Emerging cephalosporin and multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. *Euro Surveill*. 2014;19(45):20955.
44. Ison CA, Hussey J, Sankar KN, Evans J, Alexander S. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Euro Surveill*. 2011;7.
45. Unemo M, Golparian D, Hestner A. Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden, July 2010. *Euro Surveill*. 2011;16(6):11.
46. Unemo M, Golparian D, Sary A, Eigentler A. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(43):19998.
47. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol*. 2012 Dec;7(12):1401–22.
48. 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 Aug;48(8):3185–7.
49. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2013 [Internet]. 2015. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-europe-2013.pdf>



## Bibliografia

50. Ontario Agency for Health Protection and Promotion (Public Health Ontario). Guidelines for Testing and Treatment of Gonorrhoea in Ontario [Internet]. Toronto, ON: Queen's Printer for Ontario; 2013.; Available from: [http://www.publichealthontario.ca/en/eRepository/Guidelines\\_Gonorrhoea\\_Ontario\\_2013.pdf](http://www.publichealthontario.ca/en/eRepository/Guidelines_Gonorrhoea_Ontario_2013.pdf)
51. Fifer H, Hughes G, Radcliffe K. Gonorrhoea treatment position statement. *Sex Transm Infect.* 2015 Aug 1;91(5):307–307.
52. World Health Organization, Reproductive Health and Research. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012 [cited 2016 Sep 8]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44863/1/9789241503501\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44863/1/9789241503501_eng.pdf)
53. Kirkcaldy RD. S08.1 Treatment of Gonorrhoea in an Era of Emerging Cephalosporin Resistance and Results of a Randomised Trial of New Potential Treatment Options. *Sex Transm Infect.* 2013 Jul 1;89(Suppl 1):A14–5.
54. Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 Aug 21 [cited 2016 Sep 8];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4546108/>
55. Biedenbach DJ, Turner LL, Jones RN, Farrell DJ. Activity of JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, tested against *Neisseria gonorrhoeae*, including ciprofloxacin-resistant strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct 1;74(2):204–6.
56. Robert M. In vitro activity of delafloxacin against *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates. STI & AIDS World Congress; 2013; Vienna.
57. Kerstein K. Eravacycline (TP-434) is active against susceptible and multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. 53rd Annual ICAAC; 2013; Denver.

58. Zhang Y, Zhou L, Zhu D, Wu P, Hu F, Wu W, et al. In vitro activities of tigecycline against clinical isolates from Shanghai, China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004 Dec 1;50(4):267–81.
59. Fujimoto K, Takemoto K, Hatano K, Nakai T, Terashita S, Matsumoto M, et al. Novel Carbapenem Antibiotics for Parenteral and Oral Applications: In Vitro and In Vivo Activities of 2-Aryl Carbapenems and Their Pharmacokinetics in Laboratory Animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Feb;57(2):697–707.
60. Koeth L. In vitro activity of dalbavancin against *Neisseria gonorrhoeae* and development of a broth microdilution method. *IDWeek 2013*; 2013; San Francisco.
61. Jacobsson S, Golparian D, Phan LT, Ohnishi M, Fredlund H, Or YS, et al. In vitro activities of the novel bicyclics modithromycin (EDP-420, EP-013420, S-013420) and EDP-322 against MDR clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and international reference strains. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan 1;70(1):173–7.
62. Golparian D, Fernandes P, Ohnishi M, Jensen JS, Unemo M. In Vitro Activity of the New Fluoroketolide Solithromycin (CEM-101) against a Large Collection of Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates and International Reference Strains, Including Those with High-Level Antimicrobial Resistance: Potential Treatment Option for Gonorrhea? *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2739–42.
63. Jerse AE, Deal CD. Vaccine research for gonococcal infections: where are we? *Sex Transm Infect*. 2013 Dec;89(Suppl 4):iv63-iv68.
64. Shewell LK, Ku SC, Schulz BL, Jen FE-C, Mubaiwa TD, Ketterer MR, et al. Recombinant truncated AniA of pathogenic *Neisseria* elicits a non-native immune response and functional blocking antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 8;431(2):215–20.
65. Armytage J. Unusual infections with the *Neisseria*. *Med J Aust* 1944. 53:109–12.
66. Carpenter CM, Charles R. Isolation of Meningococcus from the Genitourinary Tract of Seven Patients. *Am J Public Health Nations Health*. 1942 Jun;32(6):640–3.

67. Murray E. Meningococcus infection of the male urogenital tract and the liability to confusion with gonococcus infection. *Urol Cutan Rev* 1933. 43:739–41.
68. Givan KF, Thomas BW, Johnston AG. Isolation of *Neisseria meningitidis* from the urethra, cervix, and anal canal: further observations. *Br J Vener Dis*. 1977 Apr;53(2):109–12.
69. Harriau P, Ramanantsoa C, Pierre F, Riou J-Y, Quentin R. Endocervical infection in a pregnant woman caused by *Neisseria meningitidis*: evidence of associated oropharyngeal colonization of the male partner. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1997 Aug;74(2):145–7.
70. Karolus JJ, Gandelman AL, Nolan BA. Urethritis caused by *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*. 1980 Aug;12(2):284–5.
71. Lourenço MCS, Reis RS, Andrade ACV, Tuyama M, Barroso DE. Subclinical infection of the genital tract with *Neisseria meningitidis*. *Braz J Infect Dis*. 2006 Apr;10(2):154–5.
72. Urra E, Alkorta M, Sota M, Alcalá B, Martínez I, Barrón J, et al. Oro-genital transmission of *Neisseria meningitidis* serogroup C confirmed by genotyping techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;24(1):51–3.
73. 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 JMD*. 2009 Jan;11(1):75–86.
74. Carannante A, De Carolis E, Vacca P, Vella A, Vocale C, De Francesco MA, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015 Jul 24 [cited 2016 Sep 8];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514454/>
75. Marangoni A, Foschi C, Nardini P, D’Antuono A, Banzola N, Di Francesco A, et al. Evaluation of the New Test VERSANT CT/GC DNA 1.0 Assay for the Detection of

- Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine Specimens. J Clin Lab Anal. 2012 Feb 1;26(2):70–2.
76. Marangoni A, Foschi C, Nardini P, Compri M, Cevenini R. Evaluation of the Versant CT/GC DNA 1.0 Assay (kPCR) for the Detection of Extra-Genital *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections. PLoS ONE [Internet]. 2015 Mar 23 [cited 2015 Jun 15];10(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370730/>
77. Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Enzyme Immunoassay, Culture, and Three Nucleic Acid Amplification Tests. J Clin Microbiol. 2001 May;39(5):1751–6.
78. Luijt DS, Bos PAJ, van Zwet AA, van Voorst Vader PC, Schirm J. Comparison of COBAS AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR, Including Confirmation with *N. gonorrhoeae*-Specific 16S rRNA PCR, with Traditional Culture. J Clin Microbiol. 2005 Mar;43(3):1445–7.
79. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2012 [Internet]. 2014. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2012.pdf>
80. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2009. Stockholm, Sweden; 2011.
81. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2010. Stockholm, Sweden; 2012.
82. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2011. Stockholm, Sweden; 2013.
83. Morita-Ishihara T, Unemo M, Furubayashi K, Kawahata T, Shimuta K, Nakayama S, et al. Treatment failure with 2 g of azithromycin (extended-release formulation) in

- gonorrhoea in Japan caused by the international multidrug-resistant ST1407 strain of *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 2014 Aug 1;69(8):2086–90.
84. Gose SO, Soge OO, Beebe JL, Nguyen D, Stoltey JE, Bauer HM. Failure of azithromycin 2.0 g in the treatment of gonococcal urethritis caused by high-level resistance in California. Sex Transm Dis. 2015 May;42(5):279–80.
85. Yasuda M, Ito S, Kido A, Hamano K, Uchijima Y, Uwatoko N, et al. A single 2 g oral dose of extended-release azithromycin for treatment of gonococcal urethritis. J Antimicrob Chemother. 2014 Nov 1;69(11):3116–8.
86. Lynagh Y, Aogáin MM, Walsh A, Rogers TR, Unemo M, Crowley B. Detailed characterization of the first high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases in Ireland. J Antimicrob Chemother. 2015 Aug 1;70(8):2411–3.
87. Stevens K, Zaia A, Tawil S, Bates J, Hicks V, Whiley D, et al. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Australia. J Antimicrob Chemother. 2015 Apr 1;70(4):1267–8.
88. Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, Mapanje C, Kanyamula H, Banda B, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007: Sex Transm Dis. 2010 Mar;37(3):169–72.
89. 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 Mar 1;66(3):592–5.
90. Daly CC, 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 Nov;35(11):2985–8.
91. Workowski KA, Berman SM, Douglas J John M. Emerging Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Urgent Need to Strengthen Prevention Strategies. Ann Intern Med. 2008 Apr 15;148(8):606–13.

92. Tesh LD, Shaer KM, Cho JC, Estrada SJ, Huang V, Bland CM, et al. *Neisseria gonorrhoeae* and fosfomicin: Past, present and future. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Sep 1;46(3):290–6.
93. Gardiner BJ, Mahony AA, Ellis AG, Lawrentschuk N, Bolton DM, Zeglinski PT, et al. Is fosfomicin a potential treatment alternative for multidrug-resistant gram-negative prostatitis? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2014 Feb;58(4):e101-105.
94. Barbee LA, Soge OO, Holmes KK, Golden MR. In vitro synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jun;69(6):1572–8.
95. Dickgiesser N, Kuntz P. The activity of rosoxacin, fosfomicin, cefotiam, and spectinomycin on beta-lactamase producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis*. 1984 Jun;60(3):154–6.
96. Hauser C, Hirzberger L, Unemo M, Furrer H, Endimiani A. *In Vitro* Activity of Fosfomicin Alone and in Combination with Ceftriaxone or Azithromycin against Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Mar;59(3):1605–11.
97. Yuan Z, He C, Yan S, Ke Y, Tang W. Randomized controlled clinical trial on the efficacy of fosfomicin trometamol for uncomplicated gonococcal urethritis in men. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Jun 1;22(6):507–12.
98. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2013;18(3).
99. Zhao S, Duncan M, Tomberg J, Davies C, Unemo M, Nicholas RA. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Sep;53(9):3744–51.

100. 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 Mar;46(3):769–77.
101. Thakur SD, Starnino S, Horsman GB, Levett PN, Dillon JR. Unique combined *penA/mtrR/porB* mutations and NG-MAST strain types associated with ceftriaxone and cefixime MIC increases in a “susceptible” *Neisseria gonorrhoeae* population. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jun 1;69(6):1510–6.
102. 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 Apr;39(4):316–23.
103. Allen VG, Farrell DJ, Rebbapragada A, Tan J, Tijet N, Perusini SJ, et al. Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance Mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Feb;55(2):703–12.
104. Lindberg R, Fredlund H, Nicholas R, Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jun;51(6):2117–22.
105. 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. *Microscopy*. 2010;120:A121N.
106. Heymans R, Bruisten SM, Golparian D, Unemo M, de Vries HJC, van Dam AP. Clonally Related *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with Decreased Susceptibility to the Extended-Spectrum Cephalosporin Cefotaxime in Amsterdam, the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar 1;56(3):1516–22.

107. Carannante A, Renna G, Dal Conte I, Ghisetti V, Matteelli A, Prignano G, et al. Changing Antimicrobial Resistance Profiles among *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Italy, 2003 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct 1;58(10):5871–6.
108. Jeverica S, Golparian D, Matičič M, Potočnik M, Mlakar B, Unemo M. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006–12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jun 1;69(6):1517–25.
109. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report. Sexually transmitted infections, including HIV and blood-borne viruses 2014 [Internet]. 2014. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/sexually-transmitted-infections-HIV-AIDS-blood-borne-annual-epi-report-2014.pdf>
110. Unemo M, Golparian D, Potočnik M, Jeverica S. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. [cited 2016 Sep 9]; Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N25/art20200.pdf>
111. Heymans R, A. Matser A, Bruisten SM, Heijman T, Geskus RB, Speksnijder AGCL, et al. Distinct *Neisseria gonorrhoeae* Transmission Networks Among Men Who Have Sex With Men in Amsterdam, the Netherlands. *J Infect Dis*. 2012 Aug 15;206(4):596–605.
112. Choudhury B, Riskey CL, Ghani AC, Bishop CJ, Ward H, Fenton KA, et al. Identification of individuals with gonorrhoea within sexual networks: a population-based study. *The Lancet*. 2006;368(9530):139–146.
113. Howie F. The diversity of the opa gene in gonococcal isolates from men who have sex with men. *Sex Transm Infect*. 2004 Aug 1;80(4):286–8.
114. Kolader M-E, Dukers NHTM, van der Bij AK, Dierdorff M, Fennema JSA, Coutinho RA, et al. Molecular Epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Amsterdam, The



## **Bibliografia**

---

- Netherlands, Shows Distinct Heterosexual and Homosexual Networks. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug 1;44(8):2689–97.
115. Van Duynhoven Y, Van Klingereren B, Van Santen-Verheuvell M, Van Der Meijden W, Van De Laar M. Molecular epidemiology of infections with *Neisseria gonorrhoeae* among visitors to a Sexually Transmitted Diseases Clinic. *Sex Transm Dis.* 1997 Aug;24(7):409–17.



# Annex I

Articles del doctorand no inclosos en la tesi

## Annex I: Articles no inclosos en la tesi

### **Caracterització molecular de dues soques de *Neisseria gonorrhoeae* amb resistència d'alt nivell a ceftriaxona aïllades a Catalunya, Espanya.**

Jordi Camara, **Judit Serra**, Josefina Ayats, Teresa Bastida, Dolors Carnicer-Pont, Antònia Andreu i Carmen Ardanuy.

J Antimicrob Chemother 2012; 67: 1858–1860.

**Objectius:** L'objectiu d'aquest estudi va ser caracteritzar les dues primeres soques de *Neisseria gonorrhoeae* resistents a les cefalosporines d'espectre estès, aïllades de dos pacients sexualment relacionats (homes que tenen sexe amb homes) a Espanya.

**Material i mètodes:** La sensibilitat antimicrobiana es va estudiar mitjançant l'E-test. Els gens involucrats en la resistència a quinolones, ceftriaxona i multiresistència es van amplificar per PCR i es van seqüenciar. La tipificació de les soques es va realitzar mitjançant NG-MAST.

**Resultats:** Les dues soques presentaven el mateix perfil de multiresistència, presentant resistència a penicil·lina (CMI 0,094 mg/L, betalactamasa negativa), a ceftriaxona (CMI 1,5 mg/L), a cefixima (CMI 1,5 mg/L), a cefotaxima (CMI 1 mg/L), a ciprofloxacino (CMI 32 mg/L) i tetraciclina (CMI 1,5 mg/L). Les dues soques van pertànyer al seqüenciotip ST1407 (porB-908 i tbpB-110). La resistència a ciprofloxacino va ser degut a una substitució d'aminoàcid en *GyrA* (S91F i D95G) i *ParC* (S87R). Es va detectar una delecció d'una adenina en el promotor de la bomba d'expulsió MtrC-D-E (*mtrR*). No es van detectar canvis en el gen *pilQ*. La porina PorB mostrava dues substitucions (G120K i A121N). Una substitució L421P es va detectar en la PBP1A (*ponA*). La PBP2 (*penA*) va presentar l'estructura en mosaic XXXIV amb una substitució adicional (A501P). Aquest genotip era idèntic al descrit recentment en la soca francesa (F89).

## **Annex I: Articles no inclosos en la tesi**

**Conclusions:** Aquest és el primer cas de transmissió de *N. gonorrhoeae* amb resistència d'alt nivell a les cefalosporines d'espectre estès. La tipificació molecular suggereix que aquesta soca es pot estar estenent per Europa i posa de manifest la necessitat de programes de vigilància i la importància d'estudiar la sensibilitat del gonococ a les cefalosporines.

## Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain

Jordi Cámara<sup>1</sup>, Judit Serra<sup>2</sup>, Josefina Ayats<sup>1</sup>, Teresa Bastida<sup>3</sup>, Dolors Camicer-Pont<sup>4</sup>, Antònia Andreu<sup>2</sup>  
and Carmen Ardanuy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbiology Department, Hospital Universitari de Bellvitge-Universitat de Barcelona-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Microbiology Department, 'Esperit Sant' Regional Hospital, Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>4</sup>Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT), Institut Català d'Oncologia, Badalona, Barcelona, Spain

\*Corresponding author. Tel: +34932607930; Fax: +34932607547; E-mail: c.ardanuy@bellvitgehospital.cat

Received 9 March 2012; returned 26 March 2012; revised 5 April 2012; accepted 10 April 2012

**Objectives:** The aim of this study was to characterize the first two extended-spectrum cephalosporin-resistant and multidrug-resistant (MDR) *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected from two sexually related patients (men who have sex with men) in Spain.

**Methods:** Antimicrobial susceptibility was studied by Etest. Genes involved in quinolone, ceftriaxone and multidrug resistance were amplified by PCR and sequenced in both directions. The isolates were typed by *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST).

**Results:** The two isolates had the same MDR profile, showing resistance to penicillin (MIC 0.094 mg/L;  $\beta$ -lactamase negative), ceftriaxone (MIC 1.5 mg/L), cefixime (MIC 1.5 mg/L), cefotaxime (MIC 1 mg/L), ciprofloxacin (MIC >32 mg/L) and tetracycline (MIC 1.5 mg/L). NG-MAST showed that both isolates belonged to sequence type (ST) 1407 (*porB*-908 and *tbpB*-110). Ciprofloxacin resistance was due to amino acid substitutions in GyrA (S91F and D95G) and ParC (S87R). An A deletion in the promoter of the MtrCDE efflux pump (*mtrR*) was detected. No changes were detected in the *pilQ* gene. The outer membrane protein PorB showed two substitutions at G120K and A121N. An L421P substitution was observed in the PBP1A (*penA*) sequence. The sequence of PBP2 (*penA*) showed a mosaic structure related to genotype XXXIV with a single additional amino acid substitution (A501P). This genotype was identical to a recently described French isolate (F89).

**Conclusions:** This is the first reported case of high-level extended-spectrum cephalosporin-resistant *N. gonorrhoeae* transmission. The molecular typing and MDR genotype suggest possible European spread of this strain, highlighting the need for surveillance and the importance of testing the susceptibility of *N. gonorrhoeae* to extended-spectrum cephalosporins.

**Keywords:** *N. gonorrhoeae*, NG-MAST, multidrug resistant

### Introduction

*Neisseria gonorrhoeae* remains a major cause of sexually transmitted infection. Extended-spectrum cephalosporins (ESCs; cefixime and ceftriaxone, for oral and parenteral use, respectively) are the first-line treatment in many countries, and resistance is currently rare.<sup>1</sup> However, two unrelated *N. gonorrhoeae* strains with high-level resistance to third-generation cephalosporins were recently described.<sup>2,3</sup> The first, with a ceftriaxone MIC of 2 mg/L, was described in Japan, and molecular typing using *N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) showed a novel sequence type (ST), ST4220.<sup>2</sup> To our knowledge,

this genotype has not been described elsewhere, suggesting this was a sporadic event. The second strain, also with a ceftriaxone MIC of 1.5–2 mg/L, was described later in France, and belonged to ST1407, a well-known European clone with diminished susceptibility to ESCs.<sup>3</sup> Transformation studies demonstrated that the development of new mutations in the *penA* gene (PBP2) were responsible for the development of high-level cephalosporin resistance in both strains. The *penA* gene of the Japanese strain was similar to mosaic allele X with 12 amino acid substitutions, whereas the *penA* gene of the French strain was similar to mosaic allele XXXIV with an additional amino acid substitution (A501P). In addition, both strains had alterations in other

genes responsible for resistance to several groups of antimicrobials (*gyrA*, *parC*, *mtrR*, *ponA* and *porB1b*).

Subsequently, the first two *N. gonorrhoeae* isolates in Spain with high-level resistance to ESCs were detected in two sexually related patients [men who have sex with men (MSM)].<sup>4</sup> The aims of the current study were to analyse the molecular mechanisms involved in  $\beta$ -lactam and multidrug resistance, and to undertake molecular typing of these *N. gonorrhoeae* isolates.

## Materials and methods

### Bacterial strains, antibiotic susceptibility and molecular typing

Two gonococcal isolates obtained from urethral and rectal swabs of two sexually related patients (MSM) were used for the study.<sup>4</sup> Antimicrobial susceptibility was studied by Etest (bioMérieux) on a GC medium (Becton Dickinson) following the recommendations and criteria of EUCAST.<sup>5</sup> The current EUCAST MIC breakpoints for penicillin are  $\leq 0.06$  mg/L (susceptible) and  $> 1$  mg/L (resistant) and for cefixime and ceftriaxone the breakpoints are  $\leq 0.12$  mg/L (susceptible) and  $> 0.12$  mg/L (resistant).<sup>5</sup> The production of  $\beta$ -lactamase was tested using the nitrocefin method (Becton Dickinson).

NG-MAST was used for molecular typing, following methodology described previously.<sup>6</sup> Briefly, bacterial DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Internal fragments of *porB* and *tbpB* genes were amplified by PCR, and sequenced in both directions using a BigDye Terminator v3.1 in an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Allele number and *N. gonorrhoeae* STs were assigned using the NG-MAST web site (<http://www.mlst.net>).

### Molecular characterization of the resistance profile

Bacterial DNA was extracted and genes related to quinolone resistance (*gyrA* and *parC*),  $\beta$ -lactam resistance (*ponA* and *penA*) and multidrug resistance (promoter of *mtrR*, *pilQ* and *porB*) were amplified by PCR and sequenced as described previously.<sup>7,8</sup>

## Results and discussion

The two isolates displayed the same antimicrobial susceptibility profile, with the following MICs: penicillin, 0.094 mg/L; cefixime, 1.5 mg/L; ceftriaxone, 1.5 mg/L; cefotaxime, 1 mg/L; tetracycline, 1.5 mg/L; and ciprofloxacin,  $> 32$  mg/L. The  $\beta$ -lactamase test was negative. By disc diffusion, both isolates were susceptible to azithromycin and spectinomycin. The two isolates reported here showed two amino acid substitutions in *GyrA* (S91F and D95G) and one in *ParC* (S87R), all of them previously shown to be involved in quinolone resistance.<sup>9</sup> No changes were detected in the *pilQ* gene. Both isolates showed an A deletion in the promoter of the *MtrCDE* efflux pump (*mtrR*), two amino acid substitutions (G120K and A121N) in the outer membrane protein *PorB* and an L421P change in the PBP1A (*ponA*) sequence. The sequence of PBP2 (*penA*) showed a mosaic structure related to genotype XXXIV with a single additional amino acid change (A501P).<sup>9</sup> The genotype of *mtrR*, *porB* and *ponA* with mosaic XXXIV at PBP2 has previously been associated with diminished susceptibility to cefixime in European isolates belonging to ST1407. Moreover, the F89 strain of *N. gonorrhoeae* isolated in France, which had high-level resistance to ESCs, showed the

same resistance genotype, including the A501P substitution in the PBP2 gene with a mosaic structure (XXXIV).

The patient with symptomatic urethritis was cured after doxycycline therapy (100 mg, twice a day for 7 days) in spite of the isolate showing borderline resistance to tetracycline (MIC 1.5 mg/L), probably mediated by overexpression of a multidrug resistance efflux pump, as the *tet(M)* gene was not detected by PCR (data not shown). The second patient remained asymptomatic, but azithromycin treatment (500 mg/day) for 3 days eradicated the microorganism from the rectum, as confirmed by culture.<sup>4</sup>

NG-MAST showed that both isolates belonged to ST1407 (*porB*-908 and *tbpB*-110), which is the most prevalent clone in Europe. ST1407 is a successful clone that has spread worldwide and is associated with decreased susceptibility to cefixime and treatment failure. Moreover, the first European strain (F89) with high-level resistance to ESCs, recently identified in France, also belonged to this ST.<sup>3</sup>

The two isolates described here are only the third and fourth ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* to have been reported to date. Ceftriaxone resistance in *N. gonorrhoeae* thus currently remains rare, having previously only been detected in two sporadic and epidemiologically unrelated strains from Japan and France. This may reflect the fact that ESCs have only recently been widely used in the treatment of gonorrhoea. It may also be the case that the biological cost caused by the accumulation of mutations among structural genes could affect the fitness of this pathogen, reducing its potential to spread as a successful clone.

The fact that the two patients reported here were sexual partners, coupled with the fact that the two isolates are genetically related, makes this the first documented case of inter-patient transmission of ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae*. In addition, our results showed that these two resistant isolates were genetically related to the F89 strain isolated in France. All three isolates (Spanish and French) were collected from clinical samples of MSM patients, suggesting the presence of circulating multidrug-resistant clones in this community. Two hypotheses could explain these results. Firstly, since isolates belonging to ST1407 comprise a widespread European clone with diminished susceptibility to cefixime, development of ceftriaxone resistance due to an A501P substitution in a PBP2 XXXIV allele may have occurred. This hypothesis is supported by the recent report of an Austrian isolate also belonging to 1407 and with an amino acid substitution (T534A) in the same *penA* allele, XXXIV, that was resistant to cefixime and which caused a treatment failure.<sup>10</sup> The second and more worrisome hypothesis is the continental spread of an ESC-resistant strain among the MSM community, a population at high risk of transmission of gonococcal infection. However, the epidemiological relationship between the Spanish and French patients is unknown, hence this hypothesis cannot be confirmed on the basis of currently available data. Nonetheless, the transmission between the two sexually related patients in Spain lends support to this idea. If this hypothesis is confirmed, this presages a new era in gonococcal infections, with the presence of a multidrug- and ceftriaxone-resistant strain capable of spreading successfully. However, more studies analysing the biological fitness of this new PBP2 mosaic structure are needed, since it has been suggested to be the limiting factor for the spread of ESC-resistant *N. gonorrhoeae*.



Cámara et al.

---

This report highlights the importance of undertaking surveillance of the susceptibility of *N. gonorrhoeae* to ESCs in order to detect the possible spread of this new variant of the European clone. Molecular characterization of isolates with reduced susceptibility to ESCs will be a vital component of such surveillance if we are to establish the role of this new clone in the epidemiology of sexually transmitted infections. The observation that one of the patients described here was asymptomatic emphasizes the need to sample both symptomatic and asymptomatic patients. Finally, if high-level resistance to ESCs coupled with resistance to other antibiotic classes becomes widespread, it will be essential to establish new and effective antibiotic therapy if gonorrhoea is to remain a treatable infection.

---

## Funding

This study was supported by a grant from the Microbiology Department of Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL.

---

## Transparency declarations

None to declare.

---

## References

- 1 CDC. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR* 2010; **59**: 1–110. Available at: <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/std-treatment-2010-rr5912.pdf> (27 March 2012, date last accessed).
- 2 Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K et al. 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**: 3538–45.
- 3 Unemo M, Golparian D, Nicholas R et al. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* in Europe (France): novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **56**: 1273–80.
- 4 Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E et al. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; **30**: 218–9.
- 5 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\\_2.0\\_120221.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf) (27 March 2012, date last accessed).
- 6 Martin IM, Ison CA, Aanensen DM et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004; **189**: 1497–505.
- 7 Lindberg R, Fredlund H, Nicholas R et al. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2117–22.
- 8 Tanaka M, Nakayama H, Harooka M et al. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 521–5.
- 9 Allen GV, Farrell DJ, Rebbapragada A et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 703–12.
- 10 Unemo M, Golparian D, Stary A et al. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Euro Surveill* 2011; **16**: pii=19998.



## Annex I: Articles no inclosos en la tesi

### ***Neisseria gonorrhoeae*: estudi de la resistència antimicrobiana i de la dinàmica poblacional. Situació a Barcelona el 2011.**

Serra-Pladevall J, Barberá-Gracia MJ, Roig-Carbajosa G, Juvé-Saumell R, Gonzalez-Lopez JJ, Bartolomé-Comas R, Andreu-Domingo A.

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013 Nov;31(9):579-83.

**Introducció:** Les altes taxes de resistència de *Neisseria gonorrhoeae* a certs antibiòtics, juntament amb l'aparició de soques amb sensibilitat disminuïda i resistència a les cefalosporines, fan de la infecció gonocòccica un problema de Salut Pública. Els objectius de l'estudi van ser: realitzar el seguiment de la sensibilitat antimicrobiana del gonococ entre gener i agost del 2011, i estudiar la dinàmica poblacional d'aquestes soques.

**Material i mètodes:** Es va estudiar la sensibilitat mitjançant el mètode de disc-difusió i E-test. El genotipat es va realitzar mitjançant NG-MAST.

**Resultats:** Del total de les 100 soques, el 59% van presentar sensibilitat intermitja a pencil·lina i el 9% resistència. Segons EUCAST, es van detectar 3 gonococs amb sensibilitat disminuïda a ceftriaxona, 10 a cefixima i una soca amb resistència d'alt nivell a als dos antibiòtics (CMI 1,5 µg/mL). La CMI<sub>50</sub> i CMI<sub>90</sub> a cefixima van ser de 0,016 µg/mL i 0,125 µg/mL, mentre que les de ceftriaxona van ser <0,016 µg/mL i 0,064 µg/mL, respectivament. El 99% van presentar resistència a doxiciclina, el 53% a ciprofloxacino, el 3% a azitromicina i el 1% a espectinomicina. El ST més prevalent va ser ST1407, majoritàriament associat a resistència o sensibilitat disminuïda a cefalosporines i macròlids.

## **Annex I: Articles no inclosos en la tesi**

**Conclusions:** *N. gonorrhoeae* ha desenvolupat taxes importants de resistència a diferents antibiòtics. S'ha detectat una soca amb resistència d'alt nivell a les cefalosporines de tercera generació i vàries amb sensibilitat disminuïda, a part d'observar-se un augment de la CMI<sub>50</sub> i CMI<sub>90</sub> a aquests antibiòtics. L'estructura poblacional del gonococ es manté estable i comú a la resta d'Europa, tot i que s'han identificat dos nous sequenciotips (ST7226 i ST7227) amb potencial per seleccionar-se i adquirir alts nivells de resistència a les cefalosporines.



## Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

### *Neisseria gonorrhoeae*: resistencias antimicrobianas y estudio de la dinámica poblacional. Situación en 2011 en Barcelona

Judit Serra-Pladevall<sup>a,\*</sup>, María Jesús Barberá-Gracia<sup>b</sup>, Glòria Roig-Carbajosa<sup>c</sup>, Rosa Juvé-Saumell<sup>d</sup>, Juan José Gonzalez-Lopez<sup>a</sup>, Rosa Bartolomé-Comas<sup>a</sup> y Antònia Andreu-Domingo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

<sup>b</sup> Unitat d'Infeccions de Transmissió Sexual Drassanes, CAP Drassanes, Barcelona, España

<sup>c</sup> Servei d'Anàlisis Clíniques, Secció Microbiologia, CAP Manso, Barcelona, España

<sup>d</sup> Laboratori Clínic Bon Pastor, Barcelona, España

#### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

**Historia del artículo:**  
Recibido el 13 de diciembre de 2012  
Aceptado el 8 de marzo de 2013  
On-line el 25 de abril de 2013

**Palabras clave:**  
*Neisseria gonorrhoeae*  
Gonorrea  
Test de sensibilidad antimicrobiana  
Dinámica poblacional

#### RESUMEN

**Introducción:** Las altas tasas de resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) a ciertos antibióticos, junto con la aparición de cepas con sensibilidad disminuida y resistencia a las cefalosporinas, hacen de la infección gonocócica un problema de salud pública. Los objetivos del estudio fueron: realizar el seguimiento de la sensibilidad antimicrobiana de NG obtenidas entre enero y agosto de 2011, y estudiar su dinámica poblacional.

**Métodos:** Se estudió la sensibilidad mediante el método disco-difusión y E-test. El genotipado se realizó mediante el NG-MAST.

**Resultados:** De un total de 100 cepas, el 59% presentaron sensibilidad intermedia a penicilina y el 9% resistencia. Según EUCAST, se detectaron 3 gonococos con sensibilidad disminuida a ceftriaxona, 10 a cefixima y uno con resistencia de alto nivel a ambos (CMI 1,5 µg/ml). La CMI<sub>50</sub> y la CMI<sub>90</sub> a cefixima fue de 0,016 y de 0,125 µg/ml, mientras que a ceftriaxona fue < 0,016 y 0,064 µg/ml. El 99% presentó resistencia a doxiciclina, el 53% a ciprofloxacino, el 3% a azitromicina y el 1% a espectinomicina. El ST más prevalente fue el ST1407, mayoritariamente asociado a resistencia o sensibilidad disminuida a cefalosporinas o macrólidos.

**Conclusión:** NG ha desarrollado tasas importantes de resistencia a distintos antibióticos. Se ha detectado una cepa con resistencia de alto nivel a las cefalosporinas de tercera generación y varias con sensibilidad disminuida, además de observarse un aumento de la CMI<sub>50</sub> y de la CMI<sub>90</sub> a estos antibióticos. La estructura poblacional de NG permanece estable y común al resto de Europa, aunque se han identificado 2 nuevos secuenciotipos (ST7226 y ST7227) con potencial para seleccionarse y adquirir altos niveles de resistencia a cefalosporinas.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### *Neisseria gonorrhoeae*: Antimicrobial resistance and study of population dynamics. Situation in Barcelona in 2011

#### ABSTRACT

**Keywords:**  
*Neisseria gonorrhoeae*  
Gonorrhoea  
Microbial sensitivity test  
Population dynamics

**Background:** Due to the high rates of antimicrobial resistance to certain antibiotics, together with the emergence of *Neisseria gonorrhoeae* (NG) with reduced susceptibility and resistance to third-generation cephalosporins, gonococcal infection is becoming a public health problem. The objectives of the study were: To keep track of the antimicrobial susceptibility of NG strains obtained from January to August 2011. To study the population dynamics.

**Methods:** The antimicrobial susceptibility was studied by disk-diffusion and E-test. The genotyping was performed by NG-MAST method.

**Results:** Of a total of 100 strains studied, 59% showed intermediate sensitivity to penicillin and 9% were resistant. According to EUCAST, we detected 3 gonococci with reduced susceptibility to ceftriaxone, 10 to cefixime and one with high-level resistance to both antibiotics (MIC 1.5 µg/ml). MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> to cefixime were 0.016 and 0.125 µg/ml, respectively, whereas to

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juserra@vhebron.net (J. Serra-Pladevall).

ceftriaxone they were  $< 0.016$  and  $0.064 \mu\text{g/ml}$ , respectively. Almost all (99%) of the strains were resistant to doxycycline, 53% to ciprofloxacin, 3% to azithromycin, and 1% to spectinomycin. The most prevalent ST was ST1407, predominantly associated to resistance or reduced sensitivity to cephalosporins or macrolides.

**Conclusions:** NG has developed significant rates of resistance to various antibiotics. One strain has been detected with high level resistance to third generation cephalosporins, and several strains with reduced susceptibility. An increase in MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> to these antibiotics has also been observed. NG population structure remains stable and common to the rest of Europe, although two new ST (ST7226 and ST7227) have been identified that could be selected and acquire high levels of resistance to cephalosporins.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

Actualmente la infección gonocócica es la segunda infección de transmisión sexual de etiología bacteriana más prevalente<sup>1</sup>, tras la causada por *Chlamydia trachomatis*. *Neisseria gonorrhoeae* (NG) representa un problema de salud pública importante, tanto por su magnitud como por las complicaciones y secuelas a que da lugar. Debido a la ausencia de vacunas efectivas, un diagnóstico apropiado, así como un tratamiento antimicrobiano efectivo, son 2 de las principales herramientas para evitar la diseminación de la infección<sup>2</sup>.

En Estados Unidos el *Center of Diseases Control* (CDC) informó, en 2007, 355.991 casos, lo que representa una tasa de 118,9 por 100.000 habitantes<sup>3</sup>, aunque en los últimos años se ha observado una leve disminución de su incidencia, con una tasa en 2009 de 99,1 por 100.000<sup>4</sup>. En Europa, en el año 2007 la tasa de infección gonocócica era muy variable según el área geográfica, oscilando entre 0,3/100.000 en Italia y 30,8/100.000 en el Reino Unido<sup>5</sup>. En España, el sistema de enfermedades de declaración obligatoria (EDO) notificó 1.954 casos el 2009, lo que representa una tasa de 4,33 por cada 100.000 habitantes. Desde 1995, año en que la tasa alcanzó el máximo de 11,69, se observó un claro descenso de la incidencia de la infección gonocócica, pero a partir de 2002 se advierte un incremento continuado<sup>6</sup>. La comparación entre las tasas de incidencia observadas en Estados Unidos y en diversas partes de Europa con las de España sugiere que en nuestro país la infección gonocócica está infradiagnosticada y/o infranotificada.

A lo largo de la historia se han utilizado diversos antimicrobianos para el tratamiento de la gonorrea, siendo actualmente de elección las cefalosporinas de tercera generación, concretamente ceftriaxona 250 mg intramuscular o cefixima 400 mg vía oral en dosis única. En 2001 en Japón se detectó por primera vez una cepa de gonococo con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de tercera generación, y posteriormente se han descrito casos en todo el mundo cada vez con más frecuencia. En 2009, el *Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme* (GRASP) reportó que en Inglaterra el 1,2% de las cepas de gonococo presentaban sensibilidad disminuida a cefixima (definida como CMI  $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$ ) y el 10,6% presentaban una CMI  $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ <sup>7</sup>. Actualmente las guías terapéuticas de Estados Unidos y del Reino Unido recomiendan cefixima solamente como alternativa a la ceftriaxona cuando esta no es una opción de tratamiento, y la guía del Reino Unido<sup>8</sup> ya recomienda ceftriaxona a dosis de 500 mg como tratamiento empírico de primera línea. En el año 2011 se han descrito las primeras 5 cepas de NG con resistencia de alto nivel a ceftriaxona, 2 de las cuales se han aislado en España<sup>9,10</sup>.

En este contexto se planteó el presente estudio, cuyos objetivos fueron estudiar la sensibilidad antimicrobiana de cepas de NG aisladas recientemente en la ciudad de Barcelona, lo que permitirá mantener las guías terapéuticas actualizadas, y realizar un genotipado de las mismas con la finalidad de detectar cambios epidemiológicos en las cepas circulantes.

## Métodos

### Cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

Desde enero hasta agosto de 2011 en el Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron se estudiaron 100 cepas de NG procedentes de pacientes atendidos en la Unitat d'Infeccions de Transmissió Sexual de Drassanes (UITSD) de Barcelona, en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona y en los centros de atención primaria y de planificación familiar adscritos al mismo (unos 140). Correspondieron a 85 varones, 9 mujeres y 6 de los que no se dispuso de la información sobre el sexo. Setenta y siete cepas se aislaron en exudado uretrales, 14 en rectales, 7 en endocervicales, una en un exudado vaginal y una en un frotis faríngeo.

La identificación de las cepas se realizó mediante tinción de Gram, prueba de la citocromo-oxidasa, producción de catalasa, identificación bioquímica mediante el sistema API NH (bioMérieux, Francia) y el test de coagulación utilizando el kit Phadebact<sup>®</sup> Monoclonal GC Test de Bactus (Becton Dickinson, Francia).

### Estudio de sensibilidad antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad antimicrobiana se realizó siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>11</sup>. El medio utilizado fue el medio selectivo CG (Becton Dickinson, Francia) suplementado al 1% con IsoVitalax (Becton Dickinson, Francia). Como cepa control se utilizó la ATCC 49226.

A partir de un subcultivo en medio no selectivo se preparó una suspensión con un McFarland de 0,5 en solución salina.

Mediante la técnica de E-test se estudió la sensibilidad a penicilina (0,002–32  $\mu\text{g/ml}$ ), ceftriaxona (0,016–256  $\mu\text{g/ml}$ ) y cefixima (0,016–256  $\mu\text{g/ml}$ ) (bioMérieux España S.A.) y mediante el método de disco-difusión a azitromicina, ácido nalidixico, ciprofloxacino, espectinomicina y doxiciclina. En las cepas resistentes a azitromicina se estudió su CMI mediante el E-test (0,016–256  $\mu\text{g/ml}$ ) (bioMérieux España S.A.).

Las placas se incubaron 18–24 h a 36 °C en atmósfera al 5% CO<sub>2</sub>.

La interpretación de las CMI se hizo según los criterios de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) en el caso de disco-difusión y según CLSI<sup>11</sup> y EUCAST<sup>12</sup> en el caso del E-test. Así, para la disco-difusión se consideraron sensibles a azitromicina las cepas con halo  $\geq 27$  mm, intermedio entre 26–24 mm y resistente  $< 24$  mm; para el ácido nalidixico se consideró sensible un halo  $< 25$  mm; para ciprofloxacino se consideró sensible un halo  $\geq 42$  mm, intermedio entre 41–40 mm y resistente  $< 40$  mm; para espectinomicina fueron sensibles  $\geq 20$  mm, intermedios entre 19–17 mm y resistentes  $< 17$  mm, y para doxiciclina se consideraron resistentes las cepas con halo  $< 33$  mm. En el caso del E-test, CLSI considera sensibilidad disminuida (SD) cuando la CMI a cefixima es  $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$  y a ceftriaxona  $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$  y EUCAST cuando la CMI a ambos antibióticos es  $> 0,12 \mu\text{g/ml}$ .

A todas las cepas se les estudió la producción de betalactamasa por la técnica acidimétrica en medio líquido.



**Tabla 1**  
Resistencias antimicrobianas de las 100 cepas estudiadas de *Neisseria gonorrhoeae*

	EUCAST		
	S (%)	I (%)	R (%)
Penicilina	32	59	9
Ceftriaxona	96	3	1
Cefixima	89	10	1
Azitromicina	96	1	3
Ciprofloxacino	47	—	53
Doxiciclina	1	—	99
Espectinomina	99	—	1

I: sensibilidad intermedia; R: resistente; S: sensible.

Las cepas se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en caldo Trypticase Soy con un 20% de glicerol para la realización posterior de los estudios moleculares.

#### Tipificación molecular

Se utilizó el *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) para la tipificación molecular de las cepas<sup>13</sup>. Brevemente, 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. Utilizando la página web de NG-MAST ([www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net)) se asignó 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 asignó un nuevo número alélico utilizando la base de datos disponible en <http://www.mlst.net>.

#### Resultados

De la determinación de la CMI de penicilina se deduce que el 32% de las cepas de NG fueron sensibles a este  $\beta$ -lactámico (CMI  $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ ), el 59% presentaron sensibilidad intermedia (CMI  $0,07-1 \mu\text{g/ml}$ ) y el 9% fueron resistentes (CMI  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ) (tabla 1). Del total de los 68 gonococos con sensibilidad intermedia o resistente, el 10,3% lo fueron por acción de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica. De las 7 cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa, 3 presentaron una CMI de  $0,38 \mu\text{g/ml}$ ,  $6 \mu\text{g/ml}$  y  $8 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente; 2 cepas de  $12 \mu\text{g/ml}$ , y las 2 restantes,  $> 32 \mu\text{g/ml}$ .

La sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación se determinó mediante el E-test y los resultados variaron en función de los puntos de corte utilizados. Así, según CLSI, no se obtuvo ningún gonococo con sensibilidad disminuida a cefixima y 3 a ceftriaxona; en cambio, según EUCAST, se obtuvieron 3 cepas con SD a ceftriaxona y 10 a cefixima<sup>14</sup>. En mayo de 2011 se detectó la primera cepa con resistencia de alto nivel a las cefalosporinas<sup>9,10</sup>, presentando una CMI de  $1,5 \mu\text{g/ml}$  para ceftriaxona, cefixima y cefotaxima. El total de las cepas estudiadas exhibieron una CMI<sub>50</sub> y una CMI<sub>90</sub> a cefixima de  $0,016$  y  $0,125 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente, mientras que las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> a ceftriaxona fueron  $< 0,016$  y  $0,064 \mu\text{g/ml}$ .

Fueron resistentes a azitromicina el 3% de los aislamientos, de los cuales una cepa presentó un halo de 9 mm correspondiente a una CMI de  $24 \mu\text{g/ml}$ , una de 19 mm (cepa no viable para la determinación de la CMI) y una de 21 mm con una CMI de  $0,75 \mu\text{g/ml}$ . Una cuarta cepa con halo de 22 mm presentó una CMI de  $0,5 \mu\text{g/ml}$ , lo que se consideró sensibilidad disminuida.

Por lo que refiere a las quinolonas, los resultados de sensibilidad a ciprofloxacino concordaron al 100% con los del ácido nalidixico, siendo el 47% de las cepas sensibles y el 53% resistentes a estos antibióticos.

Solo una cepa mantuvo la sensibilidad a doxiciclina, siendo el 99% de los restantes aislamientos resistentes. Veinte de las cepas resistentes presentaron un halo  $< 19$  mm.

Fueron sensibles a la espectinomina el 99% de los gonococos estudiados, aislándose una única cepa resistente con un halo de 9 mm.

De las 100 cepas solo una fue sensible a los 7 antimicrobianos estudiados. De las restantes, 27 fueron resistentes solo a doxiciclina. Otras 22 cepas fueron resistentes a 2 antibióticos: 17 a doxiciclina y con resistencia o disminución de la sensibilidad a penicilina y 5 a doxiciclina y quinolonas. Treinta y cinco cepas fueron resistentes a 3 antibióticos: 33 a doxiciclina, penicilina y quinolonas y 2 a doxiciclina, penicilina y azitromicina. Las restantes 15 cepas pueden considerarse multiresistentes, ya que fueron resistentes a más de 3 antimicrobianos, siendo: 12 cepas resistentes a doxiciclina, ciprofloxacino y resistentes o con SD a penicilina y cefalosporinas; una cepa a doxiciclina, ciprofloxacino, azitromicina y sensibilidad intermedia a penicilina; una cepa a doxiciclina, ciprofloxacino, espectinomina y sensibilidad intermedia a penicilina, y una cepa a doxiciclina, ciprofloxacino, azitromicina y sensibilidad intermedia a penicilina y cefalosporinas.

Las 3 cepas con sensibilidad disminuida a ceftriaxona también presentaron sensibilidad disminuida a penicilina, con CMI a este antibiótico de  $0,125$ ,  $0,38$  y  $0,5 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente, y además fueron resistentes a doxiciclina.

La tipificación molecular mediante NG-MAST se llevó a cabo en un total de 45 cepas que incluían la cepa resistente a ceftriaxona y cefixima, las 10 cepas con sensibilidad disminuida a alguno de estos 2 antimicrobianos, las 4 cepas resistentes o con sensibilidad disminuida a azitromicina y 29 cepas seleccionadas aleatoriamente de entre el resto de cepas sensibles a estos antibióticos.

El ST más prevalente fue el ST1407 (27%), al cual pertenecía la cepa resistente a ceftriaxona y cefixima, 7 de las 10 cepas con sensibilidad disminuida a alguno de estos 2 antibióticos y 2 de las 3 cepas resistentes a azitromicina. Dos cepas con sensibilidad disminuida a cefixima pertenecían a los ST7226 y ST7227, los cuales comparten el mismo alelo *tbpB* (alelo 110) entre ellos y con el ST1407, y una al ST4843, el cual comparte el alelo *porB* (alelo 908) también con el ST1407. La restante cepa resistente a azitromicina perteneció al ST7228 y una de las cepas con sensibilidad disminuida a cefixima no pudo ser tipificada mediante este método. Las 29 cepas sensibles a cefalosporinas y azitromicina se distribuyeron entre 22 ST diferentes, perteneciendo 3 de ellas al ST1407 (tabla 2). Los ST 7223, 7224, 7225, 7226, 7227, 7228, 7230, 7231, 7232, 7233, 7234, 7235 y 7236 fueron de nueva descripción.

#### Discusión

Debido a la tendencia al aumento de la infección gonocócica y sobre todo a la aparición de cepas multiresistentes, es fundamental desarrollar programas de monitorización de resistencias y así poder mantener las guías terapéuticas actualizadas para un correcto manejo del paciente.

Este estudio muestra los altos porcentajes de resistencia de NG en nuestro medio, de manera que penicilina (68% de cepas resistentes o sensibilidad disminuida), ciprofloxacino (53% de cepas resistentes) y doxiciclina (99%) están lejos de poder utilizarse como tratamiento empírico de elección.

El 10% de los gonococos presentaron una CMI  $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$  a cefixima y el 3% a ceftriaxona. No siempre una CMI  $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$  se relaciona con fracaso terapéutico<sup>15</sup>, por lo que son necesarios acuerdos para establecer los puntos de corte apropiados. A pesar de ello, en todo el mundo se ha descrito una disminución de la sensibilidad de NG a las cefalosporinas y casos de fracaso terapéutico con cefixima. En 2010 el GRASP reportó que en Inglaterra el 6,3% de las cepas de gonococo presentaban sensibilidad disminuida a cefixima (definida como CMI  $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$ ) y el 17,4% presentaban

# Annex I: Articles no inclosos en la tesi

582

J. Serra-Pladevall et al/ *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 201 3;**31(9)**:579-583

**Tabla 2**  
Distribución de los ST en las 45 cepas estudiadas de *Neisseria gonorrhoeae*

ST (número de aislados)	Sensibilidad antimicrobiana <sup>a</sup>			Alelo	
	Ceftriaxona	Cefixima	Azitromicina	porB	tbpB
1407 (1)	R	R	S	908	110
1407 (1)	SD	S	S	908	110
1407 (4)	S	SD	S	908	110
1407 (1)	SD	SD	S	908	110
1407 (1)	S	S	R	908	110
1407 (1)	SD	SD	R	908	110
1407 (3)	S	S	S	908	110
<b>7226 (1)</b>	<b>S</b>	<b>SD</b>	<b>S</b>	<b>4321</b>	<b>110</b>
<b>7227 (1)</b>	<b>S</b>	<b>SD</b>	<b>S</b>	<b>4324</b>	<b>110</b>
4843 (1)	S	SD	S	908	1021
<b>7228 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>65</b>	<b>1103</b>
<b>7228 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>65</b>	<b>1103</b>
<b>7224 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>SD</b>	<b>4325</b>	<b>29</b>
<b>7223 (4)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>1143</b>	<b>4</b>
1582 (3)	S	S	S	997	137
2992 (3)	S	S	S	1808	29
21 (1)	S	S	S	14	33
104 (1)	S	S	S	134	35
210 (1)	S	S	S	59	4
286 (1)	S	S	S	105	21
341 (1)	S	S	S	2078	110
2487 (1)	S	S	S	1534	241
4949 (1)	S	S	S	3001	29
5422 (1)	S	S	S	3291	29
6210 (1)	S	S	S	1914	1262
<b>7225 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>565</b>	<b>32</b>
<b>7230 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>1417</b>	<b>1103</b>
<b>7231 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>1914</b>	<b>1389</b>
<b>7232 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>1489</b>	<b>1388</b>
<b>7233 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>4322</b>	<b>1000</b>
<b>7234 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>4323</b>	<b>39</b>
<b>7235 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>908</b>	<b>1180</b>
<b>7236 (1)</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>65</b>	<b>118</b>

R: resistente; S: sensible; SD: sensibilidad disminuida.

Los ST de nueva descripción figuran en **negrita**.

<sup>a</sup> Resultados interpretados según criterios del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

una CMI  $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ <sup>17</sup>. El *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), en el estudio de vigilancia de la sensibilidad del gonococo (*European gonococcal antimicrobial surveillance, Euro-GASP*), reportó que en 2010 el 9% del total de las cepas de NG presentaba sensibilidad disminuida a cefixima (CMI  $> 0,125 \mu\text{g/ml}$ ), y que este porcentaje se elevaba al 16% en las cepas procedentes de España<sup>16</sup>. Actualmente las guías terapéuticas de Estados Unidos y del Reino Unido recomiendan cefixima 400 mg como alternativa solo cuando ceftriaxona no es una opción de tratamiento.

Este estudio incluye la primera cepa en España con resistencia de alto nivel a las cefalosporinas<sup>9,10</sup>, detectada en mayo del 2011, y que es uno de los primeros casos a escala mundial. La primera se aisló en Japón en 2011 de un frotis faríngeo de una paciente asintomática<sup>17</sup>, y la segunda y tercera en Francia<sup>18</sup> y Austria<sup>19</sup>, respectivamente, del exudado uretral de 2 varones que hacían sexo con varones, y la cuarta y quinta en España en mayo de 2011 del tracto anal y uretral, respectivamente, en 2 varones relacionados sexualmente<sup>9,10</sup>.

En este estudio se observa un aumento de la CMI<sub>50</sub> y de la CMI<sub>90</sub> a cefixima y ceftriaxona, con respecto a lo publicado en años anteriores, que era de 0,008 y 0,03 mg/l para cefixima y de 0,002 y 0,008 para ceftriaxona<sup>20</sup>. Ello tiene consecuencias ya que, aunque hasta ahora el tratamiento empírico de primera elección de la gonococia no complicada es ceftriaxona 250 mg, algunas guías, como la del Reino Unido<sup>8</sup>, empiezan a recomendar aumentar la dosis hasta 500 mg debido precisamente a los incrementos de las CMI y a la aparición de cepas con sensibilidad disminuida frente a estos antibióticos.

La azitromicina, cuando empezó a usarse, se consideraba la panacea para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual de etiología bacteriana, ya que presentaba una buena penetración en tejidos, una vida media larga y se administraba por vía oral. Probablemente debido al uso generalizado de la azitromicina para tratar infecciones respiratorias e infecciones de transmisión sexual por *Ch. trachomatis*, se ha desarrollado resistencia a este antimicrobiano. En este estudio se detectaron un 3% de cepas resistentes, aunque ninguna de ellas presentó resistencia de alto nivel (CMI  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ). Esto representa un aumento respecto a años anteriores, ya que en el estudio realizado por este grupo durante el periodo 2007-2010 solo se aisló una cepa resistente a este antibiótico en nuestro medio (póster presentado en el XV Congreso de la SEIMC 2011 «*Neisseria gonorrhoeae*: resistencia antimicrobiana durante 2007-2010. ¿Qué nos depara el futuro?»). Una cuarta cepa presentó una CMI de  $0,5 \mu\text{g/ml}$ , lo que según EUCAST puede considerarse con sensibilidad disminuida. En este sentido, para azitromicina no están claros los puntos de corte a utilizar. EUCAST define resistente cuando la CMI es  $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ , dejando a las cepas de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  en un limbo interpretable como de sensibilidad disminuida, aunque no las defina como tales. Sin embargo, el Euro-GASP define resistentes a azitromicina a las cepas con CMI  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ . En el estudio realizado por esta red en el año 2010<sup>16</sup>, la resistencia a azitromicina fue del 7%, con oscilaciones que iban del 30% en Eslovaquia al 0% en Francia, Chipre, Hungría, Malta y Reino Unido. La azitromicina actualmente no se recomienda como tratamiento único para la gonococia, pero sí en tratamiento combinado, no solo porque trata las coinfecciones de NG *Ch. trachomatis*, sino porque in vitro se ha evidenciado sinergia entre azitromicina



y cefalosporinas y porque mejora la erradicación de la gonorrea faríngea<sup>6</sup>. La azitromicina constituye una alternativa para el tratamiento de las infecciones gonocócicas no complicadas en pacientes con alergia documentada a penicilinas o cefalosporinas.

Es extremadamente importante detectar los cambios poblacionales de NG y así poder controlar y prevenir su diseminación. Debido a la gran diversidad genética de este microorganismo, se han desarrollado una gran variedad de métodos para su estudio, siendo los métodos genotípicos los de elección debido a su poder de discriminación y a su reproducibilidad y objetividad. Uno de los más utilizados actualmente es el denominado NG-MAST, el cual permite comparar los clones circulantes entre diferentes ciudades o países, a diferencia de las comparaciones de perfiles de macrorestricción obtenidos por electroforesis in campo pulsado que son útiles para hacer comparaciones epidemiológicas locales. En este estudio se demuestra que nuestra población de gonococos es similar a la que circula en el resto de Europa, ya que el ST1407 es el más prevalente aquí y en el resto del continente. Es de destacar que entre los 45 aislamientos estudiados, 4 pertenecieron al ST de nueva descripción ST7223, de manera que se podría pensar que es un nuevo clon que podría constituirse en emergente en nuestro país.

Por otro lado, se necesita seguir investigando si determinados ST están relacionados con fenotipos de resistencia específicos, utilizando un mayor número de aislamientos que sean fenotípicamente, genéticamente, geográficamente y temporalmente diversos<sup>1</sup>. En este estudio, el aislamiento con resistencia de alto nivel, los 3 con sensibilidad disminuida a ceftriaxona y 6 de los 10 con sensibilidad disminuida a cefixima pertenecen al ST1407, al que también pertenecen la cepa con resistencia de alto nivel a ceftriaxona aislada en Francia<sup>18</sup>, y la aislada en Austria<sup>19</sup>; mientras que la cepa resistente aislada en Japón pertenece al ST4220<sup>17</sup>. Otro aspecto interesante de la caracterización poblacional de las cepas estudiadas es la detección de 2 cepas pertenecientes a 2 nuevos ST (ST7226 y ST7227), las cuales poseen una sensibilidad disminuida a ceftriaxona. Estos 2 ST comparten con el ST1407 el alelo del gen *thpB* (alelo 110) y únicamente se diferencian en el alelo del gen *porB* (alelos 4321 y 4324, respectivamente). Estos 2 alelos *porB* de los ST7226 y ST7227 difieren, respectivamente, en 3 cambios nucleotídicos con el alelo del ST1407 (datos no mostrados). Este hecho sugiere que los ST7226 y ST7227 habrían surgido a partir del ST epidémico ST1407 con el cual comparten además los niveles bajos de sensibilidad a cefalosporinas. Estos ST, por tanto, podrían poseer una elevada capacidad de diseminación y un alto potencial de selección de resistencia a cefalosporinas, como ocurre con el ST1407, que debería ser tenido en cuenta en los futuros estudios de vigilancia epidemiológica.

La limitación principal del estudio es que todas las cepas procedieron del área de Barcelona y, por tanto, las conclusiones son representativas de este territorio. En contraposición hay que resaltar que es una muestra importante numéricamente difícil de disponer actualmente, entre otras razones porque desde la introducción del diagnóstico de la gonococia por PCR muchos laboratorios utilizan exclusivamente esta técnica.

En este sentido, habría que plantearse en qué situaciones es necesario el cultivo de NG o solamente su detección por PCR. Una actuación coste-beneficio equilibrada sería practicar exclusivamente la PCR en los pacientes asintomáticos en los que se realiza cribado (revisiones en colectivos de riesgo, estudios poblacionales, etc.), ya que si fuera positiva se les podría tomar muestra para cultivo y así estudiar su sensibilidad antimicrobiana. En cambio, a

los pacientes sintomáticos o a los contactos de pacientes diagnosticados de gonococia se les practicaría PCR y cultivo, ya que son tributarios de tratamiento empírico in situ.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Unemo M, Shafer WM. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1230:E19-28.
- Unemo M, Dillon JA. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:447-58.
- Department of Health and Human Services CDCaP. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2007. Atlanta, Georgia; 2008. p. 17-31.
- Department of Health and Human Services CDCaP. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2009. Atlanta, Georgia; 2010. p. 17-31.
- Health Protection Agency Centre for Infections ESOSTI Sexually Transmitted Infections Surveillance in Europe, Annual Report No. 3 2008. London [consultado 30 Sep 2012]. Disponible en: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_projects/2004/action2/docs/2004\\_2\\_08\\_a1\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_projects/2004/action2/docs/2004_2_08_a1_en.pdf)
- Epidemiología Cnd Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 1995-2009. Madrid, 2011 [consultado 25 Sep 2012]. Disponible en: <http://www.mssi.gob.es/ciudadanos/en/lesiones/en/Transmisibles/sida/vigilancia/VigilanciaITS1995-2009.pdf>
- Health Protection Agency TGRASP GRASP 2010 Report. London 2011 [consultado 30 Sep 2012]. Disponible en: <http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAwebContent/1316016752917>
- Bignell C, FitzGerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS*. 2011;22:541-7.
- Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1858-60.
- Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Hommar E, Bastida MT. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:218-9.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Twenty-First Informational Supplement, 31: 92-94 [consultado 15 Mar 2012]. Disponible en: <http://www.rsu.ac.th/medtech/files/CLSI%202011.pdf>
- EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 2.0: p. 50-53 [consultado 15 Mar 2012]. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_2.0\\_120211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120211.pdf)
- 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;189:1497-505.
- Kidd S, Kirkcaldy R, Ye T, Papp J, Trees D, Shapiro SJ. Cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* public health response plan. Division of STD Prevention; National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention; Centers for Disease Control and Prevention; 2012.
- Tapsall J, Read P, Carmody C, Bourne C, Ray S, Limnios A, et al. Two cases of failed ceftriaxone treatment in pharyngeal gonorrhoea verified by molecular microbiological methods. *J Med Microbiol*. 2009;58:683-7.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Response plan to control and manage the threat of multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. Stockholm: ECDC; 2012.
- Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. 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;55:3538-45.
- Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Galloway A, Sednaoui P, et al. 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;56:1273-80.
- 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 pii: 19998.
- Courvalin P, Leclercq R, Rice L. *Antibiogramme*. 2<sup>a</sup> ed. Paris: ESKA; 2006. p. 429-35.

## **Annex I: Articles no inclosos en la tesi**

**Infecció por *Neisseria gonorrhoeae*: posada a punt.**

**Serra-Pladevall J, Domingo AA. (Editorial)**





## Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

*Neisseria gonorrhoeae* infection: State of the art

Infección por *Neisseria gonorrhoeae*: Puesta a punto

Judit Serra-Pladevall<sup>a,b,\*</sup>, Antònia Andreu Domingo<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2015

Accepted 27 November 2015

Gonorrhea, a condition on the rise with high associated morbidity and the possibility of sequelae, has become a major public health problem worldwide with considerable socio-economic consequences. In 2012 in Europe, 50,341 new cases of gonorrhea were reported, with an increase of 58% since 2008.<sup>1</sup> Accordingly, the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) has coordinated the enhanced surveillance of sexually transmitted infections (ESSTI). And as part of this project, the European gonococcal antimicrobial surveillance program (Euro-GASP) was established in 2004.

Over the past several years, *Neisseria gonorrhoeae* has developed resistance to all the antimicrobials used in its treatment. First, it became resistant to sulfonamides, followed by penicillin, tetracycline and ciprofloxacin. Currently, the extended-spectrum cephalosporins (ESC), ceftriaxone (intramuscular) and cefixime (oral), are the only available first-line monotherapy options for gonorrhea in most settings. However, during the last decade, susceptibility to these antibiotics has decreased and clinical treatment failure has been reported, starting in 2000 in Japan and spreading worldwide in subsequent years.<sup>2–6</sup> Even though, high values of MIC for these antibiotics are not always related to treatment failure, being this one of the reasons for which there is not a consensus about clinical breakpoints for *N. gonorrhoeae*.

Today, the majority of European<sup>7</sup> guidelines recommend ceftriaxone 500 mg intramuscularly in combination with azithromycin 1 g single oral dose as first-line treatment for all uncomplicated gonorrhea cases. The dual treatment aims to mitigate against the selection of gonococci with reduced susceptibility to cephalosporins. It is important to clarify that there is no

evidence for antimicrobial synergy between ceftriaxone and either azithromycin or doxycycline. The main reason for recommending dual therapy is the difficulty for *N. gonorrhoeae*, as well as for other bacteria, to develop simultaneous resistance to two different antimicrobial classes, meaning that dual treatment creates a pharmacological barrier to the emergence of isolates exhibiting resistance to one component of the recommended therapy.

In 2013, the Euro-GASP<sup>1</sup> reported decreased susceptibility (DS) (>0.125 mg/L) to cefixime in 4.7% of isolates in Europe, a value found to be much higher among the strains received from Spain (15.1%). Moreover, of the 7 isolates showing decreased susceptibility to ceftriaxone (>0.125 mg/L), 6 were from Spain. This represents an increase compared to 2012 data, when the rate of decreased susceptibility to cefixime was 3.9% and only 3 isolates showed DS to ceftriaxone.

More alarming was the detection of the first three extremely-drug resistant (XDR) gonococcal isolates, in Japan<sup>3</sup> in 2009, France<sup>5</sup> in 2010 and Spain<sup>8,9</sup> in 2011. Fortunately since then no other strains have been isolated with high-level resistance to ceftriaxone.

*N. gonorrhoeae* has used all the known mechanisms to develop resistance, and those that affect cephalosporins are alteration of its main target, PBP2, through acquisition of *penA* mosaic alleles and non-mosaic *penA* alleles mutations; alteration of PBP1 through mutations in *ponA* gene; over expression of efflux pump MtrC-D-E though alterations in its repressor; and point mutations in *penB* which codes the major outer membrane porin, PorB1b.

In the study published by Cobo et al.<sup>10</sup> in this edition, the authors determined antimicrobial susceptibility of 65 gonococcus isolated from January 2012 to October 2014. Based on CLSI clinical breakpoints, they detected one isolate resistant to ceftriaxone and cefixime, but according to EUCAST breakpoints, they found 4 isolates resistant to cefixime (6.1%) and 3 isolates to ceftriaxone (4.6%). These results highlight the lack of consensus in this field.

\* Corresponding author.

E-mail address: jserrapladevall@gmail.com (J. Serra-Pladevall).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.001>

0213-005X/© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.



# Annex I: Articles no inclosos en la tesi

2

J. Serra-Pladevall, AA. Domingo / *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;**34**(1):1–2

Also, 64.6% of the gonococcus was resistant to ciprofloxacin and 60–70% to tetracycline. No isolate was resistant to spectinomycin. These results are similar to those published by Serra-Pladevall et al. in 2011,<sup>11</sup> in which among 100 strains, they found 4% with decreased susceptibility to ceftriaxone and 11% to cefixime according to EUCAST breakpoints, but according CLSI breakpoints no strain showed decreased susceptibility to cefixime and only three to ceftriaxone.

Spectinomycin does not seem a good option for empirical first-line treatment because the difficulties in acquiring this antibiotic in most countries, the fear of rapidly selected resistance and its reduced effectiveness at clearing pharyngeal infections. If in the future *N. gonorrhoeae* continues to decrease susceptibility to ESCs, we can face an era of untreatable gonorrhea.

Detection of local sexual networks can help to target interventions toward places and population groups that are at high risk for STI acquisition. However, interventions in *N. gonorrhoeae* transmission networks are difficult, in part due to the high number of anonymous sexual contacts and/or reluctance to reveal sexual partners.<sup>12</sup> Molecular epidemiology techniques, as NG-MAST and MLST, have been used over time to study outbreaks and to identify individuals within the same sexual network. Molecular typing combined with epidemiological data can provide better insight into *N. gonorrhoeae* transmission patterns, which can help to improve intervention strategies.<sup>13</sup>

As described in the study by Cobo et al.,<sup>10</sup> the most frequent sequence types were ST1407 followed by ST5405, ST7192, ST2992 and ST5120. Although the STs distribution varies in each country and in each area, according Chisholm et al. in 2010,<sup>14</sup> G-1407 was the most prevalent genogroup (23%) among *N. gonorrhoeae* strains isolated in the 21 European countries. The NG-MAST clone ST1407, together with the MLST clone ST7363, were responsible for all confirmed cases of therapeutic failure with cefixime, and 3 of the 5 cases of failure with ceftriaxone. These two clones are the most widespread and they have demonstrated a considerable capacity to develop high-level resistance to cefixime and ceftriaxone.<sup>15</sup> As described by Chisholm et al., ST2992 was the second most prevalent ST in Europe and in Spain, and it was statistically associated with men who have sex with men (MSM).

Due to this alarming situation, it is crucial to keep monitoring *N. gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility, to examine all gonococcal strains causing treatment failure or showing *in vitro* high-levels of ESC resistance, to identify its resistance determinants and establish appropriate MIC breakpoints for ESC resistance (together with

pharmacokinetic/pharmacodynamic simulations). Also it is essential to continue to update the treatment guidelines and keep the healthcare professionals aware of the current situation.

## References

1. EUROASP\_gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-europe-2013.pdf.
2. Ison CA, Hussey J, Sankar KN, Evans J, Alexander S. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Euro Surveill*. 2011;16:7.
3. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Netisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:3538–45.
4. Unemo M, Golparian D, Hestner A. Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden, July 2010. *Euro Surveill*. 2011;16:11.
5. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Galloway A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Netisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1273–80.
6. Unemo M, Golparian D, Stary A, Eigentler A. First *Netisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Euro Surveill*. 2011;16:19998.
7. Fifer H, Hughes G, Radcliffe K. Gonorrhoea treatment position statement. *Sex Transm Infect*. 2015;91:307.
8. Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT. Gonococcus Antimicrobial Resistance Surveillance Working Group. First cases of *Netisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:218–9.
9. Camara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Netisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1858–60.
10. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Cabeza-Barrera MI. Antimicrobial susceptibility and typing of *Netisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012–2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:3–7.
11. Serra-Pladevall J, Barberà-Gracia MJ, Roig-Carbajosa G, Juvé-Saumell R, González-López JJ, Bartolomé-Comas R, et al. *Netisseria gonorrhoeae*: resistencias antimicrobianas y estudio de la dinámica poblacional. Situación en 2011 en Barcelona. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:579–83.
12. Heymans R, Schouls LM, van der Heide HGJ, Schim van der Loeff MF, Bruisten SM. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Netisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*. 2011;49:354–63.
13. Heymans RA, Matser A, Bruisten SM, Heijman T, Geskus RB, Spelksnijder AGCL, et al. Distinct *Netisseria gonorrhoeae* transmission networks among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands. *J Infect Dis*. 2012;206:596–605.
14. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2013;18.
15. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol*. 2012;7:1401–22.



# **Annex II**

Pòsters i comunicacions en congressos

## Annex II: Pòsters i comunicacions en congressos

- ✓ **Serra-Pladevall J**, Caballero E, Roig G, Juve R, Marbara MJ, Andreu A.

Estudio comparativo del rendimiento diagnóstico de la PCR frente al cultivo convencional en la infección gonocócica.

XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). València 2014. **Comunicació oral.**

- ✓ **Serra-Pladevall J**, Roig G, Juve R, Gonzalez JJ, Bartolome R, Andreu A.

Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* population.

24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)", Barcelona 2014. **Presentadora pòster.**

- ✓ **Serra-Pladevall J**, Callarisa A, Roig G, Juve R, Bartolome R, Arando M, Barbera MJ, Andreu A.

Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae*, 2013. What does the future hold?

XXVIII International Union Against Sexually Transmitted Infections Congress Europe. Malta 2014. **Comunicació oral.**

- ✓ **Serra-Pladevall J**, Barbera MJ, Roig G, Bartolomé R, Juvé R, Andreu A.

Estado actual y evolución de la sensibilidad antimicrobiana de 785 cepas de *Neisseria gonorrhoeae*. ¿Hacia dónde vamos?

XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sevilla 2015. **Presentadora pòster.**

## Annex II: Pòsters i comunicacions en congressos

- ✓ **Serra-Pladevall J**, Callarisa AE, Oliveira I, Barbera MJ, Andreu A.

*Neisseria gonorrhoeae* dynamics population. Which is the role of sexual networks?

25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID).  
Copenhagen 2015. **Comunicació oral.**

- ✓ **Serra-Pladevall J**, Rodriguez S, Armengol P, Barbera MJ, Andreu A.

Genetic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to cephalosporins.

XXIX International Union Against Sexually Transmitted Infections Congress Europe", Sitges 2015. **Comunicació oral.**

- ✓ **Serra-Pladevall J.**

Antimicrobial resistant gonorrhoea in Spain, Symposium: Resistance and typing of STI pathogens.

XXIX International Union Against Sexually Transmitted Infections Congress Europe", Sitges 2015. **Ponent.**

- ✓ **Serra-Pladevall J**, Vila N, Barberà MJ, Locutura M, Andreu A.

¿Está aumentando la sensibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* a las cefalosporinas de espectro extendido?

XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Barcelona 2016. **Presentadora pòster.**

## Annex II: Pòsters i comunicacions en congressos

- ✓ B. Romero-Hernández, J. Serra-Pladevall, N. Larrosa, C. Pigrau, M. Locutura, A. Andreu.

Fosfomicin: *in vitro* activity of a novel antimicrobial for potential future treatment of gonorrhoea.

26th European. Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Amsterdam 2016. **Col·laboradora pòster.**