

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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>



RESISTENCIA A AZITROMICINA EN MYCOPLASMA
GENITALIUM Y NEISSERIA GONORRHOEAE EN BARCELONA

Judith Lucena Nemirosky

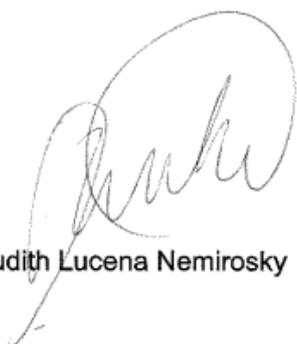
Directora: Nuria Prim

Director y Tutor :Ferran Sánchez Reus

BARCELONA 2022

SERVEI DE MICROBIOLOGIA, HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU. DEPARTAMENT DE GENÈTICA I
MICROBIOLOGIA, UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA.

Resistencia a azitromicina en *Mycoplasma genitalium* y *Neisseria gonorrhoeae*
en Barcelona



Judith Lucena Nemirosky



Dra. Núria Prim

FERNANDO
SANCHEZ REUS -
DNI 37682687Q

Firmado digitalmente por
FERNANDO SANCHEZ
REUS - DNI 37682687Q
Fecha: 2022.12.22
10:19:12 +01'00'

Dr. Ferran Sánchez-Reus

Agradecimientos

Esta tesis está especialmente dedicada a mi madre, mis abuelos, mis hijos y mi nieta Sofia.

Mi familia ha sido el motor para seguir adelante ante cualquier adversidad y estoy profundamente agradecida por la confianza que han depositado en mí. Mi madre y mis abuelos fueron los primeros en apoyarme a la hora de escoger el camino de la profesión a la que me dedico, apostaron por ello y me ayudaron a lograr mis sueños. Por todo ello, gracias.

En especial quiero agradecer a mis hijos Agustina y Aleix, mis amores y compañeros, quienes han tolerado con gran entereza mis horas de estudio y concentración, mis nervios y frustraciones. Me han ayudado, me han cuidado y siempre, sin dudarlo, han creído en mí.

Sofía, sos la luz y la alegría de nuestro hogar, te agradezco tu paciencia, tus mimos, tu silencio en las horas de estudio. Saber que quieres ser microbióloga me llena de orgullo. Espero que juntitas de la mano, recorramos ese camino. Te quiero.

Gracias David Lluch por estar siempre dispuesto a ayudarme, por tu apoyo constante y compañía. Gracias por estar conmigo en los momentos buenos y en los momentos malos. Por ser paciente, amable y generoso.

Realizar esta tesis hubiera sido imposible si no hubiera contado con la compañía e inestimable ayuda de mi amiga y directora de tesis Nuria Prim, que no solo es una gran persona, sino una excelente profesional y comunicadora. Nuria sabe transmitir el amor que siente por la ciencia y te contagia con su entusiasmo. Te admiro Nuri

y espero poder seguir aprendiendo mucho mas de vos. Tu dedicación y sacrificio para ayudar a otras personas a sacar adelante sus proyectos me conmueve. Gracias Nuria.

A mi tutor de tesis, Ferrán Sánchez Reus le agradezco profundamente sus consejos. Espero poder seguir compartiendo proyectos y aprendiendo de todo aquello que transmites con tanta coherencia y amabilidad.

Gracias Marc Rubio, sos un torbellino de trabajo, de conocimientos indescifrables y muy buen compañero. Me ayudaste muchísimo y estoy muy agradecida Marc.

También quiero agradecer a Alba Rivera Martinez, Elisenda Miró y Ferrán Navarro, por aceptarme unos días en vuestro lugar de trabajo, transmitir la mejor de las energías y animarme a seguir adelante.

Un apartado especial lo merece Ignasi Gich por su buena predisposición y ayuda.

A los médicos de cabecera, ginecólogos/as, comadronas y enfermeras del CAP Sabadell Especialistas y Cerdanyola Especialistas les dedico parte de esta tesis. Este grupo multidisciplinar me acogió desde el primer momento y colaboraron muchísimo para llevar adelante este proyecto. Muchas gracias a todos ellos.

Gracias al personal de Catlab, en especial a Liboria López Yeste y Conchita Berrar por su amabilidad y colaboración.

Por último, a mis compañeros Raquel Clivillé, Sabina González, Iolanda Calvet y Miguel Ángel Benítez por ser comprensivos y por animarme en la etapa final de la realización de la tesis.

Gracias a todos aquellos que he olvidado mencionar aquí pero que me animaron a seguir adelante.

A las niñas y los niños que sueñan con ser científicos.

Glosario

AMR: *Antimicrobial resistance*

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

tRNA: Ácido ribonucleico de transferencia

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ATG Codón de inicio

AZT: Azitromicina

BASHH: *British association for Sexual Health and HIV*

BLAST: *Basic local alignment search tool nucleotide*

C4BP: Proteína de unión a C4b

CAP: Centro de atención primaria

CEACAM: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario

CDC: *Centers for disease control and prevention*

CEE: Cefalosporinas de espectro extendido

ChemSex: Uso de drogas para mejorar las experiencias sexuales

CG: Core genome

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CR3: Receptor del complemento

CO₂: Dióxido de carbono

CTX: Ceftriaxona

DHFR: Dihidrofolato reductasa

DHPS: Dihidropteroato sintetasa

EIP: Enfermedad inflamatoria pélvica

ECDC: *European Centers for disease Prevention and Control*

ECOFF: *Epidemiological cut-offs*

EUCAST: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Euro-GASP: *European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program*

Fc: Fracción constante

GASP: *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program*

G: Genogrupo

GC: Guanina + citocina

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa

GGI: *Gonococcal Genetic Island*

HGT: *Horizontal gene transfer*

HSH: Hombres que mantienen sexo con hombres

HSM: Hombres que mantienen sexo con mujeres

IBP: Proteínas de unión a las inmunoglobulinas

IC: Intervalo de confianza

IM: Intramuscular

IL: Interleuquina

ITS: Infección de transmisión sexual

IUSTI: *International Union against Sexually Transmitted Infections*

IV: Intravenoso

LHR. Receptor de la hormona luteína / hormona HCG

LOS: Lipooligosacáridos

MALDI TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight*

MEGA: *Molecular evolutionary Genetic Analysis*

MD: Monodosis

MIB-PIB: Complejo antiglobulina

MDR: *Multidrug- resistance*

MLST: *Multilocus sequence typing*

MtrCDE: *gonococcal multiple transferable resistance efflux pump exports*

TAAN: Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

NG-MAST: *Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing*

NG-STAR: *N. gonorrhoeae sequence typing for antimicrobial resistance*

OMS: Organización mundial de la salud

OMVS: Vesículas de membrana externa

OPA: proteínas de la opacidad

ORF: *open reading frame*

OT: Orgánulo terminal

PBP: Proteínas de unión a penicilina

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PEN: Penicilina

PH: Potencial hidrógeno

PMN: Polimorfonuclear

PORB1A: Porina B1A

PORB1B: Porina B1B

PREP: Profilaxis pre-exposición

QRDR: Regiones determinantes de resistencia a quinolonas

RMP: Proteína modificable por reducción

SEIMC: Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica

ST: Secuenciotipo

T4SS: Sistema de secreción Tipo IV

TAAN: Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

TNF: Factor de necrosis tumoral

TOC: *Test of cure*

UNG: Uretritis no gonocócica

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

WGS: *Whole genome sequencing*

WHO: *World health organization*

WT: *Wild type*

XDR: *Extensively drug resistan*

Glosario.	7
1. Introducción.	15
1.1. Las infecciones de transmisión sexual.	15
1.1.1. Características generales de los micoplasmas.	16
1.2. <i>Mycoplasma genitalium</i> como agente de infección sexual.	19
1.2.1. Patogénesis de las infecciones por <i>M. genitalium</i> .	19
1.2.2. Características clínicas de la infección por <i>M. genitalium</i> .	23
1.2.3. Diagnóstico microbiológico de la infección por <i>M. genitalium</i> .	25
1.2.4. Infección por <i>M. genitalium</i> y tratamiento antibiótico dirigido.	26
1.2.5. Resistencia antibiótica adquirida en <i>M. genitalium</i> .	27
1.2.6. La infección por <i>M. genitalium</i> en nuestro entorno.	28
1.3. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . Su papel en la historia de la humanidad.	31
1.3.1. Características generales de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	31
1.3.2. Patogénesis de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	32
1.3.2.1. Estructuras en la superficie de <i>N. gonorrhoeae</i> .	33
1.3.2.2. Adhesión y colonización.	35
1.3.2.3. Invasión, daño tisular y evasión del sistema inmune.	36
1.3.2.4. Intercambio de material genético.	37
1.3.3. Cuadros clínicos asociados a la infección por <i>N. gonorrhoeae</i> .	39
1.3.3.1. Uretritis.	39
1.3.3.2. Cervicitis.	40
1.3.3.3. Infección ano-rectal.	40
1.3.3.4. Infección orofaríngea.	41
1.3.3.5. Conjuntivitis.	41
1.3.3.6. Complicaciones sistémicas.	41
1.3.3.7. Infección gonocócica en niños.	42
1.3.3.8. Infección gonocócica en neonatos.	42
1.4. El diagnóstico microbiológico.	42
1.4.1. Diagnóstico microbiológico convencional.	43
1.4.2. Nuevas metodologías.	45
Identificación mediante espectrometría de masas.	45
Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN).	45

Análisis del gen ADNr 16S.	46
<i>Whole genome sequencing</i> .	47
1.4.3. Técnicas de epidemiología molecular.	47
<i>Multilocus sequence typing (MLST)</i> .	47
<i>Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing</i> .	47
<i>N. gonorrhoeae sequence typing for antimicrobial resistance</i> .	48
1.5. Tratamiento antibacteriano.	48
1.5.1. Conjuntivitis gonocócica en adultos.	49
1.5.2. Infección diseminada gonocócica.	51
1.5.3. Tratamiento de la infección gonocócica en la infancia.	51
<i>Ophthalmia neonatorum</i> .	51
Infección diseminada.	51
Vulvovaginitis, cervicitis, uretritis, faringitis, o proctitis en niños.	51
1.6. Evolución de la resistencia a los antimicrobianos en <i>N. gonorrhoeae</i> .	52
1.7. Mecanismos moleculares de resistencia.	54
1.7.1. Resistencia a macrólidos.	54
1.7.2. Resistencia a Betalactámicos.	55
1.7.3. Resistencia a quinolonas.	57
2. Hipótesis y Objetivos.	59
3. Materiales y métodos.	62
3.1. Tipo y período de estudio.	62
3.2. Métodos microbiológicos para el diagnóstico etiológico.	63
3.2.1. Cultivo de las muestras	63
3.3. Detección molecular a partir de muestra directa.	63
3.3.1. Detección molecular de agentes de ITS.	63
3.3.2. Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a macrólidos.	64
3.4. Encuesta.	64
3.5. Análisis estadístico.	64
3.6. Muestras y criterios de inclusión.	65
3.6.1. Diseño experimental y periodo de estudio.	65
3.7. Métodos microbiológicos para el estudio etiológico.	65
3.7.1. Estudio microbiológico convencional.	66

3.8. Caracterización molecular de los aislados.	66
3.8.1. Extracción de ácidos nucleicos.	67
3.8.2. <i>Whole genome sequencing</i> (WGS).	68
3.8.3. <i>De novo assembly</i> .	68
3.8.4. <i>Map to reference</i> .	68
3.9. Epidemiología molecular.	69
3.9.1. MLST.	69
3.9.2. NG-MAST.	69
3.9.3. NG-STAR.	69
3.9.4. Análisis filogenético.	70
3.9.5. Caracterización de determinantes de resistencia.	70
3.9.6. Estudio de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a macrólidos en el gen 23S rRNA.	70
3.9.7. Estudio de mutaciones en genes asociados a la resistencia.	72
4. Resultados.	75
4.1. Análisis de la infección de <i>Mycoplasma genitalium</i> en el Vallés Occidental (2011-2017).	75
4.2. Análisis epidemiológico y clínico de la cohorte de casos con infección por <i>M. genitalium</i> (2014-2015).	75
4.3. Consejo terapéutico y seguimiento de los pacientes con infección por <i>M. genitalium</i> en la cohorte (2014-2015).	79
4.4. Análisis de la resistencia a macrólidos en <i>M. genitalium</i> .	81
4.5. Análisis de la infección por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	84
4.6. Epidemiología molecular.	85
4.7. Determinantes moleculares de resistencia a macrólidos.	91
4.7.1. Gen 23S rRNA.	91
4.7.2. Proteínas ribosomales L4 y L22 (<i>rpID-rpIV</i>).	91
4.7.3. Gen <i>mtrR</i> .	93
4.7.4. Promotor <i>mtrR</i> .	94
4.7.5. Promotor de la bomba de expulsión activa MacAB.	96
4.7.6. Genes <i>erm A/B/C/F</i> y genes <i>mef A/B</i> .	96
4.8. Determinantes de resistencia a quinolonas.	98
4.8.1. <i>gyrA</i> .	98

4.8.2. <i>parC</i> .	98
4.9. Determinantes de resistencia betalactámicos.	100
4.9.1. PBP2 (<i>penA</i>).	100
4.9.2. PBP1 (<i>ponA</i>).	100
4.9.3. Porina PorB.	101
4.9.4. Betalactamasas adquiridas.	101
5. Discusión.	103
5.1. <i>Mycoplasma genitalium</i> .	103
5.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	110
5.2.1. Sensibilidad a los antibióticos en <i>N. gonorrhoeae</i> .	110
5.2.2. Epidemiología <i>N. gonorrhoeae</i> resistente a azitromicina.	112
5.2.3. Determinantes de resistencia a antibióticos.	114
6. Conclusiones.	125
7. Bibliografía.	130
Anexo 1: Encuesta.	171
Anexo 2: Artículo original.	173
Anexo 3: Árbol filogenético.	179
Anexo 4: Tabla de SNPs.	180
Índice de Figuras y Tablas	
Figura 1. Determinantes de patogenicidad de <i>M. genitalium</i> .	21
Figura 2. Factores que intervienen en la patogenicidad de <i>N. gonorrhoeae</i> .	34
Figura 3. Crecimiento de colonias de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	44
Figura 4. Tratamientos dirigidos contra <i>M. genitalium</i> .	80
Figura 5 Árbol filogenético.	90
Figura 6. Modelo de la estructura dimérica del represor MtrR.	94
Tabla 1. Principales factores de virulencia de <i>M. genitalium</i> .	22
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>N. gonorrhoeae</i> .	38
Tabla 3. Tratamiento de la infección gonocócica.	50
Tabla 4 Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de los genes de resistencia a macrólidos en <i>M. genitalium</i> .	64
Tabla 5. Cepas WHO.	72
Tabla 6. Genes extraídos de las cepas de referencia.	73

Tabla 7. Características epidemiológicas y clínicas.	77
Tabla 8 Codetecciones de <i>M. genitalium</i> con otros microorganismos ITS.	79
Tabla 9. Características de los pacientes infectados con cepas de <i>M. genitalium</i> que presentaban mutaciones que confieren resistencia a macrólidos.	82
Tabla 10. Sensibilidad antibiótica de los aislados de <i>N. gonorrhoeae</i> .	85
Tabla 11. Análisis de 7 genes conservados y asignación de alelos.	86
Tabla 12. Asignación de NG-MAST.	87
Tabla 13. Análisis de los genes <i>penA</i> , <i>mtrR</i> , <i>porB</i> , <i>ponA</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i> y 23S.	88
Tabla 14. Sensibilidad antibiótica y epidemiología molecular de <i>N. gonorrhoeae</i> .	89
Tabla 15. Sustituciones aminoacídicas en el gen 23S.	92
Tabla 16. ST-MLST y sustituciones aminoacídicas en el gen <i>rpID</i> .	93
Tabla 17. Sustituciones aminoacídicas detectadas en el gen <i>mtrrR</i> .	95
Tabla 18. Determinantes de resistencia a macrólidos.	97
Tabla 19. Determinantes de resistencia a quinolonas.	99
Tabla 20. Análisis de <i>penA</i> .	100
Tabla 21. Sustituciones aminoacídicas detectadas en la porina <i>PorB</i>	101
Tabla 22. Determinantes de resistencia a betalactámicos.	102

1. Introducción.

1.1. Las infecciones de transmisión sexual.

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) constituyen un importante problema de salud pública global que causa graves perjuicios a la sociedad a nivel sanitario, social y económico. Cada día más de un millón de personas contraen una ITS (1). Las ITS pueden ser de etiología viral, parasitaria y bacteriana (2). Las infecciones de origen bacteriano están provocadas mayormente por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum* y *Haemophilus ducreyi* (2,3).

Las ITS se transmiten por contacto sexual (vaginal, anal y oral) y afectan a ambos sexos, en cualquier franja de edad y condición social (2). La mayoría de las ITS son de distribución universal aunque algunas tienen una distribución geográfica restringida. Estas infecciones pueden tener diversas presentaciones clínicas. Aunque algunas se pueden considerar infecciones sistémicas, la mayoría de las ITS cursan principalmente con manifestaciones mucocutáneas, como cuadros exudativos o supurativos, infecciones con vesículas y/o úlceras, y lesiones verrucosas en la piel. Sin embargo, la mayoría cursan de forma asintomática (4, 5). En ocasiones pueden debutar con complicaciones como la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y dejar secuelas como la infertilidad (6).

Algunas infecciones de adquisición sexual pueden posteriormente transmitirse de la madre al feto durante el embarazo, en el momento del parto y durante la lactancia. Estas infecciones de transmisión vertical pueden causar prematuridad, bajo peso al nacer, muerte prenatal y neonatal, sepsis, neumonía, conjuntivitis o anomalías congénitas (2,3,7).

Las ITS aumentan el riesgo de adquisición de otras ITS incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (8). Numerosos estudios demuestran la relación y el incremento del riesgo de adquisición del VIH cuando hay una ITS previa, sea ulcerativa o no ulcerativa (9-14).

La mayoría de las ITS son prevenibles (15,16). El uso de preservativo es eficaz en la prevención para contraer ITS principalmente en aquellas que no presentan úlceras extra-genitales (17). La educación sexual de la población, los diversos

métodos barrera y la vacunación son algunas de las estrategias con las que se intenta mitigar el aumento de las infecciones en todo el mundo. Esta tesis se centra en el estudio de dos de los agentes de transmisión sexual más frecuentes, *Mycoplasma genitalium* y *Neisseria gonorrhoeae*. La emergencia de cepas resistentes a los tratamientos habituales y de cepas multirresistentes (MDR) ha complicado el panorama terapéutico actual (18). Dado el incremento de la resistencia a macrólidos en ambas especies, el presente trabajo se centró en la caracterización de aislados clínicos de *M. genitalium* y *N. gonorrhoeae* con resistencia asociada a esta familia de antibióticos.

1.1.1. Características generales de los micoplasmas.

Los micoplasmas son los procariotas de vida libre más pequeños (0.2 - 0.7 μm) con capacidad de replicación autónoma (19). Pertenecen a la clase *Mollicutes* (del latín, *mollis*- blando; *-cutes* fem. piel) y a la familia *Mycoplasmataceae*, que incluye los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Las micoplasmas se caracterizan por presentar un genoma pequeño (0.6 a 1.35 Mb), con bajo contenido en guanina+citosina (G+C). Estudios moleculares han revelado que estas bacterias derivaron de un ancestro común perteneciente a los *Firmicutes* tras una importante pérdida de genes a lo largo de la evolución (20). Pese a su reducido genoma, conservan la capacidad tanto de replicación y reparación del DNA como de transcripción y de traducción. A pesar de mantener su capacidad de síntesis proteica, las vías metabólicas de los micoplasmas también se vieron reducidas. Por este motivo, adoptaron un estilo de vida parasitario, en el cual obtienen del hospedador aquellos nutrientes que no son capaces de sintetizar (21,22).

Los micoplasmas se caracterizan por la ausencia de pared celular, hecho que los hace resistentes de forma natural a los antibióticos betalactámicos. Los micoplasmas tienen una membrana celular en contacto directo con el entorno, y constituida característicamente por tres capas (con un grosor de 7.5-10nm) (21, 23). A diferencia del resto de procariotas, la membrana contiene esteroides que obtienen del hospedador y que van a contribuir a regular la fluidez de la membrana. (24).

Los micoplasmas se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Presentes en plantas, animales y en humanos, estas bacterias colonizan al hospedador y pueden comportarse como microbiota comensal o como patógenos. Los micoplasmas comensales se hallan en un alto porcentaje de individuos sanos, lo que demuestra que son capaces de ser parásitos exitosos, pasando desapercibidos para su hospedador y evadiendo el sistema inmune (25). En el hospedador humano, los micoplasmas se hallan colonizando la superficie mucosa de la vía respiratoria y el tracto urogenital, también en el tubo digestivo (23). Bajo ciertas circunstancias estos microorganismos comensales pueden volverse patógenos oportunistas y provocar diversos cuadros clínicos (26). Los micoplasmas pueden provocar infecciones agudas, aunque con mayor frecuencia se asocian a enfermedades inflamatorias crónicas.

Las especies habitualmente vinculadas a cuadros patógenos son *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*. Mas controvertido es el papel patógeno de *Ureaplasma urealyticum*, o *Mycoplasma hominis* (27). *M. hominis* fue el primer micoplasma de origen humano aislado. Considerado habitualmente como comensal del tracto genital, se ha asociado a vaginosis bacteriana. Las implicaciones de este microorganismo en la infertilidad femenina han sido discutidas. Algunos autores encontraron una asociación significativa entre *M. hominis* e infertilidad femenina (28, 29). Por otro lado, *U. urealyticum* es un microorganismo exclusivo humano, que se encuentra como comensal en el tracto urogenital (29). *U. urealyticum* se ha detectado en el 5-15% de muestras uretrales de hombres sanos, lo que ha hecho dudar de su papel patógeno en la uretritis no gonocócica (UNG) (30).

Su papel en la prostatitis, epididimitis e infertilidad masculina también ha sido tema de debate por la inconsistencia de los hallazgos (27). También se ha descrito su implicación en la corioamnionitis, siendo el microorganismo que se detecta más frecuentemente en el líquido amniótico (31).

M. pneumoniae es un patógeno exclusivo humano, cuyas manifestaciones clínicas se observan en el tracto respiratorio. Causa principalmente neumonía atípica, aunque también se ha asociado a otras patologías respiratorias tales como asma, bronquitis crónica, y distrés respiratorio agudo. Adicionalmente se han descrito otras manifestaciones extrapulmonares (32).

La patogenia de los micoplasmas está relacionada con la presencia de determinadas proteínas en sus membranas, que participan en la adherencia. La diversidad antigénica y la inactivación del sistema inmune contribuyen a su defensa frente el sistema inmune del hospedador (25). Las lipoproteínas y lipopéptidos presentes en la membrana de los micoplasmas también se unen a los receptores tipo Toll para promover la inflamación. La infección crónica por micoplasmas provoca una respuesta humoral sistémica y principalmente local con aparición de IgG, IgM e IgA (25).

La variabilidad en la superficie antigénica de los micoplasmas facilita la evasión del sistema inmune (33). Son diversos los mecanismos que contribuyen a su capacidad para modificar la composición de su superficie. Por un lado, los micoplasmas pueden alterar la expresión de los diferentes *loci* que codifican sus lipoproteínas mediante mecanismos diversos que incluyen recombinaciones y desplazamientos de cadena. Esto conduce a la activación o desactivación de la expresión de genes, a variaciones en el tamaño de la proteína expresada y a la combinación de dominios proteicos (25). También pueden producirse escisiones postraduccionales que contribuyen a su diversidad antigénica.

Por otro lado, los micoplasmas son los únicos microorganismos con una aminoacil tRNA sintetasa defectuosa que permite la acilación de un aminoácido incorrecto en el tRNA. Esto conduce a errores de traducción y por lo tanto contribuye a la diversidad de su proteoma. Adicionalmente se ha descrito el tráfico incorrecto de proteínas citoplasmáticas hacia la superficie bacteriana, que también contribuye a la variabilidad antigénica en algunas especies. Estas proteínas citoplasmáticas incorrectamente externalizadas son capaces de actuar como adhesinas al interactuar con los receptores de las células hospedadoras y con los componentes de la matriz extracelular (25).

Los micoplasmas son capaces de inactivar parcialmente las funciones del sistema inmune. Esto lo hacen mediante proteasas, proteínas de unión a inmunoglobulinas y complejos antiglobulina (25,33). Las proteasas se unen a la región bisagra de los anticuerpos actuando sobre el dominio Fc e impidiendo su acción de reclutamiento del complemento y de opsonización. Las proteínas de unión a las inmunoglobulinas (IBP) hidrolizan los anticuerpos impidiendo su reconocimiento por otras proteínas y bloqueando la función mediada por anticuerpos. Los micoplasmas también tienen

un complejo antiglobulina MIB-PIB formado por una IBP y una proteasa que actúan uniéndose a los anticuerpos y escindiendo la cadena pesada de éste, lo que impide la acción de unión al antígeno. El complejo antiglobulina MIB-PIB se encuentra en la mayoría de los micoplasmas que afectan a humanos y actúa impidiendo la formación de inmunocomplejos (25).

1.2. *Mycoplasma genitalium* como agente de infección sexual.

Mycoplasma genitalium es un patógeno emergente que se halla en la mucosa urogenital. Se aisló por primera vez en 1981 a partir de exudados uretrales de pacientes con uretritis en el Reino Unido (21). Esta bacteria estuvo asociada a uretritis no gonocócica desde su descripción, pero también se le relacionó con otros cuadros clínicos del aparato urogenital masculino y femenino (21). Con un contenido de G+C del 32%, el genoma (580 Kb) de *M. genitalium* codifica 517 genes y es el más pequeño dentro de la familia *Mycoplasmataceae* (34,35). *M. genitalium* se caracteriza por su capacidad de metabolizar la glucosa, pero no la urea ni la arginina. Se trata de un microorganismo de crecimiento lento y con requerimientos nutritivos que incluyen los esteroides. Su cultivo es complejo y requiere de varias semanas para su aislamiento (21).

La estructura de *M. genitalium* fue inicialmente estudiada por microscopía electrónica (Figura 1). Gracias a su complejo citoesqueleto, esta bacteria se caracteriza por presentar habitualmente forma de botella o matraz, con un orgánulo terminal (OT) truncado que exhibe una estructura en forma de barra. Esta estructura está formada por varias proteínas que son necesarias para la adherencia y para su motilidad deslizante característica (33, 34).

1.2.1. Patogénesis de las infecciones por *M. genitalium*.

La patogenia de *M. genitalium* es debida a varios factores de virulencia. Los principales son las lipoproteínas que actúan como adhesinas, intervienen en la motilidad por deslizamiento e inducen la respuesta inflamatoria, y la nucleasa que contribuye al daño celular (tabla 1). La variación antigénica, la invasión intracelular, la escisión de inmunoglobulinas y la formación de biopelículas contribuyen a su patogenia al participar en la evasión de la respuesta inmune (36). La adherencia de

M. genitalium a las células de la mucosa urogenital se produce a través del OT u orgánulo de adhesión (37). El citoesqueleto mantiene la forma de este orgánulo que está compuesto por tres estructuras: el botón terminal, el núcleo electrodenso y el complejo – rueda (37). Las principales proteínas implicadas en la adhesión son P140 y P110, P32 y la gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (38). Estas proteínas interactúan directamente con la célula hospedadora. La proteína P140 es una adhesina transmembrana. También conocida como MgPa, esta proteína se encuentra en el orgánulo terminal y es necesaria para la invasión de la célula hospedadora. Cuando se producen mutaciones en esta adhesina, *M. genitalium* pierde la capacidad de adherencia (39). También denominada MgPc, la proteína P110 se encuentra en el orgánulo terminal. Esta adhesina tiene funciones de citoadherencia y contribuye a la estabilización de la adherencia ejercida por P140(39). De hecho, P140 y P110 muestran un efecto estabilizador recíproco. Dado su importante papel, ambas proteínas tienden a sufrir variaciones para evadir el sistema inmune. Cuando una de estas proteínas sufre una mutación y pierde su función, disminuye la expresión de la otra. Estas adhesinas también pueden modular la expresión de otras proteínas (33). La proteína P32 es una adhesina de membrana cuya función es la estabilización de la de las adhesinas principales P140 y P110 (39, 40). La unión a la mucina facilita la colonización e invasión de la célula hospedadora. Se han descrito tres proteínas transmembrana de unión a la mucina: la GAPDH y la piruvato deshidrogenasa (PDH) subunidades A y B (41). En la adhesión intervienen también una serie de proteínas accesorias, entre las cuales encontramos MG218, MG317, MG312 y MG69 (33). Si bien no interactúan de forma directa con la célula hospedadora, estas proteínas contribuyen a mantener la adherencia, intervienen en la formación del orgánulo terminal y en la motilidad deslizante. La mutación de estas proteínas puede conllevar la pérdida o reducción de la capacidad de adhesión de *M. genitalium* (42,43). *M. genitalium* produce una nucleasa que puede dañar la superficie de la célula hospedadora (44). La nucleasa 186 es una lipoproteína asociada a membrana dependiente de calcio (44). Esta enzima tiene funciones replicativas y también biosintéticas fundamentales para la supervivencia de *M. genitalium*. Adicionalmente se ha descrito la contribución de esta enzima en la colonización e invasión de la célula hospedadora, causando daño celular de forma directa o indirecta (33,44).

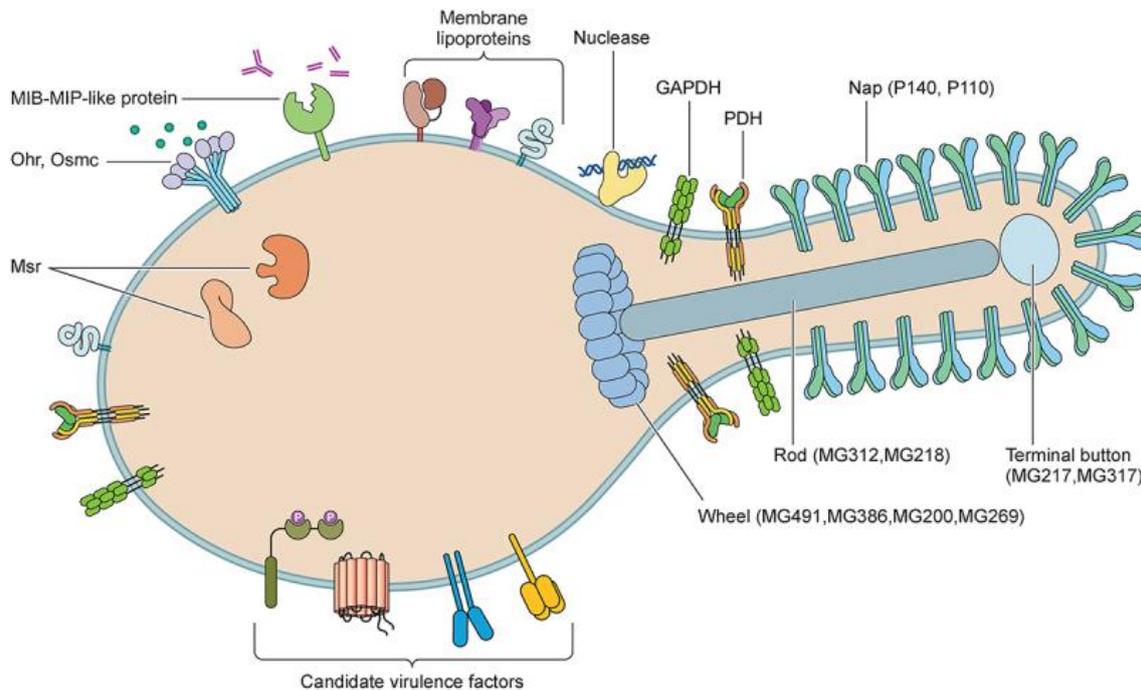


Figura 1. Determinantes de patogenicidad de *M. genitalium*. Se observan las lipoproteínas de membrana y la nucleasa que contribuye al daño celular. Las proteínas GAPDH y PDH intervienen en la unión a la mucina. Las proteínas P140 y P110 actúan como adhesinas. El orgánulo terminal está formado por las proteínas que participan en la motilidad deslizante y en la conformación del citoesqueleto (MG217, MG31, MG312, MG218, MG491, MG386, MG269). En la evasión inmune intervienen la metionina sulfóxido reductasa (Msr), hidroperóxido reductasa orgánica (Ohr) y la proteína C osmóticamente inducible (Osmc). Imagen adaptada de Yueyue *et al* (33).

La motilidad es otro factor importante en la patogénesis de *M. genitalium*. Le permite transmitir la infección y llegar a otras células diana. A diferencia de otras bacterias móviles, este microorganismo carece de flagelos o pilis. Su mecanismo de motilidad es único y le ayuda a penetrar las mucosas. Este es un complejo proceso de coordinación de varias proteínas (MG200, MG217, MG218, MG219, MG312, MG317, MG386 y MG491) implicadas en la adhesión, en el movimiento deslizante y en mantener la estructura del citoesqueleto, incluido el orgánulo terminal (40-43). La mutación en alguna de estas proteínas da como resultado movimientos circulares grandes y erráticos, la disminución en la velocidad del deslizamiento o déficit del movimiento (33, 37, 38). La infección por *M. genitalium* puede provocar síndrome inflamatorio crónico (36). La potente respuesta inflamatoria es causada por sus lipoproteínas de membrana (45).

Función	Factor de virulencia	Referencias
Adherencia	P32, P140, P110, MG218, MG312, MG317 GAPHD y PDH	(33,38-42)
Unión a la mucina	GAPHD, PDH subunidad A y B	(33,41)
Orgánulo terminal Citoesqueleto	MG200, MG217, MG218, MG312, MG317, MG491	(33,37,41,43,45)
Motilidad deslizante	P140, P110, MG200, MG217, MG218, MG219, MG269, MG312, MG317, MG386, MG491	(33,37-40,43)
Daño celular	Nucleasa M186	(44)
Evasión inmune	Msr, Ohr, OsmC Proteasa, Complejo MIB-PIB ^f	(33)

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *M. genitalium*. GAPHD, gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; Msr, metionina sulfoxido reductasa; Ohr, hidroperóxido reductasa orgánica; OsmC, proteína C osmóticamente inducible; PIB, complejo compuesto por una proteína de unión a inmunoglobulinas (MIB) y una proteasa (MIP)

La infección está asociada a la infiltración crónica de leucocitos en la mucosa urogenital y a la secreción de citoquinas proinflamatorias. La colonización persistente de la mucosa del aparato urogenital puede causar inflamación a largo plazo. Esto se asocia a daño celular a nivel de la mucosa y aumenta el riesgo de adquisición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de otras ITS (46, 47).

La evasión del sistema inmune es fundamental para la supervivencia de *M. genitalium* y contribuye a la persistencia de la infección por este germen. Al igual que otros micoplasmas, este microorganismo se vale de diversas estrategias en las

que participan su arsenal de factores de virulencia (Ver tabla 1). La mutación de las adhesinas le permite evadir la neutralización por parte de los anticuerpos.

La invasión intracelular dificulta la acción de la respuesta inmune del hospedador y de muchos antibióticos. Las proteasas degradan los anticuerpos de manera orquestada con las lipoproteínas del complejo MIB-PIB, atenuando la respuesta inmune humoral. La formación de biopelículas contribuye a la persistencia de la infección (33). La nucleasa causa daño tisular y le permite evadir la acción de los neutrófilos extracelulares y la inactivación del complemento. Adicionalmente, su supervivencia se ve favorecida por la secreción de sustancias antioxidantes y otras sustancias que contrarrestan el daño oxidativo (33).

1.2.2. Características clínicas de la infección por *M. genitalium*.

M. genitalium es un agente de transmisión sexual que produce diversos cuadros clínicos. Desde su descubrimiento, *M. genitalium* se ha considerado agente etiológico de uretritis no gonocócica (UNG). Esta bacteria también es causa de cervicitis, y se ha asociado a enfermedad inflamatoria pélvica, parto prematuro y abortos, entre otras complicaciones (47). Sin embargo, las infecciones por *M. genitalium* suelen ser con frecuencia asintomáticas, hecho que facilita la transmisión y contribuye a aumentar la carga clínica causada por este patógeno (48, 49).

M. genitalium es la segunda causa de UNG después de *Chlamydia trachomatis* (21, 50,51). *M. genitalium* es causa del 15 - 25 % de las UNG en varones, variando según las series estudiadas (21,50,51). Debido al lento crecimiento de este microorganismo, este cuadro se caracteriza por un período de incubación prolongado de hasta 60 días o más. Los pacientes presentan disuria y secreción uretral, con presencia microscópica de ≥ 5 leucocitos polimorfonucleares (PMN) por campo de gran aumento ($\times 1000$) (30). La uretritis aguda por *M. genitalium* se observa tanto en hombres que mantienen sexo con hombres (HSH) como en hombres que mantienen sexo con mujeres (HSM) (51).

La UNG persistente se define como la duración de los síntomas de uretritis tras completar un tratamiento antibiótico (52). Diversos autores han descrito una fuerte

asociación entre la UNG persistente y la infección por *M. genitalium*, probablemente en relación con tratamientos previos por tetraciclinas y macrólidos (30, 50, 53 - 55).

Actualmente no hay suficiente evidencia para relacionar la infección por *M. genitalium* con complicaciones crónicas como la epididimitis, la prostatitis y la infertilidad en los varones (30, 50).

La enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) es un síndrome del tracto genital superior femenino que comprende varias entidades clínicas como endometritis, salpingitis, absceso tuboovárico y peritonitis pélvica (56). La etiología de la EIP suele ser polimicrobiana pero en un porcentaje importante de casos no se aísla ningún agente etiológico (57). *M. genitalium* causa infección del cérvix y puede ascender hasta el tracto genital superior, motivo por el cual diversos autores han descrito una posible asociación entre *M. genitalium* y la EIP (58). Sin embargo, no hay suficiente evidencia científica para afirmar esta asociación debido a la variabilidad en los trabajos realizados (57). El diagnóstico de la EIP no contempla la búsqueda de *M. genitalium*. Adicionalmente el tratamiento antibiótico combinado de esta entidad clínica no aborda la infección por este microorganismo a pesar de ser considerado un factor de riesgo para las complicaciones de la EIP (59). La infección no tratada puede asociarse a secuelas irreversibles en la mujer, como la infertilidad tubárica o complicaciones durante el embarazo (60).

La proctitis es la inflamación de la mucosa rectal, caracterizada por dolor, tenesmo, y sangrado rectal. La detección rectal de *M. genitalium* no siempre lleva asociada una proctitis. De hecho, la detección en el recto es más frecuente que en la uretra en HSH asintomáticos (61) y la colonización rectal puede persistir durante más tiempo que la uretral (53). Algunos autores reportaron *M. genitalium* como único patógeno en el 12% de pacientes HSH con proctitis (62). La carga de *M. genitalium* en el frotis rectal de estos pacientes fue superior a la de pacientes asintomáticos. Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias significativas en la detección de *M. genitalium* entre pacientes con proctitis sintomáticos y asintomáticos, sugiriendo que los pacientes pueden actuar como portadores rectales asintomáticos (63).

La infección faríngea por *M. genitalium* es infrecuente. Se ha descrito alrededor de un 2% de detección en la faringe de pacientes HSH (63, 64). Debido a la baja carga

de *M. genitalium* en esta localización se cree que es poco probable que la faringe sea una fuente significativa de transmisión (19, 64). Por este motivo no se recomienda la búsqueda activa de *M. genitalium* en muestras faríngeas (19).

M. genitalium es una de las bacterias que se han implicado en la etiología de la artritis reactiva o síndrome de Reiter (30). Sin embargo, a pesar de haberse reportado la detección de esta bacteria en el líquido sinovial de pacientes con artritis, actualmente las infecciones articulares por *M. genitalium* siguen siendo un tema controvertido por la falta de evidencia (65).

1.2.3. Diagnóstico microbiológico de la infección por *M. genitalium*.

El diagnóstico de la infección por *M. genitalium* se basa en la utilización de técnicas moleculares. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) más empleadas son denominadas *multiplex* porque detectan más de un microorganismo de transmisión sexual en una sola determinación. Algunas de las dianas para la identificación de *M. genitalium* empleadas en las TAAN son el gen que codifica la adhesina MgPa, el gen que codifica para la PDH y regiones específicas del gen 16S ARNr (11). Las muestras utilizadas para diagnóstico son el exudado uretral y/o el primer chorro de orina en hombres, el exudado vaginal en mujeres y el exudado rectal en los pacientes con proctitis. No se recomienda realizar la detección de *M. genitalium* en muestras de exudado faríngeo por la baja incidencia encontrada en esa localización anatómica (60).

M. genitalium es un microorganismo de crecimiento lento por lo que el cultivo convencional no es viable en un laboratorio clínico. Para su crecimiento esta bacteria requiere del uso de medios de cultivo complejos suplementados con esterol y aminoácidos, y de incubación prolongada. El crecimiento óptimo de *M. genitalium* se observa a 37°C en una atmósfera anaerobia de nitrógeno suplementada con 5% CO₂. (21). El medio de cultivo empleado es el SP4 (con una base de sacarosa y fosfato Tully) , tanto agar como medio líquido. También disponible a nivel comercial, este medio de cultivo está compuesto por caldo infusión cerebro-corazón, peptona, extracto de levadura, glucosa, suero bovino

fetal, antibióticos, y rojo fenol como indicador de pH (34). Las colonias de esta bacteria tienen forma de huevo frito y penetran el agar (20). Al metabolizar la glucosa del medio de cultivo, el pH se reduce y se observa un cambio de coloración del rojo al amarillo que sirve para su identificación (20).

La detección de *M. genitalium* se recomienda solo en los casos sintomáticos (19).

Las recomendaciones incluyen a hombres menores de 50 años con uretritis o epididimitis-orquitis aguda, pacientes con proctitis cuando se haya excluido *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, y mujeres que presentan cervicitis, sangrado intermenstrual o post coital, disuria, dolor pélvico agudo o EIP (19). Adicionalmente, se recomienda su detección en los contactos de los pacientes con infección. La guía actual también recomienda la detección de mutaciones que confieran resistencia a macrólidos en todos los casos positivos.

1.2.4. Infección por *M. genitalium* y tratamiento antibiótico dirigido.

Existen marcadas diferencias en las recomendaciones para el tratamiento de la infección por *M. genitalium* en las distintas guías clínicas (11,19, 66, 67). Todas ellas incluyen la pauta extendida de azitromicina en la primera línea de tratamiento, pero varían en la posología. La guía americana y la guía australiana recomiendan un tratamiento secuencial con doxiciclina seguido de un macrólido o moxifloxacino (11,66) y la británica recomienda la doxiciclina como tratamiento inicial previa al uso de macrólidos (67).

El tratamiento de la infección por *M. genitalium* se realizaba con macrólidos y tetraciclinas antes de la aparición de una guía diagnóstica consensuada (68). En nuestro país, el tratamiento de la UNG contemplaba la dosis única de 1 gramo de azitromicina por vía oral. Actualmente la infección por *M. genitalium* se trata siguiendo las recomendaciones de la *2021 European guideline on the management of Mycoplasma genitalium infections* (19). En la infección no complicada causada por cepas sin mutaciones que confieran resistencia macrólidos se recomienda la pauta extendida de azitromicina (500 mg un día, seguido de 250 mg al día durante 2-5 días) por vía oral. La segunda línea de tratamiento en infecciones no complicadas por cepas resistentes a macrólidos es moxifloxacino (400 mg al día

durante 7 días) por vía oral. La tercera línea de tratamiento va dirigida a la infección persistente por *M. genitalium* tras haber sido tratada con azitromicina y moxifloxacino. En estos casos se recomienda doxiciclina o minociclina (100 mg durante 14 días) por vía oral o pristinamicina (1 g por día durante 10 días) por vía oral. El tratamiento recomendado en la infección complicada por *M. genitalium* (epididimitis y EIP) es moxifloxacino 400 mg al día durante 14 días (19).

El test de curación (*test of cure*, TOC) sirve para determinar que el paciente está libre de infección (19). Consiste en la realización de una nueva detección de *M. genitalium* a partir de la tercera semana tras la finalización del tratamiento.

La recomendación actual es realizar el TOC a todos los pacientes con infección por *M. genitalium*. El TOC va a permitir detectar los fallos terapéuticos debidos a infecciones causadas por cepas con mutaciones que confieran resistencia principalmente a macrólidos. La realización del TOC es una herramienta esencial para evitar la diseminación de cepas resistentes.

1.2.5. Resistencia antibiótica adquirida en *M. genitalium*.

Los macrólidos se utilizan ampliamente en el tratamiento dirigido contra *M. genitalium*. La primera cepa de *M. genitalium* resistente a esta familia de antibióticos se describió en 2006 (69). La resistencia a macrólidos en esta bacteria se debe a mutaciones en la subunidad V del gen 23S rRNA (en las posiciones 2058 y 2059 de *E. coli*). *M. genitalium* tiene una sola copia de este gen por lo que puede adquirir resistencia fácilmente (70). Las cepas que adquieren alguna mutación en este gen pueden seleccionarse con el uso de azitromicina, hecho que puede llevar a un fallo terapéutico (70, 71). La persistencia prolongada de niveles de azitromicina en concentraciones subóptimas tras el tratamiento de la infección por *M. genitalium* podría inducir o seleccionar cepas resistentes si el paciente se expone otra vez a la infección por este microorganismo (53). Estas mutaciones se han descrito con mayor frecuencia en HSH (53).

Las quinolonas se utilizan en los casos de infección por *M. genitalium* con fallo terapéutico. Sin embargo, también se han descrito resistencias asociadas a estos antibióticos. La resistencia se debe principalmente a mutaciones en el gen *parC* y

el gen *gyrA*, que codifican la topoisomerasa IV y la girasa, respectivamente (72, 73). Los primeros fallos terapéuticos observados tras el tratamiento con moxifloxacino se asociaron con la mutación S83I (posición en *M. genitalium*) en el gen *parC* (74). En los últimos años se han descrito cepas de *M. genitalium* multirresistentes, las cuales presentan resistencia a macrólidos y quinolonas (75).

La capacidad de esta bacteria para adquirir rápidamente resistencia a ambas familias de antibióticos es preocupante ya que dificulta el tratamiento, pudiendo llegar a un escenario de infección intratable (76).

1.2.6. La infección por *M. genitalium* en nuestro entorno.

Las tasas de infección por *M. genitalium* reportadas en la bibliografía varían dependiendo del área geográfica y de las características de la población estudiada (77). El sexo, el grupo etario, los hábitos sexuales y las condiciones socioeconómicas de la población estudiada son algunas de las variables que contribuyen a estas diferencias. Mientras la mayoría de los estudios publicados incluyen mayoritariamente poblaciones de alto riesgo de contraer una ITS, el número de estudios que analizan la tasa de infección en la población de bajo riesgo (población general) es reducido. En Europa, las tasas descritas de infección por *M. genitalium* en población general oscilan entre un 0.7% y un 3.3% (77). Hay pocos estudios publicados en España, con diferentes resultados debido a diferencias en los grupos de población estudiada y en la metodología empleada (77).

La parte de esta tesis correspondiente a *M. genitalium* se realizó en Catlab, que es un laboratorio de referencia situado en Viladecavalls (Barcelona). Catlab recibe muestras de diferentes centros de atención primaria (CAPs) del Vallés Occidental y de tres hospitales comarcales. En 2011 se incorporó una TAAN *multiplex* que detectaba *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y *M. genitalium*. Este avance en el diagnóstico significó un cambio importante en el área de ITS. Por un lado, hubo un aumento progresivo de las muestras. Por otro lado, se comenzaron a detectar microorganismos que requerían cultivo celular y a su vez aumentó la detección de microorganismos exigentes. Esto motivó una serie de consultas por parte de los médicos de cabecera, que no conocían las patologías asociadas a *M. genitalium* ni su tratamiento dirigido. Desde el laboratorio, se realizaron sesiones formativas dirigidas a médicos de cabecera, comadronas y enfermeras, especialmente a los profesionales de los centros de *Atenció a la salut sexual i reproductiva* (ASSIR) de Cerdanyola y Sabadell. Se crearon varias comisiones para garantizar la formación y actualización de los profesionales implicados en el diagnóstico de las ITS y se puso especial atención en el tratamiento dirigido contra *M. genitalium*. Los resultados positivos para *M. genitalium* se comunicaban por vía telefónica y se daba consejo terapéutico a los médicos de cabecera. A su vez, se solicitaba una nueva muestra pasadas al menos tres semanas tras completar el tratamiento para realizar el TOC. Esta segunda prueba diagnóstica, necesaria para comprobar que el paciente estaba libre de infección y para detectar los fallos terapéuticos, requería una segunda visita al médico.

La aparición de cepas de *M. genitalium* resistentes a macrólidos en varios países de Europa motivó la realización del presente estudio para analizar diferentes aspectos de las infecciones por *M. genitalium* en nuestra área. Este estudio se realizaría en colaboración con los CAPs que referían muestras con solicitud de diagnóstico de ITS al laboratorio. Para poder conocer los datos demográficos, la clínica y la evolución de los pacientes con infección por *M. genitalium* se elaboró una encuesta dirigida a los médicos de cabecera (anexo 1) con todos los datos que consideramos relevantes para el análisis. Es de destacar que la realización del TOC en los pacientes con infección por *M. genitalium* significaba una importante carga asistencial añadida. En muchos casos se perdía el rastro de estos pacientes. Cuando el TOC era positivo, se contactaba nuevamente con el médico de cabecera

para asesorarle sobre las alternativas terapéuticas y se solicitaba el envío de una nueva muestra. Esta tercera determinación suponía una tercera visita del paciente al médico y en varios casos no se produjo. Las cepas de *M. genitalium* obtenidas durante 2014-2015 se analizaron para determinar si presentaban mutaciones en el gen 23S rRNA asociadas a la resistencia a macrólidos. En los casos con mutaciones se contactó nuevamente con los médicos para comprobar si el tratamiento de estos pacientes había sido el adecuado y se encontraban libres de infección.

1.3. *Neisseria gonorrhoeae*. Su papel en la historia de la humanidad.

Neisseria gonorrhoeae es el agente etiológico de la gonorrea, enfermedad que acompaña a la humanidad desde épocas remotas (78). Aparece en varios libros del antiguo testamento, donde se consideraba un castigo divino. Algunos pasajes bíblicos describieron claramente los síntomas de la uretritis (Levítico 15:1-6).

Los filósofos griegos más destacados dieron testimonio de la existencia de esta enfermedad. El médico, cirujano y filósofo romano Galeno de Pérgamo (131-200 AC) describió la uretritis presente en esta enfermedad como “flujo de semillas”. El término “gonorrea” [gon- γονή gr. 'órganos sexuales' + -o- gr. + rhoiā ροία gr. 'flujo'] fue introducido años más tarde de la mano del también médico romano Lucio Celio Aureliano (siglo V DC), en el libro “*De morbis acutis et chronicis*” donde describió el flujo uretral como “secreción no deseada sin erección”(78). Posteriormente con la traducción de los libros de Hipócrates, Galeno y otros médicos, la primera escuela laica de medicina en Salerno (1020-1087 DC) describieron la gonorrea como “*esperma sine voluntariamente concupiscentia est*” (flujo de esperma sin deseo sexual) (78).

El agente etiológico de la uretritis fue descrito por Albert Neisser, bacteriólogo de origen polaco, en 1879. Se trataba de una bacteria, concretamente de cocos gramnegativos agrupados en parejas que denominó *Neisseria gonorrhoeae* (78).

1.3.1. Características generales de *Neisseria gonorrhoeae*.

El género *Neisseria* incluye especies patógenas para el hombre (*Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*) y especies que forman parte de la microbiota comensal de animales y humanos (e.g *N. cinerea*, *N. subflava*, *N. mucosa*, *N. lactamica*) (79). Las neisserias comensales tapizan la mucosa del tracto respiratorio superior, especialmente la nasofaringe, y no suelen comportarse como patógenos (80, 81). *N. meningitidis* es un patógeno exclusivo humano que se encuentra tapizando la mucosa orofaríngea y nasofaríngea del 10% de la población (82). Este microorganismo es causa de meningitis bacteriana, que puede ser fatal tanto en niños como en adultos.

N. gonorrhoeae pertenece a la familia *Neisseriaceae*, cuyos géneros con relevancia clínica son *Neisseria*, *Eikenella* y *Kingella*. Se trata de cocos gramnegativos con un diámetro entre 0.6-1 μm , aerobios estrictos e intracelulares facultativos. Estas bacterias se agrupan característicamente en parejas y forman la típica imagen en grano de café (83). El gonococo tiene un cromosoma circular. Con un contenido de G+C del 52.4%, su genoma (2.14 Mbp) codifica 2.179 proteínas (1).

N. gonorrhoeae es un microorganismo exigente a nivel nutritivo, por lo que requiere para su aislamiento de medios ricos incubados en atmósfera suplementada con CO_2 al 5% a una temperatura de 35-37°C. Produce ácido a partir de la oxidación de la glucosa. La reacción de la catalasa y la oxidasa son positivas (83).

N. gonorrhoeae es un patógeno exclusivamente humano y se transmite por contacto directo, especialmente por contacto sexual (1). Esta bacteria se halla en las superficies húmedas de las mucosas del cérvix, útero y trompas de Falopio en las mujeres y de la uretra masculina (84). Puede encontrarse en orofaringe y mucosa anal según las distintas prácticas sexuales de los pacientes. También puede causar infección a nivel conjuntival en adultos y en neonatos de madres infectadas (85).

El gonococo es una bacteria muy lábil frente a factores ambientales tales como la desecación, las bajas temperaturas, y la presencia de sustancias tóxicas como los ácidos grasos. La bacteria no sobrevive mucho tiempo fuera del hospedador humano de quien obtiene el hierro, elemento fundamental para su crecimiento (1).

1.3.2. Patogénesis de *Neisseria gonorrhoeae*.

La infección de las células de epitelio urogenital por *N. gonorrhoeae* es un proceso con diversas etapas que abarca la adhesión y la colonización, la invasión tisular y celular, la supervivencia intracelular y la exocitosis. *N. gonorrhoeae* coloniza la mucosa epitelial del hospedador compitiendo con la microbiota comensal. El evento inicial está íntimamente relacionado con el reconocimiento entre las moléculas de la superficie del gonococo y los receptores de la membrana de las células epiteliales (86). Son diversos los factores de virulencia que se hallan en la membrana externa y contribuyen a la adhesión de las células diana: los pili tipo IV, las proteínas de la

opacidad (Opa), la porina PorB y el lipooligosacárido (LOS). Algunas de estas estructuras contribuyen también a la evasión del sistema inmune y a la invasión de la célula hospedadora. Los distintos factores de virulencia y sus funciones se ven en la figura 2 y en la tabla 2.

1.3.2.1. Estructuras en la superficie de *N. gonorrhoeae*.

Los pili tipo IV actúan principalmente como adhesinas. Los pili tipo IV son largos filamentos proteicos formados por pilina. El ensamblaje de los monómeros de pilina es complejo y se produce desde el aparato de ensamblaje presente en la membrana externa. El pili es una estructura dinámica, que puede ser retraída con gran fuerza desde este aparato produciendo el movimiento espasmódico característico. Además de la adherencia y la movilidad, los pili tipo IV contribuyen a la evasión de la respuesta celular de los leucocitos polimorfonucleares (87). Los pili tipo IV también participan en el proceso de transformación, al facilitar la internalización del DNA exógeno (1). Por ello, los gonococos son naturalmente competentes para la transformación, hecho que permite la transferencia horizontal de material genético con elevada frecuencia desde neisserias comensales y también entre diferentes linajes de gonococos (88).

Las proteínas de opacidad (proteínas Opa), con un tamaño de 20-28 kD, se encuentran integradas en la membrana externa de gonococo. Su expresión está regulada de forma estocástica. Cada cepa de gonococo porta ~11 genes *opa* cuya expresión depende de eventos moleculares independientes. De este modo, las cepas de gonococo pueden expresar una Opa, muchas Opa o ninguna (86). Las proteínas Opa actúan como adhesinas que se unen a una amplia variedad de receptores presentes en diferentes tipos de células y tejidos humanos (1). Cabe destacar la interacción de las Opa con moléculas de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM), moléculas presentes en células hospedadoras relevantes para el gonococo como las células epiteliales y los neutrófilos (86, 89). A su vez, las Opa participan en la formación de microcolonias en las mucosas, contribuyendo también a la colonización (1).

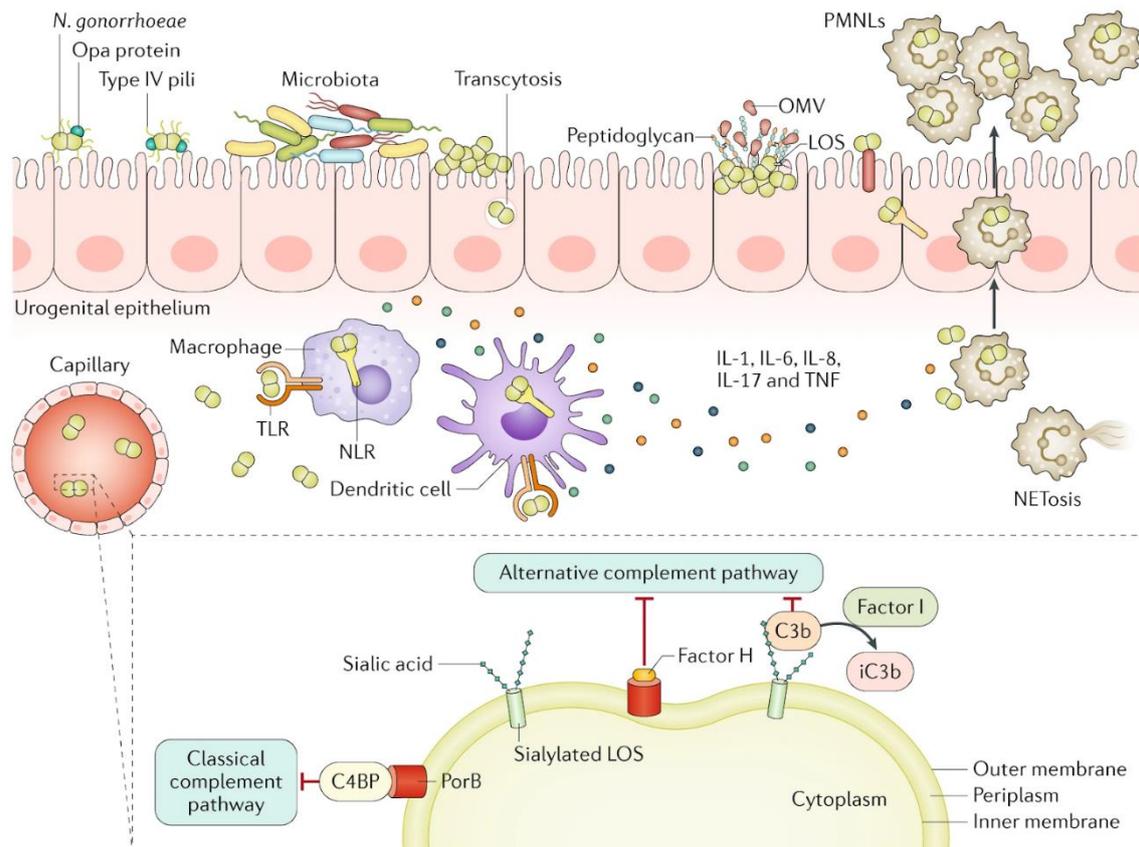


Figura 2. Factores que intervienen en la patogenicidad de *N. gonorrhoeae*. La invasión epitelial requiere de pili tipo IV y de proteínas OPA. Las bacterias proliferan en la superficie epitelial e invaden los tejidos subyacentes por transcitosis. *N. gonorrhoeae* libera fragmentos de peptidoglicano, vesículas de membrana externa (OMV) y lipooligosacárido (LOS) activando los receptores tipo Toll (TLR) y la señalización de proteínas de macrófagos y de las células dendríticas. Estas células producen quimiocinas y citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17) y factor de necrosis tumoral (TNF) que pueden reclutar leucocitos polimorfonucleares (PMNL). *N. gonorrhoeae* puede sobrevivir a la fagocitosis y a los factores liberados durante la degranulación. Para evadir la acción del complemento el LOS es modificado por su unión al ácido siálico. El LOS sializado se une a C3b y promueve su inactivación a iC3b a través del factor I, mientras que la porina localizada en la membrana externa (PorB) se une al factor H y a C4BP, ocultando a las bacterias del reconocimiento por parte del complemento. Cuando la actividad del complemento es inhibida (por mutaciones o por tratamientos inmunosupresores) prevalecen las infecciones sistémicas por *N. gonorrhoeae*. Imagen adaptada de Unemo *et al.* (1)

Las porinas son proteínas transmembrana muy abundantes en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, cuya función principal es ingresar nutrientes para la supervivencia de la célula bacteriana (90, 91). *N. gonorrhoeae* presenta la porina PorB en su membrana externa. Existen dos alelos del gen *porB* (*porB1a* y *porB1b*), con un 80% de homología entre ellos (92). Cada gonococo expresa solo un alelo del gen *porB*. La porina PorB1A favorece la invasión de las células epiteliales. Los gonococos que expresan esta variante son más invasivos y resisten a la acción del efecto bactericida del suero. Por el contrario, la mayoría de

cepas que causan enfermedad local expresan la porina PorB1B (92). Las porinas PorB1A y PorB1B difieren en sus variantes antigénicas y son la base de la tipificación de gonococo (93).

La porina PorB puede llegar a la mitocondria de la célula hospedadora a través de la formación de vesículas de membrana externa (OMV) que van a ser endocitadas por los macrófagos. Este proceso va a causar la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo oxidasa, que activará la apoptosis en los macrófagos (90). También se ha descrito la posible translocación de PorB desde la membrana externa del gonococo a la membrana plasmática de la célula hospedadora por un mecanismo todavía no dilucidado (90).

La proteína modificable por reducción (proteína Rmp) se asocia íntimamente a PorB en la membrana externa. Los anticuerpos generados frente a esta proteína bloquean la unión de los anticuerpos anti-PorB (1,94,95).

Los lipooligosacáridos (LOS) se encuentran anclados a la membrana externa del gonococo a través del lípido A. Se trata de una estructura similar al lipopolisacárido de la mayoría de bacterias gramnegativas pero carece del antígeno O. El LOS es importante en la adherencia y en la invasión de las células del huésped. El gonococo tiene mayor capacidad de invasión de las células epiteliales cervicales no ciliadas y células epiteliales uretrales en los hombres cuando los LOS son desializados (89,96).

1.3.2.2. Adhesión y colonización.

Los pili tipo IV y las OPA son adhesinas fundamentales en la colonización de la mucosa urogenital y de las mucosas en otros sitios de infección. Aun no es conocido si la estabilización de la colonización es debida a la acción de las micro colonias o los biofilms que forma *N. gonorrhoeae*, o a la interacción de ambos (89). Los pili tipo IV están implicadas en la adherencia inicial a la mucosa urogenital, típicamente a epitelios no ciliados (89). Todas las cepas clínicas de gonococo presentan pilis, por lo que son más virulentas que aquellas que no presentan estas estructuras en su envoltura (1). Como ya se ha mencionado, la porina PorB y el LOS también son

esenciales en este primer paso de colonización al interactuar con receptores del hospedador.

1.3.2.3. Invasión, daño tisular y evasión del sistema inmune.

Tras la adhesión, los gonococos proliferan en la superficie epitelial y van a ser capaces de invadir la mucosa urogenital mediante transcitosis (1). La compleja interacción Opa-CEACAM contribuye a este proceso de internalización del gonococo (97). La invasión del epitelio uretral está mediada por la interacción entre LOS y el receptor de asialoglicoproteína (89,98). En las mujeres, la invasión de la mucosa cervical está mediada por la interacción entre el LOS y el receptor CR3 (89,99,100). El receptor de la hormona luteína / hormona HCG (HCG/LHr) interviene en la invasión del gonococo en el endometrio y de las trompas de Falopio (101). Se ha descrito que la mayoría de los gonococos internalizados van a ser destruidos en los autofagolisosomas pero algunas subpoblaciones evaden la destrucción y sobreviven a nivel intracelular (97). La invasión del epitelio puede conducir en algunos casos a la infección diseminada (102).

El daño tisular causado por *N. gonorrhoeae* no es debido a exotoxinas como ocurre en otras bacterias. Por contra, los fragmentos de peptidoglicano secretados, las vesículas de membrana externa (OMVs) y el LOS tienen un papel relevante en la toxicidad celular y además pueden inhibir las células ciliadas tubáricas (1, 103). La internalización del gonococo en la trompa de Falopio activa la síntesis de factor de necrosis tumoral (TNF) que causará daño en la célula hospedadora (103). La actividad de los polimorfonucleares en el foco de infección también contribuirá al daño tisular.

El hierro es fundamental para la viabilidad de gonococo durante la infección. Se han identificado tres sistemas de adquisición de hierro a partir de proteínas humanas asociadas a hierro. Estos sistemas – LpbA-LpbB, TbpA-TbpB y HpuA-HpuB – pueden obtener el hierro de la lactoferrina, la transferrina y la hemoglobina, respectivamente (1).

El gonococo expresa al menos 5 sistemas de bombas de expulsión activa: MtrC–MtrD–MtrE, MacA–MacB–MtrE, NorM, FarA–FarB–MtrE y Mtrf (1). Estas bombas

tienen un papel importante en la patogenia, eliminando moléculas tóxicas como los ácidos grasos o los péptidos catiónicos. También actúan bombeando antimicrobiano fuera de la célula bacteriana.

N. gonorrhoeae ha desarrollado diversas estrategias para la evasión del sistema inmune. *N. gonorrhoeae* puede alterar la capacidad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares, disminuir la actividad macrofágica e inhibir la proliferación de células T. El gonococo estimula la liberación de citoquinas antiinflamatorias. A su vez la respuesta humoral que genera es débil (86). La infección persistente y la infección asintomática por *N. gonorrhoeae* están relacionadas con la capacidad que tiene esta bacteria para evadir el sistema inmune.

La capacidad de variación antigénica de sus principales estructuras en su superficie – el pili tipo IV, las proteínas Opa y el LOS – evita el reconocimiento por los anticuerpos previamente generados, y contribuye a facilitar las reinfecciones incluso por la misma cepa (1). Otra estrategia tiene el sistema del complemento como diana. La porina PorB actúa inhibiendo la acción del complemento. Por un lado, PorB se une a C4BP causando la inhibición de la vía clásica del complemento. Por otro lado, la vía alternativa se ve inhibida por la unión de PorB al factor FH, que es un inhibidor de esta ruta. El LOS sializado puede actuar también sobre la vía alternativa del complemento, causando la inactivación del factor C3b mediante el factor I (1).

1.3.2.4. Intercambio de material genético.

N. gonorrhoeae puede presentar una gran variabilidad genética gracias a diversos mecanismos. Como ya se ha mencionado, el gonococo es competente de manera natural para la adquisición de DNA exógeno en un proceso que depende del pili tipo IV (104,105). Este proceso de transformación natural contribuye a la adquisición de nuevas características entre las cuales se hallan factores de virulencia y determinantes de resistencia a los antibióticos. Este proceso se ve evidenciado en la formación de genes mosaico como ocurre con el gen *penA* y con el gen *porB*, entre otros (106).

Función	Factores de virulencia	Referencias
Adherencia	Pili tipo IV OPA PorB LOS	(1,86,87)
Motilidad espasmódica	Pili tipo IV	(1,87)
Colonización	Pili OPA PorB	(1)
Invasión celular	Pili tipo IV OPA-CEACAM PorB LOS	(92,96,97,99)
Supervivencia intracelular	PorB Bombas de expulsión (FarA-FarB- MtrE, NorM, MtrC-MtrD-MtrE, MacA-MacB-MtrE y MtrF) Complejos captadores de hierro LpbA-LpbB, HpuA-HpuB, TbpA- TbpB)	(1, 90, 91)
Protección contra PMN	Pili tipo IV	(1)
Evasión de la respuesta inmune	Pili tipo IV OPA PorB LOS Rmp	(86,87,90,92,94,95)
HGT	Pili tipo IV T4SS GGI	(1, 88,105)

Tabla 2. Factores de virulencia de *Neisseria gonorrhoeae* OPA, proteínas de opacidad; PorB, Porina B; LOS, Lipooligosacáridos; OPA-CEACAM, Moléculas de adhesión relacionadas con el antígeno carcinoembrionario; Rmp, Proteína modificable por reducción; HGT, Transmisión horizontal genética; T4SS, sistema de secreción tipo 4.

Diversos elementos genéticos móviles contribuyen a la variabilidad en el genoma de las cepas de gonococo (105). Se ha descrito el papel de secuencias de inserciones como IS1016 y de diversos transposones en la adquisición de

variabilidad. La secuenciación masiva ha evidenciado la existencia de diversas secuencias repetidas en el genoma del gonococo, hecho que contribuye también a su plasticidad genética. La existencia de plásmidos y bacteriófagos también participan en la movilización de genes. Es notoria la adquisición del gen que codifica la penicilinasa (*bla*_{TEM}) al estar vehiculizado por transposones que se hallan en plásmidos (105).

La isla de patogenicidad del gonococo (*Gonococcal Genetic Island*, GGI), con 57 kb, está presente en el ~ 80% de las cepas aisladas de *N. gonorrhoeae*. (107,108). Se trata de un elemento genético adquirido de manera horizontal y flanqueado de dos secuencias cortas invertidas. Esta isla de patogenicidad incluye más de 60 marcos abiertos de lectura (*open reading frame*, ORF), de los cuales 18 genes codifican el sistema de secreción Tipo IV (T4SS). Entre otras funciones biológicas, el T4SS facilita la transferencia de DNA monocatenario a otras cepas de gonococo, hecho que permite la posterior recombinación (104,107).

1.3.3. Cuadros clínicos asociados a la infección por *N. gonorrhoeae*.

Las infecciones por *N. gonorrhoeae* suelen asociarse a manifestaciones mucocutáneas supurativas, mayoritariamente a nivel del tracto genitourinario.

1.3.3.1. Uretritis.

El cuadro clínico característico de la infección por *N. gonorrhoeae* es la uretritis en el hombre. El período de incubación es de 2 a 8 días, aunque puede extenderse hasta 14 días (1). Posteriormente, los síntomas aparecen de manera repentina en forma de exudado, inicialmente mucoso, que se transforma en purulento a las 24 h. Este exudado se acompaña de disuria en la mitad de los pacientes (109). Otros síntomas acompañantes pueden ser polaquiuria y tenesmo vesical. La infección puede afectar el rafe medio, las glándulas de Tyson, las glándulas de Littre y provocar abscesos en el tronco del pene e incluso estenosis y fístulas periuretrales (110). Las complicaciones son la orquiepididimitis, prostatitis y la vesiculitis seminal

que pueden evolucionar como prostatitis crónica (109,110). Otras complicaciones poco frecuentes incluyen linfangitis y/o tromboflebitis (110). La uretritis en las mujeres es infrecuente y cursa como cistitis con polaquiuria y disuria (111).

1.3.3.2. Cervicitis.

La infección del cérvix por *N. gonorrhoeae* afecta tanto al canal endocervical como al cuello uterino (110). Adicionalmente en la mujer la infección puede afectar a la uretra. El gonococo coloniza e invade el epitelio cilíndrico cervical sin llegar al epitelio escamoso vaginal. El período de incubación es de 8 a 10 días tras el contacto sexual. La infección suele ser asintomática en el 70 % de los casos. El resto de mujeres infectadas presentan síntomas inespecíficos como secreción mucopurulenta, vulvitis, disuria y polaquiuria (1,112). También puede haber sangrado intermenstrual o menorragia. El examen ginecológico del cérvix revela la presencia de exudado mucopurulento, con sangrado y friabilidad de la mucosa cervical (113). La infección puede ascender por el tracto genital en el 14% de los casos y provocar enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), cuyos cuadros característicos son endometritis, salpingitis y peritonitis (114). El dolor abdominal y la dispareunia son característicos en la EIP. Las pacientes presentan fiebre y leucocitosis. En las mujeres embarazadas puede haber complicaciones en el parto (110). En raras ocasiones, la infección por gonococo llega a afectar las glándulas de Skene y Bartolino, y puede provocar bartolinitis y abscesos unilaterales dolorosos que suelen drenar de forma espontánea (110).

1.3.3.3. Infección ano-rectal.

La infección de la mucosa rectal por *N. gonorrhoeae* suele deberse a la práctica de sexo anal. Se trata de un cuadro muy frecuente en pacientes HSH (115). En la mujer puede producirse directamente por contacto sexual o por la proximidad de la vagina (115). La infección rectal suele ser con frecuencia asintomática tanto en hombres como en mujeres (116). La infección sintomática cursa con proctitis o proctocolitis, que puede presentarse con dolor, secreción purulenta, prurito, tenesmo, estreñimiento y sangrado anal (115).

1.3.3.4. Infección orofaríngea.

La infección faríngea por *N. gonorrhoeae* se adquiere tras la práctica de sexo oral. La mayoría de las infecciones gonocócicas a nivel faríngeo son asintomáticas. Las infecciones sintomáticas pueden presentar tonsilitis y/o linfadenopatías (110). Esta localización anatómica se asocia con mayor fracaso terapéutico (117).

1.3.3.5. Conjuntivitis.

La infección conjuntival por *N. gonorrhoeae* puede darse tanto en adultos como en neonatos (véase apartado 1.3.3.8.). En los adultos este cuadro se asocia a contacto sexual (118). El número de casos se ha incrementado en los últimos años debido al aumento de infección en la población joven. Este cuadro clínico requiere de un diagnóstico precoz y tratamiento antibiótico adecuado para evitar la mala evolución, que puede conducir a perforación corneal y destrucción de la cámara anterior del ojo (118).

1.3.3.6. Complicaciones sistémicas.

La diseminación hematógena de *N. gonorrhoeae* es infrecuente. Este cuadro aparece a los pocos días o semanas después de una infección genital como la uretritis o cervicitis. La diseminación es más frecuente en mujeres (4:1) y se ve favorecida en momentos con mayor vascularización como la menstruación y el tercer trimestre del embarazo. La localización faríngea también puede asociarse a este cuadro. Los pacientes afectados por cepas de gonococo invasivo suelen tener algún déficit del complemento (102).

En la diseminación hematógena, el paciente se encuentra séptico y la afectación articular es frecuente (119). La monoartritis es la manifestación articular más frecuente, principalmente de rodilla o codo (119). Con menor frecuencia, pueden afectarse otras articulaciones como muñecas, tobillos, y articulaciones metacarpofalángicas y metatarsofalángicas (119). Se han descrito casos de infección sistémica por *N. gonorrhoeae* con afectación de prótesis articulares (120). La invasión del torrente sanguíneo por esta bacteria también puede manifestarse a nivel dérmico. Las lesiones cutáneas indoloras en manos, pies y tercio distal de las extremidades pueden acompañarse de artralgias y/o artritis (síndrome artritis-

dermatitis) (120). Las máculas pueden evolucionar a pápulas eritematosas, que pueden llegar a necrotizarse (110). Otras manifestaciones sistémicas infrecuentes son la afectación cardíaca, la perihepatitis (también denominada síndrome de Fitz-Hugh-Curtis) o la meningitis.

1.3.3.7. Infección gonocócica en niños.

La infección por *N. gonorrhoeae* en la infancia se debe a contacto sexual con portadores y es atribuible a abusos sexuales (112). Este proceso se manifiesta en los niños con uretritis de características similares a los adultos (121). En las niñas se presenta como una vaginitis con exudado vaginal purulento (11,121). Ocasionalmente puede aparecer infección faríngea y ano-rectal (110,121).

1.3.3.8. Infección gonocócica en neonatos.

La *ophthalmia neonatorum* es una conjuntivitis neonatal por *N. gonorrhoeae*. Esta infección conjuntival se adquiere por transmisión perinatal al contactar con las secreciones en el canal de parto cuando la madre está infectada. Tras 2-5 días, el neonato presenta secreciones purulentas conjuntivales, celulitis periorbitaria, edema y eritema palpebral (112). Las complicaciones incluyen queratitis y panoftalmitis, que pueden conducir a la ceguera (110).

1.4. El diagnóstico microbiológico.

El diagnóstico de la infección por *N. gonorrhoeae* debe realizarse en todas las personas con riesgo o sospecha de tener gonorrea. De este modo se pueden reducir las complicaciones de la enfermedad, las reinfecciones y la transmisión (11). El diagnóstico convencional (microscopía y cultivo) requiere que las cepas estén viables. Para ello las condiciones de toma de las muestras deben ser estrictas, así como el transporte y la manipulación posterior. El aislamiento de las cepas permite la realización del estudio de sensibilidad antibiótica y la detección de cepas multirresistentes. El diagnóstico molecular ha ido ganando terreno los últimos años. Estas técnicas detectan los ácidos nucleicos, por lo que no requieren la viabilidad de las cepas y las condiciones de toma de las muestras son menos estrictas.

La toma de muestras está estrechamente relacionada con el cuadro clínico que presenta el paciente, con sus hábitos sexuales y conductas de riesgo. El exudado uretral masculino es la muestra más rentable para el diagnóstico ya que la microscopía directa suele ser diagnóstica. En las mujeres la muestra más adecuada es el exudado endocervical ya que es el sitio anatómico que coloniza e invade gonococo. Dependiendo de las prácticas sexuales de los pacientes, es conveniente obtener también muestras de exudado rectal, faríngeo y conjuntival. Es de suma importancia obtener las muestras antes de implantar el tratamiento antibiótico y no aplicar desinfectantes en la zona de la que se obtendrá la muestra. Los escobillones flocados de dacrón o rayon con medio de transporte (Stuart Amies líquido o gelificado con carbón activado) son los más adecuados para la toma de muestras debido a la labilidad de *N. gonorrhoeae* a diferentes sustancias. El primer chorro de orina transportado en un bote estéril también puede emplearse para la detección molecular del gonococo. En caso de sospecha de infección sistémica, se obtendrán muestras de sangre y de líquido articular o de líquido cefalorraquídeo. Las muestras para cultivo no pueden refrigerarse en ningún caso debido a la labilidad del gonococo al frío.

1.4.1. Diagnóstico microbiológico convencional.

La tinción de Gram de las muestras uretrales obtenidas de varones sintomáticos es útil para el diagnóstico de infección gonocócica, con una sensibilidad y especificidad superiores al 95%. La visualización a $\times 1000$ aumentos de ≥ 2 linfocitos polimorfonucleares (PMN) y diplococos gramnegativos intra y/o extracelulares confirman el diagnóstico de uretritis gonocócica (122). La sensibilidad es inferior al 50% en muestras uretrales de varones asintomáticos y en muestras obtenidas de otra localización anatómica (122).

Cultivo bacteriano.

Como ya se ha mencionado, *N. gonorrhoeae* es un microorganismo exigente a nivel nutritivo y por ello requiere medios enriquecidos como el agar chocolate para su crecimiento. Los medios selectivos, como Thayer -Martin, Martin- Lewis, o New York city, se suelen emplear para su aislamiento en muestras no estériles, ya que

incorporan antimicrobianos (vancomicina, colistina y nistatina) que inhiben el crecimiento de la microbiota comensal. Los hemocultivos y líquidos estériles positivos sembrados en viales de hemocultivo se resiembran en placas de agar chocolate. Los cultivos se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Transcurridas 24-48h de incubación se observan colonias transparentes grisáceas con forma irregular de diferentes tamaños (figura 3).

Identificación bacteriana.

La identificación presuntiva se obtiene complementando los datos clínicos y microscópicos con las pruebas de realización inmediata. La oxidasa y la catalasa, ambas positivas en las colonias de *N. gonorrhoeae*, nos orientan para recomendar la prescripción de terapia anti gonocócica. La oxidasa es una técnica rápida que permite determinar la presencia de citocromo C oxidasa. Esta enzima oxida el reactivo fenilendiamina en presencia de oxígeno atmosférico y forma el indofenol, que es un compuesto de color púrpura (123). La enzima catalasa está presente en casi todas las bacterias que poseen citocromos. Esta enzima hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, que se libera dando una reacción brusca de burbujeo (123).

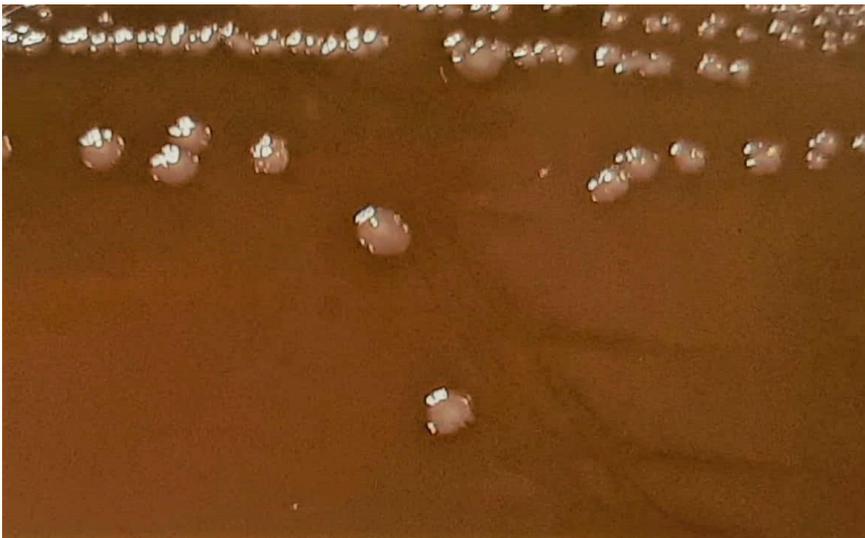


Figura 3. Crecimiento de colonias de *Neisseria gonorrhoeae*.

La identificación también puede realizarse con el perfil de utilización de carbohidratos. Existen actualmente varios métodos comerciales para evidenciar la obtención de ácido a partir de la oxidación de la glucosa, como el API NH (bioMérieux) (123).

1.4.2. Nuevas metodologías.

Las nuevas metodologías incluyen el uso de técnicas basadas en la espectrometría de masas para la identificación bacteriana, y de técnicas moleculares tanto para la identificación de los aislados bacterianos como para la detección del gonococo directamente en las muestras clínicas.

Identificación mediante espectrometría de masas

La técnica *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-flight* (MALDI TOF) se basa en la espectrometría de masas y permite la identificación bacteriana en pocos minutos a partir de colonias crecidas no envejecidas. Tras la ionización y desorción de los péptidos y pequeñas proteínas, se obtiene un perfil proteico característico de cada especie bacteriana (123). El MALDI-TOF es la técnica utilizada cada vez con mayor frecuencia para la identificación de gonococo.

Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN).

Las técnicas moleculares se recomiendan para el diagnóstico de *N. gonorrhoeae* juntamente con el cultivo. Las TAAN tienen una sensibilidad superior al 96% y son coste-efectivas. La toma de muestras para realizar TAANs tienen menos requerimientos que para el cultivo, puesto que la detección de ácidos nucleicos no requiere de cepas viables. La detección de *N. gonorrhoeae* puede realizarse a partir de muestra directa. Estas técnicas son robustas y rápidas. Existen plataformas de detección múltiple que detectan varias dianas con una sola determinación lo que facilita el diagnóstico etiológico de las ITS, cuyo porcentaje de coinfecciones es elevado. Las TAAN se utilizan tanto en los pacientes sintomáticos como en el cribado de pacientes asintomáticos debido a su alta sensibilidad (123).

Análisis del gen rDNA 16S.

Esta técnica se basa en la utilización de cebadores universales diseñados en diferentes zonas conservadas de la bacteria, que permite amplificar regiones variables características del género y la especie. Tras la obtención de un único producto de PCR, el amplicón, se realiza la secuenciación con idénticos o distintos cebadores de la amplificación. Luego se realiza la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias disponibles en diferentes bases de datos. Esto permite identificar el microorganismo y los mecanismos moleculares de resistencia asociados a diferentes familias de antimicrobianos. Es una técnica que no se encuentra disponible en los laboratorios de rutina y suelen remitirse las cepas para estudio a centros de referencia (123).

Whole genome sequencing (WGS).

La secuenciación masiva (*whole genome sequencing*, WGS) es una herramienta que en pocos años ha revolucionado la investigación de *N. gonorrhoeae* por su altísimo poder de resolución, ofreciendo la información más completa sobre una cepa bacteriana. Esta metodología se utiliza para muchos fines, entre ellos, la detección de cepas de AMR (129). WGS es una técnica de secuenciación de nueva generación conocida como secuenciación masiva. Se basa en la producción de millones de reacciones de secuenciación en paralelo sobre una única molécula de DNA, produciendo lecturas de >20000 nucleótidos sin la necesidad de electroforesis o clonación bacteriana siendo más coste efectivo que la secuenciación tipo Sanger (130). Esta técnica permite conocer, entre otras muchas aplicaciones, el comportamiento de las cepas bacterianas tanto en grupos reducidos con características especiales como en poblaciones grandes. A su vez nos brinda información sobre la propagación de cepas AMR a nivel local, nacional e internacional a lo largo del tiempo lo que posibilita la vigilancia global de clones de cepas AMR (131). La metodología WGS permite conocer nuevos determinantes de resistencia en *N. gonorrhoeae*, comprobar el éxito o fracaso terapéutico y predecir futuras resistencias a los antibióticos. Por lo tanto, WGS es una importante herramienta para predecir la evolución de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*,

además de tener infinidad de aplicaciones en el campo de la investigación, el diagnóstico, el tratamiento y la epidemiología.

1.4.3. Técnicas de epidemiología molecular.

La variabilidad dentro de la población de gonococo se puede analizar usando diversas técnicas moleculares.

Multilocus sequence typing (MLST).

La metodología del *Multilocus sequence typing* (MLST) fue desarrollada para identificar clones y/o líneas clonales en poblaciones bacterianas (124, 125). El MLST se basa en el análisis de siete o más genes conservados, evolutivamente neutrales y distribuidos en el genoma bacteriano (126). El MLST de *N. gonorrhoeae* incluye el análisis de los genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm* para elaborar un perfil alélico que permitirá determinar el clon al que pertenecen. Los resultados obtenidos se pueden depositar y comparar en una base de datos de acceso público (<https://pubmlst.org/neisseria/>).

Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing (NG-MAST).

El tipado mediante NG-MAST sirve para determinar la variabilidad en las poblaciones gonocócicas, identificar redes de transmisión e investigar fallos de tratamiento. También ha sido evaluado para predecir fenotipos específicos de resistencia antimicrobiana (126). El tipado mediante NG-MAST es altamente discriminatorio, reproducible y transferible, adecuado para responder a preguntas epidemiológicas a corto plazo (127). El NG-MAST consiste en la secuenciación de un fragmento interno hipervariable de dos genes altamente polimórficos, *porB* (490 pares de bases, pb) y *tbpB* (390 pb). Estos genes codifican dos determinantes de patogenicidad (la porina PorB y la subunidad β de la proteína fijadora de transferrina, respectivamente). Ambos genes sufren una elevada variabilidad genética que se acumula por estar expuestos a la selección derivada de la

respuesta inmunológica del huésped (126). Esta hipervariabilidad genera secuenciotipos (ST) diversos que pueden tener una relación genética estrecha. Diferentes ST son asignados al mismo genogrupo cuando un alelo es compartido y el otro alelo muestra una similitud del 99% (diferencia de ≤ 5 pb para *porB* y ≤ 4 pb para *tbpB*). Los genogrupos se denominan con la letra G seguida de un número del ST predominante en cada genogrupo (127).

***N. gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance (NG-STAR).**

El método de tipado NG-STAR permite determinar perfiles únicos de resistencia bacteriana. Se utiliza para monitorizar la diseminación mundial de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antimicrobianos (128). El secuenciotipo NG-STAR se determina utilizando siete genes (*penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC* y 23S rRNA) asociados a resistencia bacteriana a antibióticos betalactámicos, macrólidos y quinolonas. El método NG-STAR utiliza la secuencia completa de *penA*, la secuencia completa de *mtrR* y una porción del promotor *mtrR*. También incluye porciones de *ponA*, *porB*, *gyrA* y *parC*, y secuencias de 23S rRNA. Los resultados pueden consultarse en una base de datos (<https://ngstar.canada.ca/>) (128).

1.5. Tratamiento antibacteriano.

Las guías para el manejo de las ITS (nacional e internacionales) recomiendan realizar el tratamiento de la gonorrea en el sitio y en el momento de la consulta. Esta medida contribuye a aumentar la adherencia al tratamiento, evitar la transmisión de la enfermedad y reducir la aparición de complicaciones (11,132). Las recomendaciones terapéuticas actuales se detallan en la tabla 3. Es importante que los pacientes tratados se abstengan de mantener relaciones sexuales durante los siete días siguientes a haber recibido el tratamiento. Testar otras ITS, incluido el HIV, a estos pacientes es otra de las recomendaciones presentes en las guías (11,132).

El fallo terapéutico se sospecha en aquellos pacientes que persisten con síntomas a los 3 a 5 días tras recibir tratamiento adecuado y que no han mantenido relaciones

sexuales en ese período. El TOC se realizará a hombres y mujeres con infección gonocócica persistente. Se realizará un cultivo luego de 3 a 7 días tras haber completado el tratamiento. Si el cultivo es positivo, se realizará un antibiograma para descartar la emergencia de cepas resistentes al tratamiento prescrito. En el caso de realizar el TOC con TAANs, se recomienda hacerlo tras dos semanas de haber completado el tratamiento (117). Se realizará tratamiento a los compañeros sexuales con cefixima 800 mg por vía oral en una sola dosis (11).

1.5.1. Conjuntivitis gonocócica en adultos.

El tratamiento es con ceftriaxona 1 g por vía intramuscular en una sola dosis y se recomienda que los compañeros sexuales asistan a consulta para recibir tratamiento (11).

Tratamiento de la infección no complicada por <i>N. gonorrhoeae</i> en cérvix y uretra en adultos y adolescentes		
Tratamientos recomendados	1era línea tratamiento	Alternativas terapéuticas
CDC	-Ceftriaxona 500 mg IM MD	-Gentamicina 240 mg IM MD + Azitromicina 2 g VO MD -Cefixima 800 mg VO MD
BASHH	-Ceftriaxona 1g IM MD -Ciprofloxacina 500mg VO MD	-Cefixima 400mg VO MD + Azitromicina 2g VO MD -Gentamicina 240mg IM MD + Azitromicina 2g VO MD -Espectinomicina 2g IM MD + Azitromicina 2g VO MD -Azitromicina 2g VO MD
WHO	-Ceftriaxona 250 mg IM MD+ Azitromicina 1 g VO MD	-Cefixima 400 mg VO MD + Azitromicina 1 g VO MD
IUSTI	-Ceftriaxona 1 g IM MD + Azitromicina 2 g VO MD -Ceftriaxona 1 g IM MD	-Ciprofloxacina 500 mg VO MD -Gentamicina 240 mg IM MD + Azitromicina 2 g VO MD -Cefixima 400 mg VO MD + Azitromicina 2 g VO MD
GESIDA	Ceftriaxona 500 mg IM MD + Azitromicina 1 gr VO MD	Cefixima 400 mg VO MD + Azitromicina 2 gr VO MD
Tratamiento de la infección faríngea por <i>N. gonorrhoeae</i>		
CDC	-Ceftriaxona 500 mg* IM MD	
BASHH	-Ceftriaxona 1g IM MD -Ciprofloxacina 500mg VO MD	-Cefixima 400mg VO MD + Azitromicina 2g VO MD -Gentamicina 240mg IM MD + Azitromicina 2g VO MD -Azitromicina 2g VO MD
WHO		
IUSTI	-Ceftriaxona 1 g IM MD + azitromicina 2 g VO MD	-Ceftriaxona 1 g IM MD -Ciprofloxacina 500 mg VO MD
GESIDA		
Tratamiento de la infección rectal por <i>N. gonorrhoeae</i>		
CDC	-Ceftriaxona 500 mg IM MD	-Gentamicina 240 mg IM MD + Azitromicina 2 g VO MD - Cefixima 800 mg VO MD
WHO	-Ceftriaxone 250 mg IM MD + Azitromicina 1 g VO MD	-Cefixime 400 mg VO MD + Azitromicina 1 g VO MD
IUSTI	-Ceftriaxona 1 g IM MD + azitromicina 2 g VO MD	-Ciprofloxacina 500 mg VO MD -Gentamicina 240 mg IM MD + Azitromicina 2 g VO MD -Cefixima 400 mg VO MD + Azitromicina 2 g VO MD
GESIDA	-Ceftriaxona 500 mg IM MD + Azitromicina 2 gr VO MD	-Cefixima 400 mg VO MD + Azitromicina 2 gr VO MD -Gentamicina 240 mg IM MD + Azitromicina 2 gr VO MD Gemifloxacino 320 mg VO MD + Azitromicina 2 gr VO MD

Tabla 3. Tratamiento de la infección gonocócica según las diferentes guías más utilizadas en España
 CDC: Centers for disease control and prevention 2021; BASHH: British Association for Sexual Health and HIV 2018; WHO: World health organization 2021; IUSTI: Internacional unión against sexually transmitted infections 2020; GESIDA: Grupo de estudio del SIDA-SEIMC 2017.
 IM: intramuscular; MD: monodosis; VO: vía oral.

1.5.2. Infección diseminada gonocócica.

En el caso de la artritis y el síndrome artritis dermatitis, se administrará ceftriaxona 1 g por vía intramuscular o intravenosa cada 24 horas, la alternativa es cefotaxima 1 g por vía intravenosa cada 8 horas o ceftizoxima 1 g cada 8 horas. En la meningitis o endocarditis se administrará 1 a 2 g de ceftriaxona por vía intravenosa cada 24 h. La duración del tratamiento la determinará el médico clínico (11).

1.5.3. Tratamiento de la infección gonocócica en la infancia.

Ophthalmia neonatorum.

El régimen recomendado es la ceftriaxona 25–50 mg/kg por vía intravenosa o intramuscular en una sola dosis sin sobrepasar los 250 mg (11).

Infección diseminada.

Cuando se trate de neonatos se recomienda ceftriaxona 25–50 mg/kg al día por vía intravenosa o intramuscular una vez al día durante 7 días o cefotaxima 25 mg/kg al día por vía intravenosa o intramuscular cada 12 horas durante 7 días. Si hay meningitis, el tratamiento se extenderá 10-14 días. Los pacientes con artritis que pesen 45 kg o menos se tratarán con ceftriaxona 50 mg/kg llegando a una dosis máxima de 2 g por vía intravenosa o intramuscular en una sola dosis diaria durante 7 días. Si superan los 45 kg de peso la dosis de ceftriaxona será de 1g cada 24 horas durante 7 días (11).

Vulvovaginitis, cervicitis, uretritis, faringitis, o proctitis en niños.

El tratamiento recomendado es ceftriaxona 25–50 mg/kg por vía intravenosa o intramuscular sin exceder los 250 mg. Los niños con un peso superior a 45 kg recibirán el mismo tratamiento que el paciente adulto.

1.6. Evolución de la resistencia a los antimicrobianos en *N. gonorrhoeae*.

La introducción de cualquier antibiótico en la práctica clínica ha ido seguida, con mayor o menor celeridad, de la emergencia de resistencias a ese compuesto. La gonorrea comenzó a tratarse con sulfonamidas en 1930 (133). Estos compuestos análogos del ácido paraaminobenzoico actúan a nivel de la biosíntesis del ácido fólico al competir por la dihidropteroato sintetasa (DHPS). Transcurridos 14 años desde su introducción en clínica, comenzaron a reportarse fallos terapéuticos en soldados durante la segunda guerra mundial (134). Debido a un alto porcentaje de resistencia a las sulfonamidas, en 1960 se introdujo el tratamiento combinado con trimetoprima, antimicrobiano que inhibe de manera adicional la dihidrofolato reductasa (DHFR) en la misma vía metabólica (135-137). Sin embargo, dada la baja afinidad de *N. gonorrhoeae* por la trimetoprima, esta combinación se dejó de usar en la década de 1970 (137).

La penicilina fue introducida en 1943 para el tratamiento de la gonorrea en aquellos casos que no curaban con sulfonamidas (136,138). Como todos los antibióticos betalactámicos, la penicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse a las enzimas transpeptidasas *Penicillin-binding Proteins* (PBP). La penicilina se utilizó durante décadas, pero en 1960 comenzaron a reportarse fallos terapéuticos. En este contexto, la dosis de penicilina se incrementó en la década de 1980 con el fin de alcanzar el éxito terapéutico (136,137).

Las tetraciclinas se introdujeron en 1950 como tratamiento opcional para los pacientes alérgicos a la penicilina (137). Este fármaco actúa afectando la síntesis proteica por unión con la subunidad 30S ribosomal. El primer gonococo resistente a tetraciclinas se reportó en 1985 (139).

Las quinolonas comenzaron a utilizarse como primera opción terapéutica en 1983 en Estado Unidos (USA). Estos antibióticos inhiben la actividad de la DNA girasa y la topoisomerasa IV, ambas enzimas esenciales para la replicación del DNA. Numerosos fallos de tratamiento comenzaron a reportarse en 1990. Debido al incremento de resistencias, la ciprofloxacina fue retirada de las recomendaciones terapéuticas en Asia, Europa y USA en el año 2000 (140).

La azitromicina se consideró como un posible tratamiento para la gonorrea a comienzos de 1980. Pertenece a la familia de los macrólidos y es el único miembro de la subclase azalida. Los macrólidos se unen a la subunidad 50S ribosomal impidiendo la elongación de la cadena de la peptidil polipéptido transferasa, y bloquean el canal peptídico de salida (141). Como resultado, los ribosomas liberan polipéptidos incompletos, lo que le confiere un efecto bacteriostático (142). Derivada de la eritromicina, se diferencia por la inserción adicional de un átomo de nitrógeno en el anillo macrólido, hecho que aumenta su estabilidad, le confiere mayor penetración tisular y una vida media prolongada (141). En los últimos años se han reportado casos de cepas de gonococo con resistencia de alto nivel a azitromicina en varios continentes (143,144, 145).

Actualmente la ceftriaxona es el tratamiento de primera línea recomendado frente a *N. gonorrhoeae* en las guías de los CDCs (11). La ceftriaxona es una cefalosporina de tercera generación con una fuerte actividad frente al gonococo por su afinidad para unirse a las PBP2 (146). Este antibiótico betalactámico se introdujo como tratamiento de primera línea tras observar un aumento sostenido de las CIM de ciprofloxacina en cepas de gonococo (137). La cefixima es una cefalosporina de tercera generación de dosificación oral, que se comenzó a utilizar antes que la ceftriaxona para el tratamiento de la gonorrea. Sin embargo, rápidamente se observó disminución de la sensibilidad a cefixima en varios hospitales de Japón y posteriormente en Europa comenzaron a reportarse fallos terapéuticos (147,148). La cefixima dejó de utilizarse como tratamiento de primera línea y en la actualidad se emplea como tratamiento en contactos de pacientes con infección gonocócica. (117). La primera cepa de gonococo con alto nivel de resistencia a ceftriaxona se detectó en el año 2011 en Japón (149). Desde entonces, se han reportado cepas resistentes a ceftriaxona en varios países del mundo incluida España (150,151,152,153).

1.7. Mecanismos moleculares de resistencia.

1.7.1. Resistencia a macrólidos.

La azitromicina es el macrólido utilizado con mayor frecuencia en el tratamiento de las ITS incluida la infección gonocócica (117,153). *Neisseria gonorrhoeae* puede presentar resistencia a azitromicina debido a la presencia de mutaciones en genes cromosómicos y a la adquisición por vía horizontal de determinantes de resistencia (153,154).

Las mutaciones o sustituciones más ampliamente descritas tienen lugar en el gen 23S rRNA y en el promotor del gen *mtrR* (153). *N. gonorrhoeae* tiene cuatro alelos del gen 23S rRNA (143,155). Se han descrito mutaciones puntuales en la peptidil transferasa del V dominio del gen 23 S rRNA asociadas a la resistencia a macrólidos. El incremento de la CIM a azitromicina varía en función de las copias del gen 23S rRNA que presentan cambios. La presencia de mutaciones en uno o dos alelos del gen 23S suelen dar resistencia de bajo nivel, en cambio las mutaciones en tres o cuatro alelos del gen confieren resistencia de alto nivel (144). La mutación C2611T, presente en un solo alelo del gen, determina una MIC de 0.06-0.125 mg/L a azitromicina, considerado un rango de sensibilidad. Cuando esta mutación está presente en 3 alelos del gen, la CIM de azitromicina se incrementa a valores de 2-16 mg/L, considerándose un rango de resistencia por encima del ECOFF (1 mg/L según, EUCAST) (153). La mutación A2059G en un solo alelo del gen 23S rRNA es insuficiente para conferir resistencia de alto nivel a los macrólidos, aunque puede desarrollarse bajo presión selectiva (142). La mutación A2058G, descrita en 2021 en *N. gonorrhoeae*, confiere resistencia de alto nivel a macrólidos cuando se encuentra presente en 3 de los 4 alelos del gen 23S rRNA (155).

Las proteínas ribosomales L4 y L22 forman parte de subunidad 50S del ribosoma. Las sustituciones aminoacídicas en estas proteínas pueden contribuir a la resistencia a macrólidos cuando ocurren en la región de unión a estos antibióticos (156). Recientemente se ha descrito la adquisición horizontal de mosaicos en los genes que codifican las proteínas ribosomales, procedentes de especies comensales del género *Neisseria* (157).

N. gonorrhoeae expresa 4 tipos diferentes de bombas de expulsión activa, La bomba MtrCDE, FarAB-MtrE, MacAB y NorM (158). Las bombas de expulsión activa actúan eliminando al exterior sustancias antibacterianas como los péptidos antimicrobianos catiónicos, antibióticos, ácidos grasos, detergentes no iónicos y sales biliares (159). Esta acción contribuye a la resistencia y a la supervivencia de la bacteria en presencia de antibacterianos en el medio (160). La bomba de expulsión activa juega un importante papel en la resistencia a la azitromicina. El locus *mtr* contiene tres genes (*mtrC-mtrD-mtrE*) dentro de un operón MtrCDE. El operón *mtrCDE* contiene aguas arriba y en sentido inverso el gen *mtrR* que codifica para el represor transcripcional (157). La expresión de los genes que codifican para las bombas de expulsión activa está sujeta a un complejo sistema regulador de represores y activadores (160,161). Cuando existen mutaciones en el gen o en el promotor de gen que codifica al represor, se produce una sobreexpresión de la bomba (160,161). Las mutaciones aguas arriba de *mtrC*, las de la región de unión de MtrR, las mutaciones de la región promotora y las secuencias tipo mosaico dentro del *mtrD*, contribuyen a reducir la sensibilidad a la azitromicina y a otras familias de antibióticos (153,157,162). Recientemente se han descrito los alelos mosaico de resistencia transferible múltiple (*mtr*) de la bomba de eflujo, originados mediante el intercambio horizontal de genes con *Neisseria lactamica* y *N. meningitidis* (161).

La bomba MacAB tienen la capacidad de reconocer a los macrólidos y su acción conjuntamente con la bomba MtrCDE contribuye a la disminución de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* frente a los macrólidos (163). Se ha descrito la mutación G→T en la región -10 del promotor de la bomba MacAB. Esta mutación produce un incremento en la transcripción de la bomba, lo que lleva a un aumento de la resistencia a los macrólidos en *N. gonorrhoeae* (163).

Se han descrito mecanismos menos comunes que confieren resistencia a macrólidos en *N. gonorrhoeae* como la adquisición de genes *erm A/B/C/F*. Estos genes codifican las metilasas del rRNA que modifica el sitio de unión a los macrólidos en el gen 23S rRNA (164).

1.7.2. Resistencia a Betalactámicos.

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana y promoviendo la autólisis bacteriana (165). La pared bacteriana está compuesta por peptidoglicanos que forman una malla entre la membrana citoplasmática y la membrana externa. En la última fase de la formación de la pared bacteriana las transpeptidasas se unen a pentapéptidos, que mediante la pérdida de un aminoácido terminal pasan a tetrapéptidos. El anillo betalactámico presenta similitud con los pentapéptidos que se unen a estas enzimas, uniéndose a ellas de forma covalente e impidiendo la formación de la pared celular. A raíz de esta unión, las transpeptidasas se llaman *Penicillin-binding Proteins* (proteínas ligadas a la penicilina o PBP). La bacteria no puede formar la pared y muere por la exposición a los cambios en la presión oncótica (165).

La resistencia a los antibióticos betalactámicos en *N. gonorrhoeae* se debe a la presencia de plásmidos y a mutaciones cromosómicas. Los plásmidos contienen el gen *Bl_{TEM}* que codifica las betalactamasas tipo TEM-1 que confiere resistencia de alto nivel a los betalactámicos. Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico inactivando al antibiótico antes de su unión a las PBPs. Las betalactamasas de origen plasmídico son transferibles y los inhibidores de las betalactamasas suelen inactivarlas (165,166).

La resistencia cromosómica está mediada por tres mecanismos: modificación de la diana, disminución de la entrada del antibiótico a la célula bacteriana y aumento del flujo de salida del antimicrobiano (166).

Modificación de la diana: Las mutaciones en los genes *ponA* y *penA* que codifican las PBP1 y PBP2 respectivamente, afectan la actividad de la penicilina frente al gonococo. Las mutaciones en el gen *penA* que codifica las PBP2 es el principal determinante en la disminución de la sensibilidad y la aparición de resistencia a las cefalosporinas. La adquisición de un gen mosaico *penA* (la combinación de múltiples mutaciones debidas a la recombinación entre especies distintas de *Neisserias*) o una alteración en el aminoácido A501 en la PBP2 resulta en un incremento de la CIM de las cefalosporinas de espectro extendido (CEE).

Disminución de la entrada del antibiótico a la célula bacteriana: Las mutaciones en el gen *porB* alteran la porina PorB1b observándose la disminución de la entrada del antibiótico a la célula a través de esta porina. Las alteraciones del aminoácido G101 y A102 en la porina PorB1b que está codificada por el gen *porB1b* se traduce en

una disminución de la entrada de las CEE al interior de la célula bacteriana (1,167,168). Las mutaciones en el gen *pilQ* provocan una disminución en la entrada de antibióticos y resistencia de alto nivel a penicilina (169).

Aumento del flujo de salida del antimicrobiano: Las mutaciones en el promotor o la secuencia codificante del gen represor de *mtrR* causa una sobreexpresión del sistema de la bomba de eflujo MtrCDE que saca el antibiótico fuera de la célula. Estas modificaciones afectan a la penicilina, a las tetraciclinas y a los macrólidos (170,171,172).

1.7.3. Resistencia a quinolonas.

La resistencia a quinolonas se debe a mutaciones en la región de los determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR), los genes *gyrA* y *parC*, que codifican las enzimas DNA girasa (también llamada topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV, respectivamente (173). La combinación simultánea de cambios en ambas proteínas suele determinar la resistencia a quinolonas (153). Las sustituciones de aminoácidos descritas son variadas y dependen del área geográfica. Las sustituciones S91F+D95G/A en *gyrA* y S87R en *parC* son las más habituales, detectadas en el 40% de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a quinolonas (174). El clon ST 1407 de *N. gonorrhoeae* alberga estas sustituciones, mostrando CIMs >16mg/L frente a la ciprofloxacina (174).

La superproducción de la bomba NormM es otro mecanismo que puede reducir la sensibilidad de gonococo a las quinolonas. Esta superproducción es debida a una mutación puntual del gen *norM* (154).

2. Hipótesis y objetivos.

La azitromicina es uno de los antibióticos más empleados en el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual (ITS). La tesis doctoral que se presenta se enmarca en el análisis del incremento de resistencia a azitromicina observado en los últimos años en dos de los agentes bacterianos de ITS más prevalentes, *Mycoplasma genitalium* y *Neisseria gonorrhoeae*.

En el momento de iniciar este trabajo se desconocía la frecuencia de infección por *M. genitalium* en el área el Vallés Occidental, área de influencia de CatLab. La incorporación de una TAAN multiplex que detectaba *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y *M. genitalium* significó un importante avance en el diagnóstico. Sin embargo, la detección de *M. genitalium* como agente de ITS motivó una serie de consultas por parte de los médicos de cabecera en el área de influencia de Caltab, los cuales no conocían las patologías asociadas a este patógeno ni su tratamiento dirigido. Todo ello motivó la necesidad de conocer tanto la frecuencia de infección por *M. genitalium* en el área de influencia del laboratorio como la proporción de fracaso terapéutico asociado a la resistencia a macrólidos al ser la azitromicina el tratamiento de primera línea.

El incremento de resistencia de *N. gonorrhoeae* a los tratamientos habituales, ha generado preocupación a nivel mundial debido a la falta de opciones terapéuticas actuales. En este contexto la OMS recomienda la estrecha vigilancia del gonococo para evitar la diseminación de clones con resistencias antibióticas asociadas. Dado el importante incremento de la resistencia a azitromicina se consideró necesario determinar su origen y se hipotetizó la posible contribución de algún clon asociado a esta resistencia.

En el presente trabajo los aislados de *N. gonorrhoeae* analizados provienen de una población de bajo riesgo, correspondiente al área de influencia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Debido a las características de la población de la que provienen los aislados, posiblemente presenten bajos niveles de resistencia a los antibióticos. Por todo lo expuesto, en el presente trabajo se analizaron las resistencias de los aislados frente a macrólidos y adicionalmente a betalactámicos, y quinolonas a la que vez que se caracterizaron los determinantes moleculares de

resistencia de *N. gonorrhoeae* frente a esas familias de antibióticos. Se estudiaron los clones circulantes de los aislados resistentes a azitromicina.

Concretamente, los objetivos de este trabajo fueron:

- 1- Determinar la frecuencia de infección por *Mycoplasma genitalium* en una cohorte de siete años (2011-2017) con pacientes con y sin factores de riesgo para ITS en el área de influencia de CatLab (Valles Occidental).
- 2- Análisis de las características epidemiológicas de una cohorte prospectiva de pacientes con infección por *M. genitalium* en el área de influencia de CatLab durante un año (2014-2015).
3. Análisis de la eficacia del consejo terapéutico ante casos de infección por *M. genitalium* en atención primaria incluidos en la cohorte prospectiva durante un año de seguimiento. Evaluación de los tratamientos antibióticos prescritos y de su seguimiento mediante el test de cura (TOC).
- 4- Determinar la frecuencia de *M. genitalium* resistente a azitromicina en la cohorte prospectiva (2014-2015) mediante el análisis molecular de los determinantes asociados.
- 5- Análisis retrospectivo de los aislados de *Neisseria gonorrhoeae* en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) durante un período de tres años (2019-2022). Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), la CIM₅₀ y CIM₉₀ a azitromicina, penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina y doxiciclina.
- 6 – Determinar los clones de *N. gonorrhoeae* con resistencia a azitromicina circulantes en el área metropolitana de influencia mediante secuenciación del genoma completo de las cepas con CIM a azitromicina ≥ 2 mg/L. Estudio de la epidemiología molecular de estas cepas determinando su MLST, NG- MAST y NG-STAR.
- 7 – Análisis de los determinantes moleculares de resistencia en las cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a azitromicina. Evaluación de los determinantes asociados a resistencia a macrólidos, betalactámicos y fluoroquinolonas.

3. Materiales y métodos.

El estudio prospectivo de *M. genitalium* se realizó en Catlab, un laboratorio de referencia ubicado en Viladecavalls, provincia de Barcelona. Las muestras procedían de centros de atención primaria especializada (CAPs) de Sabadell y Cerdanyola, consultas de médicos de cabecera de otros CAPs, y del Hospital Universitari Mútua de Terrassa (HUMT), del Consorci Sanitari Terrassa (CST) y de la Fundació Hospital Sant Joan de Deu de Martorell (HSJDM).

En el estudio se incluyeron muestras de: a) exudados endocervicales y exudados vaginales con solicitud de estudio de ITS; b) exudados uretrales de varones a partir de los 13 años de edad, c) muestras extragenitales con solicitud de estudio de ITS, y d) lesiones/úlceras genitales.

Las muestras de pacientes con sospecha de infección por *M. genitalium* se remitieron al laboratorio en escobillones con medio de transporte (medios Stuart o Amies) y se conservaron a temperatura ambiente. Una vez procesadas las muestras y realizado el diagnóstico microbiológico, los extractos de ácidos nucleicos de interés se desvincularon de la historia clínica del paciente. Las muestras clínicas no se conservaron. Dado que las muestras fueron posteriormente tratadas de manera anónima, se solicitó la excepción del consentimiento informado por parte de los pacientes.

3.1. Tipo y período de estudio

Se realizó un estudio retrospectivo (2011-2017) para conocer la tasa global de infección por *M. genitalium* y las codetecciones asociadas en el área de influencia de Catlab. Se analizaron los datos obtenidos de la rutina diagnóstica en ese período de tiempo.

El estudio prospectivo se realizó desde junio de 2014 hasta junio de 2015. Durante este año se analizaron las muestras que llegaron al laboratorio para a) conocer la tasa de infección anual por *M. genitalium* según los grupos de edad, b) analizar la infección en pacientes asintomáticos y sintomáticos en relación al sexo, c) conocer las infecciones simples y las codetecciones con otros microorganismos de

transmisión sexual, d) conocer la asociación de la infección por *M. genitalium* a disbiosis e) analizar la adecuación del tratamiento recibido por los pacientes, f) detectar los fallos terapéuticos mediante el TOC, g) conocer la resistencia a azitromicina en las cepas detectadas mediante la detección de mutaciones en el gen 23S rDNA.

3.2. Métodos microbiológicos para el diagnóstico etiológico

El diagnóstico etiológico de las ITS se realizó con métodos convencionales combinados con métodos moleculares.

3.2.1. Cultivo de las muestras.

Las muestras se sembraron en medios enriquecidos y medio selectivos. El algoritmo diagnóstico para las muestras genitales incluye la siembra en placas de agar chocolate (bioMérieux), agar Thayer Martin (bioMérieux), agar Gardnerella (GARD, bioMérieux), y medio cromogénico para levaduras (CAND, bioMérieux)

3.3. Detección molecular a partir de muestra directa.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó mediante la plataforma automatizada QIAcube® (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los extractos de ácidos nucleicos se guardaron congelados en -80°C.

3.3.1. Detección molecular de agentes de ITS.

La detección de *C. trachomatis* (CT), *N. gonorrhoeae* (NG) y *M. genitalium* (MG) se realizó mediante una PCR multiplex a tiempo real que emplea el preparado Dx CT/NG/MG Assay (BIO-RAD) y la plataforma Dx Real-Time System (BIO-RAD) a partir de las muestras con solicitud de estudio de ITS.

3.3.2. Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a macrólidos.

Se determinó la resistencia a macrólidos de todas las cepas de *M. genitalium* obtenidas durante el período del estudio prospectivo mediante amplificación y secuenciación del gen 23S tal y como describe Jensen (175). Los genes que se utilizaron en estas técnicas se muestran en la tabla 4.

	Gen	Producto de la expresión	Oligonucleótidos
Macrólidos	23S rDNA	23S RNA	F: 5'-CCATCTCTTGACTGTCTCGGCTAT-3' R: 5'-CCTACCTATTCTCTACATGGTGGTGT-3'

Tabla 4 Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de los genes de resistencia a macrólidos en *M. genitalium*. F: Forward; R: Reverse.

3.4. Encuesta.

Durante el estudio prospectivo de *M. genitalium* (2014-2015) se contactó telefónicamente con los médicos responsables de los pacientes con infección activa por este microorganismo. En esta llamada se comunicaba el resultado, se daba consejo terapéutico y se sugería la realización de TOC. A su vez se preguntaban los items de la encuesta (Anexo1) formulados para conocer los datos del paciente, la presentación clínica y el tratamiento recibido.

3.5. Análisis estadístico.

En el estudio de *M. genitalium* Los datos fueron resumidos con porcentajes e intervalos de confianza del 95% para variables categóricas, la media \pm desvíos standard para variables cuantitativas, mediana e IQR para variables no normales. Las variables categóricas se compararon mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) y las que mostraron distribución normal se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA). Las pruebas bilaterales con un valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM-SPSS v25.

***Neisseria gonorrhoeae*.**

El estudio de *N. gonorrhoeae* se realizó en el servicio de microbiología del Hospital de Santa Creu y Sant Pau del área metropolitana de Barcelona. Las muestras procedían mayormente de la unidad de infecciones de transmisión sexual del hospital cuya población de influencia es alrededor de 400000 habitantes.

3.6. Muestras y criterios de inclusión.

En el estudio se incluyeron todas las muestras con solicitud de estudio de ITS, tanto las de origen genital como extragenital. Las muestras incluidas fueron: a) exudado uretral, b) exudado endocervical, c) exudado vaginal, d) exudado balanoprepucial, e) exudado rectal, f) exudado faríngeo y g) exudado conjuntival. Se remitieron al laboratorio en escobillones con medio de transporte (medios Stuart o Amies) y se conservaron a temperatura ambiente. Una vez procesadas, los aislados de *N. gonorrhoeae* se desvincularon de la historia clínica del paciente. Las muestras clínicas no se conservaron. Las cepas se congelaron a -80°C.

3.6.1. Diseño experimental y periodo de estudio.

El estudio de *N. gonorrhoeae* se realizó de manera retrospectiva. Se analizaron los aislados obtenidos en la rutina durante tres años (2019 – 2022); no se incluyeron los aislados duplicados del mismo paciente con el mismo perfil de sensibilidad. Los aislados resistentes a azitromicina durante este periodo se seleccionaron para la realización de WGS. Se incluyeron también dos aislados sensibles a azitromicina procedentes de dos pacientes que posteriormente presentaron aislados resistentes.

3.7. Métodos microbiológicos para el estudio etiológico.

El diagnóstico etiológico se realizó de manera convencional mediante cultivo y mediante métodos moleculares aplicados directamente a la muestra clínica. La detección molecular de rutina se realizó con el sistema *STI Plus ELITE MGB® Kit*

(ELITechGroup) que detecta *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, y *T. vaginalis*.

3.7.1. Estudio microbiológico convencional.

Las muestras se sembraron en medios enriquecidos y medios selectivos como se ha descrito anteriormente (véase el algoritmo en apartado 1.4.1). La identificación bacteriana se realizó con MALDI-TOF MS, usando el sistema Bruker Microflex® LT y el *software* MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics).

El estudio de sensibilidad a los antibióticos se realizó por difusión en gradiente en el medio GC II (Becton Dickinson) siguiendo las recomendaciones de CLSI (*M100-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition*) (176). Se determinó la concentración mínima inhibitoria frente a penicilina (BioMérieux), ceftriaxona (Liofilchem), azitromicina (Liofilchem), ciprofloxacina (Liofilchem) y doxiciclina (BioMérieux). La detección de betalactamasa se realizó con el *test* de nitrocefin (Remel, United Kingdom). La categorización de los aislados se realizó siguiendo los criterios de EUCAST (177). Se determinaron las categorías Resistente (R) , Sensibilidad con exposición incrementada (I) y Sensible (S) para penicilina (CIM \leq 0.06 mg/L, $>$ 1 mg/L), ceftriaxona (CIM \leq 0.125 mg/L, $>$ 0.125 mg/L) y ciprofloxacina (CIM \leq 0.03mg/L, $>$ 0.06 mg/L). Debido a la falta de punto de corte a azitromicina se utilizó el *Epidemiological cut off-value* (ECOFF) $>$ 1 mg/L para determinar la existencia de algún mecanismo de resistencia. El punto de corte de la tetraciclina se utilizó para determinar la sensibilidad a la doxiciclina debido a la ausencia de punto de corte para este antibiótico (177).

3.8. Caracterización molecular de los aislados.

La caracterización molecular de los aislados seleccionados (véase apartado 3.8.2.) se realizó mediante secuenciación del genoma completo. Esta caracterización incluyó el estudio de determinantes de resistencia y la epidemiología molecular.

3.8.1. Extracción de ácidos nucleicos.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó con DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen). El procedimiento seguido se detalla a continuación:

2. Agregar 1.8 ml de cultivo bacteriano a un tubo de 2 ml. Centrifugar a 10.000×g durante 30 segundos. Decantar el sobrenadante y volver a centrifugar. Retirar el sobrenadante con una punta de una pipeta.
3. Resuspender las células en 300 µl de solución PowerBead y agitar suavemente. Transferir las células resuspendidas a un tubo PowerBead y agregar 50 µl de solución SL.
4. Fijar los tubos PowerBead de forma horizontal con el adaptador Vórtex (13000-V1-24). Vortear a velocidad máxima durante 10 minutos.
5. Centrifugar los tubos a un máximo de 10.000 ×g durante 30 segundos.
6. Transferir el sobrenadante (300-500 µl) a un tubo limpio de 2 ml.
7. Añadir 100 µl de solución IRS al sobrenadante y agitar en vórtex durante 5 segundos. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
8. Centrifugar a 10.000 ×g durante 1 minuto y transferir 450 µl del sobrenadante a un tubo limpio.
9. Añadir 900 µl de solución de unión SB y agitar en vórtex durante 5 segundos.
10. Cargar 700 µl en MB Spin Column y centrifugar a 10.000×g durante 30 segundos. Desechar el líquido y repetir el proceso con el sobrenadante restante.
11. Añadir 300 µl de solución de lavado CB y centrifugar a 10.000 ×g durante 30 segundos. Desechar el líquido sobrante y centrifugar a 10.000 ×g durante 1 minuto.
12. Colocar la columna de centrifugación MB en un tubo de recogida de 2ml.
13. Agregar 50 µl de tampón de elución EB y centrifugar a 10.000 ×g durante 30 segundos para recoger el extracto eluido.

Los extractos de DNA de los aislados se congelaron a -20° C.

3.8.2. Whole genome sequencing (WGS).

La secuenciación del genoma completo fue realizada en la empresa NovoGene (Cambridge, Reino Unido). Los datos generados se obtuvieron con un secuenciador NovaSeq™ 6000 de Illumina® con la técnica de secuenciación por síntesis de Illumina 2x150.

Los reads fueron filtrados y recortados utilizando el programa fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>). Se eliminaron los *reads* de un tamaño inferior a 50bp y con una calidad inferior a Q30.

3.8.3. De novo assembly.

Los reads se ensamblaron utilizando Unicycler v0.5.0 (169), un programa basado en el motor de ensamblaje *St. Petesburb Genome Assembler* (SPAdes v13.15). Para mejorar la calidad del ensamblaje, los fastas obtenidos por unicycler se editaron para eliminar los contigs con un tamaño inferior a 500 pb.(178) Seguidamente, se utilizó el programa prokka v1.14.5 para anotar los genomas en proteínas (179). Con el programa Roary se hizo el alineamiento del core genome de los aislados con las cepas de referencia WHO (180). La extracción de los SNPs del alineamiento, eliminando las inserciones y/o deleciones, se realizó con el programa snp-sites (<https://www.sanger.ac.uk/tool/snp-sites/>).

3.8.4. Map to reference.

Los *reads* filtrados fueron alineados con el genoma de referencia de NCBI TUM19854 (número de acceso del GenBank NZ_AP023069.1) mediante el programa snippy (disponible en <https://github.com/tseemann/snippy>). Este programa utiliza Samtools y freebayes para crear archivos de mapas de alineamiento de secuencias y anotar las variantes (SNPs, inserciones, deleciones y variantes complejas) (181,182). A continuación, utilizamos el programa Gubbins v3.0.0 (disponible en <https://github.com/nickjcroucher/gubbins>) para marcar y eliminar *loci* con altas densidades de sustituciones debidas a la recombinación (182, 183). Los *loci* con altas densidades de sustituciones debidas a la recombinación se

marcaron y eliminaron mediante el programa Gubbins v3.0.0 (disponible en <https://github.com/nickjcroucher/gubbins>) (182, 183).

3.9. Epidemiología molecular.

Se determinaron los secuenciotipos de MLST, NG MAST y NG STAR. los datos de ensamblajes del genoma fueron enviados a la página web de acceso público PubMLST Neisseria (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

3.9.1. *Multilocus sequence typing (MLST).*

Para la determinación del secuenciotipo MLST se analizaron los genes conservados *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *phC* y *pgm*. Se asignó un número a cada alelo y se calculó el secuenciotipo introduciendo la numeración en la base de datos pública PubMLST Neisseria (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

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

Para la obtención del secuenciotipo NG-MAST se secuenciaron los fragmentos internos variables de dos genes altamente polimórficos, *porB* y *tbpB* que codifican las proteínas de membrana externa Porina y TbpB. A los aislados tipificados se les asignó un identificador compuesto por dos números que corresponden a las secuencias de los dos alelos en el orden *porB-tbpB*. La numeración obtenida se introdujo en la base de datos pública (<http://www.ng-mast.net>).

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

El secuenciotipo NG-STAR se obtuvo analizando los 7 genes *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC* y 23S rRNA. Se asignó un número a cada alelo y la numeración obtenida se introdujo en una base de datos de acceso público (<https://ngstar.canada.ca/>).

3.9.4. Análisis filogenético.

El análisis filogenético de las cepas se realizó mediante *Map to Reference* con la cepa de referencia *Neisseria gonorrhoeae* WHO-V. El método de *maximum likelihood* para generar el árbol filogenético. Para la creación del árbol se utilizó el programa RAxML v. 8.2.12 con el modelo evolutivo General Time Reversible (GTRCAT) y un bootstrap de 1000 repeticiones. Para las anotaciones, figuras y visualización del árbol filogenético se utilizó el programa figtree (184).

3.9.5. Caracterización de determinantes de resistencia.

A partir de la secuencia completa de los genomas de los aislados se analizaron los determinantes genéticos asociados con resistencia a macrólidos, betalactámicos y quinolonas localizados en los genes 23 S ARNr, *rplD-rplV*, *mtrR* y su promotor, *erm A/B/C/F*, *mef A/B*, el promotor de la bomba de expulsión activa MacAB, *penA*, *ponA*, *porB*, *tbpB*, *gyrA* y *parC*.

Para la búsqueda de genes de resistencia antibiótica adquirida se compararon los fastas obtenidos con las bases de datos NCBI, CARD, RESFINDER y PLASMIDFINDER mediante la utilización del programa Abricate v 0.9.9 (disponible en <https://github.com/tseemann/abricate>).

Las mutaciones puntuales en genes estructurales asociadas a la resistencia a antimicrobianos se estudiaron utilizando la plataforma Blast. Los genes conocidos de los aislados fueron comparados con el genoma de referencia. La traducción de los genes proteicos se realizó con el programa Emboss transeq y la comparación de estos genes con el genoma de referencia se realizó con el programa Clustal Omega. Los determinantes de resistencia a azitromicina, quinolonas y betalactámicos fueron identificados en la página web PubMLST *Neisseria* (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

3.9.6. Estudio de mutaciones en puntuales asociadas a la resistencia a macrólidos en el gen 23S ARNr.

Se extrajeron cuatro copias del gen 23S ARNr del genoma de *N. gonorrhoeae* utilizando los archivos fasta obtenidos del map to reference con snippy. Utilizando

la herramienta samtools view, se extrajeron los 4 alelos del gen 23S ARNr de los aislados utilizando como referencia las posiciones de estos genes en la cepa de referencia (número de acceso NZ_AP023069.1; alelo 1: 1201168-1204056, alelo 2:1581966-1584854; alelo 3:1663361-1666249; y alelo 4: 1892156-1895044) (181). La herramienta *online* EMBOSS Seqret se utilizó para transformar los alelos 1, 2 y 3 de reverse a forward. Para la comparación de genes, se realizó el alineamiento de los fastas con el algoritmo de clustal w en el programa MEGA X (disponible en <https://www.megasoftware.net/>) utilizando las cepas de referencia WHO (180) que se detallan en la tabla 5.

Cepa	Número de acceso
WHO F	NZ_LT591897.1
WHO G	NZ_LT591898.1
WHO L	NZ_LT591901.1
WHO M	NZ_LT591904.1
WHO K	NZ_LT591908.1
WHO N	NZ_LT591910.1
WHO O	NZ_LT592146.1
WHO V	NZ_LT592150.1
WHO Z	NZ_LT592153.1
WHO X	NZ_LT592155.1
WHO P	NZ_LT592157.1
WHO U	NZ_LT592159.1
WHO Y	NZ_LT592161.1
WHO W	NZ_LT592163.1

Tabla 5. Cepas WHO. Cepas de referencia utilizadas para la comparación de genes de resistencia en los aislados estudiados y el número de acceso.

3.9.7. Estudio de mutaciones en genes asociados a la resistencia.

El estudio de los genes *rplD-rplV*, *mtrR* y su promotor, *erm A/B/C/F*, *mef A/B*, el promotor de la bomba de expulsión activa MacAB, los genes *penA*, *ponA*, *porB*, *tbpB*, *gyrA* y *parC*, se realizó utilizando archivos fasta obtenidos en el ensamblaje *de novo*. Con los genomas de los aislados se elaboró una base de datos de blast. Para extraer los genes de los aislados estudiados se utilizaron los genes de referencia detallados en la tabla 6. La extracción de los genes se realizó utilizando el programa ncbi-blast 2.12.0+(disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los genes *penA*, *porB*, *ponA*, *tbpB*, *tbp1 (tbpA)* se extrajeron utilizando los archivos obtenidos del prokka directamente en proteínas. Una vez extraídos, fueron comparados con las proteínas extraídas de las cepas de referencia (Tabla 6) obtenidas con prokka (179).

Gen	referencia	Número de acceso: gen	Número de acceso: proteína
parC	FA 1090	AE004969.1:1210529-1212827	AAW89918.1
mtrR	FA 1090	AE004969.1:1327798-1328430	AAW90014.1
promotor mtrR	FA 1090	AE004969.1:1327798-1328430	No aplica
gyrA	FA 1090	AE004969.1:618439-621189	AAW89357.1
promotor macAB	TUM19854	NZ_LT592159.1:1414903-1415195	No aplica
rplD	TUM19854	AP023069.1:1968730-1969350	BCD76151.1
rplV	TUM19854	AP023069.1:1970793-1971122	BCD76155.1
macAB	WHO U	NZ_LT592159.1:1411785-1414963	WP_003695602.1, WP_003689303.1

Tabla 6. Genes extraídos de la cepa de referencias FA1090 TUM 19854 y WHO- U. Número de acceso del gen y de la proteína en la cepa control

4. Resultados.

4.1. Análisis de la infección de *Mycoplasma genitalium* en el Vallés Occidental (2011-2017).

Se analizaron un total de 20133 muestras para estudio de ITS procedentes de 17846 pacientes (4775 hombres y 13071 mujeres) durante el periodo a estudio (2011-2017). Se detectaron 612 casos con infección por *M. genitalium* durante este periodo, que correspondieron al 37.7% (231/612) de hombres y al 62.2% (381/612) de mujeres; la razón hombre: mujer fue 0.60. La tasa global de infección por *M. genitalium* fue del 3.4% (612/17846; IC 95% 3.2-3.7). Desglosada por sexos, la tasa de infección por *M. genitalium* fue del 4.8% (IC 95% 4.3-5.5) en hombres y del 2.9% (IC 95% 2.6-3.2) en mujeres. La tasa de incidencia de infección (DI) por *M. genitalium* en el Vallés Occidental (considerando el área de influencia de CatLab) fue de 0.0002%. La incidencia acumulada anual fue de 0.0373% (IC 95% 0.0315-0.0440).

4.2. Análisis epidemiológico y clínico de la cohorte de casos con infección por *M. genitalium* (2014-2015).

Se evaluaron prospectivamente las características epidemiológicas y clínicas de una cohorte de pacientes para estudio de ITS durante un año (2014-2015), con la finalidad de determinar la tasa de infección de *M. genitalium* en nuestra área de influencia y la resistencia a macrólidos. Se incluyeron 3540 pacientes, de los cuales 132 presentaron infección por *M. genitalium*. La tasa global de infección por *M. genitalium* fue del 3.7% (IC 95% 3.1-4.4) Para la recogida de los datos demográficos y clínicos, así como del seguimiento de los casos con infección, se diseñó una encuesta dirigida a los médicos responsables de cada paciente (anexo 1).

La distribución de la infección por *M. genitalium* en la cohorte prospectiva se evaluó según el sexo. De los pacientes incluidos en la cohorte, el 34.6% (1225/3540) fueron hombres y el 65.3% (2315/3540) fueron mujeres. Se detectaron 132 casos de infección por *M. genitalium*, que correspondieron a 45.4% (60/132) hombres y 54.5% (72/132) mujeres; la razón hombre: mujer fue 0.83. La tasa global de

infección desglosada por sexos fue de 4.9% (60/1225) en hombres y de 3.1% (72/2315) en mujeres. La asociación entre el sexo y la adquisición de la infección fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Las características de la infección por *M. genitalium* (sintomática versus asintomática) se analizaron en relación con el sexo de los pacientes de la cohorte. La infección por *M. genitalium* fue asintomática en el 50.7% (67/132) de los pacientes y sintomática en el 49.2% (65/132). Los pacientes asintomáticos correspondieron a hombres en el 38.8% (26/67) y a mujeres en el 61.1% (41/67) de los casos; la razón hombre: mujer fue 0.63. La tasa global de pacientes asintomáticos fue del 1.9% (67/3540; IC 95% 1.47-2.40), desglosada por sexos fue de 2.1% (26/1225; IC 95% 1.39-3.09) en hombres y de 1.8% (41/2315; IC 95% 1.28-2.40) en mujeres. Los pacientes con presentación sintomática de la infección correspondieron en el 52.2% (34/65) a hombres y en el 47.6% (31/65) a mujeres; la razón hombre: mujer fue 1.09. La uretritis fue el cuadro clínico predominante en los hombres (19/60) y la leucorrea (10/72) fue el signo más frecuente en las mujeres.

Se establecieron cuatro grupos etarios para analizar la relación entre infección por *M. genitalium* y la edad de los pacientes incluidos en la cohorte a estudio. La mediana de edad de los pacientes estudiados fue 27.5 años (rango 15 - 66 años). La mayor tasa de infección por *M. genitalium* se observó dentro del grupo A (15 a 25 años), correspondiendo a un 5.7% (58/1008). La tasa de infección en el grupo B (26 a 35 años), grupo C (36 a 45 años) y grupo D (≥ 46 años) fue del 4% (45/1114), del 2.4% (21/836) y del 1.4% (8/555), respectivamente. Las tasas globales de infección por *M. genitalium* por grupos etarios (A, B, C y D) fueron de 1.6% (58/3540), 1.2% (45/3540), 0.5% (21/3540), 0.2% (8/3540), respectivamente. A pesar de la mayor frecuencia de detección de *M. genitalium* observada en pacientes jóvenes, la asociación entre la edad y la adquisición de la infección fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). En la tabla 7 se detallan las características de los pacientes con infección por *M. genitalium*.

Características	
Edad (años)	
Media (DS)	29.2 (8.8)
mediana (rango)	27.5 (15-66)
Sexo, n (%)	
mujer	72 (54.5)
hombre	60 (45.4)
Presentación clínica, n (%)	
Asintomático	67 (50.8)
mujer	41
hombre	26
Sintomático	65 (49.2)
mujer	31
hombre	34
Características de la infección, n (%)	
Infección simple por MG	(39.3)
mujer	19
hombre	33
Codetección con otros agentes ITS	
mujer	15
hombre	14
Primer tratamiento, n (%)	
Tratamiento dirigido contra MG	81 (61.4)
Azitromicina pauta extendida	63 (47.7)
Azitromicina monodosis	11 (8.3)
Doxiciclina	4 (3)
Moxifloxacino	3 (2.3)
Otros tratamientos*	12 (9.1)
No tratamiento	29 (29.5)
TOC, n	
Total realizados, n (%)	56 (42.4)
negativo	46
positivo	10
Tratamiento post TOC, n	
moxifloxacino	9
No tratamiento	1

Tabla 7. Características epidemiológicas y clínicas. Pacientes (n=132) con test positivo para *M.genitalium* (2014-2015)DS, desviación estándar; MG, *Mycoplasma genitalium*; ITS, Infección de transmisión sexual; TOC, Test de curación.*Otros tratamientos: ceftriaxona, cefixima, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, clindamicina, ciprofloxacina, levofloxacina y eritromicina. Estos antibióticos no tienen efecto sobre *M.genitalium*.

M. genitalium fue detectado como único patógeno (infección simple) en el 39.3% (52/132) de los pacientes de la cohorte estudiada. De los casos con infección simple, el 63.4% (33/52) corresponden a hombres y el 36.5% (19/52) a mujeres; la razón hombre: mujer fue 1.73. La presentación asintomática de la infección simple fue del 53.8% (28/52), correspondiendo el 60.7% (17/28) y 39.2% (11/28) a hombres y mujeres respectivamente; la razón hombre: mujer fue 1.54.

M. genitalium fue detectado con otros agentes de transmisión sexual (codetección) en el 21.9% (29/132) de los pacientes de la cohorte. De los casos con alguna codetección, el 48.2% (14/29) fueron hombres y el 51.7% (15/29) fueron mujeres; la razón hombre: mujer fue 0.93. La presentación fue asintomática en el 44.8% (13/29) de los pacientes con codetecciones, correspondiendo el 38.4% (5/13) a hombres y el 61.5% (8/13) a mujeres. La presentación fue sintomática en el 55.1% (16/29) de los pacientes con codetecciones, correspondiendo el 56.2% (9/16) a hombres y el 43.7% (7/16) a mujeres. La codetección más frecuente fue con *C. trachomatis* [51.7% (15/29)], seguido de *Haemophilus* spp. [27.5% (8/29)] *N. gonorrhoeae* [17.4% (5/29)], y el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) [6.8% (2/29)]. El 34.4% (10/29) de los pacientes con codetección por agentes de transmisión sexual presentaron también microorganismos asociados a disbiosis. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la codetección de *M. genitalium* con otros agentes de transmisión sexual, el sexo de los pacientes y la presencia o ausencia de síntomas ($p=0.317$). Las codetecciones con otros microorganismos de transmisión sexual se detallan en la tabla 8.

La coinfección de *M. genitalium* con microorganismos comensales que pueden estar asociados a uretritis, vaginitis y vaginosis en caso de disbiosis se detectó en el 38.6% (51/132) de los pacientes. *Ureaplasma urealyticum* fue la bacteria que se detectó con mayor frecuencia, correspondiendo al 62.7% (32/51) de estos casos, seguido de *Gardnerella vaginalis* [23.5% (12/51)]; dos pacientes presentaron coinfección con *M. hominis* y un paciente con *Streptococcus agalactiae*. La coinfección de *M. genitalium* con *Candida* spp se detectó en el 35.2% (18/51) de estos casos.

	Mujer, <i>n</i>	Hombre, <i>n</i>	Total, <i>n</i> (%)
Casos	72	60	132
Detección simple	19	33	52(39.3)
Codetección	15	14	29 (21.9)
<i>C. trachomatis</i>	10	5	15 (51.7)
<i>Haemophilus</i> sp.	2	6	8 (27.5)
<i>N. gonorrhoeae</i>	1	4	5 (17.4)

Tabla 8 Codetecciones de *M. genitalium* con otros microorganismos de transmisión sexual.
C. trachomatis fue el microorganismo codetectado con más frecuencia.

4.3. Consejo terapéutico y seguimiento de los pacientes con infección por *M. genitalium* en la cohorte (2014-2015).

El diseño experimental incluyó el consejo terapéutico como intervención activa. Durante este período se aconsejó la pauta extendida de azitromicina para el tratamiento en los casos con infección por *M. genitalium* de la cohorte estudiada. El tratamiento dirigido frente a *M. genitalium*, fue prescrito en el 61.4% (81/132) (IC 95% 52.9-69.4) de los pacientes. El 56% (74/132) (IC 95% 47.5-64.3) de los pacientes recibieron alguna de las pautas de azitromicina. La pauta extendida de azitromicina (500mg el primer día seguidos de 250 mg durante 4 días por vía oral) fue prescrita en el 47.7% (63/132) de los pacientes, mientras que la azitromicina en monodosis (1 g por vía oral) fue pautada en el 8.3% (11/132) de los pacientes. La doxiciclina (200 mg al día durante 7 días, por vía oral) fue prescrita en el 3% (4/132) de los pacientes y el 2.2% (3/132) recibieron moxifloxacino (400 mg al día durante 7 días por vía oral). El tratamiento se consideró inadecuado frente a *M. genitalium* en el 9% (12/132) de los pacientes, los cuales recibieron antibióticos betalactámicos (amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación), fluoroquinolonas distintas a moxifloxacino (ciprofloxacino, levofloxacino), o clindamicina. Un 29.5% (39/132) de los pacientes no recibieron ningún tratamiento. En la figura 4 se muestran los tratamientos prescritos a los pacientes con infección por *M. genitalium*.

La realización del TOC se aconsejó a los clínicos para evaluar si los pacientes se encontraban libres de infección tras el tratamiento y para detectar los fracasos terapéuticos. Para el TOC, se realizó un segundo test de detección de *M. genitalium* como mínimo tres semanas después de haber completado el tratamiento dirigido frente a este microorganismo. El TOC se realizó en el 42.4% (56/132) de los pacientes de la cohorte; la prueba fue positiva en el 7.5% (10/132) de estos pacientes. Nueve de los diez pacientes que se consideraron con fallo terapéutico habían sido tratados con azitromicina en pauta extendida (500mg el primer día seguidos de 250 mg durante 4 días por vía oral) y uno con doxiciclina (200 mg al día durante 7 días por vía oral).

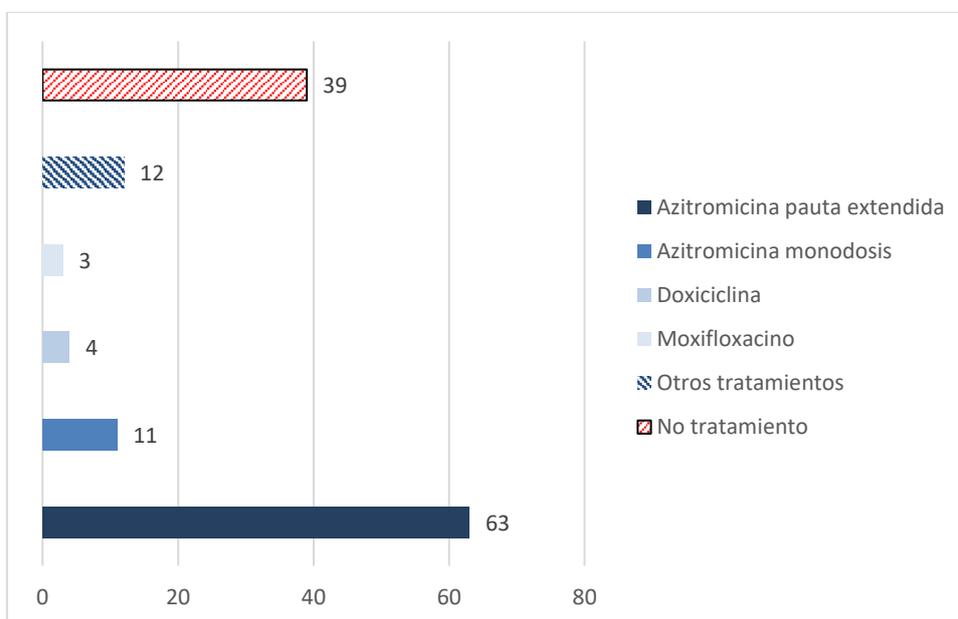


Figura 4. Tratamientos dirigidos contra *M. genitalium*: Azitromicina en pauta extendida: 500 mg el primer día seguido de 250 mg durante 2-5 días por vía oral; azitromicina monodosis: 1 g al día por vía oral; doxiciclina 200 mg al día durante 7 días por vía oral; moxifloxacino 400 mg al día durante 7 días por vía oral

4.4. Análisis de la resistencia a macrólidos en *M. genitalium* en la cohorte (2014-2015).

El análisis de la resistencia a macrólidos se realizó en la cohorte correspondiente al periodo 2014-2015. El estudio molecular se realizó para determinar aquellos casos de infección por *M. genitalium* debidos a cepas con mutaciones que conferirían resistencia a macrólidos. Del total de 132 casos de infección por *M. genitalium*, solo 111 se pudieron incluir en el estudio molecular debido a la degradación de los extractos correspondientes a los 21 casos restantes. No se detectó ninguna mutación relacionada con resistencia a macrólidos en el 87.3% (97 /111) de los extractos analizados, considerándose que la infección por *M. genitalium* en estos casos fue debida a cepas salvajes. Se detectó alguna mutación en la subunidad V del gen 23S rRNA (posiciones 2058 y 2059 de *E. coli*) en el 12.6% (14/111) restante. Se detectaron tres tipos de mutaciones distintas asociadas a resistencia a macrólidos; la mutación A2058G fue la más prevalente (8/14), seguida de las mutaciones A2058T (3/14) y A 2059G (3/14).

Las características de los 14 pacientes [hombres (n=9), mujeres (n=5)] con infección por *M. genitalium* debida a cepas con mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos se presentan en la tabla 9. Nueve de los 14 pacientes presentaron el TOC positivo. Ocho de estos pacientes habían recibido tratamiento con azitromicina en pauta extendida y uno de ellos había recibido azitromicina en pauta extendida más doxiciclina. Los tres pacientes con TOC negativo habían recibido tratamiento con moxifloxacino 400 mg al día durante 7 días por vía oral y habían curado. En los dos pacientes restantes, el TOC no se había realizado. Uno de ellos había recibido tratamiento con azitromicina en pauta extendida y el otro con azitromicina 1g en monodosis.

La detección de mutaciones en el gen 23S rRNA se analizó con la presentación clínica de la infección (sintomática *versus* asintomática) y la presencia o ausencia de agentes de ITS o de disbiosis. El 57.1% (8/14) de las cepas con mutaciones que confieren resistencia a macrólidos se detectaron en pacientes asintomáticos [hombres (n=5), mujeres (n=3)]. De estas, seis casos correspondieron a infecciones simples por *M. genitalium*.

Caso	Mutación	Sexo	Edad	CD	VIH	Clínica	TTO	TOC	2do TTO	2doTOC
1 ^a	A2058G	H	21	no	N	AS	AZM 1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	N
2	A2058G	M	28	CT	NR	S	AZM 1 g/1 d	NR	desconocido	NR
3 ^a	A2058G	M	18	no	N	AS	AZM 1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	N
4	A2058G	M	28	no	N	AS	AZM1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	NR
5	A2058G	H	33	no	N	AS	MXF 400 mg/10 d	N	*	*
6 ^a	A2058G	H	37	no	N	S	AZM 1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	N
7	A2058G	M	24	no	N	S	AZM 1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	N
8	A2058G	H	49	H	N	S	MXF 400 mg/10 d	N	*	*
9	A2058T	H	32	no	NR	AS	MXF 400 mg/10 d	N	*	*
10 ^a	A2058T	H	22	no	N	AS	AZM 1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	N
11	A2058T	H	32	NG	NR	S	AZM 1.5 g/5 d	NR	desconocido	NR
12 ^a	A2059G	M	27	no	N	AS	AZM 1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	N
13 ^a	A2059G	H	25	no	N	S	AZM 1.5 g/5 d plus DXC 200 mg/7 d	P	MXF 400 mg/10 d	N
14 ^a	A2059G	H	66	no	N	AS	AZM 1.5 g/5 d	P	MXF 400 mg/10 d	N

Tabla 9. Características de los pacientes infectados con cepas de *M. genitalium* que presentaban mutaciones que confieren resistencia a macrólidos, tratamiento, TOC y seguimiento. H, hombre; M, mujer; CD, codetección; TOC, test de curación; N, negativo; P, positivo; NR, no realizado; CT, *C. trachomatis*; H, *Haemophilus* spp.; NG, *N. gonorrhoeae*; VIH, Virus de la inmunodeficiencia humana; TTO, tratamiento; AZT, azitromicina, MXF, moxifloxacino; DXC, doxiciclina; d, días, 2do TOC, segundo TOC; S: Sintomático; AS, asintomático.

a- Siete de los pacientes tuvieron infección previa por *M. genitalium* pero se desconoce si recibieron tratamiento dirigido.

*Pacientes con cepas de *M. genitalium* con mutación que recibieron moxifloxacino como primera opción terapéutica y curaron. El TOC fue negativo.

Luego del TOC positivo contactamos con los médicos para recomendar tratamiento con moxifloxacino y solicitar una nueva muestra para comprobar la curación mediante un segundo TOC.

La existencia de infecciones previas por *M. genitalium* se analizó en la subpoblación de casos positivos de esta cohorte en relación con la presencia o ausencia de mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos. Estas infecciones previas (analizadas hasta 2011) se consideraron como marcador subrogado de posible consumo previo de macrólidos en esta subpoblación. El 10% (11/111) de los casos incluidos en el estudio molecular para detección de mutaciones de resistencia a macrólidos habían presentado una infección por *M. genitalium* previa al período de estudio. De estos, siete correspondieron a casos debidos a cepas con mutaciones (7/14) y cuatro a casos con cepas salvajes (4/97). La asociación de infecciones previas por *M. genitalium* con la infección por cepas resistentes a esta familia de antibióticos se consideró estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

4.5. Analisis de la infección por *Neisseria gonorrhoeae*

Se analizaron 201 aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes de 197 pacientes atendidos en el dispensario de ITS del Hospital Santa Creu i Sant Pau de Barcelona durante 2019 y 2022. El 39.8 % (80/201) de las muestras correspondieron a exudados uretrales, 37.3 % (75/201) a exudado rectal, 16.9% (34/201) a exudado endocervical, 3% (6/201) exudado faríngeo, 2.5% (5/201) exudado vaginal, 0.5% (1/201) exudado balanoprepucial y 0.5% (1/202) exudado conjuntival. De los 197 pacientes incluidos en el estudio, 4 presentaron más de 1 muestra positiva para *N. gonorrhoeae* en diferentes episodios de infección.

La distribución de la infección por sexos fue de 78.6% en hombres (155/197) y del 21.3% en mujeres (42/197). La razón hombre: mujer fue 3.7. La mediana de edad de los pacientes fue 31 años (rango 15-59 años). Se establecieron cuatro grupos de edad para analizar la distribución de la infección por *N. gonorrhoeae*, grupo A (15-25 años), B (26-35 años), C (36-45 años) y D (>46 años). La tasa de infección por grupos (A, B, C y D) fue de 28.9% (57/197), 34.5% (68/197), 22.8% (45/197) y 13.7% (27/197), respectivamente.

La sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antibióticos durante el período de estudio se muestra en la tabla 10. La frecuencia de resistencia fue de 11% (15/136), 14.2% (28/197) y 66.8% (127/190) a azitromicina, penicilina y ciprofloxacina, respectivamente; no se detectaron aislados resistentes a ceftriaxona. Del total de cepas resistentes a azitromicina (>1mg/L) 14 fueron resistentes a quinolonas; la co-resistencia fue del 37.8%. De los 15 aislados caracterizados a nivel molecular con resistencia a azitromicina (≥ 2 mg/L), tres presentaron resistencia a ciprofloxacina y todos fueron sensibles con exposición incrementada a penicilina.

Antibiótico	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Rango MIC (mg/L)	S		I		R		Total* (n)
				n	%	n	%	n	%	
Ceftriaxona^a	0.006	0.023	0.002-0.125	197	100	-	-	-	-	197
Penicilina	0.38	3	0.01-96	8	4	162	82.2	28	14.2	197
Azitromicina	0.5	1.5	0.03-4	104	76.4	17	12.5	15	11	136
Ciprofloxacina	3	8	0.002->32	62	32.6	1	0.5	127	66.8	190
Doxiciclina	2	12	0.19-32	13	15.1	26	30.2	47	54.6	86

Tabla 10. Sensibilidad antibiótica de los aislados de *N. gonorrhoeae* incluidos en el estudio. La categorización clínica se realizó según los criterios de EUCAST. El ECOFF (1 mg/L) se utilizó para determinar la sensibilidad a azitromicina. Los puntos de corte de la tetraciclina se utilizaron para determinar la sensibilidad a doxiciclina.

^a De los 197 aislados sensibles a ceftriaxona, 23 (11.6%) presentaron una CIM por encima del ECOFF de cefotaxima (0.016 mg/L); EUCAST no dispone de ECOFF de ceftriaxona.* Aislados con CIM.

4.6. Epidemiología molecular.

La caracterización molecular mediante MLST, NG-MAST y NG-STAR se realizó en 15 aislados de gonococo resistentes a azitromicina. Dos de los pacientes con aislados resistentes (pacientes A y B) habían presentado dos aislados sensibles a azitromicina que también se incluyeron en el estudio.

Para calcular el ST-MLST se obtuvieron los alelos de los genes *abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *adh*, *pdhC* y *pgm* (Tabla 11).

Los aislados estudiados por MLST presentaron cinco secuenciotipos diferentes, ST-MLST 9363, ST-MLST 11422, ST-MLST 9362, ST-MLST 1588 y ST-MLST 1599. El secuenciotipo más prevalente fue ST-MLST 9363 (47%, 8/17) seguido de ST-MLST 11422 (29. 4%, 5/17) y ST-MLST 9362 (11.7%, 2/17). Otros secuenciotipos detectados fueron el ST-MLST 1588 (n=1) y el ST-MLST 1599

(n=1). Los aislados sensibles y resistentes correspondientes a los pacientes A y B presentaron diferentes secuenciotipos.

n	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	<i>MLST</i>
GON_1	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_2	59	39	67	158	148	71	65	1588
GON_3	109	39	67	238	148	153	133	11422
GON_4	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_5	109	39	67	238	148	153	133	11422
GON_6	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_7	126	39	67	238	147	153	133	9362
GON_8	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_9	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_10	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_11	109	39	67	238	148	153	133	11422
GON_12	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_13	109	39	67	238	148	153	133	11422
GON_14	126	39	67	238	148	153	133	9363
GON_15	59	39	67	157	148	153	65	1599
GON_16	109	39	67	238	148	153	133	11422
GON_17	126	39	67	238	147	153	133	9362

Tabla 11. Análisis de 7 genes conservados y asignación de alelos Se obtuvieron 119 alelos y a todos los aislados se les asignó un ST-MLST.

Los aislados sensible y resistente del paciente A presentaron el ST-MLST 1588 y el ST-MLST 11422, respectivamente. Los aislados sensible y resistente del paciente B presentaron el ST-MLST 1599 y el ST-MLST 11422, respectivamente. El NG-MAST se determinó analizando la secuencia de dos 2 genes altamente polimórficos, *porB* y *tbpB*. Los aislados estudiados por NG-MAST mostraron siete secuenciotipos diferentes, NG-MAST 3935, 6765, 19762, 338, 5802, 20379 y 11461 siendo NG-MAST 3935 el más prevalente (47%, 8/17), NG-MAST 6765 (11.7%,

2/17), NG-MAST 19762 (11.7%, 2/17), NG-MAST 338 (n=1), NG-MAST 5802 (n=1), NG-MAST 20379 (n=1), y NG-MAST 11461 (n=1).

En la tabla 12 se muestran los secuenciotipos obtenidos para cada aislado.

El aislado NG.9 presentó una nueva combinación de alelos por lo que está pendiente de asignación de NG MAST ST. Los aislados sensible y resistente del paciente A presentaron el NG-MAST 338 y el NG-MAST 3935, respectivamente. Los aislados sensible y resistente del paciente B presentaron el NG-MAST 11461 y el NG-MAST 3935, respectivamente.

n	NG-MAST	<i>porB</i>	<i>tbpB</i>
GON_1	3935	908	29
GON_2	338	90	121
GON_3	5802	3373	29
GON_4	20379	11948	29
GON_5	3935	908	29
GON_6	3935	908	29
GON_7	19762	7738	1867
GON_8	3935	908	29
GON_9			29
GON_10	6765	2078	29
GON_11	3935	908	29
GON_12	6765	2078	29
GON_13	3935	908	29
GON_14	3935	908	29
GON_15	11461	6720	188
GON_16	3935	908	29
GON_17	19762	7738	1867

Tabla 12. Asignación de NG-MAST. Alelos de los genes hipervariables *porB* y *tbpB*

Para calcular el NG-STAR se obtuvieron los alelos de los genes *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC* y *23S* (ver tabla 13). El NG-STAR se determinó en los 17 aislados obteniéndose dos secuenciotipos, el NG-STAR 193 (13/14) y en NG-STAR 520 (1/14). Los aislados correspondientes al paciente B mostraron diferente NG-STAR (el aislado sensible a azitromicina el NG-STAR 520 y el aislado resistente el NG-STAR 193) En tres aislados no se obtuvo ningún secuenciotipo dado que la combinación de alelos no tenía asignado un número de ST.

n	<i>penA</i>	<i>mtrR</i>	<i>porB</i>	<i>ponA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>23S</i>	NG-STAR
GON_1	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_2	228	261	13	1	7	3	100	
GON_3	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_4	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_5	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_6	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_7	166	1	100	100	7	3	100	
GON_8	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_9	166	39	100	100	7	100	100	
GON_10	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_11	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_12	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_13	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_14	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_15	294	130	3	100	100	2	100	520
GON_16	166	39	11	100	100	100	100	193
GON_17	1526	1	100	100	7	3	100	

Tabla 13. Análisis de los genes *penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC* y *23S* Cada aislado obtiene un número de alelo para el gen estudiado. En tres aislados la combinación de alelos hallada no existía en la base de datos consultada.

Los secuenciotipos MLST, NG-MAST y NG-STAR de los aislados estudiados se muestran en la tabla 14.

Nº	TIPO MUESTRA	AZM ^e (mg/L)	CIP ^f (mg/L)	CRO ^g (mg/L)	PEN ⁱ (mg/L)	NG-MAST	MLST	NG-STAR	G ^j
1	U ^a	2	0.016	0.006	0.38	3935	9363	193	G3935
3	U	2	0.023	0.006	0.25	5802	11422	193	G3935
4	E ^b	3	0.023	0.016	0.38	20379	9363	193	G3935
5*	R ^c	2	0.016	0.008	0.5	3935	11422	193	G3935
6	F ^d	4	0.016	0.006	0.5	3935	9363	193	G3935
7	U	2	3	0.003	0.19	19762	9362		
8	U	2	0.016	0.023	0.5	3935	9363	193	G3935
9	U	2	0.19	0.003	0.19		9363		
10	E	3	0.016	0.006	0.38	6765	9363	193	G3935
11	R	3	0.016	0.008	0.5	3935	11422	193	G3935
12	U	3	0.016	0.016	0.75	6765	9363	193	G3935
13	R	2	0.023	0.016	0.38	3935	11422	193	G3935
14	R	2	0.016	0.023	0.5	3935	9363	193	G3935
16**	R	2	0.023	0.006	0.75	3935	11422	193	G3935
17	R	2	4	0.012	0.38	19762	9362		
2*	R	0.064	4	0.006	3	338	1588		
15**	R	0.125	0.004	0.004	0.125	11461	1599	520	

Tabla 14. Sensibilidad antibiótica y epidemiología molecular de *N. gonorrhoeae* (n=17). *Paciente A con un aislado sensible y un aislado resistente a azitromicina; **Paciente B con un aislado sensible y un aislado resistente a azitromicina; ^a Uretral; ^b Endocervical; ^c Rectal; ^d Faringeo; ^e azitromicina; ^f ciprofloxacina; ^g ceftriaxona; ^h doxiciclina; ⁱ penicilina; ^j genogrupo.

La relación filogenética de los distintos aislados en base al *core genome* se muestra en la figura 5. Las cepas resistentes a azitromicina se agruparon en cuatro clados distintos, que en general se correlacionaron con los secuenciotipos de MLST. Las cepas pertenecientes al ST-9363 se separaron en dos clados (véase anexo 3). Uno de ellos incluyó cuatro cepas con menos de 33 SNPs de diferencia entre ellas por lo que se consideraron estrechamente relacionadas; NG-6 y NG-14 fueron las más

parecidas con 11 SNPs distintos (véase anexo 4). Las dos cepas pertenecientes al MLST ST-9362 presentaron 49 SNPs de diferencia entre ellas; el clado donde se agruparon presentó una mayor distancia filogenética respecto a los MLST ST- 9363 y ST-11422.

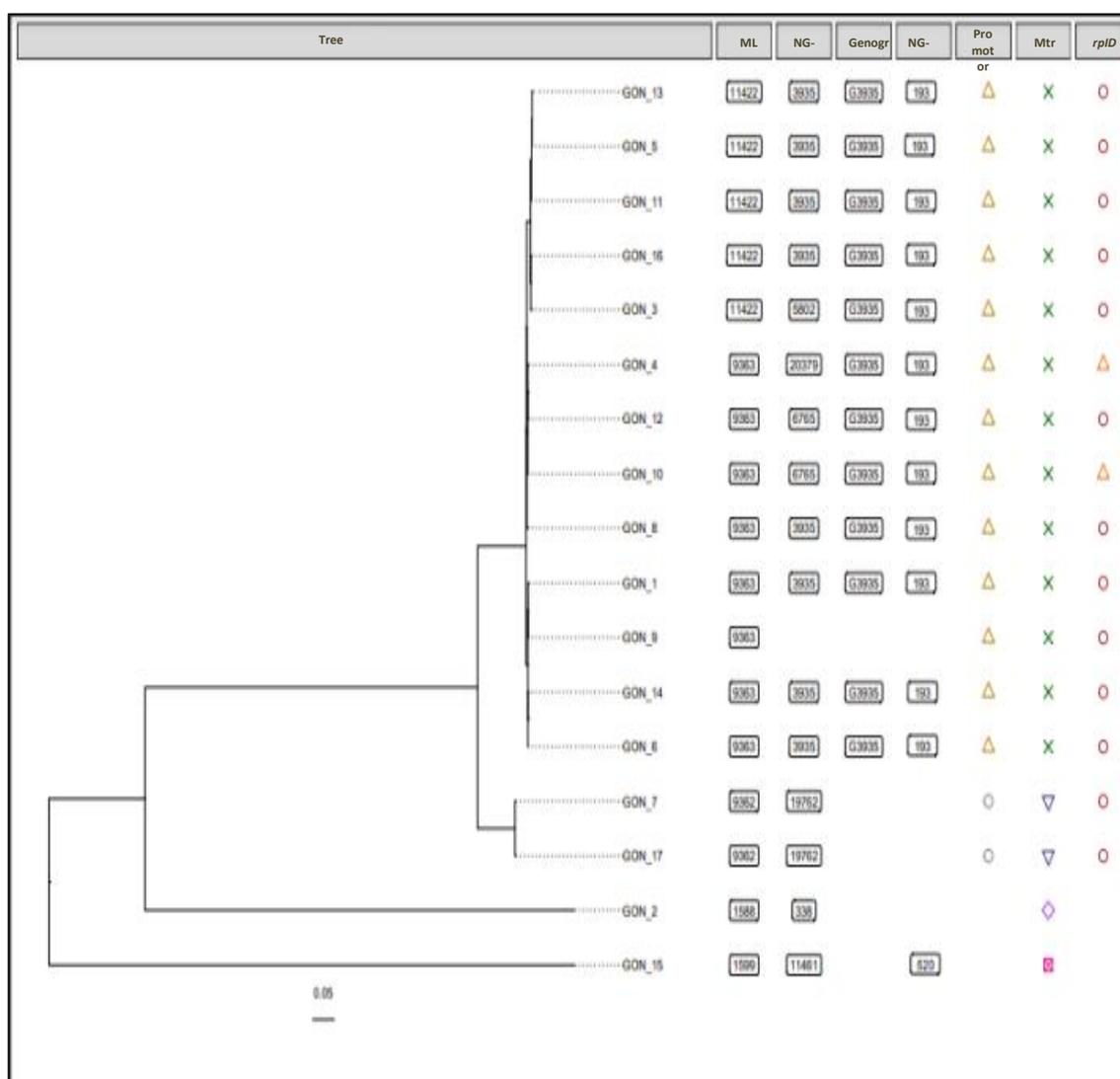


Figura 5 Árbol filogenético. En la figura se observa la distancia entre los aislados, los secuenciotipos MLST, NG-MAST, NG-STAR y el genogrupo asignados a cada aislado. Adicionalmente se detallan los determinantes moleculares de resistencia a macrólidos, gen *mtrR* y su promotor y el gen *rplD*, detectados en cada aislado.

4.7. Determinantes moleculares de resistencia a macrólidos.

Se realizó WGS en 15 aislados de gonococo resistentes a azitromicina. Se incluyeron también dos aislados sensibles a azitromicina en dos de los pacientes con aislados posteriormente resistentes (pacientes A y B). Las secuencias obtenidas se depositaron en Genbank con el Bioproject accesión PRJNA897110 y los números de acceso para cada secuencia: SRR22163953, SRR22163952, SRR22163951, SRR22163950, SRR22163948, SRR22163945, SRR22163949, SRR22163946, SRR22163947, SRR22163944, SRR22163943, SRR22163942, SRR22163941, SRR22163940, SRR22163939, SRR22163938, SRR22163937.

Se analizaron los determinantes moleculares de resistencia a macrólidos, quinolonas, y betalactámicos incluyendo los genes *23S rRNA*, *mtrR* y su promotor, *rpID*, *rpIV*, *mef* (A/B), el promotor de la bomba de eflujo MacAB y *erm* (A/B/C/F), *gyrA* y *parcC*, *penA*, *porB* y *ponA*.

4.7.1 Gen 23S rRNA.

Se analizaron los cuatro alelos del gen 23 S *rRNA* en los 15 aislados resistentes a azitromicina y en dos aislados sensibles. Ninguno de los aislados estudiados presentó mutaciones asociada a resistencia a macrólidos en el dominio V del gen *23S rRNA*. Se detectaron mutaciones en los dominios I y/o II en siete de los aislados estudiados (tabla 15).

4.7.2. Proteínas ribosomales L4 y L22 (*rpID-rpIV*)

Las sustituciones aminoacídicas en la proteína ribosomal L4 se muestran en la tabla 16. Los aislados resistentes presentaron tres sustituciones aminoacídicas, V125A, A147G y R157Q; los aislados NG-4 y NG-10 también presentaron la sustitución G70D. Ninguno de los aislados analizados presentó mutaciones en el determinante *rpIV*.

N°	MLST	23S_1	23S_2	23S_3	23S_4
NG-1	9363	C695T	C695T	C695T	C695T
NG-2	1588	C695T, C933T	C695T, C933T	C695T, C933T	C695T, C933T
NG-3	11422	WT	WT	WT	WT
NG-4	9363	WT	WT	WT	WT
NG-5	11422	WT	WT	WT	WT
NG-6	9363	C695T	C695T	C695T	C695T
NG-7	9362	WT	WT	WT	WT
NG-8	9363	WT	WT	WT	WT
NG-9	9363	C695T	C695T	C695T	C695T
NG-10	9363	A948G	A948G	A948G	A948G
NG-11	11422	WT	WT	WT	WT
NG-12	9363	WT	WT	WT	WT
NG-13	11422	WT	WT	WT	WT
NG-14	9363	C695T	C695T	C695T	C695T
NG-15	1599	G262A, C695T	G262A, C695T	G262A, C695T	G262A, C695T
NG-16	11422	WT	WT	WT	WT
NG-17	9362	WT	WT	WT	WT

Tabla 15. Sustituciones aminoacídicas detectadas en las cuatro copias del gen 23S rRNA y secuenciotipo MLST de aislados de *N. gonorrhoeae*. WT: wild type.

N° aislado	MLST	<i>rpID</i>
NG-1	9363	V125A, A147G, R157Q
NG-2	1588	WT
NG-3	11422	V125A, A147G, R157Q
NG-4	9363	G70D, V125A, A147G, R157Q
NG-5	11422	V125A, A147G, R157Q
NG-6	9363	V125A, A147G, R157Q
NG-7	9362	V125A, A147G, R157Q
NG-8	9363	V125A, A147G, R157Q
NG-9	9363	V125A, A147G, R157Q
NG-10	9363	G70D, V125A, A147G, R157Q
NG-11	11422	V125A, A147G, R157Q
NG-12	9363	V125A, A147G, R157Q
NG-13	11422	V125A, A147G, R157Q
NG-14	9363	V125A, A147G, R157Q
NG-15	1599	WT
NG-16	11422	V125A, A147G, R157Q
NG-17	9362	V125A, A147G, R157Q

Tabla 16. Secuenciotipo MLST y sustituciones aminoacídicas en el gen *rpID*. WT: wild type.

4.7.3. Gen *mtrR*

El aislado NG-2 presentó dos inserciones, la primera de ellas de quince nucleótidos detrás del ATG inicial. La segunda inserción de dos citosinas a partir de la posición 384 produjo un cambio en la pauta de lectura con la formación de un codón stop en la posición 532 (TGA) motivo por el cual se formó una proteína truncada de 149 aminoácidos. (Figura 6)

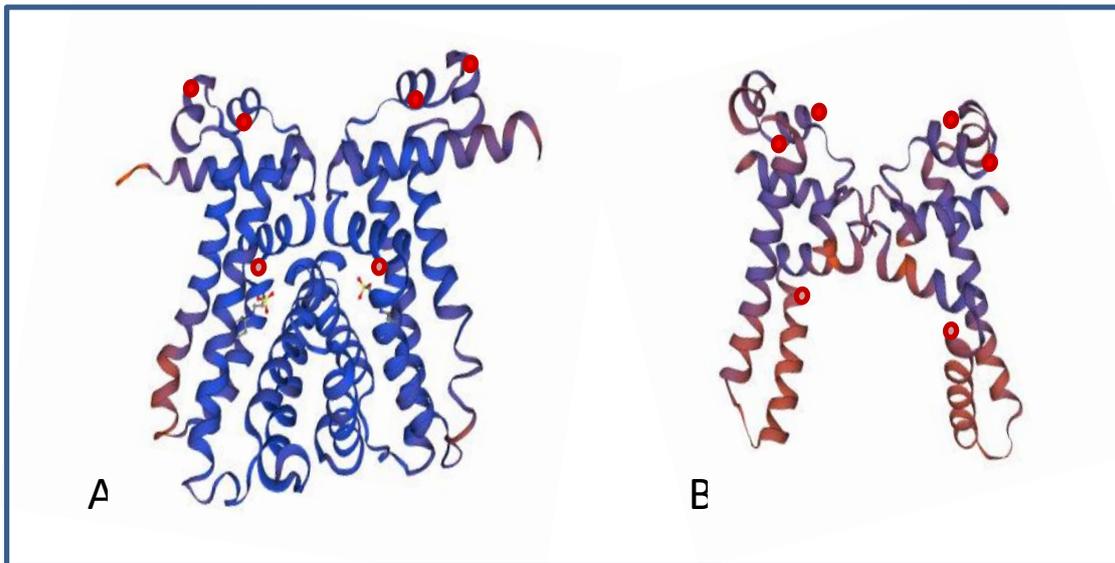


Figura 6. Modelo de la estructura dimérica del represor MtrR. A) MtrR *wild-type* en la cepa NG-6; B) Estructura mutada (149 aminoácidos) cepa NG-2. En rojo se indican las posiciones del dominio de unión al promotor (39 y 45). En naranja se muestra la posición H105.

Los cambios aminoacídicos detectados se muestran en la tabla 17. Las sustituciones D79N, S183N, M197I se observaron en los aislados resistentes a azitromicina que pertenecían al MLST ST-9363 y ST-11422. La sustitución H105Y se observó en los dos aislados pertenecientes al MLST ST-9362. Los dos aislados sensibles a azitromicina (NG-2 y NG-15) presentaron la sustitución A39T; adicionalmente el aislado NG-15 presentó la sustitución Y48D y S183N.

4.7.4. Promotor *mtrR*.

Las mutaciones observadas en el promotor *mtrR* se muestran en la figura 7. Los dos aislados sensibles a azitromicina (NG-2 y NG-15) no presentaron ninguna mutación en la región promotora del *mtrR*. En los aislados resistentes a azitromicina se detectaron diversos cambios (mutaciones y deleciones) en el promotor del gen *mtrR*. La deleción de A disminuyendo el espacio entre las cajas -10 y -35 se observó en los dos aislados pertenecientes al MLST ST-9362. Los aislados pertenecientes al MLST ST-9363 y ST-11422 presentaron una mutación (A→C) entre las cajas -10 y -35 del promotor y una mutación de (G→A) en la caja -35.

N° aislado	MLST	<i>mtrR</i>
GON_1	9363	D79N, S183N, M197I
GON_2	1588	A39T truncada
GON_3	11422	D79N, S183N, M197I
GON_4	9363	D79N, S183N, M197I
GON_5	11422	D79N, S183N, M197I
GON_6	9363	D79N, S183N, M197I
GON_7	9362	H105Y
GON_8	9363	D79N, S183N, M197I
GON_9	9363	D79N, S183N, M197I
GON_10	9363	D79N, S183N, M197I
GON_11	11422	D79N, S183N, M197I
GON_12	9363	D79N, S183N, M197I
GON_13	11422	D79N, S183N, M197I
GON_14	9363	D79N, S183N, M197I
GON_15	1599	A39T, Y48D y S183N.
GON_16	11422	D79N, S183N, M197I
GON_17	9362	H105Y

Tabla 17. Sustituciones aminoacídicas detectadas en el gen *mtrR*.
 Todos los aislados estudiados presentan sustituciones aminoacídicas.

Nº aislado	Promotor <i>mtrR</i>			<i>mtrR</i>	23S	<i>prfD</i>	Azitromicina CIM (mg/L)
	Del A ^a	A→C ^b	G→A ^c				
1		✓	✓	D79N S183N M197I	C695T	V125A A147G R157Q	2
2				A39T Truncada	C695T C933T	WT	0.064
3		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	V125A A147G R157Q	2
4		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	G70D V125A A147G R157Q	3
5		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	V125A A147G R157Q	2
6		✓	✓	D79N S183N M197I	C695T	V125A A147G R157Q	4
7	✓			H105Y	WT	V125A A147G R157Q	2
8		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	V125A A147G R157Q	2
9		✓	✓	DD79N S183N M197I	C695T	V125A A147G R157Q	2
10		✓	✓	D79N S183N M197I	A948G	G70D V125A A147G R157Q	3
11		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	V125A A147G R157Q	3
12		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	V125A A147G R157Q	3
13		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	V125A A147G R157Q	2
14		✓	✓	D79N S183N M197I	C695T	V125A A147G R157Q	2
15				A39T Y48D S183N	G262A C695T	WT	0.125
16		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	V125A A147G R157Q	2
17	✓			H105Y	WT	V125A A147G R157Q	2

Tabla 18 Determinantes de resistencia a macrólidos presentes en los aislados estudiados.

Se detectaron sustituciones aminoacídicas en las cuatro copias del gen 23S rRNA.

^a deleción A; ^b sustitución de C por A, ^c Sustitución de A por G.

4.8. Determinantes de resistencia a quinolonas.

Los determinantes de resistencia a quinolonas *gyrA* y *parC* se analizaron en los 15 aislados de gonococo resistentes a azitromicina. Se incluyeron también dos aislados sensibles a azitromicina correspondientes a dos de los pacientes con aislados posteriormente resistentes (pacientes A y B).

4.8.1. *gyrA*.

Las sustituciones aminoacídicas halladas en la girasa se muestran en la tabla 19. Al estudiar el determinante *gyrA* se observó que los aislados resistentes a quinolonas presentaron dos sustituciones aminoacídicas, S91F y D95A. Cinco aislados sensibles a quinolonas presentaron la sustitución R318H.

4.8.2. *parC*.

Se analizó el determinante *parC*. Las sustituciones aminoacídicas detectadas se observan en la tabla 196. Todos los aislados, excepto la NG-15, presentaban la sustitución F479L. La sustitución S87R se detectó en los aislados resistentes a quinolonas (NG-2, NG-7 y NG-17). La sustitución V435A se detectó en un aislado sensible y en un aislado resistente a quinolonas (NG-15 y NG-2, respectivamente) Las sustituciones V384I, V596I y V740A se detectaron en aislados sensibles a quinolonas.

N aislado	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	CIP (mg/L)	MLST	NG-STAR	Genogrupo
NG-1	WT	F479L	0.016	9363	193	G3935
NG-2	S91F, D95A	S87R, V435A, F479L	4	1588	193	G3935
NG-3	R318H	F479L	0.023	11422	193	G3935
NG-4	WT	F479L, V740A	0.023	9363	193	G3935
NG-5	R318H	F479L	0.016	11422	193	G3935
NG-6	WT	F479L	0.016	9363		
NG-7	S91F, D95A	S87R, F479L	3	9362	193	G3935
NG-8	WT	F479L	0.016	9363		
NG-9	S91F, D95A	F479L	0.19	9363	193	G3935
NG-10	WT	F479L	0.016	9363	193	G3935
NG-11	R318H	F479L	0.016	11422	193	G3935
NG-12	WT	F479L	0.016	9363	193	G3935
NG-13	R318H	F479L	0.023	11422	193	G3935
NG-14	WT	F479L,	0.016	9363	193	G3935
NG-15	WT	V384I, V435A, V596I,	0.004	1599		
NG-16	R318H	F479L	0.023	11422		
NG-17	S91F, D95A	S87R, F479L	4	9362	520	

Tabla 19. Determinantes de resistencia a quinolonas. Sustituciones aminoacídicas detectadas en *gyrA* y *parC*. Se resaltan en color las sustituciones que se asocian a la resistencia a quinolonas y las CIM de las cepas que presentan estas sustituciones. Todos los aislados presentan sustituciones aminoacídicas en *parC*. Se observa el secuenciotipo MLST, el NG_STAR y el Genogrupo. WT: *wild type*.

4.9. Determinantes de resistencia a betalactámicos

Se analizaron los determinantes de resistencia a betalactámicos en 17 aislados (15 resistentes a azitromicina y dos aislados sensibles a azitromicina de dos de los pacientes con aislados posteriormente resistentes, pacientes A y B). Se determinaron los genes *penA*, *porB* y *ponA*, así como la presencia de betalactamasas adquiridas.

4.9.1. PBP2 (gen *penA*).

El análisis del determinante *penA* reveló la existencia de un gen mosaico perteneciente al tipo XXVII en el aislado NG-17 que presentaba una CIM de 0.38 y 0.012 mg/L a penicilina y ceftriaxona, respectivamente (tabla 20). Los aislados restantes presentaron alelos no mosaico que correspondieron a los tipos IV, XIV y XIX (185).

Patrón <i>penA</i>	Nº aislado
XXVII Mosaico	NG-17
XIX No mosaico	NG-2
XIV No mosaico	NG-15
IV No mosaico	NG-1,3,4,5,6,8, 10,11,12,13, 14,16

Tabla N 20. Análisis de *penA*. Patrones de gen mosaico/no mosaico (185).

4.9.2. PBP1 (gen *ponA*).

El análisis de la PBP1 mostró la sustitución aminoacídica L421P en el aislado NG-2 que presentó una CIM de 3 mg/L y 0.006 mg/L para penicilina y ceftriaxona, respectivamente. Los aislados restantes no mostraron sustituciones en este determinante y se consideraron *wild type*.

4.9.3. Porina PorB.

El determinante *porB* fue analizado en los 17 aislados estudiados. Se detectaron un total de 47 sustituciones aminoacídicas que se distribuyeron en tres patrones distintos según el aislado (Tabla 21). Los cambios aminoacídicos en las posiciones G120K/A121N que se asocian a resistencia a penicilina, se observaron en el patrón I y se detectaron en todas los aislados pertenecientes al MLST ST-11422 y ST-9363 excepto en el aislado NG-9; los valores de CIM a penicilina fueron entre 0.25 y 0.75 mg/L. Los cinco aislados restantes no presentaron sustituciones aminoacídicas en estas posiciones. No se detectaron cambios aminoacídicos en la porina del aislado NG-2 por lo que no se le asignó ningún patrón.

Patrón	PorB			Nº aislado
I	E48G* G120K Y131F* E134N* F135V* K140G* R143Q	A151V G190N* I21M* T260A V261M A263G A276V*	L283V* S296T* H298D* S299D D301N Y302H E337D*	1,3,4,5,6,8, 10,11,12,13, 14,16
II	E38G	S262R*	V109T	7,9,17
III	A121S N122K R143E	G257Q T260L	W261V A263D	15

Tabla 21. Patrones de sustituciones aminoacídicas detectadas en la porina PorB. Se muestran las sustituciones mayoritarias detectadas en los aislados estudiadas. *Las sustituciones marcadas con un asterisco incluyen también el aislado 15. No se incluyeron las sustituciones únicas o dobles en un solo aislado. NG-3 F135M, NG-4 E211K, I220M, NG-9 T89S, NG-10 R40W. El aislado NG-2 se consideró *wild type*.

En la tabla 22 se resumen los determinantes de resistencia a betalactámicos detectados por WGS en los aislados estudiados.

4.9.4. Betalactamasas adquiridas.

No se detectaron betalactamasas adquiridas en las cepas resistentes a azitromicina caracterizadas a nivel molecular. De las dos cepas sensibles a macrólidos, se detectó una betalactamasa TEM-1 en la cepa NG-2, con resistencia a penicilina (CIM 3 mg/L) y sensible a ceftriaxona.

Nº aislado	Promotor <i>mtr</i>			<i>mtr</i>	<i>ponA</i>	<i>penA</i>	<i>porB</i>	PEN (mg/L)	CTX (mg/L)
	Del AΦ	A→C	G→A						
1		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.38	0.006
2				A39T Truncada	L421P	XIX No mosaico		3	0.006
3		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.25	0.006
4		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.38	0.016
5		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.5	0.008
6		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.5	0.006
7	✓			H105Y	WT	IV No mosaico		0.19	0.003
8		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.5	0.023
9		✓	✓	DD79N S183N M197I	WT	IV No mosaico		0.19	0.003
10		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.38	0.006
11		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.50	0.008
12		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.75	0.016
13		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.38	0.016
14		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.5	0.023
15				A39T Y48D S183N	WT	XIV No mosaico		0.125	0.004
16		✓	✓	D79N S183N M197I	WT	IV No mosaico	G120K/A 121N	0.75	0.006
17	✓			H105Y	WT	XXVII Mosaico	G120K/A 121N	0.38	0.012

Tabla 22. Determinantes de resistencia a betalactámicos. Aislados de *N. gonorrhoeae* que presentan cambios (delecciones/sustituciones/mutaciones).

5. Discusión

5.1. *Mycoplasma genitalium*.

La implementación de las TAAN en el diagnóstico de ITS en los laboratorios de microbiología clínica supuso un gran avance. Con la incorporación de una TAAN que incluía *M. genitalium* en nuestro laboratorio, se comenzó a detectar esta bacteria que hasta el momento no era contemplada en el diagnóstico sintomático habitual. En este contexto, surgió la necesidad de trabajar conjuntamente con los médicos de cabecera que derivaban muestras a nuestro centro para dar una respuesta efectiva a esta infección. Por un lado, fue necesario dar la formación en cuanto a las patologías asociadas y las alternativas terapéuticas. Desde el laboratorio se recomendaba la terapia con azitromicina en pauta extendida, y solicitábamos una nueva muestra pasadas al menos tres semanas de finalizado el tratamiento para realizar el TOC. Por otro lado, se desconocía la tasa de infección por *M. genitalium* en nuestra área geográfica, hecho que motivó la realización del estudio que se presenta. Posteriormente, los fallos terapéuticos observados, motivaron el estudio de la cohorte prospectiva para conocer las posibles mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos.

Las tasas de infección por *M. genitalium* han comenzado a conocerse en la última década debido a la incorporación de TAAN multiplex en la rutina. Las tasas reportadas en los estudios son muy variables hecho que puede atribuirse a diferentes factores como el diseño del estudio, el tipo de población objeto del estudio (población general, HSH, diferentes grupos de edad, etc.) y a la variación geográfica (77). En el presente estudio se analizaron muestras de población general, considerada de bajo riesgo en la transmisión de ITS. Incluían una mayor proporción de mujeres que de hombres, las cuales acudían al control ginecológico anual y por ello eran mayoritariamente asintomáticas. En el presente estudio, la prevalencia general de infección por *M. genitalium* (3.4%) fue similar al de la cohorte prospectiva de un año (3.7%) con una tasa global de infección mayor en hombres que en mujeres. Estos valores fueron similares a otros estudios realizados en España y en el resto de Europa también en población general que incluían mayoritariamente pacientes de atención primaria (186-192). Estos datos en

población general contrastan con estudios realizados en grupos de alto riesgo. En este contexto, tasas de infección del 10% se reportaron en un estudio realizado en el área metropolitana de Barcelona, que incluía población de alto riesgo, principalmente hombres sintomáticos y contactos de pacientes con ITS (75). Así mismo tasas similares fueron reportadas en otros estudios realizados en países europeos, cuya población de alto riesgo incluían pacientes HSH (193-195).

La tasa de infección por *M. genitalium* en adolescentes y adultos jóvenes suele ser más alta que en otros grupos de edad lo que se asocia a una mayor actividad sexual en esta etapa de la vida (191, 196). En nuestro caso, se detectó una mayor frecuencia de la infección en los grupos de pacientes más jóvenes, siendo el grupo de 15 a 25 años el que presentaba las tasas más elevadas, coincidiendo con otros estudios realizados en España y en el resto de Europa (190,196,197). A medida que la edad de las pacientes del estudio aumentó, las tasas de infección disminuyeron, encontrándose diferencias significativas al analizar la edad de los pacientes con la tasa de infección por *M. genitalium*.

Las infecciones por *M. genitalium* pueden ser frecuentemente asintomáticas. Actualmente la guía europea de 2021 no recomienda la detección de *M. genitalium* en pacientes asintomáticos (19). Se considera que el riesgo del incremento de resistencias a antimicrobianos es mayor a las consecuencias de padecer una infección asintomática (19, 198). Este cambio de criterio respecto a las recomendaciones de 2016 fue posterior a la realización del presente estudio (68). En nuestra cohorte prospectiva se recomendó realizar el cribaje de ITS en la consulta anual ginecológica en mujeres sintomáticas y asintomáticas. A su vez se realizó una detección de *M. genitalium* a todos los hombres con sospecha de ITS, o que hubieran mantenido relaciones sexuales sin utilizar métodos barrera. El diseño experimental de nuestro estudio permitió determinar que la mitad de los pacientes de la cohorte presentaron infección asintomática por *M. genitalium* y correspondieron mayoritariamente a mujeres. Estos resultados contrastan con los del estudio de Van der Pol *et al.*, con una población similar a la de la cohorte prospectiva (198). Estos autores encontraron tasas superiores de infección por *M. genitalium* en pacientes sintomáticos en ambos sexos (198). En nuestro caso, la

intervención realizada en la cohorte prospectiva pudo haber contribuido a una mayor detección de la infección en pacientes asintomáticos.

El consejo terapéutico a los médicos de cabecera fue una práctica habitual en este estudio prospectivo, en el que se aconsejó la terapia con azitromicina en pauta extendida para el tratamiento de la infección por *M. genitalium*. A pesar de la evidencia científica, el régimen en pauta extendida no estaba recomendado en las guías clínicas europeas en el momento del estudio (199). Mas de la mitad de los pacientes recibieron tratamiento con azitromicina, principalmente en régimen extendido. En ese sentido, es posible que el consejo terapéutico puede haber influido en los tratamientos prescritos a los pacientes con infección por *M. genitalium*. Así mismo se recomendó la realización del TOC que resultó una herramienta efectiva en la detección de pacientes con fallo terapéutico. Cuando el TOC era positivo se contactaba nuevamente con el médico para recomendar el tratamiento con moxifloxacino.

Las coinfecciones son frecuentes en las ITS. Diversos estudios reportan la codetección de *M. genitalium* con otros agentes de ITS (189,190,200). En el presente estudio, *C. trachomatis* fue el agente de ITS más frecuentemente codetectado, tal como habían descrito anteriormente otros autores (192,201-203). La codetección *M. genitalium*-*C. trachomatis* fue mayor en mujeres que en hombres y más de la mitad fueron asintomáticas. Las ITS suelen presentarse de manera asintomática en las mujeres y por eso no suele prescribirse tratamiento empírico. Este hecho contrasta con la mayoría de los hombres, los cuales fueron clínicamente sintomáticos al acudir a la consulta. La carencia de tratamiento en las pacientes asintomáticas podría explicar la mayor prevalencia de codetecciones hallada.

M. genitalium se ha asociado también a disbiosis bacteriana (189,190,200). La asociación a disbiosis se observó en el 38.6% de los pacientes con infección por *M. genitalium*. A su vez, la alteración en el equilibrio de la microbiota comensal puede facilitar la adquisición de microorganismos causantes de ITS incluido *M. genitalium* (204). En el presente estudio la mitad de los pacientes que presentaron una codetección de *M. genitalium* con otro agente de ITS también presentaron microorganismos asociados a disbiosis.

La resistencia a azitromicina es debida a mutaciones en las posiciones A2058 y A2059 de la región V del gen 23S rRNA, gen que se halla en copia única en *M. genitalium*. Estas mutaciones se han asociado con el consumo previo de este antibiótico por otras infecciones, ya sean ITS o de otra índole (34). Se ha observado que el tratamiento con monodosis de azitromicina puede ser insuficiente para erradicar la infección por *M. genitalium* y puede favorecer la selección de cepas con mutaciones en los genes relacionados con la resistencia a macrólidos (205). En el presente estudio se detectaron 14 casos de infecciones por *M. genitalium* con cepas con mutaciones asociadas a macrólidos. La frecuencia de infección con cepas de *M. genitalium* resistentes a macrólidos fue del 12.6% en nuestra cohorte. Estos casos correspondieron a pacientes tratados con azitromicina excepto tres que habían recibido moxifloxacino como primera opción terapéutica.

Las mutaciones A2058G y A2059G son las más frecuentemente asociadas a resistencia de alto nivel a macrólidos en *M. genitalium* (206). La mutación A2058G fue la más prevalente en nuestra área geográfica, coincidiendo con lo descrito por Rivaya et al (76). Esto podría deberse a una posible diseminación clonal de cepas con la mutación A2058G aunque no se realizaron estudios de epidemiología molecular para determinar la clonalidad. La mayor prevalencia de la mutación A2058G detectada en el presente trabajo contrasta con otros estudios realizados en Catalunya y en otros países europeos, en los cuales la mutación A2059G fue la más prevalente o tenía una frecuencia similar a la mutación A2058G (189, 197, 207-211). Recientemente se ha descrito la emergencia de cepas de *M. genitalium* resistentes a macrólidos en pacientes asintomáticos como un fenómeno multiclonal (212). Así pues, este comportamiento alodémico contribuiría a la compleja dinámica de transmisión de cepas resistentes en las poblaciones. Descrita con elevada prevalencia en Holanda, el presente estudio describió la detección de la mutación A2058T en tres pacientes por primera vez en España (70, 71, 213). La frecuencia de detección de esta mutación en el estudio de Braam *et al.*, no se atribuyeron a un único brote clonal (213). La mutación A2058T fue detectada posteriormente y de manera minoritaria por otros autores en nuestra área geográfica y también en Galicia (76,197,189, 190).

Como se ha mencionado anteriormente, las recomendaciones actuales de las distintas guías de tratamiento no recomiendan realizar la detección de *M. genitalium* en pacientes asintomáticos excepto en las parejas de casos positivos (19,66,67). Esta recomendación se basa por un lado en el riesgo de prescribir tratamientos innecesarios debido a que la infección asintomática puede remitir de manera espontánea y se desconoce exactamente su contribución a la carga de complicaciones patológicas (214). Por otro lado, la recomendación pretende reducir la presión antibiótica para evitar el incremento de resistencias especialmente a macrólidos. A pesar de estas recomendaciones, algunos autores describen a los pacientes asintomáticos, especialmente en la población de hombres que tienen sexo con hombres, como reservorio de cepas resistentes tanto a macrólidos como a fluoroquinolonas (48, 214). En el presente estudio más de la mitad de los pacientes con cepas que presentaron mutaciones relacionadas a resistencia a macrólidos fueron asintomáticos. Si bien se desconocen los hábitos sexuales de los pacientes, existe el riesgo de transmisión de estas cepas resistentes también en los pacientes asintomáticos incrementando de este modo su reservorio. Las recomendaciones actuales están planteadas en países con altos niveles de resistencias con el fin de no llegar a una situación de infecciones por *M. genitalium* no tratables. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos en un área de baja prevalencia hacen replantear la aplicación de estas recomendaciones de manera tan drástica en todos los pacientes asintomáticos. El manejo terapéutico de estas infecciones asintomáticas es un reto puesto que existe una delgada línea entre el incremento de resistencias debido al tratamiento y el aumento de reservorio por carencia de tratamiento.

Las tasas de resistencia a macrólidos en *M. genitalium* muestran variabilidad geográfica y son altamente dependientes del grupo poblacional estudiado (77, 191). En el presente estudio se incluyeron muestras con solicitud de ITS procedentes de atención primaria incluidos ASSIR donde se atiende tanto población general como población de mayor riesgo para la adquisición de ITS. La frecuencia detectada de cepas con mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos fue inferior a un estudio realizado en Lleida (189) y tres veces menor a la de dos estudios realizados en Barcelona sobre población de alto riesgo (75, 197). Por el contrario, nuestros resultados fueron similares al de otros estudios europeos que incluyeron

principalmente muestras diagnósticas realizadas en la rutina (208,210, 215). Sin embargo, se observaron importantes variaciones en la tasa de resistencia a los macrólidos en un estudio que incluyó tres países escandinavos (216). A pesar de que las poblaciones analizadas tenían características similares, tales variaciones fueron atribuidas por los autores a las diferencias en las recomendaciones terapéuticas en las guías clínicas de cada país. Actualmente el tratamiento de elección de la uretritis no gonocócica en España se realiza con doxiciclina (100 mg cada 12 h durante 7 días por vía oral) (132). La segunda opción de tratamiento es la azitromicina en monodosis (1 g vía oral). A su vez, la guía incluye un apartado para el tratamiento de *M. genitalium* con azitromicina en pauta extendida (132). En el momento en que se realizó el presente estudio, la guía no incluía un apartado específico para el tratamiento de *M. genitalium* y el tratamiento con azitromicina en monodosis era habitual por su fácil dosificación. Se ha reportado que este régimen terapéutico se asocia a la aparición de mutaciones que confieren resistencia a macrólidos con mayor frecuencia que la pauta extendida con este antibiótico (217). El diseño experimental de nuestro trabajo no nos permitió corroborar esta afirmación. Sin embargo, la mitad de los pacientes que tenían cepas con mutaciones relacionadas con resistencia a macrólidos tuvieron antecedentes de infección previa por *M. genitalium*. Dada esta asociación significativa, estos pacientes podrían haber recibido macrólidos en el pasado. El tratamiento con macrólidos para otros fines (incluido el tratamiento de infecciones respiratorias) también podría haber contribuido a este tipo de mutaciones en *M. genitalium* (217). El TOC se considera actualmente la herramienta más útil para la detectar fracasos terapéuticos en infecciones por *M. genitalium*. En nuestra cohorte prospectiva, el TOC se realizó en 42% de los casos, de los cuales la quinta parte fueron positivos. Tras detectar cada uno de los diez fracasos terapéuticos se contactó nuevamente con sus médicos de cabecera y se recomendó citar a los pacientes para iniciar el tratamiento con moxifloxacino. Nueve de estos pacientes, seis de ellos inicialmente asintomáticos, estaban infectados con cepas de *M. genitalium* que tenían mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos por lo que el tratamiento recomendado no había sido eficaz para eliminar el microorganismo. El paciente restante estaba infectado con una cepa que no presentaba mutaciones asociadas, pero había sido tratado con doxiciclina, antibiótico que suele mostrar una alta

prevalencia de fracaso terapéutico si se da en monoterapia (72). Nuestros resultados respaldan la utilidad del TOC para detectar los fallos terapéuticos en el seguimiento de los casos con infección por *M. genitalium* y para prevenir la diseminación de cepas resistentes a macrólidos. A pesar de esto, hay autores que sugieren no realizar el TOC cuando, una vez finalizado el tratamiento, los pacientes están asintomáticos ya que la prescripción de nuevo tratamiento podría favorecer la emergencia de resistencias no solo a macrólidos sino también a fluoroquinolonas (218). Cabe señalar que no siempre es posible realizar el TOC debido al requerimiento de nuevas visitas médicas. En estos casos, una opción alternativa y conveniente para evitar el fracaso terapéutico es la disponibilidad de herramientas moleculares para la detección de resistencia a macrólidos en la rutina del laboratorio (74, 75).

El presente estudio tiene varias limitaciones. Se recopilaron datos epidemiológicos y clínicos de todos los pacientes incluidos en la cohorte prospectiva mediante la encuesta clínica, pero algunos datos relevantes como la orientación sexual de los pacientes o sus hábitos sexuales no pudieron ser recopilados en la mayoría de los casos. No se pudo disponer de todas las cepas de *M. genitalium* para realizar el estudio molecular por lo que la frecuencia de resistencia a macrólidos en nuestra cohorte podría no ser exacta. Dado que en nuestra área geográfica no existían datos sobre las frecuencias de infección y de resistencia a macrólidos, no se pudo determinar si la intervención de asesoramiento terapéutico pudo haber contribuido de alguna manera a modificar los datos de resistencia.

La diseminación de cepas de *M. genitalium* resistentes es un problema de salud pública mundial. Nuestros resultados respaldan la contribución del uso previo de macrólidos en la aparición de cepas resistentes. Por otro lado, dada la dificultad de realizar el TOC en todos los pacientes con infección por *M. genitalium*, la incorporación de la detección de resistencia a macrólidos en las pruebas de detección de *M. genitalium* debería realizarse rutinariamente

5.2. *Neisseria gonorrhoeae*.

La emergencia de resistencia a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de *N. gonorrhoeae* ha generado una alarma mundial por su impacto en salud pública. Las guías de tratamiento empírico deben ser actualizadas periódicamente en base a los datos de resistencias y a nuevas evidencias científicas. Por esta razón, la OMS considera a este microorganismo prioritario y aconseja la vigilancia activa frente a la aparición de resistencias antibióticas. En este contexto, el objetivo de la presente tesis fue caracterizar los clones de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina circulantes en nuestra área de influencia.

5.2.1. Sensibilidad a los antibióticos en *N. gonorrhoeae*.

Los betalactámicos presentan un efecto bactericida frente a *N. gonorrhoeae* (153). Las infecciones causadas por gonococo solían tratarse con penicilina históricamente (153). Sin embargo, el incremento de cepas con resistencia debido especialmente a la presencia de betalactamasas, ha propiciado que este antibiótico haya dejado de ser efectivo en la actualidad en muchas áreas geográficas y no se considere tratamiento de elección (219, 220). Por ello la OMS recomienda que las pautas de tratamiento deberían modificarse en aquellos lugares donde la resistencia sea mayor al 5% (220). En el presente estudio, la resistencia a penicilina fue del 14.2%, siendo la mayoría de aislados (82.2%) categorizados como sensibles con exposición aumentada. Estos resultados de resistencia a penicilina son similares a otros estudios realizados en nuestro entorno por lo que este antibiótico ha dejado de ser considerado de elección (166, 221).

El tratamiento de la gonorrea no complicada se realiza con ceftriaxona y azitromicina (1, 132). Desde la descripción de la primera cepa resistente a ceftriaxona, se han reportado cepas resistentes en todo el mundo, incluyendo Europa y también en nuestro entorno (149,152, 222). En el presente estudio no se detectaron cepas resistentes a ceftriaxona. Todos los aislados se categorizaron como sensibles según EUCAST. Sin embargo, el 11.6% de las cepas presentaron una CIM de ceftriaxona por encima del ECOFF por lo que se consideraron con sensibilidad disminuida al categorizarse como *no-wild type*. Estos resultados de

sensibilidad disminuida a la ceftriaxona son similares a los obtenidos en un estudio multicéntrico a nivel español (221).

La azitromicina es el tratamiento más frecuente en el tratamiento de las ITS (153). En el caso del gonococo se ha observado una disminución progresiva de su sensibilidad. El uso previo de azitromicina y la diseminación clonal pueden contribuir a la disminución de la sensibilidad a este antibiótico (223). Estudios previos realizados en Barcelona reportaron la emergencia de resistencia a azitromicina en cepas de gonococo durante la última década (224, 225), describiendo las primeras cepas con alto nivel de resistencia en 2016 (222, 224). En el presente estudio se detectaron 15 cepas con resistencia de bajo nivel a azitromicina que posteriormente se caracterizaron por WGS. La resistencia a azitromicina fue del 11%, frecuencia similar a la reportada en un estudio multicéntrico español en el cual se describe una gran variabilidad geográfica y temporal (221). Sin embargo, la frecuencia de resistencia a azitromicina detectada contrasta con los estudios previos realizados en nuestra área geográfica entre 2013 y 2018 en los que la resistencia era del 2.6-3.7% (224, 225, 226). Un incremento sostenido de la resistencia a azitromicina se ha observado a nivel europeo desde 2017 (222). La mayor frecuencia observada en nuestro estudio realizado entre 2019 y 2022 podría ser debida a la diseminación de nuevos clones.

La evidencia de la emergencia de resistencia a cefalosporinas de tercera generación detectada en determinadas áreas geográficas ha propiciado que la OMS incluya la terapia dual dentro de las recomendaciones de tratamiento (220). Se han descrito casos de gonorrea con fracasos terapéuticos con ceftriaxona, e incluso con el tratamiento combinado con azitromicina (227, 228). La resistencia dual a ceftriaxona y azitromicina se ha reportado en los últimos años, aunque de manera poco frecuente (228 - 232). En el presente estudio no se detectaron aislados con resistencia dual.

Las quinolonas solo se recomiendan como tratamiento de primera línea cuando se conoce el resultado del antibiograma debido a las elevadas frecuencias de resistencia conocidas (1, 233). A nivel europeo, las frecuencias de resistencia a ciprofloxacino se han mantenido alrededor del 50% desde 2011, observándose un incremento progresivo a partir de 2017 (222). En el presente estudio se detectó una

resistencia a fluoroquinolonas del 66.8%, cifra superior a la descrita en otros estudios previos realizados a nivel español (224). La co-resistencia de azitromicina y quinolonas fue frecuente, especialmente en cepas con una CIM a azitromicina de 1.5 mg/L. Solo tres de las 15 cepas con una CIM a azitromicina ≥ 2 mg/L fueron resistentes a ciprofloxacino. De estas cepas multirresistentes, los dos aislados con las CIM de ciprofloxacino más elevadas (3-4mg/L) pertenecieron al mismo clon ST-9362.

5.2.2. Epidemiología de las cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina.

La vigilancia de los clones circulantes de *N. gonorrhoeae* ha adquirido especial relevancia con la emergencia de cepas resistentes a los tratamientos de elección. La caracterización molecular de los aislados resistentes a azitromicina incluidos en el presente estudio mostró escasa diversidad, especialmente mediante el esquema MLST. La relación filogenética en base al *core genome* mostró que las cepas resistentes a azitromicina se agruparon en cuatro clados distintos, que incluían en general cepas estrechamente relacionadas. Estos clados se correlacionaron con los secuenciotipos de MLST, tal como han descrito otros autores (130). Sin embargo, las cepas pertenecientes al ST-9363 se separaron en dos clados, uno de los cuales con menos de 33 SNPs de diferencia entre las distintas cepas.

En los aislados resistentes a azitromicina se obtuvieron tres MLST distintos, de los cuales el ST-9363 fue el mayoritario, seguidos del ST-11422 y del ST-9362, ambos secuenciotipos son variantes en un único locus respecto al primero (234). De los diversos linajes del clon ST-9363, el linaje europeo emergió a mediados de la década de 1970 para diseminarse posteriormente a América y Oceanía (234). Recientemente los mismos autores describieron la adquisición de variantes alélicas en el gen *mtrR* y en su promotor ocurrida en este clon ya durante este milenio, hecho que contribuiría a la expansión clonal de un subgrupo con sensibilidad disminuida a la azitromicina (234). El ST-9363 es actualmente el clon asociado a bajo nivel de resistencia a la azitromicina predominante en Estados Unidos, Canadá y Australia (161, 234, 235). El clon ST-9363 fue reportado de manera ocasional en algunos países a nivel europeo en una colección de cepas incluidas en Euro-GASP

hasta 2014 (236). El predominio del subgrupo de este clon asociado a resistencia a azitromicina se ha descrito recientemente en Austria (237). En España se ha descrito el aislamiento de cepas de este clon asociadas tanto a cepas con bajo nivel de resistencia a azitromicina como en cepas con alto nivel (221, 238). Nuestros resultados respaldan la diseminación clonal del ST-9363 asociado a resistencia de bajo nivel a azitromicina en nuestro entorno.

Los esquemas NG-MAST y NG-STAR describen mejor la diversidad genética en las poblaciones de gonococo (130). El NG-MAST realiza la caracterización de los alelos de dos genes con regiones hipervariables (*porB* y *tbpB*). En el presente estudio el NG-MAST predominante en los aislados resistentes a azitromicina fue el ST-3935, detectado solo en aislados pertenecientes a los MLST ST9363 y ST-11422 y coincidiendo con los hallazgos descritos anteriormente por Thomas *et al.* (234). El secuenciotipo NG-MAST ST-3935 (mayoritariamente MSLT ST-9363 o ST-11422, y NG STAR ST-193) fue el segundo en frecuencia detectado tras el clon emergente NG-MAST ST-12302 en un estudio realizado en el marco de Euro-GASP en 2018 (239). Con menor frecuencia se detectaron otros NG-MAST (ST-5802, ST-6765 y ST-20379) pertenecientes a los dos MLST predominantes. Excepto el aislado NG-9, las cepas resistentes pertenecientes a los MLST ST-9363 y ST-11422 pertenecieron a un mismo genogrupo NG-MAST (G3935) y al NG-STAR ST-193.

Las dos cepas sensibles a azitromicina caracterizadas a nivel molecular pertenecieron al NG-MAST ST-388 (MLST ST-1588) y al ST-11461 (MLST ST-1599 y NG-STAR ST-520). Aunque el diseño experimental no permitió determinar la estructura poblacional de todos los aislados sensibles durante el periodo estudiado, este último perfil correspondió a uno de los sublinajes más frecuentes detectados en el estudio de Euro-GASP antes mencionado (239). Estas dos cepas sensibles a azitromicina habían sido aisladas en los pacientes A y B, los cuales presentaron posteriormente una cepa resistente a azitromicina con un secuenciotipo distinto. Estos resultados revelaron que ambos pacientes se infectaron con otra cepa distinta por lo que se descartó la hipótesis inicial de la posible emergencia de resistencia a azitromicina en estos dos casos debida al tratamiento previo con macrólidos.

El tipaje de gonococo mediante el esquema NG-STAR proporciona información a nivel epidemiológico de las cepas y de la resistencia a antibióticos. Se trata de un sistema introducido en 2017 por lo que su uso todavía no está demasiado extendido. Como ya se ha comentado, el NG-STAR predominante en las cepas fue el ST-193. Todos los aislados pertenecientes a este secuenciotipo presentaron el mismo perfil de resistencia y de manera característica fueron sensibles a ciprofloxacino.

5.2.3. Determinantes de resistencia a antibióticos.

La resistencia a macrólidos es debida a la combinación de diversos determinantes de resistencia. La resistencia puede ser por mutaciones en el 23S rDNA, en los genes *rpl* que codifican las proteínas ribosomales L4 y L22, en el promotor y/o el gen *mtrR* que codifica la bomba de expulsión activa MtrCDE, los genes *erm* de las metilasas, en el gen *mef* que codifica otra bomba de expulsión y por la sobreexpresión de la bomba MacA-MacB.

Las mutaciones en el dominio V del gen del 23S rRNA causan resistencia de alto nivel a los macrólidos, especialmente cuando todas las copias del gen se ven afectadas (240). Todas las cepas de gonococo con resistencia a azitromicina de alto nivel descritas en un estudio realizado anteriormente en Barcelona presentaron mutaciones en este gen (224). Asociadas a tres brotes de gonococo resistente a azitromicina, las cepas con mutaciones solo en este determinante pertenecían al MLST ST-9363 (NG-MAST ST-3935 y NG STAR ST-1993) mientras las cepas que adicionalmente presentaban la delección -35A en el promotor *mtrR* pertenecían al MLST ST-7823 (predominantemente al NG-MAST ST-5309 y NG-STAR ST-2044). En el presente estudio, todas las cepas incluidas presentaron resistencia de bajo nivel a azitromicina y, acorde con lo esperado, no presentaron ninguna de las mutaciones en el 23S rRNA asociadas a la resistencia a macrólidos.

Todas las cepas resistentes a macrólidos presentaron las sustituciones aminoacídicas V125A, A147G y R157Q en la proteína ribosomal L4, sustituciones descritas con anterioridad y asociadas a resistencia a azitromicina (242, 234). Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de Thomas *et al.* (234), quienes describieron la presencia de estas tres sustituciones en un *cluster* de cepas con

resistencia de bajo nivel a azitromicina (CIM 2-4mg/L) pertenecientes mayoritariamente al MLST ST-9363 y NG-MAST ST-3935. La sustitución G70D en la proteína ribosomal L4 cerca de la región de unión a macrólidos se ha descrito asociada a incrementos en la CIM a azitromicina (153, 243). Adicionalmente a las tres sustituciones aminoacídicas mencionadas, las dos únicas cepas resistentes a azitromicina aisladas en mujeres (NG4 y NG10) presentaron la sustitución G70D en la proteína L4, que contribuiría también a la resistencia en estas cepas (CIM 3 mg/L). Ninguna cepa resistente a azitromicina presentó mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en la proteína ribosomal L22, coincidiendo con otros autores (242, 244).

N. gonorrhoeae presenta diversas bombas de expulsión activa que, entre otras funciones, pueden eliminar activamente el antibiótico (158). El gen *mtrR* actúa como regulador de la expresión de los genes que codifican la bomba MtrCDE. Algunas de las sustituciones aminoacídicas en el represor MtrR, como A39T, G45D y H105Y se han descrito de manera frecuente asociadas a un incremento de la CIM a azitromicina. Mutaciones en la región codificante de este gen y también mutaciones en su promotor contribuyen a la sobreexpresión de la bomba, hecho que puede causar resistencia a antibióticos como los macrólidos y los betalactámicos (158).

Mutaciones puntuales en la región promotora del gen *mtrR* se han asociado a CIM a azitromicina más elevadas (158). Todas las cepas resistentes a azitromicina pertenecientes a los MLST ST-9363 y ST11422 presentaron las mismas dos mutaciones en la región promotora, una de ellas (A→C) entre las cajas -10 y -35 y la otra (G→A) en la caja -35. Las cepas pertenecientes al MLST ST-9362 presentaron la delección -A disminuyendo el espacio entre las cajas -10 y -35. Se ha descrito que esta delección nucleotídica dentro de la región invertida de 13 pb en la región del promotor *mtrR* causa una disminución en la expresión del MtrR, causando una elevación de la CIM de azitromicina (162, 245, 246). Sin embargo, se ha reportado la presencia de esta delección como único determinante de resistencia a macrólidos en cepas sensibles a azitromicina por lo que esta delección no sería suficiente por si sola para conferir resistencia de bajo nivel (238). En el presente estudio las dos cepas sensibles a macrólidos caracterizadas no presentaron ninguna modificación en la región promotora mientras todas las cepas

resistentes a azitromicina presentaron además modificaciones en otros determinantes.

Todas las cepas estudiadas resistentes a azitromicina y pertenecientes a los MLST ST-9363 y ST11422 presentaron las mismas sustituciones aminoacídicas (D79N, S183N y M197I) en el represor MtrR. Estas tres sustituciones configuran el mosaico MtrR, cuya adquisición se ha descrito originaria de especies de *Neisseria* spp. comensales y asociado a un incremento en la resistencia a azitromicina (161, 247). Coincidiendo con nuestros resultados, Reimche *et al.* describieron la asociación de los clones MLST ST-9363 y ST-11422 con el mosaico *mtrR* y la mutación A→C en el promotor del *mtrR* en cepas resistentes a azitromicina con CIM 2-4mg/L (266). Como ya se ha comentado, la diseminación clonal del ST-9363 ha contribuido al incremento en la resistencia a macrólidos. Ambos determinantes de resistencia, el mosaico y la mutación A→C, se han descrito en este clon como de incorporación reciente durante la última década y se han asociado predominantemente a HSH (234). Los aislados estudiados pertenecientes a este clon procedieron mayoritariamente de varones, aunque la falta de datos sobre su orientación sexual no permitió realizar ninguna asociación.

La sustitución H105Y en el dominio de dimerización del MtrR causa una alteración en la conformación de este represor (248). Este cambio conformacional produce una disminución en la unión del represor a la región promotora del operón *mtrCDE*, hecho asociado a resistencia a antimicrobianos hidrofóbicos como los macrólidos (245). Sin embargo, la trascendencia directa de esta mutación en cepas con resistencia de bajo nivel a azitromicina en la región codificante del MtrR no está clara debido a su frecuente asociación con la delección en la región promotora (162, 248, 249). En nuestro estudio las dos cepas resistentes a azitromicina pertenecientes al MLST ST-9362 presentaron la misma sustitución H105Y, en ambos casos junto con la delección -A en la región promotora, coincidiendo con lo descrito por otros autores (248, 249).

La sustitución A39T en el dominio de unión al DNA del gen *mtrR* causa una disminución de la afinidad de unión al promotor (248). Beggs *et al.* hipotetizaron que cualquier influencia que esta sustitución aminoacídica puede tener sobre la sobreexpresión del operón *mtrCDE* debería acompañarse de otras sustituciones en

posiciones clave para la afinidad de unión como Y48D (248). Sin embargo, el presente estudio reveló la presencia de la sustitución A39T únicamente en las dos cepas sensibles a azitromicina, de las cuales una presentó también la sustitución Y48D. Estas dos cepas no presentaron ninguna mutación adicional en el promotor del *mtrR* por lo que la combinación de A39T y Y48D no sería suficiente para conferir resistencia.

Las sustituciones A39T y G45D en el dominio de unión al DNA del *mtrR* se han descrito asociadas a la exposición previa a azitromicina (223). Ambas sustituciones aminoacídicas se han asociado a la sobreexpresión de la bomba MtrCDE cuando se hallan juntamente con la delección -A en la posición -35 del promotor (153). En el presente estudio, ninguna de las cepas resistentes a azitromicina presentó esta combinación concreta en la región promotora y en la región codificante del gen *mtrR*. Como ya se ha mencionado, la sustitución A39T estuvo presente únicamente en las dos cepas sensibles a azitromicina, hecho que respaldaría la necesidad de modificaciones concomitantes en otros determinantes de resistencia para que se produzca la resistencia de bajo nivel a azitromicina, de acorde a lo descrito por otros autores (153).

La presencia de una proteína MtrR truncada se ha descrito con anterioridad *N. gonorrhoeae* (245,250). Ambos autores las describen tanto en cepas sensibles a cefalosporinas de tercera generación como en cepas con sensibilidad reducida aunque éstas presentaban adicionalmente otras mutaciones que podían estar involucradas en la resistencia. Sin embargo, no determinaron la resistencia a macrólidos en estas cepas con una MtrR truncada. La funcionalidad de estas proteínas truncadas dependerá del tamaño y de cómo afecta a la conformación de los dominios esenciales, especialmente el de unión al promotor. Curiosamente la cepa NG-2 sensible a macrólidos presentó una proteína truncada de 149 aminoácidos probablemente no funcional. Sin embargo, esta cepa presentó una proteína ribosomal L4 *wild-type*, por lo que se hipotetizó la contribución relevante de este determinante en preservar la sensibilidad a azitromicina incluso con un probable aumento de la expresión de la bomba MtrCDE.

Las mutaciones en el locus *mtrR* que afectan a la expresión de la bomba MtrCDE se han asociado a un mayor *fitness* respecto a las cepas *wild-type* (246). Los

mismos autores sugieren que estas mutaciones presentes en el MLST ST-9363 conferirían una ventaja selectiva a este clon, que contribuiría a su persistencia temporal en Estados Unidos. La presencia de estas mutaciones que determinan la sobreexpresión de la bomba MtrCDE en nuestras cepas con resistencia de bajo nivel a azitromicina podría contribuir a una mayor ventaja selectiva, especialmente en un entorno en el cual el uso de macrólidos es frecuente. En este contexto, estas mutaciones asociadas a resistencia de bajo nivel podrían contribuir en parte a la diseminación clonal del ST-9363 en nuestra área geográfica.

La bomba de expulsión MacA-MacB reconoce macrólidos (163). Mutaciones en la región -10 del promotor *macAB* se han asociado a un incremento de la expresión de esta bomba de expulsión por lo que contribuyen a la disminución de la sensibilidad a estos antibióticos (163). Ninguna cepa incluida en el estudio molecular presentó mutaciones en el promotor del gen que codifica la bomba MacA-MacB. Estos resultados coinciden con la ausencia o muy baja prevalencia de estas mutaciones reportadas en la bibliografía reciente (164, 169, 241, 251).

La adquisición de resistencia a macrólidos puede ser debida a la transferencia horizontal de genes *erm* y al gen *mef*, que codifican diversas metilasas y una bomba de expulsión, respectivamente. La adquisición de estos genes está ampliamente reportada en bacterias como *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp. (252, 253). Sin embargo, en el gonococo la contribución de estos determinantes a la resistencia a macrólidos parece ser escasa y no se detecta en la mayoría de los estudios (164, 242, 244, 254). Coincidiendo con la bibliografía, no se detectó la presencia de los determinantes *erm* y *mef* en los genomas de los aislados resistentes a azitromicina estudiados.

La resistencia a los antibióticos betalactámicos en *N. gonorrhoeae* puede ser debida a diversos determinantes. Las dianas principales de resistencia a los betalactámicos son las dos proteínas de unión a penicilina (PBP1 y PBP2) que presenta el gonococo. Otro determinante de resistencia a esta familia de antibióticos es la porina PorB. Como ya se ha comentado, también las mutaciones que afectan al locus *mtrR* afectan a los betalactámicos por sobreexpresión de la bomba MtrCDE.

El mecanismo cromosómico más frecuente en gonococo involucrado en la disminución de la sensibilidad a betalactámicos son las modificaciones en el dominio transpeptidasa de la PBP2, ya sea debidas a la presencia de un mosaico o a mutaciones puntuales en el gen *penA* (106,185). Excepto la cepa NG-17, todas las cepas resistentes a azitromicina estudiadas presentaron el mismo patrón no-mosaico IV en el gen *penA* (185). La mayoría de estas cepas presentaron sensibilidad con exposición incrementada a penicilina y fueron sensibles a ceftriaxona. Todas las cepas estudiadas con patrones no-mosaico en el gen *penA* presentaron la inserción de un residuo Asp-345A en la PBP2. La inserción de este único residuo de ácido aspártico en esta posición causa la expresión de una PBP2 modificada que se ha asociado a disminución de la sensibilidad a penicilinas (255). La acumulación de otras mutaciones, así como cambios en otros genes como *ponA*, se ha asociado a la adquisición de resistencia de alto nivel a penicilinas, pero no se ha relacionado con resistencia a cefalosporinas (100, 256).

Los alelos mosaicos en el gen *penA* involucrados en la resistencia a betalactámicos derivan de especies comensales del género *Neisseria* por transformación *in vivo* (106). En el presente estudio, solo una de las cepas caracterizadas a nivel molecular (NG-17) presentó un alelo mosaico en el gen *penA*, que correspondió al patrón XXVII (185). Esta cepa presentó sensibilidad con exposición incrementada a penicilina y fue sensible a ceftriaxona. De las distintas mutaciones presentes en los alelos mosaico de *penA*, las sustituciones G545S, I312M y V316T se asociaron a un incremento en la resistencia a los betalactámicos, especialmente a cefixima (257). Sin embargo, posteriormente se describió el fenómeno de la epistasis asociado a estas tres sustituciones al requerir de la presencia de otras mutaciones en los alelos mosaico para conferir resistencia (258).

Las mutaciones en la porina PorB pueden causar una disminución en la entrada de penicilina, cefalosporinas y tetraciclinas cuando afectan a las posiciones 120 y 121 que se consideran críticas en la conformación del tamaño del poro (167). En estas dos posiciones en PorB1b se han descrito diversas sustituciones asociadas a resistencia entre las cuales se halla la combinación G120K/A121N (167, 259). En el presente estudio estas dos sustituciones se detectaron en todas las cepas con resistencia a macrólidos que presentaron un rango de CIM a penicilina de 0.38-

0.75mg/L. Por el contrario, las dos cepas con la CIM de penicilina más baja (CIM 0.19 mg/L) no presentaron estas sustituciones. Cabe destacar que la combinación de mutaciones en el *mtrR* y de mutaciones en el gen de la porina es necesaria para incrementar la resistencia a penicilina y contribuye a elevar los valores de CIM en cefalosporinas de tercera generación (167, 259). Como ya se ha comentado, todas las cepas resistentes a macrólidos presentaron adicionalmente alguna de las mutaciones en el gen *mtrR* asociadas a resistencia. Sin embargo, ninguna de ellas presentó valores elevados de CIM a cefalosporinas y en el caso de la penicilina fue difícil atribuir a estos determinantes algún tipo de asociación dado el diseño experimental. Coincidiendo con nuestros resultados, Reimche *et al.*

describieron que la combinación de las sustituciones G120DK y G121DN en PorB junto con la mutación A→C en el promotor *mtrR* asociada al mosaico en el operon *mtrCDE* fue prevalente en aislados pertenecientes a los MLST ST9363 y ST11422 (266).

La alteración en la conformación del represor MtrR debida a la sustitución H105Y puede causar también una mayor afinidad de unión a la penicilina (260). Esta unión al antibiótico contribuiría también a alterar la conformación que causaría una disminución de unión al promotor. Como ya se ha mencionado, esta sustitución aminoacídica estuvo presente en las dos cepas MLST ST-9362, las cuales diferían en otros determinantes asociados a la resistencia a betalactámicos. Con el alelo mosaico en el gen *penA* y la sustitución G120K / A121N en la porina PorB, la cepa NG-17 presentó unos valores de CIM a penicilina y a ceftriaxona más elevados que la cepa NG-7, que no presentó alelo mosaico y tenía una porina *wild-type*.

La adquisición de betalactamasas tipo TEM se asocia a resistencia de alto nivel a la penicilina en el gonococo (261). Ninguna de las cepas resistentes a azitromicina estudiadas fue resistente a penicilina. De las cepas caracterizadas a nivel molecular, solo una de las dos cepas sensibles a azitromicina presentó resistencia de alto nivel a penicilina, atribuida principalmente a la adquisición de un gen *bla*_{TEM}. Sin embargo, además de la betalactamasa TEM-1, esta cepa presentó el patrón XIX no-mosaico en la PBP2 con la inserción Asp-345A antes mencionada y la sustitución aminoacídica L421P en la PBP1. La sustitución L421P en el dominio transpeptidasa de la PBP1 se ha relacionado con la disminución de su eficiencia de

acilación *in vitro* con diversos antibióticos betalactámicos (256, 262). Esta sustitución aminoacídica se ha detectado con frecuencia en cepas con resistencia de alto nivel a penicilina y con sensibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación (245). Sin embargo, esta mutación no parece ser suficiente por si sola para causar resistencia de alto nivel a la penicilina y disminución de la sensibilidad a cefalosporinas de tercera generación (256, 263). Otros determinantes de resistencia adicionales como la presencia de un gen *penA* mosaico serían necesarios para que esta sustitución en la PBP1 contribuya a estos fenotipos de resistencia (256,263).

Ciprofloxacino no se recomienda en el tratamiento empírico de la infección por gonococo (220). La elevada resistencia a ciprofloxacino antes mencionada en el conjunto de las cepas incluidas en el estudio, contrasta con la baja resistencia observada en las cepas con resistencia a macrólidos. La resistencia a fluoroquinolonas en el gonococo es debida a determinadas mutaciones puntuales adquiridas de manera secuencial en las regiones QRDR de los genes que codifican la girasa y la topoisomerasa IV, enzimas esenciales en la replicación del DNA (153). Sustituciones dobles en la posición Ser-91 y Asp-95 en el gen *gyrA* junto con una sustitución única o doble en el gen *parC* tienen un papel relevante en el desarrollo de resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (174). Tres de las cepas resistentes a ciprofloxacino (CIM ciprofloxacino 3-4 mg/L) caracterizadas a nivel molecular presentaron las sustituciones S91F y D95A en el gen *gyrA* junto con la sustitución S87R en la región QRDR del gen *parC*. Dos de estas cepas pertenecieron al MLST ST-9362, secuenciotipo poco prevalente en nuestro entorno que no se ha descrito anteriormente asociado a resistencia a fluoroquinolonas (264).

Recientemente diversos autores han asociado la diseminación global de resistencia a fluoroquinolonas en *N. gonorrhoeae* especialmente a tres MLST (ST-1901, ST-7363 y ST-9363) (157, 265; 266). Como ya se ha mencionado, el MLST ST-9363 fue predominante en las cepas resistentes a macrólidos detectadas durante el periodo a estudio. Sin embargo, solo una de las cepas pertenecientes a este ST presentó resistencia a fluoroquinolonas (CIM ciprofloxacino 0.19 mg/L). La presencia de la doble sustitución en *gyrA* en ausencia de sustituciones en el QRDR de *parC* se ha asociado a incrementos en la CIM menores (174, 236). Esta cepa

presentó las sustituciones aminoacídicas antes mencionadas en el gen *gyrA* pero ninguna sustitución en la región QDRD del gen *parC*, hecho que justificaría su menor CIM a ciprofloxacino.

Las mutaciones en la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC* pueden tener un impacto en el fitness del *N. gonorrhoeae* (267). La elevada frecuencia de resistencia a fluoroquinolonas en gonococo podría ser explicada en parte por la selección de mutaciones compensatorias que estabilizarían estos fenotipos de resistencia en determinados clones (267). Estos autores hacían especial referencia a las mutaciones concomitantes en el gen *mtrR*. Sin embargo, otras mutaciones (R537L y R537S) en *parC* localizadas también fuera del QRDR se han descrito con anterioridad en cepas de gonococo resistentes a ciprofloxacino y se ha sugerido su posible contribución a la resistencia (268). En nuestro caso, todas las cepas caracterizadas, incluidas las sensibles a ciprofloxacino (excepto NG-15) presentaron la sustitución F479L en *parC*, mutación descrita con anterioridad en cepas resistentes a ciprofloxacino (269). Esta sustitución en *parC* podría contribuir de alguna manera a la compensación antes mencionada de mutaciones críticas, aunque se desconoce su posible relevancia en este sentido.

El estudio de las cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a azitromicina presentó diversas limitaciones. Una limitación importante fue no poder disponer de los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes por lo que se desconoce la información de los hábitos sexuales y de los tratamientos previos con macrólidos que hubieran podido contribuir a la selección de cepas resistentes a azitromicina. La caracterización molecular solo se realizó en las cepas con un valor de CIM a azitromicina ≥ 2 mg/L. La no inclusión de las cepas con un valor de 1.5 mg/L podría haber subestimado la contribución de otros clones en la diseminación de la resistencia de bajo nivel en nuestra área geográfica.

La resistencia de bajo nivel a azitromicina en *N. gonorrhoeae* detectada en nuestro estudio fue mediada por la contribución de diversos determinantes de resistencia en cada una de las cepas caracterizadas. Como ya se ha comentado, uno de los mecanismos más relevantes involucrados en esta resistencia fueron las modificaciones en la proteína ribosomal L4, estando las mismas sustituciones

mosaico presentes en todas las cepas de manera independiente al clon que pertenecían. La sobreexpresión de la bomba de expulsión activa MtrCDE fue el otro mecanismo involucrado. Sin embargo, las mutaciones concretas tanto en la región promotora del gen *mtrR* como en la región codificante presentaron una distribución clonal específica, que podría sugerir su diseminación clonal. En este contexto, el uso tan frecuente de macrólidos en el tratamiento de infecciones respiratorias y de uretritis no gonocócica podría contribuir a la selección de aquellos clones de gonococo que presenten algún tipo de mutaciones que confieran resistencia de bajo nivel (1). El uso de concentraciones subóptimas de azitromicina podría contribuir también a este proceso de selección. En este sentido, un estudio reciente sobre los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) de los principales tratamientos frente a gonococo mediante simulaciones con curvas de Monte Carlo, reveló que la probabilidad con la que la monodosis oral de azitromicina (1g y 2g) alcanzaría el objetivo de terapéutico PK/PD considerado de eficacia (>90%) se daría solo cuando el valor máximo de CIM a azitromicina fuera de 0.064 y 0.125 mg/L, respectivamente (238). Teniendo en cuenta que la CIM50 del total de aislados incluidos en nuestro estudio fue de 0.5 mg/L, la probabilidad de estar usando dosis subóptimas de azitromicina en el tratamiento de la gonorrea sería muy elevada, y podría contribuir a la selección de las cepas categorizadas como *no-wild type* para este antibiótico.

6. Conclusiones.

1. Se detectaron 612 casos de *Mycoplasma genitalium* en los 17846 pacientes incluidos en el estudio retrospectivo (2011-2017), que correspondieron a una frecuencia de infección del 3.4%. La frecuencia de infección fue mayor en hombres (4.8%) que en mujeres (2.9%) observándose una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.001$)
2. La frecuencia de infección por *M. genitalium* fue del 3.7 % en la cohorte prospectiva (2014-2015). La frecuencia de infección se observó principalmente en pacientes jóvenes (15 - 35 años) presentado una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). La infección fue asintomática en la mitad de los pacientes y fueron mayoritariamente a mujeres (61.1%).
3. La infección simple por *M. genitalium* se detectó en el 39.3% de los pacientes, de los cuales la mitad fueron asintomáticos. La codetección de *M. genitalium* con otros agentes de transmisión sexual (ITS) se halló en el 21.9% de los pacientes. El agente de ITS más frecuentemente codetectado fue *C. trachomatis* (51.7%) y se observó principalmente en mujeres. La presencia de disbiosis se observó en un 38.6 % de los pacientes con infección por *M. genitalium* y *U. urealyticum* fue la bacteria detectada con más frecuencia.
4. El consejo terapéutico realizado influyó en la prescripción. Más de la mitad de los pacientes recibieron tratamiento dirigido contra *M. genitalium* y un 47.7% recibió la pauta extendida con azitromicina. El test de cura (TOC) se realizó en el 42% de los pacientes con infección por *M. genitalium* en la cohorte prospectiva, y fue positivo en una quinta parte. El TOC fue efectivo para detectar los fracasos terapéuticos.

5. La frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos fue del 12.6% en la cohorte prospectiva. La mutación más prevalente fue A2058G, seguida de A2059G y de A2058T. El presente estudio describió la mutación A2058T por primera vez en España.

6. Más de la mitad de los pacientes con infección por cepas con mutaciones asociadas a resistencia fueron asintomáticos, por lo que podrían considerarse reservorio de resistencia en ausencia del tratamiento adecuado. La mitad de ellos habían tenido una infección previa por esta bacteria por lo que podrían haber recibido macrólidos en el pasado. Estos resultados apoyan el papel de los tratamientos con macrólidos en la emergencia de resistencia a esta familia de antibióticos.

7. La frecuencia de infección por *Neisseria gonorrhoeae* en los hombres fue cuatro veces mayor que en las mujeres. Respecto a la edad de adquisición de la infección, predominó entre los pacientes jóvenes, principalmente entre 26 y 35 años.

8. La resistencia a azitromicina en *N. gonorrhoeae* fue del 11% durante el periodo estudiado. Esta frecuencia de resistencia obtenida triplicó las descritas anteriormente tanto en el área metropolitana de Barcelona como en otras regiones de España. Aunque todos los aislados presentaron resistencia de bajo nivel a azitromicina (1.5-4 mg/L), nuestros resultados cuestionan la adecuación de la azitromicina en el tratamiento empírico de la gonorrea en nuestra área geográfica.

9. No se detectó resistencia a ceftriaxona en *N. gonorrhoeae* durante el periodo a estudio. Sin embargo, el 11.6 % de los aislados presentaron una CIM a este antibiótico por encima del punto de corte epidemiológico. Los resultados de este estudio sugieren que la ceftriaxona es efectiva para el tratamiento de la infección gonocócica, pero es necesario vigilar el incremento de la CIM de este antibiótico

debido a la presencia de aislados que presentan algún mecanismo de resistencia asociado y a su potencial diseminación.

10. La resistencia a quinolonas en *N. gonorrhoeae* fue del 66.8 % en el conjunto de las cepas, en contraste con la baja resistencia observada en las cepas resistentes a macrólidos. La elevada resistencia global evidencia la falta de utilidad de ciprofloxacino en el tratamiento empírico de la infección gonocócica en nuestra área geográfica

11. Las cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a azitromicina (≥ 2 mg/L) detectadas durante el periodo a estudio presentaron poca variabilidad clonal, perteneciendo a tres MLST distintos (ST-9363, ST-11422 y ST-9362). En contraste, los dos aislados sensibles a azitromicina caracterizados a nivel molecular pertenecieron a clones distintos a los resistentes que se aislaron posteriormente en los mismos pacientes, por lo que se consideró que se habían infectado de nuevo por cepas distintas.

12. El MLST ST-9363 asociado a bajos niveles de resistencia a azitromicina fue el más prevalente en las cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a este antibiótico. Los dos otros secuenciotipos detectados en las cepas resistentes fueron los ST-11422 y ST-9362, ambos son variantes en un solo locus del ST-9363. Estos hallazgos sugieren que la diseminación actual de resistencia a azitromicina en nuestra área geográfica podría ser mayoritariamente debida al clon MLST ST-9363.

13. Se detectaron seis secuenciotipos NG-MAST distintos entre las cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina, siendo el ST-3935 el más prevalente. Este secuenciotipo está ampliamente distribuido en Europa, siendo el segundo más frecuente en un estudio realizado por la Red Euro-Gasp. La mayoría de las cepas pertenecieron al NG-STAR ST-193, con un mismo perfil de resistencia antibiótica en el que destacaba su sensibilidad a ciprofloxacino.

14. Las cepas de gonococo caracterizadas a nivel molecular mostraron en general elevada correlación entre el fenotipo de sensibilidad a los antibióticos estudiados y los determinantes de resistencia detectados.

15. La resistencia a azitromicina de las cepas fue de bajo nivel. Ninguna de estas cepas presentó mutaciones en el dominio V del gen que codifica el 23S rRNA, mecanismo que puede asociarse a resistencia de alto nivel a macrólidos cuando está presente en diversas copias del gen. No se detectaron mutaciones en la proteína ribosomal L22 ni en el promotor de la bomba MacA-MacB. Ninguna de estas cepas presentó los genes adquiridos (*erm* y *mef*) asociados a resistencia a macrólidos.

16. La resistencia de bajo nivel a azitromicina fue causada por tres sustituciones aminoacídicas (V125A, A147G y A147Q) en la proteína ribosomal L4 presentes en todas las cepas resistentes, junto con la sobreexpresión de la bomba de expulsión activa MtrCDE debida principalmente a mutaciones en el promotor del gen *mtrR* y a determinadas sustituciones aminoacídicas en el represor MtrR.

17. Las sustituciones aminoacídicas (D79N, S183N y M197I) en el represor MtrR asociadas a resistencia a macrólidos estuvieron presentes en todas las cepas resistentes pertenecientes a los clones MLST ST-9363 y ST-11422. Estas cepas presentaron también las mutaciones (A→C / G→A) en el promotor del gen *mtrR*. Por el contrario, las dos cepas pertenecientes al clon ST-9362 presentaron la sustitución H105Y en la región codificante del represor y la delección -A en su región promotora. Estos resultados sugieren la diseminación clonal de estos determinantes de resistencia asociados al MtrR en nuestra área geográfica.

18. Todas las cepas resistentes a azitromicina estudiadas presentaron el mismo patrón no-mosaico IV en el gen *penA* excepto la cepa NG-17. La mayoría de ellas presentaron también las sustituciones G120DK y G121DN en la porina PorB. Las cepas con la combinación de ambos determinantes junto con la sobreexpresión de

la bomba MtrCDE presentaron un rango de CIM a la penicilina de 0.38 – 0.75mg/L y pertenecieron a los clones MLST ST-9363 y ST-11422.

19. Una de las dos cepas pertenecientes al clon ST-9362 (NG-17) presentó el alelo mosaico XXVII en la PBP2, la sustitución G120DK/G121DN en PorB, la delección -A en el promotor *mtrR* y la sustitución H105Y en el gen *mtrR*. A pesar de esta combinación de determinantes de resistencia a betalactámicos, el fenotipo de resistencia observado no difirió de manera relevante al de la cepa NG-7.

7. Bibliografía.

1. Unemo M, Seifert HS, Hook EW 3rd, Hawkes S, Ndowa F, Dillon JR. Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Nov 21;5(1):79. doi: 10.1038/s41572-019-0128-6. PMID: 31754194.
2. World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance, [Internet] 2018. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565691>
3. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol*. 2012 Dec;7(12):1401-22. doi: 10.2217/fmb.12.117. PMID: 23231489; PMCID: PMC3629839.
4. Buder S, Schöfer H, Meyer T, Bremer V, Kohl PK, Skaletz-Rorowski A, Brockmeyer N. Bacterial sexually transmitted infections. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2019 Mar;17(3):287-315. doi: 10.1111/ddg.13804. PMID: 30920748.
5. Queirós C, Costa JBD. Oral Transmission of Sexually Transmissible Infections: A Narrative Review. *Acta Med Port*. 2019 Dec 2;32(12):776-781. doi: 10.20344/amp.12191. Epub 2019 Dec 2. PMID: 31851887.
6. Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 2017 Jan;216(1):1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2016.08.008. PMID: 28007229; PMCID: PMC5193130.
7. Waltmann A, McKinnish TR, Duncan JA. Nonviral sexually transmitted infections in pregnancy: current controversies and new challenges. *Curr Opin Infect Dis*. 2021 Feb 1;34(1):40-49. doi: 10.1097/QCO.0000000000000702. PMID: 33337618; PMCID: PMC8634851.
8. Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect*. 1999 Feb;75(1):3-17. doi: 10.1136/sti.75.1.3. PMID: 10448335; PMCID: PMC1758168.

9. Ward H, Rönn M. Contribution of sexually transmitted infections to the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Jul;5(4):305-10. doi: 10.1097/COH.0b013e32833a8844. PMID: 20543605; PMCID: PMC2923028.
10. Coll J, Videla S, Leon A, Ornelas A, García F, Fernández E, Blanco JL, Carrillo A, Bravo I, Meulbroek M, García-Cuyas F, González V, Casabona J, Leal L, Clotet B, Brander C; Check-Ear Project. Early detection of HIV infection and of asymptomatic sexually transmitted infections among men who have sex with men. *Clin Microbiol Infect*. 2018 May;24(5):540-545. doi: 10.1016/j.cmi.2017.08.012. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28843621.
11. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, Reno H, Zenilman JM, Bolan GA. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm Rep*. 2021 Jul 23;70(4):1-187. doi: 10.15585/mmwr.rr7004a1. PMID: 34292926; PMCID: PMC8344968.
12. Wu MY, Gong HZ, Hu KR, Zheng HY, Wan X, Li J. Effect of syphilis infection on HIV acquisition: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2021 Nov;97(7):525-533. doi: 10.1136/sextrans-2020-054706. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33219164; PMCID: PMC8543214.
13. Donnell D, Baeten JM, Kiarie J, Thomas KK, Stevens W, Cohen CR, McIntyre J, Lingappa JR, Celum C; Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team. Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis. *Lancet*. 2010 Jun 12;375(9731):2092-8. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60705-2. Epub 2010 May 26. PMID: 20537376; PMCID: PMC2922041.
14. Whelan J, Eeuwijk J, Bunge E, Beck E. Systematic Literature Review and Quantitative Analysis of Health Problems Associated with Sexually Transmitted *Neisseria gonorrhoeae* Infection. *Infect Dis Ther*. 2021 Dec;10(4):1887-1905. doi: 10.1007/s40121-021-00481-z. Epub 2021 Jul 17. PMID: 34279817; PMCID: PMC8572915.
15. Diamond V, Harman J, Gerend MA. The Underuse of STI Prevention Counseling in Primary Care. *Sex Transm Dis*. 2020 Aug;47(8):e18-e20. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001182. PMID: 32658407.

16. Okiring J, Getahun M, Gutin SA, Lebu S, Lee J, Maeri I, Eyul P, Bukusi EA, Cohen CR, Neilands TB, Ssali S, Charlebois ED, Camlin CS. Sexual partnership concurrency and age disparities associated with sexually transmitted infection and risk behavior in rural communities in Kenya and Uganda. *Int J Infect Dis.* 2022 Jul; 120:158-167. doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.038. Epub 2022 Apr 25. PMID: 35472527.
17. Gupta N. Sexually Transmitted Infections: Part I: Genital Bumps and Genital Ulcers. *Pediatr Rev.* 2020 Sep;41(9):455-468. doi: 10.1542/pir.2018-0261. PMID: 32873560.
18. Młynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. *Med Microbiol Immunol.* 2020 Apr;209(2):95-108. doi: 10.1007/s00430-019-00651-4. Epub 2019 Dec 4. Erratum in: *Med Microbiol Immunol.* 2020 Oct;209(5):641. PMID: 31802195; PMCID: PMC7125254.
19. Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H, Wilson J, Unemo M. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2022 May;36(5):641-650. doi: 10.1111/jdv.17972. Epub 2022 Feb 19. PMID: 35182080.
20. Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. *Res Microbiol.* 2017 Nov-Dec;168(9-10):875-881. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.009. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28263902.
21. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jul;24(3):498-514. doi: 10.1128/CMR.00006-11. PMID: 21734246; PMCID: PMC3131060.
22. Citti C, Baranowski E, Dordet-Frisoni E, Faucher M, Nouvel LX. Genomic Islands in *Mycoplasmas*. *Genes (Basel).* 2020 Jul 22;11(8):836. doi: 10.3390/genes11080836. PMID: 32707922; PMCID: PMC7466169.
23. Razin S. *Mycoplasmas*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 37. PMID: 21413254.

24. Razin S. Sterols in Mycoplasma membranes. In: Bronner F, Kleinzeller A, editors. Current Topics in Membranes and Transport. Vol. 171. New York, NY, USA: Academic Press; 1982. pp. 187–205
25. Arfi Y, Lartigue C, Sirand-Pugnet P, Blanchard A. Beware of Mycoplasma Anti-immunoglobulin Strategies. *mBio*. 2021 Dec 21;12(6):e0197421. doi: 10.1128/mBio.01974-21. Epub 2021 Nov 16. PMID: 34781733; PMCID: PMC8593674.
26. Ahmed J, Rawre J, Dhawan N, Khanna N, Dhawan B. Mycoplasma hominis: An under recognized pathogen. *Indian J Med Microbiol*. 2021 Jan;39(1):88-97. doi: 10.1016/j.ijmmb.2020.10.020. Epub 2020 Dec 11. PMID: 33610259.
27. Beeton ML, Payne MS, Jones L. The Role of Ureaplasma spp. in the Development of Nongonococcal Urethritis and Infertility among Men. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jul 3;32(4):e00137-18. doi: 10.1128/CMR.00137-18. PMID: 31270127; PMCID: PMC6750135.
28. Tantengco OAG, de Castro Silva M, Velayo CL. The role of genital mycoplasma infection in female infertility: A systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2021 Jun;85(6):e13390. doi: 10.1111/aji.13390. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33417733.
29. Charity Ezeanya-Bakpa C, Regina Agbakoba N, Blanche Oguejiofor C, Bessie Enweani-Nwokelo I. Sequence analysis reveals asymptomatic infection with Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum possibly leads to infertility in females: A cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed*. 2021 Dec 13;19(11):951-958. doi: 10.18502/ijrm.v19i11.9910. PMID: 34977452; PMCID: PMC8717075.
30. Horner PJ, Martin DH. Mycoplasma genitalium Infection in Men. *J Infect Dis*. 2017 Jul 15;216(suppl_2):S396-S405. doi: 10.1093/infdis/jix145. PMID: 28838074; PMCID: PMC5853510.
31. Matasariu DR, Ursache A, Agache A, Mandici CE, Boiculese VL, Bujor IE, Rudisteanu D, Dumitrascu I, Schaas CM. Genital infection with Ureaplasma urealyticum and its effect on pregnancy. *Exp Ther Med*. 2022 Jan;23(1):89. doi: 10.3892/etm.2021.11012. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34934454; PMCID: PMC8652385.

32. Gómez Rufo D, García Sánchez E, García Sánchez JE, García Moro M. Implicaciones clínicas de las especies del género *Mycoplasma* [Clinical implications of the genus *Mycoplasma*]. *Rev Esp Quimioter*. 2021 Jun;34(3):169-184. Spanish. doi: 10.37201/req/014.2021. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33735544; PMCID: PMC8179937.
33. Yueyue W, Feichen X, Yixuan X, Lu L, Yiwen C, Xiaoxing Y. Pathogenicity and virulence of *Mycoplasma genitalium*: Unraveling Ariadne's Thread. *Virulence*. 2022 Dec;13(1):1161-1183. doi: 10.1080/21505594.2022.2095741. PMID: 35791283; PMCID: PMC9262362.
34. Sethi S, Singh G, Samanta P, Sharma M. *Mycoplasma genitalium*: an emerging sexually transmitted pathogen. *Indian J Med Res*. 2012 Dec;136(6):942-55. PMID: 23391789; PMCID: PMC3612323.
35. Yang Z, Hou J, Mu M, Wu SY. Subtractive proteomics and systems biology analysis revealed novel drug targets in *Mycoplasma genitalium* strain G37. *Microb Pathog*. 2020 Aug;145:104231. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104231. Epub 2020 Apr 25. PMID: 32344179.
36. McGowin CL, Totten PA. The Unique Microbiology and Molecular Pathogenesis of *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis*. 2017 Jul 15;216(suppl_2):S382-S388. doi: 10.1093/infdis/jix172. PMID: 28838077; PMCID: PMC5853509.
37. Martinelli L, García-Morales L, Querol E, Piñol J, Fita I, Calisto BM. Structure-Guided Mutations in the Terminal Organelle Protein MG491 Cause Major Motility and Morphologic Alterations on *Mycoplasma genitalium*. *PLoS Pathog*. 2016 Apr 15;12(4):e1005533. doi: 10.1371/journal.ppat.1005533. PMID: 27082435; PMCID: PMC4833410.
38. Seybert A, Gonzalez-Gonzalez L, Scheffer MP, Lluch-Senar M, Mariscal AM, Querol E, Matthaeus F, Piñol J, Frangakis AS. Cryo-electron tomography analyses of terminal organelle mutants suggest the motility mechanism of *Mycoplasma genitalium*. *Mol Microbiol*. 2018 May;108(3):319-329. doi: 10.1111/mmi.13938. Epub 2018 Mar 24. PMID: 29470847.

39. Burgos R, Pich OQ, Ferrer-Navarro M, Baseman JB, Querol E, Piñol J. Mycoplasma genitalium P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J Bacteriol.* 2006 Dec;188(24):8627-37. doi: 10.1128/JB.00978-06. Epub 2006 Oct 6. PMID: 17028283; PMCID: PMC1698224.
40. Burgos R, Pich OQ, Querol E, Piñol J. Deletion of the Mycoplasma genitalium MG_217 gene modifies cell gliding behaviour by altering terminal organelle curvature. *Mol Microbiol.* 2008 Aug;69(4):1029-40. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06343.x. Epub 2008 Jun 28. PMID: 18573175.
41. Alvarez RA, Blaylock MW, Baseman JB. Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Mycoplasma genitalium binds mucin. *Mol Microbiol.* 2003 Jun;48(5):1417-25. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03518.x. PMID: 12787366.
42. Chaudhry R, Ghosh A, Chandolia A. Pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae: An update. *Indian J Med Microbiol.* 2016 Jan-Mar;34(1):7-16. doi: 10.4103/0255-0857.174112. PMID: 26776112.
43. Burgos R, Pich OQ, Querol E, Piñol J. Functional analysis of the Mycoplasma genitalium MG312 protein reveals a specific requirement of the MG312 N-terminal domain for gliding motility. *J Bacteriol.* 2007 Oct;189(19):7014-23. doi: 10.1128/JB.00975-07. Epub 2007 Aug 3. PMID: 17675381; PMCID: PMC2045215.
44. Li L, Krishnan M, Baseman JB, Kannan TR. Molecular cloning, expression, and characterization of a Ca²⁺-dependent, membrane-associated nuclease of Mycoplasma genitalium. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(19):4876-84. doi: 10.1128/JB.00401-10. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20639320; PMCID: PMC2944508.
45. Christodoulides A, Gupta N, Yacoubian V, Maithel N, Parker J, Kelesidis T. The Role of Lipoproteins in Mycoplasma-Mediated Immunomodulation. *Front Microbiol.* 2018 Jul 31;9:1682. doi: 10.3389/fmicb.2018.01682. PMID: 30108558; PMCID: PMC6080569.
46. Dehon PM, McGowin CL. The Immunopathogenesis of Mycoplasma genitalium Infections in Women: A Narrative Review. *Sex Transm Dis.* 2017

Jul;44(7):428-432. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000621. PMID: 28608793; PMCID: PMC5470585.

47. McGowin CL, Annan RS, Quayle AJ, Greene SJ, Ma L, Mancuso MM, Adegboye D, Martin DH. Persistent *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion. *Infect Immun*. 2012 Nov;80(11):3842-9. doi: 10.1128/IAI.00819-12. Epub 2012 Aug 20. PMID: 22907815; PMCID: PMC3486055.

48. Chua TP, Bodiyaadu K, Machalek DA, Garland SM, Bradshaw CS, Plummer EL, Danielewski J, Vodstrcil LA, Doyle ML, Murray GL. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* fluoroquinolone-resistance markers, and dual-class-resistance markers, in asymptomatic men who have sex with men. *J Med Microbiol*. 2021 Sep;70(9):001429. doi: 10.1099/jmm.0.001429. PMID: 34590993; PMCID: PMC8697509.

49. Romano SS, Jensen JS, Lowens MS, Morgan JL, Chambers LC, Robinson TS, Totten PA, Soge OO, Golden MR, Manhart LE. Long Duration of Asymptomatic *Mycoplasma genitalium* Infection After Syndromic Treatment for Nongonococcal Urethritis. *Clin Infect Dis*. 2019 Jun 18;69(1):113-120. doi: 10.1093/cid/ciy843. PMID: 30281079; PMCID: PMC6579957.

50. Raj JS, Rawre J, Dhawan N, Khanna N, Dhawan B. *Mycoplasma genitalium*: A new superbug. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2022 Jan-Jun;43(1):1-12. doi: 10.4103/ijstd.ijstd_103_20. Epub 2022 Jun 7. PMID: 35846530; PMCID: PMC9282694.

51. Mclver R, Jalocon D, McNulty A, Jeffreys NJ, Chen SC, Power M, Couldwell DL. Men Who Have Sex With Men With *Mycoplasma genitalium*-Positive Nongonococcal Urethritis Are More Likely to Have Macrolide-Resistant Strains Than Men With Only Female Partners: A Prospective Study. *Sex Transm Dis*. 2019 Aug;46(8):513-517. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001009. PMID: 31295218.

52. Bachmann LH, Kirkcaldy RD, Geisler WM, Wiesenfeld HC, Manhart LE, Taylor SN, Seña AC, McNeil CJ, Newman L, Myler N, Fuchs R, Bowden KE; MAGNUM Laboratory Working Group. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* Infection, Antimicrobial Resistance Mutations, and Symptom Resolution Following

- Treatment of Urethritis. *Clin Infect Dis*. 2020 Dec 17;71(10):e624-e632. doi: 10.1093/cid/ciaa293. PMID: 32185385; PMCID: PMC7744987.
53. Horner P. Mycoplasma genitalium Nongonococcal Urethritis Is Likely to Increase in Men Who Have Sex With Men Who Practice Unsafe Sex: What Should We Do? *Sex Transm Dis*. 2019 Aug;46(8):518-520. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001030. PMID: 31295219.
54. Horner PJ, Blee K, Falk L, van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS*. 2016 Oct;27(11):928-37. doi: 10.1177/0956462416648585. Epub 2016 May 4. PMID: 27147267.
55. Deguchi T, Ito S, Yasuda M, Sato Y, Uchida C, Sawamura M, Manda K, Takanashi M, Kiyota H. Surveillance of the prevalence of macrolide and/or fluoroquinolone resistance-associated mutations in Mycoplasma genitalium in Japan. *J Infect Chemother*. 2018 Nov;24(11):861-867. doi: 10.1016/j.jiac.2018.08.009. Epub 2018 Sep 3. PMID: 30190106.
56. Beesley V, Thng C. Testing for Mycoplasma genitalium in pelvic inflammatory disease: A clinical audit. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2022 Sep 11. doi: 10.1111/ajo.13609. Epub ahead of print. PMID: 36089701.
57. De Carvalho NS, Palú G, Witkin SS. Mycoplasma genitalium, a stealth female reproductive tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Feb;39(2):229-234. doi: 10.1007/s10096-019-03707-8. Epub 2019 Sep 14. PMID: 31522281.
58. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. Mycoplasma genitalium infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2015 Aug 1;61(3):418-26. doi: 10.1093/cid/civ312. Epub 2015 Apr 21. PMID: 25900174.
59. Ma C, Du J, Dou Y, Chen R, Li Y, Zhao L, Liu H, Zhang K. The Associations of Genital Mycoplasmas with Female Infertility and Adverse Pregnancy Outcomes: a Systematic Review and Meta-analysis. *Reprod Sci*. 2021 Nov;28(11):3013-3031. doi: 10.1007/s43032-020-00399-w. Epub 2021 Jan 4. PMID: 33398853.
60. Peel J, Aung E, Bond S, Bradshaw C. Recent advances in understanding and combatting Mycoplasma genitalium. *Fac Rev*. 2020 Oct 30;9:3. doi: 10.12703/b/9-3. PMID: 33659935; PMCID: PMC7886083.

61. Couldwell DL, Jalocon D, Power M, Jeoffreys NJ, Chen SC, Lewis DA. *Mycoplasma genitalium*: high prevalence of resistance to macrolides and frequent anorectal infection in men who have sex with men in western Sydney. *Sex Transm Infect.* 2018 Sep;94(6):406-410. doi: 10.1136/sextrans-2017-053480. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29567802.
62. Bissessor M, Tabrizi SN, Bradshaw CS, Fairley CK, Hocking JS, Garland SM, Twin J, Poljak M, Peel J, Chen MY. The contribution of *Mycoplasma genitalium* to the aetiology of sexually acquired infectious proctitis in men who have sex with men. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Mar;22(3):260-5. doi: 10.1016/j.cmi.2015.11.016. Epub 2015 Dec 12. PMID: 26686807.
63. Read TRH, Murray GL, Danielewski JA, Fairley CK, Doyle M, Worthington K, Su J, Mokany E, Tan LT, Lee D, Vodstrcil LA, Chow EPF, Garland SM, Chen MY, Bradshaw CS. Symptoms, Sites, and Significance of *Mycoplasma genitalium* in Men Who Have Sex with Men. *Emerg Infect Dis.* 2019 Apr;25(4):719-727. Doi: 10.3201/eid2504.181258. PMID: 30882306; PMCID: PMC6433010.
64. Latimer RL, Vodstrcil L, De Petra V, Fairley CK, Read TR, Williamson D, Doyle M, Chow EP, Bradshaw C. Extragenital *Mycoplasma genitalium* infections among men who have sex with men. *Sex Transm Infect.* 2020 Feb;96(1):10-18. doi: 10.1136/sextrans-2019-054058. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31217322.
65. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Horowitz S, Horowitz J. *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994 Dec;13(12):1066-9. doi: 10.1007/BF02111830. PMID: 7889971.
66. Ong JJ, Bourne C, Dean JA, Ryder N, Cornelisse VJ, Murray S, Kenchington P, Moten A, Gibbs C, Maunsell S, Davis T, Michaels J, Medland NA. Australian sexually transmitted infection (STI) management guidelines for use in primary care 2022 update. *Sex Health.* 2022 Nov 11. doi: 10.1071/SH22134. Epub ahead of print. PMID: 36356948.
67. Soni S, Horner PJ. Launch of the BASHH guideline for the management of *M. genitalium* in adults. *Sex Transm Infect.* 2019 Jun;95(4):237. doi: 10.1136/sextrans-2018-053831. PMID: 31097546.

68. Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Oct;30(10):1650-1656. doi: 10.1111/jdv.13849. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27505296.
69. Sethi S, Zaman K, Jain N. *Mycoplasma genitalium* infections: current treatment options and resistance issues. *Infect Drug Resist*. 2017 Sep 1;10:283-292. doi: 10.2147/IDR.S105469. PMID: 28979150; PMCID: PMC5589104.
70. Lucena Nemirosky J, Espelt R, López Grado E, Sobrino J, Acera A, Pérez J, Jensen JS, Sánchez-Reus F, Prim N. Macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in Catalonia, Spain: a 1 year prospective study. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Sep 15;76(10):2702-2707. doi: 10.1093/jac/dkab224. PMID: 34278431.
71. Cadosch D, Garcia V, Jensen JS, Low N, Althaus CL. Understanding the spread of de novo and transmitted macrolide-resistance in *Mycoplasma genitalium*. *PeerJ*. 2020 Apr 7;8:e8913. doi: 10.7717/peerj.8913. PMID: 32292658; PMCID: PMC7147432.
72. van der Schalk TE, Braam JF, Kusters JG. Molecular basis of antimicrobial resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Apr;55(4):105911. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105911. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31991219.
73. Hamasuna R, Le PT, Kutsuna S, Furubayashi K, Matsumoto M, Ohmagari N, Fujimoto N, Matsumoto T, Jensen JS. Mutations in ParC and GyrA of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. *PLoS One*. 2018 Jun 8;13(6):e0198355. doi: 10.1371/journal.pone.0198355. PMID: 29883482; PMCID: PMC5993279.
74. Couldwell DL, Tagg KA, Jeffreys NJ, Gilbert GL. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *Int J STD AIDS*. 2013 Oct;24(10):822-8. doi: 10.1177/0956462413502008. Epub 2013 Aug 29. PMID: 24052013.
75. Barberá MJ, Fernández-Huerta M, Jensen JS, Caballero E, Andreu A. *Mycoplasma genitalium* Macrolide and Fluoroquinolone Resistance: Prevalence and Risk Factors Among a 2013-2014 Cohort of Patients in Barcelona, Spain. *Sex*

Transm Dis. 2017 Aug;44(8):457-462. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000631. PMID: 28703723.

76. Rivaya B, Le Roy C, Jordana-Lluch E, Fernández-Rivas G, Casañ C, González V, Wang-Wang JH, Bébéar C, Matas L, Pereyre S. Detection and Prevalence of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium* in Badalona, Spain. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Apr 5;11(4):485. doi: 10.3390/antibiotics11040485. PMID: 35453236; PMCID: PMC9025937.

77. Baumann L, Cina M, Egli-Gany D, Goutaki M, Halbeisen FS, Lohrer GR, Ali H, Scott P, Low N. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in different population groups: systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2018 Jun;94(4):255-262. doi: 10.1136/sextrans-2017-053384. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29440466; PMCID: PMC5969327.

78. Vicentini CB, Manfredini S, Maritati M, Di Nuzzo M, Contini C. Gonorrhoea, a current disease with ancient roots: from the remedies of the past to future perspectives. *Infez Med*. 2019 Jun 1;27(2):212-221. PMID: 31205048.

79. Vanbaelen T, Van Dijck C, Laumen J, Gonzalez N, De Baetselier I, Zhao SS, De Block T, Kenyon C. Global epidemiology of antimicrobial resistance in commensal *Neisseria* species: A systematic review. *Int J Med Microbiol*. 2022 Apr;312(3):151551. doi: 10.1016/j.ijmm.2022.151551. Epub 2022 Feb 22. PMID: 35231823.

80. Dorey RB, Theodosiou AA, Read RC, Jones CE. The nonpathogenic commensal *Neisseria*: friends and foes in infectious disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2019 Oct;32(5):490-496. doi: 10.1097/QCO.0000000000000585. PMID: 31356239.

81. Humbert MV, Christodoulides M. Atypical, Yet Not Infrequent, Infections with *Neisseria* Species. *Pathogens*. 2019 Dec 20;9(1):10. doi: 10.3390/pathogens9010010. PMID: 31861867; PMCID: PMC7168603.

82. Custodio R, Johnson E, Liu G, Tang CM, Exley RM. Commensal *Neisseria cinerea* impairs *Neisseria meningitidis* microcolony development and reduces pathogen colonisation of epithelial cells. *PLoS Pathog*. 2020 Mar 24;16(3):e1008372. doi: 10.1371/journal.ppat.1008372. PMID: 32208456; PMCID: PMC7092958.

83. Morse SA. Neisseria, Moraxella, Kingella and Eikenella. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 14. PMID: 21413257.
84. Semchenko EA, Tan A, Borrow R, Seib KL. The Serogroup B Meningococcal Vaccine Bexsero Elicits Antibodies to Neisseria gonorrhoeae. Clin Infect Dis. 2019 Sep 13;69(7):1101-1111. doi: 10.1093/cid/ciy1061. PMID: 30551148; PMCID: PMC6743822.
85. Seifert HS. Location, Location, Location-Commensalism, Damage and Evolution of the Pathogenic Neisseria. J Mol Biol. 2019 Jul 26;431(16):3010-3014. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.007. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30986425.
86. Imarai, M. , Acuña, C. , Escobar, A. , Maisey, K. , Reyes-Cerpa, S. . Mucosal Immunity and Evasion Strategies of Neisseria gonorrhoeae. In: Malla, N. , editor. Sexually Transmitted Infections [Internet]. London: IntechOpen; 2012 [cited 2022 Dec 07]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/33066> doi: 10.5772/32824
87. Stohl EA, Dale EM, Criss AK, Seifert HS. Neisseria gonorrhoeae metalloprotease NGO1686 is required for full piliation, and piliation is required for resistance to H₂O₂- and neutrophil-mediated killing. mBio. 2013 Jul 9;4(4):e00399-13. doi: 10.1128/mBio.00399-13. PMID: 23839218; PMCID: PMC3735123.
88. Shaughnessy J, Ram S, Rice PA. Biology of the Gonococcus: Disease and Pathogenesis. Methods Mol Biol. 2019;1997:1-27. doi: 10.1007/978-1-4939-9496-0_1. PMID: 31119614.
89. Quillin SJ, Seifert HS. Neisseria gonorrhoeae host adaptation and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2018 Apr;16(4):226-240. doi: 10.1038/nrmicro.2017.169. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29430011; PMCID: PMC6329377.
90. Deo P, Chow SH, Hay ID, Kleifeld O, Costin A, Elgass KD, Jiang JH, Ramm G, Gabriel K, Dougan G, Lithgow T, Heinz E, Naderer T. Outer membrane vesicles from Neisseria gonorrhoeae target PorB to mitochondria and induce apoptosis. PLoS Pathog. 2018 Mar 30;14(3):e1006945. doi: 10.1371/journal.ppat.1006945. PMID: 29601598; PMCID: PMC5877877.

91. Pérez-Losada M, Viscidi RP, Demma JC, Zenilman J, Crandall KA. Population genetics of *Neisseria gonorrhoeae* in a high-prevalence community using a hypervariable outer membrane porB and 13 slowly evolving housekeeping genes. *Mol Biol Evol.* 2005 Sep;22(9):1887-902. doi: 10.1093/molbev/msi184. Epub 2005 Jun 8. PMID: 15944444.
92. Lewis LA, Ram S. Complement interactions with the pathogenic *Neisseriae*: clinical features, deficiency states, and evasion mechanisms. *FEBS Lett.* 2020 Aug;594(16):2670-2694. doi: 10.1002/1873-3468.13760. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32058583.
93. Serra Pladevall, Judit; Andreu Domingo, Antònia, dir. *Neisseria gonorrhoeae* : monitorització de la sensibilitat antimicrobiana, estudi de la dinàmica poblacional i caracterització molecular de les resistències. 1 recurs en línia (Tesis doctotal). Universitat Autònoma de Barcelona ISBN 9788449028076. <<https://ddd.uab.cat/record/175808>>
94. Gulati S, Mu X, Zheng B, Reed GW, Ram S, Rice PA. Antibody to reduction modifiable protein increases the bacterial burden and the duration of gonococcal infection in a mouse model. *J Infect Dis.* 2015 Jul 15;212(2):311-5. doi: 10.1093/infdis/jiv024. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25596304; PMCID: PMC4565997.
95. Joiner KA, Scales R, Warren KA, Frank MM, Rice PA. Mechanism of action of blocking immunoglobulin G for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Invest.* 1985 Nov;76(5):1765-72. doi: 10.1172/JCI112167. PMID: 3932472; PMCID: PMC424204.
96. Schneider H, Schmidt KA, Skillman DR, Van De Verg L, Warren RL, Wylie HJ, Sadoff JC, Deal CD, Cross AS. Sialylation lessens the infectivity of *Neisseria gonorrhoeae* MS11mkC. *J Infect Dis.* 1996 Jun;173(6):1422-7. doi: 10.1093/infdis/173.6.1422. PMID: 8648215.
97. Mendes AC, Ciccone M, Gazolla B, Bahia D. Epithelial Haven and Autophagy Breakout in Gonococci Infection. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jun 9;8:439. doi: 10.3389/fcell.2020.00439. PMID: 32582714; PMCID: PMC7295977.
98. Harvey HA, Jennings MP, Campbell CA, Williams R, Apicella MA. Receptor-mediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral

epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. *Mol Microbiol.* 2001 Nov;42(3):659-72. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02666.x. PMID: 11722733.

99. Edwards JL, Apicella MA. The role of lipooligosaccharide in *Neisseria gonorrhoeae* pathogenesis of cervical epithelia: lipid A serves as a C3 acceptor molecule. *Cell Microbiol.* 2002 Sep;4(9):585-98. doi: 10.1046/j.1462-5822.2002.00212.x. PMID: 12390351.

100. Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Takahashi Y, Ishihara S, Kawamura Y, Ezaki T. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan;49(1):137-43. doi: 10.1128/AAC.49.1.137-143.2005. PMID: 15616287; PMCID: PMC538884.

101. Rao CV. Potential Therapy for *Neisseria Gonorrhoeae* Infections With Human Chorionic Gonadotropin. *Reprod Sci.* 2015 Dec;22(12):1484-7. doi: 10.1177/1933719115580998. Epub 2015 Apr 12. PMID: 25868582.

102. Kageyama M, Hagiya H, Ueda Y, Ohtani K, Fukumori Y, Inoue N, Wakamiya N, Yoneda N, Kimura K, Nagasawa M, Nakagami F, Nishi I, Sugimoto K, Rakugi H. Disseminated gonococcal infection in a Japanese man with complement 7 deficiency with compound heterozygous variants: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2021 Apr 2;100(13):e25265. doi: 10.1097/MD.00000000000025265. PMID: 33787610; PMCID: PMC8021336.

103. Lenz JD, Dillard JP. Pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* and the Host Defense in Ascending Infections of Human Fallopian Tube. *Front Immunol.* 2018 Nov 21;9:2710. doi: 10.3389/fimmu.2018.02710. PMID: 30524442; PMCID: PMC6258741.

104. Shaskolskiy B, Kravtsov D, Kandinov I, Gorshkova S, Kubanov A, Solomka V, Deryabin D, Dementieva E, Gryadunov D. Comparative Whole-Genome Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates Revealed Changes in the Gonococcal Genetic Island and Specific Genes as a Link to Antimicrobial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Feb 18;12:831336. doi: 10.3389/fcimb.2022.831336. PMID: 35252037; PMCID: PMC8895040.

105. Cehovin A, Lewis SB. Mobile genetic elements in *Neisseria gonorrhoeae*: movement for change. *Pathog Dis*. 2017 Aug 31;75(6). doi: 10.1093/femspd/ftx071. PMID: 28645177.
106. Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, Goto H, Suzuki H, Oishi Y. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 Gene (penA) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Dec;46(12):3744-9. doi: 10.1128/AAC.46.12.3744-3749.2002. PMID: 12435671; PMCID: PMC132769.
107. Rotman E, Seifert HS. The genetics of *Neisseria* species. *Annu Rev Genet*. 2014;48:405-31. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092007. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25251852.
108. Hamilton HL, Domínguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol*. 2005 Mar;55(6):1704-21. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04521.x. PMID: 15752195.
109. Sherrard J, Barlow D. Gonorrhoea in men: clinical and diagnostic aspects. *Genitourin Med*. 1996 Dec;72(6):422-6. doi: 10.1136/sti.72.6.422. PMID: 9038638; PMCID: PMC1195730.
110. Barberá MJ, Serra-Pladevall J. Gonococcal infection: An unresolved problem. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2019 Aug-Sep;37(7):458-466. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2018.12.008. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30732970.
111. Wallin JE, Thompson SE, Zaidi A, Wong KH. Urethritis in women attending an STD clinic. *Br J Vener Dis*. 1981 Feb;57(1):50-4. doi: 10.1136/sti.57.1.50. PMID: 6781707; PMCID: PMC1045868.
112. Hook EW 3rd, Holmes KK. Gonococcal infections. *Ann Intern Med* [Internet]. 1985;102(2):229-43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-102-2-229>
113. Jackson SL, O'Connell NG, Borzelleca JF, Dinsmoor MJ, Soper DE. Cervicitis as a clinical indicator of gonococcal and chlamydial infections in

- pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1995;3(5):184-8. doi: 10.1155/S1064744995000585. PMID: 18472888; PMCID: PMC2366149.
114. Xu SX, Gray-Owen SD. Gonococcal Pelvic Inflammatory Disease: Placing Mechanistic Insights Into the Context of Clinical and Epidemiological Observations. *J Infect Dis.* 2021 Aug 16;224(12 Suppl 2):S56-S63. doi: 10.1093/infdis/jiab227. PMID: 34396410; PMCID: PMC8365115.
115. de Vries HJC, Nori AV, Kiellberg Larsen H, Kreuter A, Padovese V, Pallawela S, Vall-Mayans M, Ross J. 2021 European Guideline on the management of proctitis, proctocolitis and enteritis caused by sexually transmissible pathogens. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021 Jul;35(7):1434-1443. doi: 10.1111/jdv.17269. Epub 2021 May 31. PMID: 34057249.
116. Mayor MT, Roett MA, Uduhiri KA. Diagnosis and management of gonococcal infections. *Am Fam Physician.* 2012 Nov 15;86(10):931-8. Erratum in: *Am Fam Physician.* 2013 Feb 1;87(3):163. PMID: 23157146.
117. Unemo M, Ross J, Serwin AB, Gomberg M, Cusini M, Jensen JS. 2020 European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2020 Oct 29;956462420949126. doi: 10.1177/0956462420949126. Epub ahead of print. PMID: 33121366.
118. Kawashima M, Kawakita T, Den S, Tomita M, Shimazaki J. Surgical management of corneal perforation secondary to gonococcal keratoconjunctivitis. *Eye (Lond).* 2009 Feb;23(2):339-44. doi: 10.1038/sj.eye.6703051. Epub 2007 Dec 7. PMID: 18064057.
119. Rice PA. Gonococcal arthritis (disseminated gonococcal infection). *Infect Dis Clin North Am.* 2005 Dec;19(4):853-61. doi: 10.1016/j.idc.2005.07.003. PMID: 16297736.
120. Ogbemor O, Mortimer TD, Fryling K, Zhang JJ, Bhanot N, Grad YH. Disseminated Gonococcal Infection Complicated by Prosthetic Joint Infection: Case Report and Genomic and Phylogenetic Analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2020 Dec 18;8(2):ofaa632. doi: 10.1093/ofid/ofaa632. PMID: 33553473; PMCID: PMC7850131.

121. Woods CR. Gonococcal infections in neonates and young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005 Oct;16(4):258-70. doi: 10.1053/j.spid.2005.06.006. PMID: 16210106.
122. Galán JC, Lepe JA, Otero L, Serra J, Vázquez F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. [Internet]. Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2019. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento24a.pdf>
123. Fernández Olmos A, García de la Fuente C, Saéz Nieto JA, Valdezate Ramos S. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. [internet] Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC);2010. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
124. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr;50(4):1355-61. doi: 10.1128/JCM.06094-11. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22238442; PMCID: PMC3318499.
125. Coll P, Coque M. T, Domínguez M. A, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. [internet] Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2005. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
126. 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 Jul;24(3):447-58. doi: 10.1128/CMR.00040-10. PMID: 21734242; PMCID: PMC3131056.

127. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, Van de Laar MJ. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill.* 2013 Jan 17;18(3):20358. PMID: 23351652.

128. Demczuk W, Sidhu S, Unemo M, Whiley DM, Allen VG, Dillon JR, Cole M, Seah C, Trembizki E, Trees DL, Kersh EN, Abrams AJ, de Vries HJC, van Dam AP, Medina I, Bharat A, Mulvey MR, Van Domselaar G, Martin I. Neisseria gonorrhoeae Sequence Typing for Antimicrobial Resistance, a Novel Antimicrobial Resistance Multilocus Typing Scheme for Tracking Global Dissemination of N. gonorrhoeae Strains. *J Clin Microbiol.* 2017 May;55(5):1454-1468. doi: 10.1128/JCM.00100-17. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28228492; PMCID: PMC5405263.

129. Unemo M, Golparian D, Sánchez-Busó L, Grad Y, Jacobsson S, Ohnishi M, Lahra MM, Limnios A, Sikora AE, Wi T, Harris SR. The novel 2016 WHO Neisseria gonorrhoeae reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Nov;71(11):3096-3108. doi: 10.1093/jac/dkw288. Epub 2016 Jul 17. PMID: 27432602; PMCID: PMC5079299.

130. Guerrero Torres, María Dolores (2021) Epidemiología, caracterización molecular y estudio de resistencia a antimicrobianos de aislamientos de Neisseria gonorrhoeae en un centro de infecciones de transmisión sexual de la Comunidad de Madrid. [Tesis doctoral] Universidad Complutense de Madrid.

131. Golparian D, Unemo M. Now Is the Time to Implement Whole Genome Sequencing in the Global Antimicrobial Resistance Surveillance for Neisseria gonorrhoeae? *EClinicalMedicine.* 2019 Feb 18;7:11-12. doi: 10.1016/j.eclinm.2019.02.002. PMID: 31193652; PMCID: PMC6539334

132. Grupo de estudio del SIDA SEIMC (GESIDA). Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos,

- niños y adolescentes. [Internet]. GESIDA; 2017 [citado 10 noviembre 2022]. Disponible en: <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/otras-guidas-vigentes/>
133. Kampmeier RH. Introduction of sulfonamide therapy for gonorrhea. *Sex Transm Dis*. 1983 Apr-Jun;10(2):81-4. doi: 10.1097/00007435-198304000-00007. PMID: 6362039.
134. Campbell DJ. Gonorrhoea in N. Africa and Central Mediterranean. *Br Med J*. 1944 Jul 8;2(4357):44. doi: 10.1136/bmj.2.4357.44. PMID: 20785525; PMCID: PMC2285755.
135. Csonka GW, Knight GJ. Therapeutic trial of trimethoprim as a potentiator of sulphonamides in gonorrhoea. *Br J Vener Dis*. 1967 Sep;43(3):161-5. doi: 10.1136/sti.43.3.161. PMID: 5233504; PMCID: PMC1047874.
136. 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. doi: 10.1128/CMR.00010-14. PMID: 24982323; PMCID: PMC4135894.
137. Costa-Lourenço APRD, Barros Dos Santos KT, Moreira BM, Fracalanza SEL, Bonelli RR. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. *Braz J Microbiol*. 2017 Oct-Dec;48(4):617-628. doi: 10.1016/j.bjm.2017.06.001. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28754299; PMCID: PMC5628311.
138. Mahoney JF, Ferguson C, Buchholtz M, van Slyke CJ. The use of penicillin sodium in the treatment of sulfonamide-resistant gonorrhea in men. A preliminary report. *Am J Gonorr Vener Dis*. 1943;27:525-8.
139. Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986 Nov;30(5):664-70. doi: 10.1128/AAC.30.5.664. PMID: 3099640; PMCID: PMC176510.
140. Gransden WR, Warren CA, Phillips I, Hodges M, Barlow D. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. *Lancet*. 1990 Jan 6;335(8680):51. doi: 10.1016/0140-6736(90)90177-7. Erratum in: *Lancet* 1990 Feb 3;335(8684):302. PMID: 1967354.

141. Bakheit AH, Al-Hadiya BM, Abd-Elgalil AA. Azithromycin. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2014;39:1-40. doi: 10.1016/B978-0-12-800173-8.00001-5. PMID: 24794904.
142. Derby A, Mekonnen D, Woldeamanuel Y, Abebe T. Azithromycin resistant gonococci: a literature review. Antimicrob Resist Infect Control. 2020 Aug 18;9(1):138. doi: 10.1186/s13756-020-00805-7. PMID: 32811545; PMCID: PMC7436955.
143. Galarza PG, Abad R, Canigia LF, Buscemi L, Pagano I, Oviedo C, Vázquez JA. 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. doi: 10.1128/AAC.01506-09. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20123998; PMCID: PMC2849369.
144. 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. doi: 10.1128/AAC.00309-10. Epub 2010 Jun 28. PMID: 20585125; PMCID: PMC2935028.
145. Shimuta K, Lee K, Yasuda M, Furubayashi K, Uchida C, Nakayama SI, Takahashi H, Ohnishi M. Characterization of 2 *Neisseria gonorrhoeae* Strains With High-Level Azithromycin Resistance Isolated in 2015 and 2018 in Japan. Sex Transm Dis. 2021 Jul 1;48(7):e85-e87. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001303. PMID: 32976359.
146. Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhea: the impending problem of resistance. Expert Opin Pharmacother. 2009 Mar;10(4):555-77. doi: 10.1517/14656560902731993. PMID: 19284360; PMCID: PMC2657229.
147. Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Takahashi Y, Ishihara S, Kawamura Y, Ezaki T. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jan;49(1):137-43. doi: 10.1128/AAC.49.1.137-143.2005. PMID: 15616287; PMCID: PMC538884.
148. -Cole MJ, Day M, Jacobsson S, Amato-Gauci AJ, Spiteri G, Unemo M; , the European Gonorrhoea Response Plan Group; European Gonorrhoea Response

Plan Group. The European response to control and manage multi- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Euro Surveill.* 2022 May;27(18):2100611. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.18.2100611. PMID: 35514307; PMCID: PMC9074391.

149. Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Watanabe H, Kitawaki J. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jan;17(1):148-9. doi: 10.3201/eid1701.100397. PMID: 21192886; PMCID: PMC3204624.

150. Pleininger S, Indra A, Golparian D, Heger F, Schindler S, Jacobsson S, Heidler S, Unemo M. Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* causing possible gonorrhoea treatment failure with ceftriaxone plus azithromycin in Austria, April 2022. *Euro Surveill.* 2022 Jun;27(24):2200455. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.24.2200455. PMID: 35713023; PMCID: PMC9205165.

151. Poncin T, Fouere S, Braille A, Camelena F, Agsous M, Bebear C, Kumanski S, Lot F, Mercier-Delarue S, Ngangro NN, Salmona M, Schnepf N, Timsit J, Unemo M, Bercot B. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* failing treatment with ceftriaxone and doxycycline in France, November 2017. *Euro Surveill.* 2018 May;23(21):1800264. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.21.1800264. PMID: 29845928; PMCID: PMC6152217.

152. Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, Ardanuy C. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Aug;67(8):1858-60. doi: 10.1093/jac/dks162. Epub 2012 May 7. PMID: 22566592.

153. Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, Marusza W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance and Epidemiology of Multidrug-Resistant Variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 10;23(18):10499. doi: 10.3390/ijms231810499. PMID: 36142410; PMCID: PMC9505821.

154. Rouquette-Loughlin C, Dunham SA, Kuhn M, Balthazar JT, Shafer WM. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes

antimicrobial cationic compounds. *J Bacteriol.* 2003 Feb;185(3):1101-6. doi: 10.1128/JB.185.3.1101-1106.2003. PMID: 12533487; PMCID: PMC142806.

155. Pham CD, Nash E, Liu H, Schmerer MW, Sharpe S, Woods G, Roland B, Schlanger K, St Cyr SB, Carlson J, Sellers K, Olsen A, Sanon R, Hardin H, Soge OO, Raphael BH, Kersh EN. Atypical Mutation in *Neisseria gonorrhoeae* 23S rRNA Associated with High-Level Azithromycin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Jan 20;65(2):e00885-20. doi: 10.1128/AAC.00885-20. PMID: 33139288; PMCID: PMC7848993.

156. Ma KC, Mortimer TD, Duckett MA, Hicks AL, Wheeler NE, Sánchez-Busó L, Grad YH. Increased power from conditional bacterial genome-wide association identifies macrolide resistance mutations in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nat Commun.* 2020 Oct 23;11(1):5374. doi: 10.1038/s41467-020-19250-6. PMID: 33097713; PMCID: PMC7584619.

157. Manoharan-Basil SS, Laumen JGE, Van Dijck C, De Block T, De Baetselier I, Kenyon C. Evidence of Horizontal Gene Transfer of 50S Ribosomal Genes *rplB*, *rplD*, and *rplY* in *Neisseria gonorrhoeae*. *Front Microbiol.* 2021 Jun 10;12:683901. doi: 10.3389/fmicb.2021.683901. PMID: 34177869; PMCID: PMC8222677.

158. Routh MD, Zalucki Y, Su CC, Zhang Q, Shafer WM, Yu EW. Efflux pumps of the resistance-nodulation-division family: a perspective of their structure, function, and regulation in gram-negative bacteria. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 2011;77:109-46. doi: 10.1002/9780470920541.ch3. PMID: 21692368; PMCID: PMC4390553.

159. Handing JW, Ragland SA, Bharathan UV, Criss AK. The MtrCDE Efflux Pump Contributes to Survival of *Neisseria gonorrhoeae* From Human Neutrophils and Their Antimicrobial Components. *Front Microbiol.* 2018 Nov 20;9:2688. doi: 10.3389/fmicb.2018.02688. PMID: 30515136; PMCID: PMC6256084.

160. Ohneck EA, Goytia M, Rouquette-Loughlin CE, Joseph SJ, Read TD, Jerse AE, Shafer WM. Overproduction of the MtrCDE efflux pump in *Neisseria gonorrhoeae* produces unexpected changes in cellular transcription patterns. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan;59(1):724-6. doi: 10.1128/AAC.04148-14. Epub 2014 Nov 3. PMID: 25367915; PMCID: PMC4291417.

161. Sawatzky P, Demczuk W, Lefebvre B, Allen V, Diggle M, Hoang L, Van Caesele P, Haldane D, Minion J, Mulvey MR, Martin I. Increasing Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Due to NG-MAST 12302 Clonal Spread in Canada, 2015 to 2018. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Mar 15;66(3):e0168821. doi: 10.1128/AAC.01688-21. Epub 2022 Jan 3. PMID: 34978884; PMCID: PMC8923198.
162. Hagman KE, Shafer WM. Transcriptional control of the mtr efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1995 Jul;177(14):4162-5. doi: 10.1128/jb.177.14.4162-4165.1995. PMID: 7608095; PMCID: PMC177154.
163. Rouquette-Loughlin CE, Balthazar JT, Shafer WM. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Nov;56(5):856-60. doi: 10.1093/jac/dki333. Epub 2005 Sep 14. PMID: 16162665.
164. Kubanov AA, Runina AV, Chestkov AV, Kudryavtseva AV, Pekov YA, Korvigo IO, Deryabin DG. Whole-Genome Sequencing of Russian *Neisseria Gonorrhoeae* Isolates Related to ST 1407 Genogroup. *Acta Naturae.* 2018 Jul-Sep;10(3):68-76. PMID: 30397529; PMCID: PMC6209400.
165. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 Feb;27(2):116-29. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2008.12.001. Epub 2009 Feb 15. PMID: 19254642.
166. Guerrero-Torres MD, Menéndez MB, Guerras CS, Tello E, Ballesteros J, Clavo P, Puerta T, Vera M, Ayerdi O, Carrio JC, Mozo I, Del Romero J, Vázquez JA, Abad R. Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016. *Epidemiol Infect.* 2019 Sep 24;147:e274. doi: 10.1017/S095026881900150X. PMID: 31547889; PMCID: PMC6805738.
167. Olesky M, Zhao S, Rosenberg RL, Nicholas RA. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. *J Bacteriol.* 2006 Apr;188(7):2300-8. doi: 10.1128/JB.188.7.2300-2308.2006. PMID: 16547016; PMCID: PMC1428387.
168. Pérez-Losada M, Viscidi RP, Demma JC, Zenilman J, Crandall KA. Population genetics of *Neisseria gonorrhoeae* in a high-prevalence community

using a hypervariable outer membrane porB and 13 slowly evolving housekeeping genes. *Mol Biol Evol.* 2005 Sep;22(9):1887-902. doi: 10.1093/molbev/msi184. Epub 2005 Jun 8. PMID: 15944444.

169. Mitchev N, Singh R, Ramsuran V, Ismail A, Allam M, Kwenda S, Mnyameni F, Garrett N, Swe Swe-Han K, Niehaus AJ, Mlisana KP. Assessment of Antibiotic Resistance and Efflux Pump Gene Expression in *Neisseria Gonorrhoeae* Isolates from South Africa by Quantitative Real-Time PCR and Regression Analysis. *Int J Microbiol.* 2022 Oct 21;2022:7318325. doi: 10.1155/2022/7318325. PMID: 36312786; PMCID: PMC9616671.

170. Veal WL, Nicholas RA, Shafer WM. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an mtrR mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 2002 Oct;184(20):5619-24. doi: 10.1128/JB.184.20.5619-5624.2002. PMID: 12270819; PMCID: PMC139619.

171. Sethi S, Golparian D, Bala M, Dorji D, Ibrahim M, Jabeen K, Unemo M. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from India, Pakistan and Bhutan in 2007-2011. *BMC Infect Dis.* 2013 Jan 24;13:35. doi: 10.1186/1471-2334-13-35. PMID: 23347339; PMCID: PMC3565906.

172. Cristillo AD, Bristow CC, Torrone E, Dillon JA, Kirkcaldy RD, Dong H, Grad YH, Nicholas RA, Rice PA, Lawrence K, Oldach D, Shafer WM, Zhou P, Wi TE, Morris SR, Klausner JD. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Proceedings of the STAR Sexually Transmitted Infection-Clinical Trial Group Programmatic Meeting. *Sex Transm Dis.* 2019 Mar;46(3):e18-e25. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000929. PMID: 30363025; PMCID: PMC6370498.

173. Sood S, Agarwal M, Bala M, Mahajan N, Singh R, Kapil A, Sreenivas V, Ram RJ, Kar HK, Sharma VK; for ICMR Collaborative Study*. Exploring quinolone resistance-determining region in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from across India. *Indian J Med Res.* 2017 Jul;146(Supplement):S64-S69. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_730_15. PMID: 29205198; PMCID: PMC5735573.

174. Zhao LH, Zhao SP. Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Shandong Province, China. *Braz J Microbiol.*

2013 May 7;44(1):273-6. doi: 10.1590/S1517-83822013005000020. PMID: 24159315; PMCID: PMC3804209.

175. Jensen JS. Protocol for the detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR from clinical specimens and subsequent detection of macrolide resistance-mediating mutations in region V of the 23S rRNA gene. *Methods Mol Biol.* 2012;903:129-39. doi: 10.1007/978-1-61779-937-2_8. PMID: 22782815.

176. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-134-5 [Print]; ISBN 978-1-68440-135-2 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2022.

177. "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.[internet].Version 12.0, 2022. Available from: <http://www.eucast.org>

178. -Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017 Jun 8;13(6):e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595. PMID: 28594827; PMCID: PMC5481147.

179. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014 Jul 15;30(14):2068-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153. Epub 2014 Mar 18. PMID: 24642063.

180. Unemo M, Fasth O, Fredlund H, Limnios A, Tapsall J. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jun;63(6):1142-51. doi: 10.1093/jac/dkp098. Epub 2009

181. -Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19505943; PMCID: PMC2723002.

182. -Liu F, Zhang Y, Zhang L, Li Z, Fang Q, Gao R, Zhang Z. Systematic comparative analysis of single-nucleotide variant detection methods from single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol.* 2019 Nov 19;20(1):242. doi: 10.1186/s13059-019-1863-4. PMID: 31744515; PMCID: PMC6862814.
183. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SR. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015 Feb 18;43(3):e15. doi: 10.1093/nar/gku1196. Epub 2014 Nov 20. PMID: 25414349; PMCID: PMC4330336.
184. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014 May 1;30(9):1312-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24451623; PMCID: PMC3998144.
185. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul;55(7):3538-45. doi: 10.1128/AAC.00325-11. Epub 2011 May 16. PMID: 21576437; PMCID: PMC3122416.
186. Asenjo A, Kusters JG, Severs TT, Alós JI. *Mycoplasma genitalium* in Spain: prevalence of genital infection and frequency of resistance to macrolides. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2018 Mar;36(3):169-171. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2017.01.006. Epub 2017 Mar 11. PMID: 28291669.
187. Trueba Argamasilla AA, Martínez Jordán J, Moreno-Docón A. Azithromycin and moxifloxacin resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*, in the Region of Murcia, by a commercial PCR assay. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet].* 2022; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2022.04.017>
188. López-Corbeto E, González V, Lugo R, Rivaya B, Casabona J, Matas L; CT/NG Study Group; Investigators of the CT/NG Study Group:. Pooling of urine samples for molecular detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* as a screening strategy among young adults in

Catalonia. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2020 Feb;38(2):65-71. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2019.05.003. Epub 2019 Jul 7. PMID: 31288994.

189. -Muñoz Santa A, Aramburu Arnuelos J, Bernet Sánchez A, Bellés Bellés A. *Mycoplasma genitalium*: Analysis of mutations associated with macrolide resistance in Lleida, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021 Mar 23:S0213-005X(21)00041-0. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2021.02.004. Epub ahead of print. PMID: 33771406.

190. -Treviño M, Rodríguez-Velasco M, Manso T, Cea M. *Mycoplasma genitalium* en Atención Primaria: Prevalencia y resistencia a azitromicina en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela [*Mycoplasma genitalium* in Primary Care: Prevalence and azithromycin resistance in Santiago de Compostela Health Care Area]. *Rev Esp Quimioter*. 2021 Oct;34(5):496-499. Spanish. doi: 10.37201/req/052.2021. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34286949; PMCID: PMC8638832.

191. Sonnenberg P, Ison CA, Clifton S, Field N, Tanton C, Soldan K, Beddows S, Alexander S, Khanom R, Saunders P, Copas AJ, Wellings K, Mercer CH, Johnson AM. Epidemiology of *Mycoplasma genitalium* in British men and women aged 16–44 years: evidence from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *Int J Epidemiol*. 2015 Dec;44(6):1982-94. doi: 10.1093/ije/dyv194. PMID: 26534946; PMCID: PMC4690003.

192. -Edouard S, Tissot-Dupont H, Dubourg G, Bernard A, Fournier PE, Ravaux I, Stein A, Raoult D. *Mycoplasma genitalium*, an agent of reemerging sexually transmitted infections. *APMIS*. 2017 Oct;125(10):916-920. doi: 10.1111/apm.12731. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28762558.

193. Jansen K, Steffen G, Potthoff A, Schuppe AK, Beer D, Jessen H, Scholten S, Spornraft-Ragaller P, Bremer V, Tiemann C; MSM Screening Study group. STI in times of PrEP: high prevalence of chlamydia, gonorrhoea, and mycoplasma at different anatomic sites in men who have sex with men in Germany. *BMC Infect Dis*. 2020 Feb 7;20(1):110. doi: 10.1186/s12879-020-4831-4. PMID: 32033533; PMCID: PMC7007644.

194. Van Praet JT, Steyaert S, Vandecasteele S, Van Den Bergh B, Mahieu H, De Buyser S, Grootaert V, Descheemaeker P, Reynders M. *Mycoplasma genitalium*

acquisition and macrolide resistance after initiation of HIV pre-exposure prophylaxis in men who have sex with men. *Sex Transm Infect.* 2020 Sep;96(6):396-398. doi: 10.1136/sextrans-2019-054335. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31896737.

195. Ring A, Balakrishna S, Imkamp F, Burkard S, Triet F, Brunschweiler F, Grube C, Bodmer R, Kouyos RD, Günthard HF, Braun DL. High Rates of Asymptomatic *Mycoplasma genitalium* Infections With High Proportion of Genotypic Resistance to First-Line Macrolide Treatment Among Men Who Have Sex With Men Enrolled in the Zurich Primary HIV Infection Study. *Open Forum Infect Dis.* 2022 Apr 27;9(6):ofac217. doi: 10.1093/ofid/ofac217. PMID: 35783686; PMCID: PMC9246285.

196. Desdorf R, Andersen NM, Chen M. *Mycoplasma genitalium* prevalence and macrolide resistance-associated mutations and coinfection with *Chlamydia trachomatis* in Southern Jutland, Denmark. *APMIS.* 2021 Dec;129(12):706-710. doi: 10.1111/apm.13174. Epub 2021 Oct 24. PMID: 34580906; PMCID: PMC9297889.

197. -Fernández-Huerta M, Vall M, Fernández-Naval C, Barberá MJ, Arando M, López L, Andreu A, Pumarola T, Serra-Pladevall J, Esperalba J, Espasa M. *Mycoplasma genitalium* macrolide resistance update: Rate among a 2016-2017 cohort of patients in Barcelona, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2020 Mar;38(3):99-104. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2019.06.008. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31445815.

198. Van Der Pol B, Waites KB, Xiao L, Taylor SN, Rao A, Nye M, Chavoustie S, Ermel A, Kaplan C, Eisenberg D, Chan PA, Mena L, Pacheco S, Krishnamurthy S, Mohan R, Bertuzis R, McGowin CL, Arcenas R, Marlowe EM. *Mycoplasma genitalium* Detection in Urogenital Specimens from Symptomatic and Asymptomatic Men and Women by Use of the cobas TV/MG Test. *J Clin Microbiol.* 2020 May 26;58(6):e02124-19. doi: 10.1128/JCM.02124-19. PMID: 32213558; PMCID: PMC7269414.

199. Horner PJ, Blee K, Falk L, van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS.* 2016 Oct;27(11):928-37. doi: 10.1177/0956462416648585. Epub 2016 May 4. PMID: 27147267.

200. Nye MB, Harris AB, Pherson AJ, Cartwright CP. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection in women with bacterial vaginosis. *BMC Womens Health*. 2020 Mar 26;20(1):62. doi: 10.1186/s12905-020-00926-6. PMID: 32216785; PMCID: PMC7
201. Horner P, Ingle SM, Garrett F, Blee K, Kong F, Muir P, Moi H. Which azithromycin regimen should be used for treating *Mycoplasma genitalium*? A meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2018 Feb;94(1):14-20. doi: 10.1136/sextrans-2016-053060. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28717050.
202. Gratrix J, Plitt S, Turnbull L, Smyczek P, Brandley J, Scarrott R, Naidu P, Parker P, Blore B, Bull A, Shokoples S, Bertholet L, Martin I, Chernesky M, Read R, Singh A. Prevalence and antibiotic resistance of *Mycoplasma genitalium* among STI clinic attendees in Western Canada: a cross-sectional analysis. *BMJ Open*. 2017 Jul 10;7(7):e016300. doi: 10.1136/bmjopen-2017-016300. PMID: 28698342; PMCID: PMC5541599.099815.
203. Pitt R, Fifer H, Woodford N, Hopkins S, Cole MJ. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* coinfections and *M. genitalium* antimicrobial resistance in rectal specimens. *Sex Transm Infect*. 2021 Sep;97(6):469-470. doi: 10.1136/sextrans-2020-054803. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33106438.
204. Molenaar MC, Singer M, Ouburg S. The two-sided role of the vaginal microbiome in *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* pathogenesis. *J Reprod Immunol*. 2018 Nov;130:11-17. doi: 10.1016/j.jri.2018.08.006. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30149363.
205. Bissessor M, Tabrizi SN, Twin J, Abdo H, Fairley CK, Chen MY, Vodstrcil LA, Jensen JS, Hocking JS, Garland SM, Bradshaw CS. Macrolide resistance and azithromycin failure in a *Mycoplasma genitalium*-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. *Clin Infect Dis*. 2015 Apr 15;60(8):1228-36. doi: 10.1093/cid/ciu1162. Epub 2014 Dec 23. PMID: 25537875.
206. Kristiansen GQ, Lisby JG, Schønning K. A 5' Nuclease Genotyping Assay for Identification of Macrolide-Resistant *Mycoplasma genitalium* in Clinical Specimens.

- J Clin Microbiol. 2016 Jun;54(6):1593-1597. doi: 10.1128/JCM.00012-16. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27053672; PMCID: PMC4879279.
207. Tagg KA, Jeoffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA, Gilbert GL. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2245-9. doi: 10.1128/JCM.00495-13. Epub 2013 May 8. PMID: 23658265; PMCID: PMC3697725.
208. Hadad R, Golparian D, Lagos AC, Ljungberg J, Nilsson P, Jensen JS, Fredlund H, Unemo M. Macrolide and fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium* in two Swedish counties, 2011-2015. APMIS. 2018 Feb;126(2):123-127. doi: 10.1111/apm.12792. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29235145.
209. Shipitsyna E, Rumyantseva T, Golparian D, Khayrullina G, Lagos AC, Edelstein I, Joers K, Jensen JS, Savicheva A, Rudneva N, Sukhanova L, Kozlov R, Guschin A, Unemo M. Prevalence of macrolide and fluoroquinolone resistance-mediating mutations in *Mycoplasma genitalium* in five cities in Russia and Estonia. PLoS One. 2017 Apr 13;12(4):e0175763. doi: 10.1371/journal.pone.0175763. PMID: 28407014; PMCID: PMC5391023.
210. Chrismont D, Charron A, Cazanave C, Pereyre S, Bébéar C. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in France. J Antimicrob Chemother. 2012 Nov;67(11):2598-601. doi: 10.1093/jac/dks263. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22773740.
211. Gossé M, Nordbø SA, Pukstad B. Bacterial Load in Daily Urine Samples of Patients Infected with *Mycoplasma genitalium*, Mutation Analysis, and Response to Treatment. Infect Dis Obstet Gynecol. 2016;2016:8382469. doi: 10.1155/2016/8382469. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27829780; PMCID: PMC5088277.
212. Fernández-Huerta M, Serra-Pladevall J, Esperalba J, Moreno-Mingorance A, Fernández-Naval C, Barberá MJ, Aparicio D, Pich OQ, Pumarola T, Jensen JS, Espasa M. Single-Locus-Sequence-Based Typing of the *mgpB* Gene Reveals Transmission Dynamics in *Mycoplasma genitalium*. J Clin Microbiol. 2020 Mar 25;58(4):e01886-19. doi: 10.1128/JCM.01886-19. PMID: 31941694; PMCID: PMC7098777.

213. Braam JF, Slotboom B, Van Marm S, Severs TT, Van Maarseveen NM, Van Zwet T, Boel ECH, Berkhout H, Hagen F, Van De Bovenkamp JHB, Van Dommelen L, Kusters JG. High prevalence of the A2058T macrolide resistance-associated mutation in *Mycoplasma genitalium* strains from the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2017 May 1;72(5):1529-1530. doi: 10.1093/jac/dkw584. PMID: 28158595.
214. Ando N, Mizushima D, Takano M, Mitobe M, Miyake H, Yokoyama K, Sadamasu K, Aoki T, Watanabe K, Uemura H, Yanagawa Y, Gatanaga H, Oka S. High prevalence of circulating dual-class resistant *Mycoplasma genitalium* in asymptomatic MSM in Tokyo, Japan. *JAC Antimicrob Resist.* 2021 Jun 30;3(2):dlab091. doi: 10.1093/jacamr/dlab091. PMID: 34223146; PMCID: PMC8242132.
215. Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bébéar C, Pereyre S. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1549-55. doi: 10.1128/JCM.03318-13. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24574291; PMCID: PMC3993663.
216. Unemo M, Salado-Rasmussen K, Hansen M, Olsen AO, Falk M, Golparian D, Aasterød M, Ringlander J, Nilsson CS, Sundqvist M, Schønning K, Moi H, Westh H, Jensen JS. Clinical and analytical evaluation of the new Aptima *Mycoplasma genitalium* assay, with data on *M. genitalium* prevalence and antimicrobial resistance in *M. genitalium* in Denmark, Norway and Sweden in 2016. *Clin Microbiol Infect.* 2018 May;24(5):533-539. doi: 10.1016/j.cmi.2017.09.006. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28923377.
217. Björnelius E, Anagrius C, Bojs G, Carlberg H, Johannisson G, Johansson E, Moi H, Jensen JS, Lidbrink P. Antibiotic treatment of symptomatic *Mycoplasma genitalium* infection in Scandinavia: a controlled clinical trial. *Sex Transm Infect.* 2008 Feb;84(1):72-6. doi: 10.1136/sti.2007.027375. Epub 2007 Oct 11. PMID: 17932127.
218. Gnanadurai R, Fifer H. *Mycoplasma genitalium*: A Review. *Microbiology (Reading).* 2020 Jan;166(1):21-29. doi: 10.1099/mic.0.000830. PMID: 31329090.

219. Unemo M, Fasth O, Fredlund H, Limnios A, Tapsall J. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jun;63(6):1142-51. doi: 10.1093/jac/dkp098. Epub 2009 Mar 24. PMID: 19318360.
220. -WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: World Health Organization; 2016. PMID: 27512795.
221. -Salmerón P, Viñado B, Arando M, Alcoceba E, Romero B, Menéndez B, Bernal S, Idigoras P, Colomina J, Martin-Saco G, Leal-Negredo Á, Torreblanca A, Martínez O, Serra-Pladevall J. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Spain: a prospective multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2021 May 12;76(6):1523-1531. doi: 10.1093/jac/dkab037. PMID: 33569588.
222. .European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in the Europe Union/European Economic Area. Summary of results 2020. Stockholm: ECDC; 2022.
223. Wind CM, de Vries E, Schim van der Loeff MF, van Rooijen MS, van Dam AP, Demczuk WHB, Martin I, de Vries HJC. Decreased Azithromycin Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Patients Recently Treated with Azithromycin. *Clin Infect Dis.* 2017 Jul 1;65(1):37-45. doi: 10.1093/cid/cix249. PMID: 28510723.
224. Salmerón P, Viñado B, El Ouazzani R, Hernández M, Barbera MJ, Alberny M, Jané M, Larrosa N, Pumarola T, Hoyos-Mallecot Y, Serra-Pladevall J. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona during a five-year period, 2013 to 2017. *Euro Surveill.* 2020 Oct;25(42):1900576. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.42.1900576. PMID: 33094716; PMCID: PMC7651876.
225. Serra-Pladevall J, Barberá-Gracia MJ, Roig-Carbajosa G, Juvé-Saumell R, Gonzalez-Lopez JJ, Bartolomé-Comas R, Andreu-Domingo A. *Neisseria gonorrhoeae*: resistencias antimicrobianas y estudio de la dinámica poblacional. Situación en 2011 en Barcelona [*Neisseria gonorrhoeae*: antimicrobial resistance and study of population dynamics. Situation in Barcelona in 2011]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013 Nov;31(9):579-83. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2013.03.010. Epub 2013 Apr 25. PMID: 23623686.

226. Salmerón P, Moreno-Mingorance A, Trejo J, Amado R, Viñado B, Cornejo-Sanchez T, Albery M, Barbera MJ, Arando M, Pumarola T, Hoyos-Mallecot Y, Serra-Pladevall J, González-López JJ. Emergence and dissemination of three mild outbreaks of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Barcelona, 2016-18. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Mar 12;76(4):930-935. doi: 10.1093/jac/dkaa536. PMID: 33367806.
227. Pleininger S, Indra A, Golparian D, Heger F, Schindler S, Jacobsson S, Heidler S, Unemo M. Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* causing possible gonorrhoea treatment failure with ceftriaxone plus azithromycin in Austria, April 2022. *Euro Surveill.* 2022 Jun;27(24):2200455. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.24.2200455. PMID: 35713023; PMCID: PMC9205165.
228. Fifer H, Cole M, Hughes G, Padfield S, Smolarchuk C, Woodford N, Wensley A, Mustafa N, Schaefer U, Myers R, Templeton K, Shepherd J, Underwood A. Sustained transmission of high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in England: an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2018 May;18(5):573-581. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30122-1. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29523496.
229. Eyre DW, Sanderson ND, Lord E, Regisford-Reimmer N, Chau K, Barker L, Morgan M, Newnham R, Golparian D, Unemo M, Crook DW, Peto TE, Hughes G, Cole MJ, Fifer H, Edwards A, Andersson MI. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Euro Surveill.* 2018 Jul;23(27):1800323. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.27.1800323. PMID: 29991383; PMCID: PMC6152157.
230. Whiley DM, Jennison A, Pearson J, Lahra MM. Genetic characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to both ceftriaxone and azithromycin. *Lancet Infect Dis.* 2018 Jul;18(7):717-718. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30340-2. PMID: 29976521.
231. -Yuan Q, Li Y, Xiu L, Zhang C, Fu Y, Jiang C, Tang L, Peng J. Identification of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with combined resistance to both ceftriaxone and azithromycin, China, 2017-2018. *Emerg Microbes Infect.*

2019;8(1):1546-1549. doi: 10.1080/22221751.2019.1681242. PMID: 31661379; PMCID: PMC6830194.

232. Jennison AV, Whiley D, Lahra MM, Graham RM, Cole MJ, Hughes G, Fifer H, Andersson M, Edwards A, Eyre D. Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and high-level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. *Euro Surveill.* 2019 Feb;24(8):1900118. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1900118. PMID: 30808445; PMCID: PMC6446956

233. Fifer H, Saunders J, Soni S, Sadiq ST, FitzGerald M. 2018 UK national guideline for the management of infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J STD AIDS.* 2020 Jan;31(1):4-15. doi: 10.1177/0956462419886775. PMID: 31870237.

234. Joseph SJ, Thomas JC, Schmerer MW, Cartee JC, St Cyr S, Schlanger K, Kersh EN, Raphael BH, Gernert KM; Antimicrobial Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Working Group. Global Emergence and Dissemination of *Neisseria gonorrhoeae* ST-9363 Isolates with Reduced Susceptibility to Azithromycin. *Genome Biol Evol.* 2022 Jan 4;14(1):evab287. doi: 10.1093/gbe/evab287. PMID: 34962987; PMCID: PMC8778598.

235. Williamson DA, Chow EPF, Gorrie CL, Seemann T, Ingle DJ, Higgins N, Easton M, Tairaoa G, Grad YH, Kwong JC, Fairley CK, Chen MY, Howden BP. Bridging of *Neisseria gonorrhoeae* lineages across sexual networks in the HIV pre-exposure prophylaxis era. *Nat Commun.* 2019 Sep 5;10(1):3988. doi: 10.1038/s41467-019-12053-4. PMID: 31488838; PMCID: PMC6728426.

236. Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, Sánchez-Busó L, Golparian D, Jacobsson S, Goater R, Abudahab K, Yeats CA, Bercot B, Borrego MJ, Crowley B, Stefanelli P, Tripodo F, Abad R, Aanensen DM, Unemo M; Euro-GASP study group. Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis.* 2018 Jul;18(7):758-768. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30225-1. Epub 2018 May 15. PMID: 29776807; PMCID: PMC6010626.

237. Schaeffer J, Lippert K, Pleininger S, Stöger A, Hasenberger P, Stadlbauer S, Heger F, Eigentler A, Geusau A, Indra A, Allerberger F, Ruppitsch W. Association

of Phylogenomic Relatedness among *Neisseria gonorrhoeae* Strains with Antimicrobial Resistance, Austria, 2016-2020. *Emerg Infect Dis.* 2022 Aug;28(8):1694-1698. doi: 10.3201/eid2808.220071. PMID: 35876744; PMCID: PMC9328923.

238. Alonso R, Rodríguez-Achaerandio A, Aguirre-Quiñonero A, Artetxe A, Martínez-Ballesteros I, Rodríguez-Gascón A, Garaizar J, Canut A. Molecular Epidemiology, Antimicrobial Surveillance, and PK/PD Analysis to Guide the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae* Infections. *Pharmaceutics.* 2021 Oct 15;13(10):1699. doi: 10.3390/pharmaceutics13101699. PMID: 34683991; PMCID: PMC8541456.

239. Sánchez-Busó L, Cole MJ, Spiteri G, Day M, Jacobsson S, Golparian D, Sajedi N, Yeats CA, Abudahab K, Underwood A, Bluemel B, Aanensen DM, Unemo M; Centre for Genomic Pathogen Surveillance and the Euro-GASP study group. Europe-wide expansion and eradication of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* lineages: a genomic surveillance study. *Lancet Microbe.* 2022 Jun;3(6):e452-e463. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00044-1. Epub 2022 May 10. PMID: 35659907.

240. Hall CL, Harrison MA, Pond MJ, Chow C, Harding-Esch EM, Sadiq ST. Genotypic determinants of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Health.* 2019 Sep;16(5):479-487. doi: 10.1071/SH18225. PMID: 31366421.

241. Gianecini RA, Poklepovich T, Golparian D, Cuenca N, Tuduri E, Unemo M, Campos J, Galarza P; Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Programme—Argentina1. Genomic Epidemiology of Azithromycin-Nonsusceptible *Neisseria gonorrhoeae*, Argentina, 2005-2019. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(9):2369-2378. doi: 10.3201/eid2709.204843. PMID: 34424175; PMCID: PMC8386799.

242. Jacobsson S, Golparian D, Cole M, Spiteri G, Martin I, Bergheim T, Borrego MJ, Crowley B, Crucitti T, Van Dam AP, Hoffmann S, Jeverica S, Kohl P, Mlynarczyk-Bonikowska B, Pakarna G, Sary A, Stefanelli P, Pavlik P, Tzelepi E, Abad R, Harris SR, Unemo M. WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC >2 mg/L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe

- from 2009 to 2014. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Nov;71(11):3109-3116. doi: 10.1093/jac/dkw279. Epub 2016 Jul 17. PMID: 27432597.
243. Ma KC, Mortimer TD, Duckett MA, Hicks AL, Wheeler NE, Sánchez-Busó L, Grad YH. Increased power from conditional bacterial genome-wide association identifies macrolide resistance mutations in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nat Commun.* 2020 Oct 23;11(1):5374. doi: 10.1038/s41467-020-19250-6. PMID: 33097713; PMCID: PMC7584619.
244. Belkacem A, Jacquier H, Goubard A, Mougari F, La Ruche G, Patey O, Micaëlo M, Semaille C, Cambau E, Bercot B. Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013-14. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Sep;71(9):2471-8. doi: 10.1093/jac/dkw182. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27301565.
245. Liao M, Gu WM, Yang Y, Dillon JA. Analysis of mutations in multiple loci of *Neisseria gonorrhoeae* isolates reveals effects of PIB, PBP2 and MtrR on reduced susceptibility to ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother.* 2011 May;66(5):1016-23. doi: 10.1093/jac/dkr021. Epub 2011 Feb 22. PMID: 21393127.
246. Warner DM, Shafer WM, Jerse AE. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. *Mol Microbiol.* 2008 Oct;70(2):462-78. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06424.x. Epub 2008 Aug 27. PMID: 18761689; PMCID: PMC2602950.
247. Rouquette-Loughlin CE, Reimche JL, Balthazar JT, Dhulipala V, Gernert KM, Kersh EN, Pham CD, Pettus K, Abrams AJ, Trees DL, St Cyr S, Shafer WM. Mechanistic Basis for Decreased Antimicrobial Susceptibility in a Clinical Isolate of *Neisseria gonorrhoeae* Possessing a Mosaic-Like mtr Efflux Pump Locus. *mBio.* 2018 Nov 27;9(6):e02281-18. doi: 10.1128/mBio.02281-18. PMID: 30482834; PMCID: PMC6282211.
248. Beggs GA, Ayala JC, Kavanaugh LG, Read TD, Hooks GM, Schumacher MA, Shafer WM, Brennan RG. Structures of *Neisseria gonorrhoeae* MtrR-operator complexes reveal molecular mechanisms of DNA recognition and antibiotic resistance-conferring clinical mutations. *Nucleic Acids Res.* 2021 Apr

19;49(7):4155-4170. doi: 10.1093/nar/gkab213. PMID: 33784401; PMCID: PMC8053128.

249. Nokchan N, Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Nitayanon P, Tribuddharat C. Whole-genome sequence analysis of high-level penicillin-resistant strains and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates from Thailand. *PLoS One*. 2022 Jul 29;17(7):e0271657. doi: 10.1371/journal.pone.0271657. PMID: 35905043; PMCID: PMC9337635.

250. Veal WL, Yellen A, Balthazar JT, Pan W, Spratt BG, Shafer WM. Loss-of-function mutations in the *mtr* efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology (Reading)*. 1998 Mar;144 (Pt 3):621-627. doi: 10.1099/00221287-144-3-621. PMID: 9534233.

251. Harrison OB, Maiden MC. Recent advances in understanding and combatting *Neisseria gonorrhoeae*: a genomic perspective. *Fac Rev*. 2021 Aug 27;10:65. doi: 10.12703/r/10-65. PMID: 34557869; PMCID: PMC8442004.

252. Timsina R, Shrestha U, Singh A, Timalina B. Inducible clindamycin resistance and *erm* genes in *Staphylococcus aureus* in school children in Kathmandu, Nepal. *Future Sci OA*. 2020 Oct 20;7(1):FSO361. doi: 10.2144/fsoa-2020-0092. PMID: 33437500; PMCID: PMC7787115.

253. Schroeder MR, Stephens DS. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Sep 21;6:98. doi: 10.3389/fcimb.2016.00098. PMID: 27709102; PMCID: PMC5030221.

254. Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, Whittington WL, Holmes KK. Erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral commensal *Neisseria* spp. carry known rRNA methylase genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jun;43(6):1367-72. doi: 10.1128/AAC.43.6.1367. PMID: 10348754; PMCID: PMC89280.

255. -Brannigan JA, Tirodimos IA, Zhang QY, Dowson CG, Spratt BG. Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*. 1990 Jun;4(6):913-9. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00664.x. PMID: 2120542.

256. -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. doi: 10.1128/AAC.46.3.769-777.2002. PMID: 11850260; PMCID: PMC127492.
257. Takahata S, Senju N, Osaki Y, Yoshida T, Ida T. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Nov;50(11):3638-45. doi: 10.1128/AAC.00626-06. Epub 2006 Aug 28. PMID: 16940068; PMCID: PMC1635225.
258. Tomberg J, Unemo M, Davies C, Nicholas RA. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. *Biochemistry*. 2010 Sep 21;49(37):8062-70. doi: 10.1021/bi101167x. PMID: 20704258; PMCID: PMC2939205.
259. Thakur SD, Levett PN, Horsman GB, Dillon JR. Association of *Neisseria gonorrhoeae* genogroups and specific PBP2/MtrR/PorB mutation patterns with susceptibility to penicillin in a susceptible gonococcal population. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Oct 1;73(10):2682-2686. doi: 10.1093/jac/dky233. PMID: 29992304.
260. Sachdev D, Kumari I, Chopra M, Singh LR, Saluja D. Functional and structural characterization of H105Y mutation in MtrR protein of *Neisseria gonorrhoeae*. 2020 Jul 8; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.07.192807>
261. Nakayama S, Tribuddharat C, Prombhul S, Shimuta K, Srifuengfung S, Unemo M, Ohnishi M. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb;56(2):916-20. doi: 10.1128/AAC.05665-11. Epub 2011 Dec 5. PMID: 22143532; PMCID: PMC3264274.
262. Zapun A, Morlot C, Taha MK. Resistance to β -Lactams in *Neisseria ssp* Due to Chromosomally Encoded Penicillin-Binding Proteins. *Antibiotics (Basel)*. 2016

Sep 28;5(4):35. doi: 10.3390/antibiotics5040035. PMID: 27690121; PMCID: PMC5187516.

263. Deng X, Allan-Blitz LT, Klausner JD. Using the genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to cefixime to develop a molecular assay to predict cefixime susceptibility. *Sex Health*. 2019 Sep;16(5):488-499. doi: 10.1071/SH18227. PMID: 31230613; PMCID: PMC7386398.

264. Alfsnes K, Eldholm V, Olsen AO, Brynildsrud OB, Bohlin J, Steinbakk M, Caugant DA. Genomic epidemiology and population structure of *Neisseria gonorrhoeae* in Norway, 2016-2017. *Microb Genom*. 2020 Apr;6(4):e000359. doi: 10.1099/mgen.0.000359. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32213251; PMCID: PMC7276708.

265. Osnes MN, Didelot X, Korne-Elenbaas J, Alfsnes K, Brynildsrud OB, Syversen G, Nilsen ØJ, De Blasio BF, Caugant DA, Eldholm V. Sudden emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* clade with reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins, Norway. *Microb Genom*. 2020 Dec;6(12):mgen000480. doi: 10.1099/mgen.0.000480. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33200978; PMCID: PMC8116678.

266. Reimche JL, Chivukula VL, Schmerer MW, Joseph SJ, Pham CD, Schlanger K, St Cyr SB, Weinstock HS, Raphael BH, Kersh EN, Gernert KM; Antimicrobial-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Working Group. Genomic Analysis of the Predominant Strains and Antimicrobial Resistance Determinants Within 1479 *Neisseria gonorrhoeae* Isolates From the US Gonococcal Isolate Surveillance Project in 2018. *Sex Transm Dis*. 2021 Aug 1;48(8S):S78-S87. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001471. PMID: 33993166; PMCID: PMC8284387.

267. Kunz AN, Begum AA, Wu H, D'Ambrozio JA, Robinson JM, Shafer WM, Bash MC, Jerse AE. Impact of fluoroquinolone resistance mutations on gonococcal fitness and in vivo selection for compensatory mutations. *J Infect Dis*. 2012 Jun 15;205(12):1821-9. doi: 10.1093/infdis/jis277. Epub 2012 Apr 5. PMID: 22492860; PMCID: PMC3415892.

268. González N, Abdellati S, De Baetselier I, Laumen JGE, Van Dijck C, de Block T, Kenyon C, Manoharan-Basil SS. Alternative Pathways to Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: An In Vitro Study of the WHO-P and WHO-F Reference Strains. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Apr 8;11(4):499. doi: 10.3390/antibiotics11040499. PMID: 35453249; PMCID: PMC9026730.
269. Alm RA, Lahiri SD, Kutschke A, Otterson LG, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Lewis LA, Su X, Huband MD, Gardner H, Mueller JP. Characterization of the novel DNA gyrase inhibitor AZD0914: low resistance potential and lack of cross-resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Mar;59(3):1478-86. doi: 10.1128/AAC.04456-14. Epub 2014 Dec 22. PMID: 25534723; PMCID: PMC4325766.

Anexo 1: Encuesta realizada a los pacientes con infección por *M. genitalium*.

ENCUESTA MYCOPLASMA GENITALIUM

N paciente:

Año aislamiento:

Centro de Origen:

CAP/HOSPITAL (C/H):

Médico:

Servicio:

Pertenece a la unidad de ITS (SI/NO):

Nombre paciente:

NHC:

CIP:

Sexo:

Edad:

Origen:

Trabajador/a sexo comercial (SI/NO/NS NC):

Coinfección:

HIV+:

Antecedentes:

Síntomas:

TRATAMIENTO (antibacteriano y dosis):

-1er antibacteriano:

-2do antibacteriano:

Duración del tratamiento:

-1er antibacteriano:

-2do antibacteriano:

EVOLUCIÓN(curación, recidiva,desconocida C/R/D):

SEGUNDO TEST(SI/NO):

RESULTADO SEGUNDO TEST (Positivo/Negativo P/N):

Si segundo test positivo

-2do Tratamiento antibacteriano:

Duración 2do tratamiento:

Anexo 2

Artículo original: *Macrolide resistance in Mycoplasma genitalium in Catalonia, Spain. A 1 year prospective study.* Publicado en la revista Journal of antimicrobial chemotherapy en febrero de 2021.

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkab224

**Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy**

Macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in Catalonia, Spain: a 1 year prospective study

J. Lucena Nemirosky¹, R. Espelt², E. López Grado², J. Sobrino², A. Acera³, J. Pérez⁴, J. S. Jensen ⁵,
F. Sánchez-Reus ^{6,7*} and N. Prim^{6,8}

¹Laboratori Ceiba Internacional SAE, Plaça Ramon Llull, 7, 08203, Sabadell, Barcelona, Spain; ²Institut Català de la Salut, Direcció d'Atenció Primària Metropolitana Nord, Atenció de la Salut Sexual i Reproductiva CAP Sant Felix, 08203, Sabadell, Barcelona, Spain; ³Institut Català de la Salut, Direcció d'Atenció Primària Metropolitana Nord, Atenció de la Salut Sexual i Reproductiva CAP II Cerdanyola - Ripollat, 08291, Ripollat, Barcelona, Spain; ⁴Catlab (Parc Logístic de Salut), 08232, Viladecavalls, Barcelona, Spain; ⁵Research Unit for Reproductive Microbiology, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300, Copenhagen S, Denmark; ⁶Seu de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041, Barcelona, Spain; ⁷Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ⁸Laboratori de Referència de Catalunya, 08820, El Prat de Llobregat, Barcelona, Spain

*Corresponding author. E-mail: fsanchez@santpau.cat

Received 20 February 2021; accepted 1 June 2021

Background: *Mycoplasma genitalium* is an emergent cause of sexually transmitted disease (STD). The first-line treatment is azithromycin, but macrolide resistance is increasing due to mutations in the 23S rRNA gene.

Objectives: To determine the rates of *M. genitalium* infection and macrolide resistance in an area adjacent to Barcelona.

Methods: This 1 year prospective study was performed in a heterogeneous population that included both low- and high-risk patients. *M. genitalium* was detected in all specimens sent to our institution for STD detection. Epidemiological and relevant clinical data were collected in the positive cases. Characterization of macrolide-associated resistance was performed by 23S rDNA sequencing.

Results: Of the 3540 patients included, 132 (3.7%) were positive for *M. genitalium*. Another sexually transmitted bacteria was detected in 20.4% of the *M. genitalium* cases, and *Chlamydia trachomatis* (11%) was the most frequently co-detected microorganism. Only 61.4% of patients received an adequate initial treatment against *M. genitalium*. The test of cure (TOC) was performed in 42% of patients, and therapeutic failure was detected in 10 cases. The rate of macrolide resistance was 12.6% and the most prevalent mutation was A2058G. There was an association between macrolide resistance and a previous history of *M. genitalium* detection ($P < 0.001$).

Conclusions: Our results support the contribution of the previous use of macrolides in resistant strains. Given the difficulties in performing TOC in all patients, the inclusion of macrolide resistance in the detection test should be mandatory.

Introduction

Mycoplasma genitalium is an emergent cause of sexually transmitted disease (STD).¹ The absence of a cellular wall, which is a distinctive trait shared by all members within the family Mycoplasmataceae, confers its intrinsic resistance to antibiotics targeting this structure such as β -lactams. Given its fastidious nature and slow growth *in vitro*, aetiological diagnosis of *M. genitalium* is performed by nucleic acid amplification tests.²

M. genitalium is a significant aetiological agent of non-gonococcal urethritis, with rates ranging from 10% to 25% in males.³ *M. genitalium* has also been associated with cervicitis, endometritis, pelvic inflammatory disease, preterm birth and

stillbirth.^{3,4} Patients without appropriate treatment may have clinical complications even later in life, such as infertility.⁴ However, *M. genitalium* infections are often asymptomatic; a fact that contributes to the burden of this infection.

Azithromycin is the mainstay of treatment for *M. genitalium* infections. Currently, the first-line treatment is azithromycin in an extended regimen (i.e. 500 mg the first day, followed by 250 mg per day for 4 days) according to the European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections.⁵ This extended regimen has been suggested to be more effective than the 1 g single-dose regimen so widely used in STD treatments, and additionally it has been associated with less therapeutic failure.⁶ When azithromycin treatment fails, moxifloxacin (400 mg for 7–10 days) is

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

1 of 6

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkab224/6333546 by UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA user on 19 July 2021

recommended. However, therapeutic failure has also been reported for fluoroquinolones.⁷ Doxycycline may be an alternative, but it has low eradication rates.^{1,6}

The first *M. genitalium* strain bearing resistance to macrolides was reported in 2006.⁸ Macrolide resistance is due to mutations in region V of the 23S rRNA gene (at positions 2058 and 2059 in *Escherichia coli*). *M. genitalium* can easily acquire resistance to macrolides because it has only one copy of this gene.⁹ These mutations have been described more frequently in MSM and also in certain geographical areas.^{10–17} Resistance to fluoroquinolones is mainly due to mutations in the *parC* gene.^{11,8} The emergence of MDR *M. genitalium* strains, i.e. resistant to macrolides and fluoroquinolones, poses an important public health problem, not only for hampering treatment, but also for the potential dissemination of these strains.^{14,19}

Reported rates of *M. genitalium* vary depending on the geographical area and the characteristics of the population under study (sex, age, sexual habits, socio-economic conditions, etc.).^{20,21} Regarding the general population, the rates in Europe range from 0.1% to 3.3%.^{3,20} In Spain, few reports have been published with very different results due to the differences both in the population groups under study and the methodology used.^{30,22}

Given the scarce data on *M. genitalium* in Catalonia, the aim of the present work was to determine the rates of *M. genitalium* infection and macrolide-resistant strains in a cohort that included mainly symptomatic and asymptomatic patients with sexually transmitted infection (STI) suspicion in an area adjacent to Barcelona. The clinical presentation and the clinical follow-up were also evaluated.

Materials and methods

Ethics approval

The Ethics Committee of the Hospital Universitari Mútua de Terrassa approved the research (approval number: P/1224).

Specimen collection

The clinical specimens were urethral exudates in males, and vaginal and endocervical exudates in females, collected in Stuart or Amies media. These samples were collected from patients attending primary healthcare centres (PHCs) and two teaching hospitals in our geographical area, el Vallès Occidental (Catalunya, Spain), which is an area covering a population of 910 031 inhabitants (data from Institut d'Estadística de Catalunya, Idescat, 2017, <https://www.idescat.cat>). The referring centres included gynaecologists (Sabadell and Cardanyola PHCs) and GPs, from Hospital Universitari Mútua de Terrassa (534 beds) and Consorci Sanitari Terrassa (460 beds). All physicians were informed about the study and they agreed to participate. *M. genitalium* testing was performed in all men with clinical suspicion of urethritis or recent unsafe sexual intercourse. Testing in women was performed in both symptomatic patients, when an STI was clinically suspected, and in asymptomatic patients attending a routine gynaecological examination or with a sexual partner diagnosed with an STI or with recent unsafe intercourse.

Study design

This prospective study to analyse the rates of macrolide resistance-associated mutations in *M. genitalium* included all specimens sent to our institution for STD detection during 1 year (June 2014 to June 2015). Epidemiological and relevant clinical data were collected through a clinical

survey performed by physicians in the *M. genitalium*-positive cases. Only one sample per patient was included. An additional retrospective analysis to outline the overall *M. genitalium* prevalence in our geographical included data from a 7-year period (2011–17).

Microbiological diagnosis

M. genitalium detection was performed using the multiplex PCR Dx CT/NG/MG Assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), which also included the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*, and the Dx Real-Time System (Bio-Rad). Nucleic acid extraction was performed using the QIAcube[®] (QIAGEN, Hilden, Germany) system, following the manufacturer's instructions. Samples were streaked onto PolyVitek (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and Thayer Martin plates (bioMérieux), and incubated following the standard procedures. Bacterial identification was performed by VITEK[®] 2 Compact (bioMérieux).

Following the initial diagnosis of *M. genitalium* infection, the clinical microbiologist contacted the physician to recommend an extended azithromycin treatment and the performance of a test of cure (TOC), which is a second molecular test performed at least 3 weeks after the end of treatment.

Molecular detection of macrolide resistance

Characterization of macrolide resistance was performed on the DNA extracts of the samples prospectively collected. 23S rDNA sequencing was performed at the Statens Serum Institute (Copenhagen) as previously reported.²

Statistical analysis

Data were summarized with percentages and 95% CI for categorical, as mean \pm SD for quantitative, or median and IQR for non-normal variables. Categorical variables were compared by χ^2 test or by Fisher's exact test. Quantitative variables without a normal distribution were compared using non-parametric tests (Kruskal-Wallis) and those that showed a normal distribution were compared by analysis of variance (ANOVA). All statistical tests were two-sided, with a *P* value of <0.05 considered statistically significant. Statistical analyses were performed using IBM-SPSS v25.

Results

The 7-year retrospective study included 20 133 samples from 17 846 patients and the global rate of *M. genitalium* was 3.4% (95% CI 3.2–3.7) (Table 1). The 1-year prospective study to evaluate macrolide resistance included 3540 patients. Of these, 132 (3.7% (95% CI 3.13–4.4)) were positive for *M. genitalium*. The median age was 27.5 years (range 15–66 years). The distribution of *M. genitalium* infection rates according to the age-specific groups was 5.7% (58/1008), 4.0% (45/1114), 2.4% (21/863) and 1.4%

Table 1. Data collected during the 7-year retrospective study (2011–17)

	Total (n)	%
Samples	20 133	
Patients	17 846	
female	13 071	73.2
male	4 775	26.7
<i>M. genitalium</i> -positive cases	612	3.4 (95% CI 3.2–3.7)
female	381	2.9 (95% CI 2.6–3.2)
male	231	4.8 (95% CI 4.3–5.5)

(8/555) for 15–25, 26–35, 36–45 and >46 years, respectively; no statistical association was observed despite the higher detection in the youngest group ($P=0.164$). Table 2 shows the clinical data of patients with a positive *M. genitalium* detection. Of these 132 patients, the proportion of symptomatic and asymptomatic was 1:1. There were 56.9% (41/72) of asymptomatic women and 43.3% (26/60) of asymptomatic men. Clinical data for *M. genitalium*-negative patients were not collected. Single infection by *M. genitalium* was detected in 79.5% (105/132) of the patients (Table 3). At least one other sexually transmitted agent was detected in the remaining 20.4% (27/132) of the patients. The most frequent co-detected microorganism was *C. trachomatis* (11%; 15/132); there was no significant association among this co-detection, gender and symptomatic/asymptomatic patients ($P=0.317$).

An initial directed treatment against *M. genitalium* was given in 81 out of 132 patients [61.4% (95% CI 52.9–69.4)]. Overall, azithromycin was given in 74 patients [56.1% (95% CI 47.5–64.3)], mainly in extended dosage (47.7%; 63/132); four patients received doxycycline and three received moxifloxacin (Table 2). No treatment was given to 29.5% (39/132) of the patients. Treatment was inadequate against *M. genitalium* (mainly β -lactams) in the remaining 10% (13/132). TOC was performed at least 3 weeks after the end of treatment in 56 patients and it was positive in 10 cases, which were considered therapeutic failure (nine had been treated with azithromycin and one with doxycycline).

Of the 132 positive samples, 111 were available for the molecular detection of macrolide resistance; there were 97 WT strains and 14 (12.6%) with a mutation. The most prevalent mutation was A2058G ($n=8$), followed by A2058T ($n=3$) and A2059G ($n=3$). Table 4 shows the clinical presentation of the 14 patients with a mutated strain, the treatment received and their follow-up. There were nine men and five women; eight were asymptomatic. These patients were initially treated against *M. genitalium* either with a macrolide or moxifloxacin; none received doxycycline alone. Three patients received an initial treatment with moxifloxacin and had a negative TOC. Following a positive TOC, moxifloxacin was also prescribed in nine patients initially treated with macrolides; the second TOC was negative in the eight cases in which it was performed. Eleven patients (10%, 11/111) had a history of *M. genitalium* detection prior to the period under study. Of these patients, seven had strains with mutations associated with resistance to macrolides while only four were WT strains ($P<0.001$).

Discussion

The diversity in *M. genitalium* infection rates reported in the literature can be attributed to several factors, ranging from the study design to the type of population under study (general population, MSM, different age groups, etc.).²⁰ The geographical area under study also seems to contribute to differences in the rates of this infection.²⁰ The present prospective study revealed a rate of *M. genitalium* of 3.7%, which was similar to the overall prevalence (3.4%) observed in the 7 year retrospective analysis and quite with the average of other similar reports in Europe.^{21–26} *M. genitalium* rates seem to be higher in teenagers and young adults.²³ Our population was mainly adults, but we did observe predominance

Table 2. Characteristics of 132 patients with a positive test for *M. genitalium*

Characteristics	
Age (years)	
mean (SD)	29.2 (8.8)
median (range)	27.5 (15–66)
Gender, n (%)	
female	72 (54.5)
male	60 (45.4)
Clinical presentation, n (%)	
asymptomatic ^a	67 (50.8)
female	41
male	26
symptomatic	65 (49.2)
female	31
male	34
Characteristics of the infection ^b , n (%)	
simple MG infection	105 (79.5)
female	59
male	46
positive co-detection with other STD agents	27 (20.4)
female	13
male	14
First treatment, n (%)	
appropriate treatment against MG	81 (61.4)
azithromycin in extended regimen	63 (47.7)
azithromycin in single dose	11 (8.3)
doxycycline	4 (3)
moxifloxacin	3 (2.3)
other treatments ^c	12 (9.1)
unknown treatment/no treatment ^d	39 (29.5)
TOC, n	
total performed, n (%)	56 (42.4)
negative	46
positive ^e	10
Treatment post-TOC, n	
moxifloxacin	9
no treatment	1

MG, *M. genitalium*; TOC, test of cure.

^aA total of 3540 patients were tested. The age-specific rates were 5.7% (58/1008) for 15–25 years, 4.0% (45/1114) for 26–35 years, 2.4% (21/863) for 36–45 years and 1.4% (8/555) for the group >46 years.

^bAfter being informed of a positive test, all asymptomatic patients received treatment against *M. genitalium* except for 17 cases.

^cCo-detections included: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *Haemophilus* spp. Additionally, three patients presented had HIV ($n=1$), HBV ($n=1$), syphilis ($n=1$).

^dOther treatments: patients treated with β -lactams ($n=9$), clindamycin ($n=1$), erythromycin ($n=1$), levofloxacin ($n=1$) and difloxacin ($n=1$). After counselling, nine patients received treatment against *M. genitalium*: macrolides ($n=5$), doxycycline ($n=3$), moxifloxacin ($n=1$).

^eFifteen of these patients had a second negative *M. genitalium* test.

^fNine of these patients had *M. genitalium* strains with mutations. The remaining patient had a WT strain; this patient was treated with doxycycline and it was considered a treatment failure.

in young adults. Similar rates of *M. genitalium* infection for both genders were previously reported in a study performed on a general population that was mainly asymptomatic.²³ In contrast, our 7 year retrospective study, including both symptomatic and asymptomatic patients, showed a higher overall rate in males than in females. This might be due to the fact that men usually present with urethritis at the moment of consultation.

Therapeutic counselling recommending azithromycin in an extended regimen was given to the prescribing physicians in all *M. genitalium* cases detected in the prospective study. The recommendations also included the performance of TOC, which was performed in 42.4% of the cases. Over half of the patients received azithromycin, mainly at an extended regimen. Despite scientific evidence, this currently recommended regimen was still not included in the clinical guidelines at the time of the present

study.²⁷ A second detection was negative in 15 of the 40 patients in which treatment was unknown. Given the therapeutic counselling performed, we assumed that these patients had been probably given an appropriate treatment against *M. genitalium* despite the lack of clinical data on this regard.

Co-infections are frequent in STD. *C. trachomatis* was the most frequent STD agent co-detected with *M. genitalium* as previously described by other authors.^{24,28} In our case, this co-detection with *C. trachomatis* was higher in women than in men. This might be due to the high percentage of asymptomatic women that did not receive empirical treatment in contrast with most men that were clinically symptomatic when consulting.

The most frequent 23S rDNA mutations associated with high-level macrolide resistance are A2058G and A2059G.^{29,30} We had 14 cases with macrolide resistance-associated mutations, which corresponded to a rate of 12.6%. These cases were all initially treated with azithromycin except for three that received moxifloxacin. We found A2058G to be the most frequent mutation; a fact in contrast with other studies where either both mutations had similar rates or A2059G was predominant.^{14,31-34} This might be due to clonal dissemination, but no clonality study was performed to confirm this. Three strains had the A2058T mutation, which is not a frequent mutation in general despite its high prevalence in Holland.^{17,35}

Macrolide resistance rates show geographical variability and they are highly dependent on the population group.^{30,37} The macrolide resistance rate in our study, which included samples from a routine diagnostic service, was three times lower than the rate previously reported in high-risk population in Barcelona.¹⁰ In contrast, our results were similar to other European studies that

Table 3. Description of the sexually transmitted microorganisms in co-detection with *M. genitalium* in the prospective study

	Female, n	Male, n	Total, n (%)
Total of cases	72	60	132
Single infection	59	46	105 (79.6)
Co-detection ^a	13	14	27 (20.4)
<i>C. trachomatis</i>	10	5	15 (11.3)
<i>Haemophilus</i> spp.	2	6	8 (6.1)
<i>N. gonorrhoeae</i>	1	4	5 (3.8)

^aCo-detection of *M. genitalium* together with more than one other STD agent was observed in one male with *C. trachomatis* plus *N. gonorrhoeae*.

Table 4. Characteristics of patients infected with strains of *M. genitalium* that present mutations, treatment against *M. genitalium*, TOC and follow-up

Case	Mutation	Sex	Age	Co-detection	HiV	Clinical	Case	Mutation	Sex	Age
1 ^a	A2058G	M	21	no	N	asymptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N
2	A2058G	F	28	CT	NP	symptomatic	azithromycin 1 g/1 d	NA	unknown	NA
3 ^a	A2058G	F	18	no	N	asymptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N
4	A2058G	F	28	no	N	asymptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	NA
5	A2058G	M	33	no	N	asymptomatic	maxifloxacin 400 mg/10 d	N	NA	NA
6 ^a	A2058G	M	37	no	N	symptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N
7	A2058G	F	24	no	N	symptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N
8	A2058G	M	49	H	N	symptomatic	maxifloxacin 400 mg/10 d	N	NA	NA
9	A2058T	M	32	no	NP	asymptomatic	maxifloxacin 400 mg/10 d	N	NA	NA
10 ^a	A2058T	M	22	no	N	asymptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N
11	A2058T	M	32	NG	NP	symptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	NA	unknown	NA
12 ^a	A2059G	F	27	no	N	asymptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N
13 ^a	A2059G	M	25	no	N	symptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d plus doxycycline 200 mg/7 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N
14 ^a	A2059G	M	66	no	N	asymptomatic	azithromycin 1.5 g/5 d	P	maxifloxacin 400 mg/10 d	N

M, male; F, female; TOC, test of cure; N, negative; P, positive; NA, not available; NP, not performed; CT, *C. trachomatis*; H, *Haemophilus* spp.; NG, *N. gonorrhoeae*; d, days.

Following a positive TOC, the physician was contacted and recommended treating with moxifloxacin and to request a new sample to check the therapeutic success after treatment.

^aSeven patients had previous MG infection, but it was not known if they had received treatment.

included mostly routine diagnostic samples.^{13,33,36} However, important variations in the macrolide resistance rates were observed in a study that included data from three Scandinavian countries.³⁷ Despite the similar characteristics of the analysed populations, such variations were attributed by the authors to differences in the therapeutic recommendations in the clinical guidelines. Currently, the empirical treatment for urethritis in our country includes the single-dose azithromycin regimen because of its suitable administration.³⁸ This therapeutic regimen has been reported to cause macrolide resistance mutations more frequently than the extended regimen.³⁴ The experimental design in our study did not allow corroboration of this statement. However, considering those patients with a previous history of *M. genitalium* detection, 50% had a strain with a mutation associated with macrolide resistance. Given this significant association, we assumed that these patients might have received macrolides in the past. Previous treatments with macrolides for other purposes (including treatment of respiratory infections) might have also contributed to this type of mutation in *M. genitalium*.^{34,39}

Currently, TOC is considered the most useful tool to detect therapeutic failure in *M. genitalium* infections. In our study, TOC was performed in 42% of the cases and it was positive in 10 of them. Following the detection of a therapeutic failure, we contacted the practitioner again and treatment with moxifloxacin was recommended. Nine of these patients (six of them initially asymptomatic) were confirmed afterwards to have a strain with a macrolide-associated mutation. The other patient had a WT strain, but this patient had been treated with doxycycline, which is known to have a high failure rate. Our results support the use of TOC to detect therapeutic failure and to prevent the dissemination of resistant *M. genitalium* strains. However, performing a TOC is not always possible due to the requirement of more medical appointments. In these cases, a convenient alternative option to avoid therapeutic failure would be the availability of molecular tools to detect macrolide resistance.^{30,30}

Our study had some limitations. It included all routine samples for STI testing, some epidemiological and clinical data were collected, but we did not collect the sexual habits of the patients. The prevalence of macrolide resistance may not be exact as not all strains were available to perform the molecular study. As no previous studies of macrolide resistance had been performed in our area, it is unknown whether the therapeutic counseling performed may have contributed in modifying these resistance rates.

The dissemination of resistant *M. genitalium* strains is a worldwide health problem. Our results support the contribution of the previous use of macrolides in resistant strains. Given the difficulties in performing TOC in all patients, the inclusion of macrolide resistance in the detection test should be mandatory.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the contribution of Dr Ignasi Gich to the statistical analysis.

Funding

This study was carried out as part of our routine work.

Transparency declarations

None to declare.

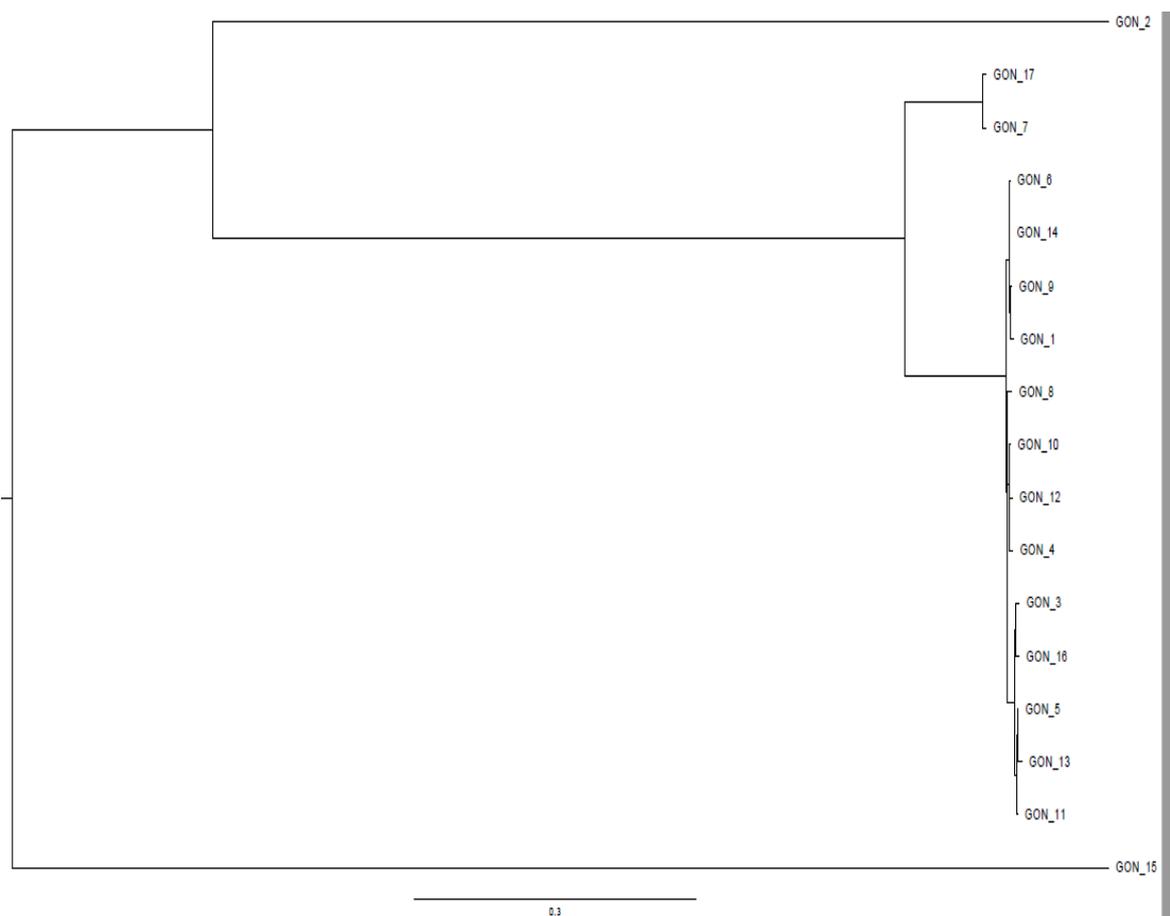
References

- Taylor-Robinson D, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 498–514.
- Jensen JS. Protocol for the detection of Mycoplasma genitalium by PCR from clinical specimens and subsequent detection of macrolide resistance-mediated mutations in region V of the 23S rRNA gene. *Methods Mol Biol* 2012; **903**: 129–39.
- Unemo M, Jensen JS. Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and Mycoplasma genitalium. *Nat Rev Urol* 2017; **14**: 139–52.
- McGowan CL, Anderson-Smits C. Mycoplasma genitalium: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS Pathog* 2011; **7**: e1001324.
- Jensen JS, Gusini M, Gøtzberg M et al. 2016 European guideline on Mycoplasma genitalium infections. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2016; **30**: 1650–6.
- Homer P, Ingle SM, Garrett F et al. Which azithromycin regimen should be used for treating Mycoplasma genitalium? A meta-analysis. *Sex Transm Infect* 2018; **94**: 14–20.
- Broom JF, van Dommelen L, Henquet C et al. Multidrug-resistant Mycoplasma genitalium infections in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; **36**: 1565–7.
- Bradshaw CS, Jensen JS, Tabrizi SN et al. Azithromycin failure in Mycoplasma genitalium urethritis. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 1149–52.
- Jensen JS, Bradshaw C. Management of Mycoplasma genitalium infections – can we hit a moving target? *BMC Infect Dis* 2015; **15**: 343.
- Barberá MJ, Fernández-Huerta M, Jensen JS et al. Mycoplasma genitalium Macrolide and Fluoroquinolone Resistance: Prevalence and Risk Factors Among a 2013–2014 Cohort of Patients in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2017; **44**: 467–62.
- Couldwell DL, Jdocon D, Power M et al. Mycoplasma genitalium: high prevalence of resistance to macrolides and frequent anorectal infection in men who have sex with men in western Sydney. *Sex Transm Infect* 2018; **94**: 406–10.
- Salado-Rasmussen K, Jensen JS. Mycoplasma genitalium testing pattern and macrolide resistance: a Danish nationwide retrospective survey. *Clin Infect Dis* 2014; **59**: 24–30.
- Coorevits L, Traen A, Binge L et al. Macrolide resistance in Mycoplasma genitalium from female sex workers in Belgium. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; **12**: 149–52.
- Björnelius E, Magnusson C, Jensen JS. Mycoplasma genitalium macrolide resistance in Stockholm, Sweden. *Sex Transm Infect* 2017; **93**: 167–8.
- Rajkumari N, Kaur H, Roy A et al. Association of Mycoplasma genitalium with infertility in North Indian women. *Indian J Sex Transm Dis AIDS* 2015; **36**: 144–8.
- Anderson T, Coughlan E, Werno A. Mycoplasma genitalium macrolide and fluoroquinolone resistance detection and clinical implications in a selected cohort in New Zealand. *J Clin Microbiol* 2017; **55**: 3242–8.
- Nijhuis RHT, Severs TT, Van der Vegt DSM et al. High levels of macrolide resistance-associated mutations in Mycoplasma genitalium warrant antibiotic susceptibility-guided treatment. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2525–8.
- Tagg K, Jeffreys NJ, Couldwell D et al. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in Mycoplasma genitalium. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 2245–9.

- 19 Sethi S, Zaman K, Jain N. Mycoplasma genitalium in faeciae: current treatment options and resistance issues. *Infect Drug Resist* 2017; **10**: 283-92.
- 20 Baumann I, Cina M, Egl-Gary D et al. Prevalence of Mycoplasma genitalium in different population groups: systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect* 2018; **94**: 255-62.
- 21 Gesink DC, Mulvad G, Montgomery-Andersen R et al. Mycoplasma genitalium presence, resistance and epidemiology in Greenland. *Int J Circumpolar Health* 2012; **71**: 1-8.
- 22 Asenjo A, Kusters JG, Severs TT et al. Mycoplasma genitalium in Spain: prevalence of genital infection and frequency of resistance to macrolides. *Eur J Clin Microbiol Infect* 2018; **38**: 169-71.
- 23 Sonnenberg P, Isan CA, Clifton S et al. Epidemiology of Mycoplasma genitalium in British men and women aged 16-44 years: evidence from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *Int J Epidemiol* 2015; **44**: 1982-94.
- 24 Madsen A, Thorsteinsson K, Lebech AM et al. Prevalence and significance of Mycoplasma genitalium in women living with HIV in Denmark. *BMC Res Notes* 2017; **10**: 468.
- 25 Chro P, Pappasarkis J, Papadogeorgaki E et al. Prevalence of Mycoplasma genitalium and other sexually-transmitted pathogens among high-risk individuals in Greece. *Gems* 2018; **8**: 12-20.
- 26 Edouard S, Tissot-Dupont H, Dubourg G et al. Mycoplasma genitalium, an agent of re-emerging sexually transmitted infections. *APMIS* 2017; **125**: 916-20.
- 27 Homer P, Blee K, Adams E. Time to manage Mycoplasma genitalium as an STI: but not with azithromycin 1. *g1 Cur Opin Infect Dis* 2014; **27**: 68-74.
- 28 Gratix J, Ritt S, Turnbull L et al. Prevalence and antibiotic resistance of Mycoplasma genitalium among STI clinic attendees in Western Canada: a cross-sectional analysis. *BMJ Open* 2017; **7**: e016300.
- 29 Kristiansen GQ, Libby JG, Schanning K. A 5' Nuclease Genotyping Assay for Identification of Macrolide-Resistant Mycoplasma genitalium in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 1593-7.
- 30 Couldwell DL, Lewis DA. Mycoplasma genitalium infection: current treatment options, therapeutic failure, and resistance-associated mutations. *Infect Drug Resist* 2015; **8**: 147-61.
- 31 Hadad R, Galparian D, Lagos AC et al. Macrolide and fluoroquinolone resistance in Mycoplasma genitalium in two Swedish counties, 2011-2015. *APMIS* 2018; **126**: 123-7.
- 32 Shipitsyna E, Romyantsava T, Galparian D et al. Prevalence of macrolide and fluoroquinolone resistance-mediating mutations in Mycoplasma genitalium in five cities in Russia and Estonia. *PLoS One* 2017; **12**: e0175763.
- 33 Christant D, Charon A, Cazanave C et al. Detection of macrolide resistance in Mycoplasma genitalium in France. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2988-90.
- 34 Gossé M, Lysvand H, Rukstad B et al. A novel simple probe PCR assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide resistance in Mycoplasma genitalium in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 2563-7.
- 35 Broam JF, Slotboom B, Van Marm S et al. High prevalence of the A2058T macrolide resistance-associated mutation in Mycoplasma genitalium strains from the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 1529-30.
- 36 Touazi A, Peuchant O, Jensen JS et al. Direct detection of macrolide resistance in Mycoplasma genitalium isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 1549-55.
- 37 Jensen JS. Mycoplasma genitalium: yet another challenging STI. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 795-6.
- 38 Polo R, Palacios R, Barberá MJ et al. Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes. http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2017/06/Documento_de_consenso_sobre_diagnostico_y_tratamiento_de_las_infecciones_de_transmision_sexual_en_adultos_02.pdf.

Anexo 3

Árbol Filogenético.



Anexo 4

Tabla de SNPs

	GO10	GO11	GO12	GO13	GO14	GO15	GO16	GO17	GO1	GO2	GO3	GO4	GO5	GO6	GO7	GO8	GO9
GO10	0	98	27	95	62	2983	90	787	79	2505	90	23	102	69	793	52	73
GO11	98	0	102	35	88	2971	48	803	103	2490	50	109	13	90	809	99	87
GO12	27	102	0	100	72	2944	95	794	86	2504	95	39	106	71	798	71	76
GO13	95	35	100	0	99	2923	44	802	116	2488	49	100	35	99	808	97	98
GO14	62	88	72	99	0	2966	94	787	21	2480	96	71	86	11	792	61	18
GO15	2983	2971	2944	2923	2966	0	2925	2743	2909	2844	2929	2977	2958	2952	2752	2919	2952
GO16	90	48	95	44	94	2925	0	801	109	2491	37	100	54	96	809	93	93
GO17	787	803	794	802	787	2743	801	0	801	2332	806	794	804	791	49	789	777
GO1	79	103	86	116	21	2909	109	801	0	2422	111	89	100	30	798	75	32
GO2	2505	2490	2504	2488	2480	2844	2491	2332	2422	0	2495	2501	2472	2476	2356	2489	2459
GO3	90	50	95	49	96	2929	37	806	111	2495	0	100	53	95	809	93	95
GO4	23	109	39	100	71	2977	100	794	89	2501	100	0	109	75	797	63	80
GO5	102	13	106	35	86	2958	54	804	100	2472	53	109	0	88	809	96	85
GO6	69	90	71	99	11	2952	96	791	30	2476	95	75	88	0	792	67	17
GO7	793	809	798	808	792	2752	809	49	798	2356	809	797	809	792	0	789	780
GO8	52	99	71	97	61	2919	93	789	75	2489	93	63	96	67	789	0	67
GO9	73	87	76	98	18	2952	93	777	32	2459	95	80	85	17	780	67	0