

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>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE GENÈTICA I DE MICROBIOLOGIA FACULTAT DE BIOCÈNCIES UNIVERSITAT
AUTÒNOMA DE BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORADO



Universitat Autònoma
de Barcelona

Estudio sobre la infección por *Neisseria gonorrhoeae* en España: sensibilidad antibiótica y dinámica poblacional.

Autor: Paula Salmerón Menéndez

Directora: Judit Serra Pladevall

Tutor: Juan José González-López

Barcelona, 2024

Tesis doctoral

Estudio sobre la infección por *Neisseria gonorrhoeae* en España: sensibilidad antibiótica y dinámica poblacional

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

PAULA SALMERÓN MENÉNDEZ

Trabajo realizado en el al Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Vall
d'Hebron de Barcelona, bajo la dirección de:

Dra. Judit Serra Pladevall

Judit Serra Pladevall, facultativa especialista del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Vic y Profesora asociada de la Universidad de Vic y **Juan José González López**, facultativo especialista del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d’Hebron y Profesor asociado de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación, titulado “**Estudio sobre la infección por *Neisseria gonorrhoeae* en España: susceptibilidad antibiótica y dinámica poblacional**” y presentado por **Paula Salmerón Menéndez**, Graduada en Farmacia, ha sido realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d’Hebron bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas por la normativa vigente para ser presentada y defendida como Tesis Doctoral por compendio de publicaciones ante el tribunal que corresponda.

Directora de Tesis Doctoral:

Tutor:

Dra. Judit Serra Pladevall

Dr. Juan José González López

AGRADECIMIENTOS:

La elaboración de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda de todas las personas que me han acompañado a lo largo de esta etapa.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Judit Serra por dirigir esta tesis y haber depositado en mí la confianza para trabajar juntas en uno de sus proyectos de investigación. Por contagiarme tus ganas de trabajar y tu entusiasmo. También te quería agradecer todos los consejos que me has dado tanto de mi vida profesional como personal.

A mi “co-R”, Fernando Velásquez, quien ha hecho de la residencia una de las etapas más bonitas de la vida. Me siento muy afortunada de haber trabajado juntos, de todo lo que me has enseñado. Para mí, te has convertido en un hermano.

Al resto de mis compañeros del laboratorio, especialmente Ari, Arantxa, Dani, Miguel, Jesús, que me han acompañado en este camino y ayudado en cada piedra con la que he tropezado. Me siento afortunada por la amistad que hemos forjado durante estos años.

A todo el equipo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Vall d’Hebron, tanto personal técnico como facultativo que, de una forma u otra, ha hecho posible la elaboración de esta tesis. Gracias también al Dr. Juanjo González, al equipo de *recerca*, a Candela y a Aroa. Gracias por vuestros consejos, estar siempre dispuestos a enseñar y ayudarme a profundizar en mis conocimientos.

A la Dra. Nieves Larrosa, gracias por guiarme durante mis primeros años en el laboratorio como tutora y por todos tus consejos durante este tiempo.

A Luis, mi “cucote”, por haberme ayudado a levantarme cuando no tenía fuerzas para seguir y no dejarme perder la fe en mí. Gracias por escucharme, por tu paciencia y ser la persona que me da calma.

A mis padres, por enseñarme que con esfuerzo y perseverancia siempre se alcanza la meta. Espero algún día convertirme en tan buena madre como habéis sido, y poder enseñar a mis hijos todos los valores que me habéis inculcado.

A mi hermana, mi compañera de vida y ejemplo a seguir. Gracias por toda la alegría y carisma que contagias con tu sonrisa. Eres también un ejemplo de que con ilusión y trabajo se pueden cumplir tus sueños.

A todos,

Muchas gracias.

FIGURAS:

Figura 1. Estructura de la envoltura celular de *Neisseria gonorrhoeae*

Figura 2. Etapas de la infección por *Neisseria gonorrhoeae*

Figura 3. Número de casos confirmados de infección gonocócica por 100.000 habitantes por país, UE/EEE, 2021.

Figura 4. Tasas de notificación de casos confirmados de infección gonocócica por 100.000 habitantes en total y por género, UE/EEE, 2012-2021.

Figura 5. Número de casos confirmados de infección gonocócica por género, categoría de transmisión y año, UE/EEE, 2012-2021.

Figura 6. Incidencia de infección gonocócica. Número de casos y tasas por 100.000 habitantes. España, 1995-2021.

Figura 7. Incidencia de infección gonocócica por Comunidad Autónoma, España, 2021. Tasas por 100.000 habitantes.

Figura 8. Evolución de la tasa per 100.000 habitantes de los casos de infección gonocócica en Cataluña, 2012-2021.

Figura 9. Tinción de Gram donde se puede observar diplococos Gram negativos intraleucocitarios.

Figura 10. Colonias de *Neisseria gonorrhoeae* en agar Thayer-Martin

Figura 11. Determinación de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* por la técnica de difusión en gradiente.

Figura 12. Historia de los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de la infección gonocócica y la evolución de la resistencia antimicrobiana en *Neisseria gonorrhoeae*.

TABLAS:

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

Tabla 2: Determinantes y mecanismos de resistencia de *N. gonorrhoeae*.

Tabla 3: Tratamiento recomendado para infecciones no complicadas de la uretra, el cuello uterino y el recto en adultos.

Tabla 4: Tratamiento de la infección gonocócica faríngea.

Tabla 5: Tratamiento de la infección gonocócica resistente a ESCs.

Tabla 6: Dianas de interés para el desarrollo de vacunas contra *Neisseria gonorrhoeae*.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BASHH	British Association for Sexual Health and HIV
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
CCAA	Comunidades Autónomas
CDC	Center for Diseases Control and Prevention
CEACAM	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DSC	<i>Decreased susceptibility to cephalosporins</i> (sensibilidad disminuida a cefalosporinas)
DU	Dosis única
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECOFF	<i>Epidemiological cut-offs</i> (puntos de corte epidemiológicos)
EEE	Espacio Económico Europeo
EPI	Enfermedad Pélvica Inflamatoria
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ESCs	Cefalosporinas de espectro extendido
G	Genogrupo
HL-AziR	<i>High-Level Azithromycin Resistance</i>
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
HSM	Hombres que tienen sexo con mujeres
IGD	Infección gonocócica diseminada
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
ITS	Infección de transmisión sexual
IUSTI	<i>International Union against Sexually Transmitted Infections</i>

LOS	Lipooligosacárido
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
MDR-NG	<i>Multidrug-resistant N. gonorrhoeae</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NG-MAST	<i>Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing</i>
NG-STAR	<i>Neisseria gonorrhoeae sequence typing for antimicrobial resistance</i>
NHBA	<i>Neisserial heparin binding antigen</i>
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
OMV	Outer membrane vesicle
PBPs	Penicillin-binding proteins
PMN	Polimorfonucleares
PPNG	<i>N. gonorrhoeae</i> productor de penicilinas
RAM	Resistencia antimicrobiana
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
ST	Secuenciotipo
TAANs	Técnica de amplificación de ácidos nucleicos
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOC	Test de cura (por sus siglas en inglés, <i>test of cure</i>)
UE	Unión Europea
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VO	Vía oral
WHO	World Health Organization
WGS	Whole genome sequencing
XDR-NG	Extensively drug-resistant <i>N. gonorrhoeae</i>

RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	18
RESUM.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	22
1.1 Importancia de la infección gonocócica en Salud Pública como motivación por este estudio.....	23
1.2 Historia de la infección causada por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....	25
1.3 Descripción de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....	25
1.3.1 Características microbiológicas.....	25
1.3.2 Factores de virulencia.....	26
1.3.3 Patogenia.....	29
1.3.3.1 Adhesión, colonización e invasión.....	30
1.3.3.2 Inflamación.....	31
1.3.3.3 Mecanismos de evasión del sistema inmunitario.....	31
1.4 Epidemiología.....	32
1.4.1 Europa.....	32
1.4.2 España.....	35
1.4.3 Cataluña.....	36
1.5 Manifestaciones clínicas.....	38
1.5.1 Infecciones urogenitales.....	38
1.5.2 Infecciones extragenitales.....	39
1.5.3 Infección en el embarazo.....	40
1.5.4 Infección en el neonato e infancia.....	40
1.6 Diagnóstico.....	41
1.6.1 Recogida, transporte y almacenamiento de la muestra.....	41
1.6.2 Microscopia.....	42
1.6.3 Cultivo.....	43
1.6.4 Identificación	44
1.6.5 Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.....	45
1.7 Métodos de tipado molecular.....	46
1.7.1 <i>Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing</i> (NG-MAST)	46
1.7.2 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	46
1.7.3 <i>Neisseria gonorrhoeae sequence typing for antimicrobial resistance</i> (NG-STAR)	47
1.7.4 Secuenciación de genoma completo (WGS).....	47

1.8 Sensibilidad antimicrobiana y tratamiento.....	48
1.8.1 Estudio de la sensibilidad antimicrobiana.....	48
1.8.2 Historia de los regímenes de tratamiento y evolución de la resistencia.....	49
1.8.3 Mecanismo de resistencia.....	54
1.8.4 Regímenes de tratamiento.....	63
1.8.5 Nuevos tratamientos.....	66
1.8.6 Vacuna.....	68
2. JUSTIFICACIÓN.....	70
3. OBJETIVOS.....	73
4. RESULTADOS.....	75
4.1 Publicación 1: Sensibilidad antimicrobiana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en Barcelona en un período de cinco años, 2013-2017.....	76
4.2 Publicación 2: Emergencia y diseminación de tres brotes de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> con resistencia de alto nivel a azitromicina en Barcelona, 2016-2018.....	87
4.3 Publicación 3: Resistencia antimicrobiana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en España: estudio prospectivo multicéntrico.....	95
4.4 Publicación 4: Epidemiología molecular y resistencia antimicrobiana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en España: un estudio prospectivo multicéntrico.....	106
5. DISCUSIÓN.....	116
6. CONCLUSIONES.....	132
7. PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	135
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
9. ANEXO.....	149



RESUMEN

La infección gonocócica es la segunda infección de transmisión sexual de etiología bacteriana más prevalente a nivel mundial, representando un importante problema para la salud pública. En los últimos años, la resistencia a los antimicrobianos en el gonococo ha aumentado rápidamente y ha reducido las opciones terapéuticas. De hecho, la primera cepa de *N. gonorrhoeae* con resistencia a ceftriaxona y alto nivel de resistencia a azitromicina (HL-AziR) fue detectada en Reino Unido en 2018. Por otro lado, la vigilancia genómica mediante secuenciación del genoma completo junto con datos epidemiológicos y de resistencia a los antimicrobianos son esenciales para caracterizar los linajes de *N. gonorrhoeae* circulantes y su asociación con grupos de población (definidos por factores demográficos y epidemiológicos). Sin embargo, existe escasa información sobre la sensibilidad antimicrobiana y la dinámica poblacional de *N. gonorrhoeae* en el territorio español.

Esta tesis proporciona nuevos conocimientos sobre la sensibilidad antimicrobiana y la epidemiología molecular de *N. gonorrhoeae* tanto en Barcelona como a nivel estatal. Los estudios sobre sensibilidad antimicrobiana (años 2013-2017 en Barcelona y años 2018-2019 estudio multicéntrico) muestran que la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a cefalosporinas de tercera generación, última opción terapéutica empírica para el tratamiento de esta infección, permanece alta y estable a lo largo de los años. Por el contrario, la tasa de resistencia a azitromicina en Barcelona aumentó durante el período de estudio, detectándose los primeros aislados con HL-AziR entre 2016 y 2018, que fueron los primeros casos descritos en España. La tasa global de resistencia a azitromicina en España fue del 12,1% y se observaron diferencias significativas entre regiones. En este sentido, se observó una alta tasa de resistencia a las quinolonas, siendo más de la mitad de los aislados resistentes a esta familia de antimicrobianos.

Por otro lado, gracias a la secuenciación de genoma completo de las cepas del estudio multicéntrico, se concluye que la población de *N. gonorrhoeae* en España es bastante heterogénea. Sin embargo, se observaron dos subpoblaciones independientes presentando cada una de ellas un

perfil de resistencia y una localización geográfica determinados, lo que sugiere redes de transmisión de gonococo en áreas concretas del territorio español.

ABSTRACT

Gonorrhoea is the second most commonly reported bacterial sexually transmitted infection worldwide, representing a major public health problem. In recent years, increasing rates of antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae* have reduced therapeutic options. In fact, the first strain of *N. gonorrhoeae* with combined ceftriaxone resistance and high-level azithromycin resistance (HL-AziR) was detected in the United Kingdom in 2018. On the other hand, genomic surveillance, based on whole genome sequencing, combined with epidemiological data and antimicrobial resistance are essential to characterize circulating *N. gonorrhoeae* lineages and their association with population groups (defined by demographic and epidemiological factors). However, there is scarce information on the antimicrobial susceptibility and population dynamics of *N. gonorrhoeae* in Spain.

This study provides further knowledge about the antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *N. gonorrhoeae* both in Barcelona and Spain. The results of antimicrobial susceptibility (2013-2017 in Barcelona and 2018-2019 multicentre study) show that the third-generation cephalosporins susceptibility, the last empirical therapeutic option for the treatment of this infection, remains high and stable over the years. However, azithromycin resistance increased in Barcelona during the study period, with the first isolates with HL-AziR being detected between 2016 and 2018, which were also the first cases described in Spain. The overall rate of azithromycin resistance in Spain was 12.1%, with significant differences between regions. In addition, more than half of the isolates were resistant to ciprofloxacin.

On the other hand, whole genome sequencing of the strains from the multicentre study showed that the population of *N. gonorrhoeae* is quite heterogeneous in Spain. However, we detected the circulation of two gonococcal subpopulations with a specific resistance profile and sequence type in a certain geographic area, which suggests gonococcus transmission networks in specific areas of Spain.

RESUM

La infecció gonocòccica és la segona infecció de transmissió sexual d'etiologia bacteriana més prevalent a nivell mundial, representant un problema important per a la salut pública. En els últims anys, la resistència als antimicrobians en el gonococ ha augmentat ràpidament i ha reduït les opcions terapèutiques. De fet, la primera soca de *N. gonorrhoeae* amb resistència a ceftriaxona i alt nivell de resistència a azitromicina (HL-AziR) es va descriure al Regne Unit el 2018. D'altra banda, la vigilància genòmica mitjançant seqüenciació del genoma complet, juntament amb dades epidemiològiques i de resistència als antimicrobians, és essencial per caracteritzar els llinatges circulants de *N. gonorrhoeae* i la seva associació amb grups de població (definites per factors demogràfics i epidemiològics). No obstant això, hi ha escassa informació sobre la sensibilitat antimicrobiana i la dinàmica poblacional de *N. gonorrhoeae* al territori espanyol.

Aquesta tesi proporciona nous coneixements sobre la sensibilitat antimicrobiana i l'epidemiologia molecular de *N. gonorrhoeae* tant a Barcelona com a nivell estatal. Els estudis sobre sensibilitat antimicrobiana (anys 2013-2017 a Barcelona i anys 2018-2019 estudi multicèntric) mostren que la sensibilitat de *N. gonorrhoeae* a cefalosporines de tercera generació, darrera opció terapèutica empírica per al tractament d'aquesta infecció, es manté alta i estable al llarg dels anys. Contràriament, la taxa de resistència a azitromicina a Barcelona va augmentar durant el període d'estudi, detectant-se els primers aïllats amb HL-AziR entre el 2016 i el 2018, sent, a més, els primers casos descrits a Espanya. La taxa global de resistència a azitromicina a Espanya va ser del 12,1% i es van observar diferències significatives entre regions. En aquest sentit, es va observar una alta taxa de resistència a les quinolones, sent més de la meitat dels aïllats resistents a aquesta família d'antimicrobians.

D'altra banda, gràcies a la seqüenciació de genoma complet de les soques de l'estudi multicèntric, es conclou que la població de *N. gonorrhoeae* a Espanya és força heterogènia. No obstant això, es van observar dues subpoblacions independents presentant cadascuna un perfil de resistència i una

localització geogràfica determinats, cosa que suggereix xarxes de transmissió de gonococ en àrees concretes del territori espanyol.



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN GONOCÓCICA EN SALUD PÚBLICA COMO MOTIVACIÓN PARA ESTE ESTUDIO

Neisseria gonorrhoeae es el agente etiológico de la infección gonocócica y actualmente, es la segunda infección de transmisión sexual (ITS) de etiología bacteriana más prevalente a nivel mundial.^{1, 2}

El tratamiento antimicrobiano efectivo y accesible es esencial para el manejo de la infección gonocócica. Sin embargo, *N. gonorrhoeae* ha desarrollado resistencia a todos los antibióticos utilizados en su tratamiento a lo largo de la historia^{3,4} por lo que podría convertirse en una infección intratable. Actualmente, ceftriaxona es la última opción terapéutica empírica contra la infección gonocócica, aunque se han detectado casos de infección por cepas resistentes a este antibiótico en todo el mundo^{5,6,7,8,9}. Del mismo modo, se han confirmado fracasos terapéuticos esporádicos en infecciones faríngeas tratadas con ceftriaxona.^{10,11,12,13} Por ello, a partir de 2011, diversas guías internacionales empezaron a recomendar la terapia antimicrobiana dual (ceftriaxona 250-500 mg más azitromicina 1–2 g)^{1,14,15,16} como tratamiento empírico de primera línea. El primer fracaso con terapia dual se reportó en 2016¹⁷ en una infección faríngea, y posteriormente se confirmó la propagación internacional de cepas resistentes a ceftriaxona entre 2015 y 2019^{9,18,19,20,21}, concretamente en 2018 se detectaron las primeras cepas con resistencia dual a ceftriaxona y azitromicina en Inglaterra y Australia.^{11,22,23}

En 2012 se publicó en Europa un plan de respuesta para controlar y gestionar *N. gonorrhoeae* multirresistente (MDR-NG)²⁴, elaborado por el ECDC y el centro de coordinación Euro-GASP junto con un grupo amplio de expertos internacionales. Se detallaron tres áreas principales de enfoque: (i) fortalecer la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, (ii) implementar el seguimiento de los fracasos del tratamiento y (iii) establecer una estrategia de comunicación para la conciencia sobre MDR-NG y difundir adecuadamente los resultados de la vigilancia de la resistencia

antimicrobiana (RAM). Sin embargo, la disminución de la sensibilidad a la azitromicina, junto con el aumento de cepas resistentes a ceftriaxona y MDR/XDR y fracasos terapéuticos, hicieron imprescindibles una evaluación, una revisión detallada y una actualización del mismo. El plan de respuesta del ECDC de 2019²⁵, debería ayudar a controlar y gestionar la amenaza de MDR/XDR-NG en Europa mediante el fortalecimiento de la vigilancia de la RAM y la gestión clínica, incluido el seguimiento de los fracasos terapéuticos. La eficacia del plan de respuesta del ECDC de 2019 debe supervisarse periódicamente para identificar y abordar con celeridad áreas de mejora²⁶.

La vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana es esencial para detectar la RAM emergente, monitorizar las tendencias de la RAM y proporcionar evidencia para mantener actualizadas las pautas terapéuticas y establecer políticas de salud pública a nivel mundial, nacional y regional.

Dada la alta prevalencia de la infección gonocócica, el uso incontrolado de los antibióticos, el control inadecuado de la resistencia antimicrobiana, los fracasos terapéuticos, la insuficiente actualización de las guías de tratamiento en muchos países y la gran capacidad de *N. gonorrhoeae* para desarrollar resistencia a los antibióticos, el problema global de la resistencia antimicrobiana podría empeorar en los próximos años.

Por otro lado, los estudios de epidemiología molecular ayudan a conocer de forma fiable la distribución de los distintos genotipos, pueden contribuir a una mejor comprensión de los patrones de la transmisión de infección gonocócica en la población y detectar redes sexuales de alto riesgo. Así, conocer la epidemiología molecular de *N. gonorrhoeae* en nuestro entorno podría servir para diseñar planes de actuación para intervenir en estas redes y evitar la diseminación de la infección. Por todo ello, en este trabajo se describe, por un lado, la sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* en Barcelona, durante un período de cinco años. Además, se estudia la epidemiología molecular de un brote de infección gonocócica asociada a un alto nivel resistencia a azitromicina. Por otro lado, se describe la sensibilidad antimicrobiana de 10 hospitales distribuidos por el Estado Español durante un año y medio; así como los resultados del estudio de la epidemiología molecular y caracterización de los mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana mediante

secuenciación de genoma completo de un número de cepas representativas de la geografía española.

1.2 HISTORIA DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR *Neisseria gonorrhoeae*

La infección gonocócica es una enfermedad antigua sobre la cual ya hacía referencia el Antiguo Testamento (Levítico 15: 1-3), donde se advierte de que: "Cuando cualquier hombre tiene flujo corporal, el flujo es impuro". En el siglo II, el médico y filósofo Galeno de Pérgamo, interpretó erróneamente que la secreción purulenta de la uretra que tenía lugar durante la infección era semen. De hecho, el término gonorrea proviene del griego γονόρροια que significa flujo seminal.²⁷ En inglés, el término "the clap" fue introducido en 1378 para referirse a esta enfermedad y proviene del nombre del antiguo barrio parisino Les Clapiers, donde se alojaban las personas que ejercían la prostitución.⁴

El microorganismo causal fue descrito por primera vez por Albert Ludwig Sigismund Neisser en 1879 y se aisló en cultivo en 1882 por Leistikow y Löffler²⁸.

1.3 DESCRIPCIÓN DE *Neisseria gonorrhoeae*

1.3.1 Características microbiológicas

El género *Neisseria* pertenece al filo *Proteobacteria*, clase *Beta Proteobacteria*, orden *Neisseriales*, familia *Neisseriaceae*. Hasta la fecha, se han reconocido 30 especies dentro de este género. La mayoría de ellas son bacterias comensales del ser humano y sólo dos especies se consideran patógenos primarios: *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*.

N. gonorrhoeae es un coco Gram negativo, tiene un tamaño de entre 0.6 - 1.9 µm y se agrupa en parejas en forma de "grano de café". Es aerobio o anaerobio facultativo, inmóvil, no capsulado y no produce esporas. Sin embargo, poseen pili de tipo IV en su superficie celular.

En cuanto a sus características bioquímicas, produce catalasa, una enzima que hidroliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxígeno (O_2). Además, oxida de forma rápida la dimetilparafenileno diamina en tetrametilparafenileno diamina.

N. gonorrhoeae tiene unos requerimientos nutricionales muy complejos ya que necesita factores de crecimiento como vitaminas, aminoácidos y hierro, entre otros. Consecuentemente, a diferencia del resto de especies del género *Neisseria*, necesita medios enriquecidos para crecer. Además, únicamente puede utilizar la glucosa, pero no la maltosa, ni la sacarosa o la lactosa en su metabolismo.

Las condiciones óptimas para su crecimiento son una temperatura de entre 35 y 37°C y una concentración de dióxido de carbono del 5%.

1.3.2 Factores de virulencia

La estructura básica de la envoltura de *N. gonorrhoeae* es similar a la de otras bacterias Gram negativas. Contiene distintos factores de virulencia que intervienen en los procesos de adherencia, invasión celular, citotoxicidad y algunos de ellos suponen una vía de evasión frente a los mecanismos de defensa, tanto a nivel sistémico como de las mucosas²⁸.

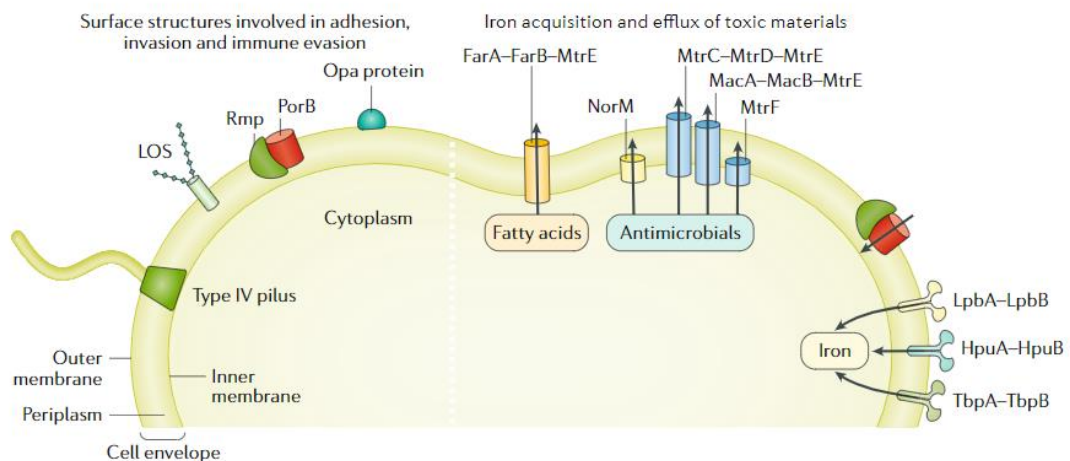


Figura 1: Estructura de la envoltura celular de *Neisseria gonorrhoeae*²⁹

- **Pili o fimbrias de tipo IV**

Los pili o fimbrias de tipo IV son estructuras proteicas formados principalmente por subunidades repetidas de pilina. Los pili son esenciales para una colonización eficaz de la mucosa y desempeñan varias funciones, como la adhesión inicial a las células del huésped, la adhesión a otras células de *N. gonorrhoeae*, la motilidad bacteriana y evadir los mecanismos de eliminación por parte de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Además, la transferencia genética horizontal en *N. gonorrhoeae* se produce principalmente por transformación del ácido desoxirribonucleico (ADN) mediada por pilus de tipo IV (captación de ADN del entorno y su posterior incorporación al genoma).

La pilina contiene regiones de considerable similitud antigénica entre cepas y otras regiones que presentan una elevada variabilidad antigénica, lo que permite a las bacterias evitar el reconocimiento por parte del sistema inmunitario. Asimismo, una sola cepa de *N. gonorrhoeae* es capaz de producir pili con diferentes composiciones antigénicas, dificultando el desarrollo de vacunas basadas en estas estructuras. Los gonococos forman inicialmente colonias de tipos P⁺ y P⁺⁺ que contienen múltiples pili, pero después de 20-24 horas de crecimiento *in vitro* tiene lugar lo que se llama variación de fase, y pierden los pili (colonias P⁻). Los gonococos con pili se unen con mayor facilidad a las superficies de las mucosas humanas, por lo que son más virulentos.

- **Membrana externa**

Como todos los microorganismos Gram negativos, el gonococo posee una envoltura celular formada por tres capas: la membrana citoplasmática, la pared celular formada por peptidoglucano y una membrana externa formada por el lipooligosacárido (LOS), fosfolípidos y varias proteínas.

- **Lipooligosacárido (LOS)**

El LOS se compone del lípido A y un núcleo oligosacárido el cual, a diferencia del polisacárido de la mayoría de las bacterias Gram negativas, no contiene cadenas laterales de antígeno O. La sialización de los glúcidos del núcleo del LOS protege los epítomos tanto del LOS como de la

porina y esto confiere resistencia frente a los anticuerpos bactericidas. Además, los glúcidos del núcleo sufren variaciones antigénicas de alta frecuencia que pueden contribuir a la patogenia de la infección, incluida la resistencia a los anticuerpos anti-LOS presentes en el suero y la invasión de las células epiteliales.

- **Porina**

La porina, previamente denominada proteína I, es la proteína más abundante de la membrana externa, tiene un peso molecular de 32-36 kD y forma canales que permiten a los solutos acuosos atravesar la membrana externa (hidrófoba).

Existen dos clases de porinas, PorB1A y PorB1B, cada una de ellas con serovariedades diferentes, que son la base del sistema de serotipificación gonocócica. Las cepas que expresan PorB1A tienden a asociarse con enfermedad diseminada, mientras que los aislados que expresan PorB1B suelen causar infecciones urogenitales localizadas³⁰.

A diferencia del LOS, la porina durante el transcurso de la infección no suele sufrir variación antigénica, por lo que constituye la base para los sistemas de serotipificación y tipificación molecular. Asimismo, es una de las principales dianas para el desarrollo de vacunas^{28, 30}.

- **Proteína Opa**

Las proteínas Opa, con peso molecular de 20-28 kD, también se encuentran insertadas en la membrana externa del gonococo. Pertenecen a una familia multigénica que contiene 11 alelos opa y presentan variación antigénica y de fase. Por tanto, una cepa de *N. gonorrhoeae* puede o bien no expresar ninguna variante o hasta 11. Muchas proteínas Opa aumentan la adhesión entre gonococos y diversas células eucariotas, incluidos los fagocitos³¹.

- **Peptidoglucano**

La capa de peptidoglucano de *N. gonorrhoeae* posee transglucosilasas líticas que producen y liberan monómeros de peptidoglucano altamente inflamatorios³² y que dañan la mucosa de las trompas de Falopio. Por otro lado, se han detectado fragmentos de peptidoglucano en el líquido articular de pacientes que presentaron artritis gonocócica³³.

- **Cápsula polisacárida**

N. gonorrhoeae no produce una verdadera cápsula polisacárida sino un polifosfato de superficie que desempeña funciones similares a las de la cápsula, como crear una superficie celular hidrófila de carga negativa²⁸.

1.3.3 Patogenia

N. gonorrhoeae coloniza principalmente el tracto urogenital después del contacto sexual con una persona infectada. El gonococo puede existir tanto como organismo extracelular como intracelular, pero no puede sobrevivir fuera su huésped, el ser humano.

N. gonorrhoeae infecta el epitelio de las mucosas del tracto urogenital, el recto, la faringe o la conjuntiva. Se transmite principalmente a través de relaciones sexuales vaginales, anales u orales sin protección. Durante el sexo vaginal, la tasa de transmisión de hombres a mujeres es más alta que de mujeres a hombres.²⁹ Además, las mujeres con infección por *N. gonorrhoeae* pueden transmitir eficazmente la infección a sus hijos durante el parto, pero no durante el embarazo. La conjuntiva del recién nacido está muy expuesta durante el tránsito por el canal del parto, y la infección por *N. gonorrhoeae* de la conjuntiva da como resultado una oftalmía neonatal.

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

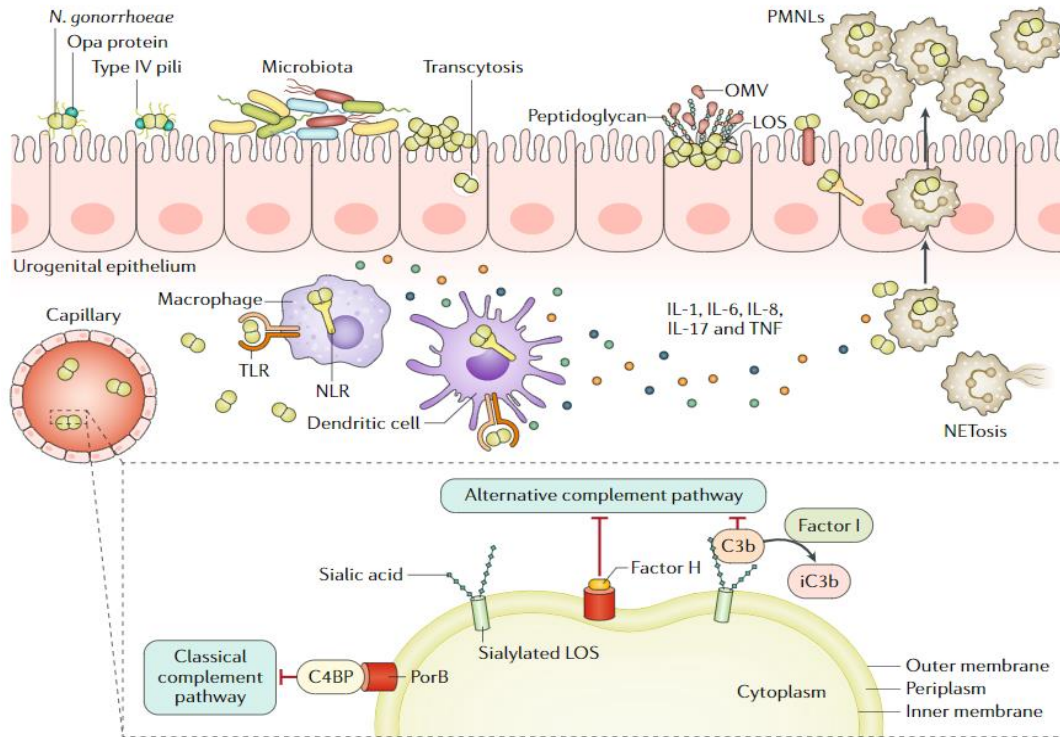


Figura 2: Etapas de la infección por *Neisseria gonorrhoeae*²⁹

1.3.3.1 Adherencia, colonización e invasión

Después de la transmisión, *N. gonorrhoeae* se divide hasta alcanzar una densidad celular necesaria que le permita llevar a cabo la reorganización de su citoesqueleto y la adherencia bacteriana al epitelio de la mucosa, que está mediada por diferentes estructuras de la superficie bacteriana que incluyen pili tipo IV, proteínas Opa, LOS y la porina.

Las primeras estructuras que participan en la adhesión son los pili de tipo IV, que en los hombres se unen a CD46 y en las mujeres también a CR3²⁸. Una vez unidos, las estructuras del pilus se retraen a través de la despolimerización de PilE que promueve un contacto más estrecho con las células huésped a través de la unión de Opa a los receptores de la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM.) Tras la unión a CEACAM, se induce la polimerización y reordenamiento de actina dentro de la célula huésped, lo que da como resultado la endocitosis bacteriana, la transcitosis transcelular y la liberación de las bacterias en la capa subepitelial³⁴.

1.3.3.2 Inflamación

El síntoma distintivo de una infección gonocócica no complicada es un reclutamiento masivo de neutrófilos al sitio de la infección que conduce a la formación de una secreción purulenta.

Tras la unión del gonococo a la mucosa, se liberan las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF-alfa, así como la quimiocina IL-8, lo que conduce al reclutamiento de neutrófilos. Además, al llegar a la capa subepitelial, los gonococos liberan LOS y lipoproteínas que estimulan aún más la producción de citocinas, ya que estos componentes de la membrana externa son detectados por los receptores tipo Toll (TLR) en las células inmunes. Las células huésped también responden a los fragmentos de peptidoglucano bacteriano dentro de las vesículas de la membrana externa a través de receptores citoplasmáticos similares a NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos) que también contribuyen a la secreción de citocinas proinflamatorias adicionales^{34,35}.

A pesar del reclutamiento activo de leucocitos (PMN) al sitio de infección, los gonococos pueden sobrevivir a los mecanismos de defensa oxidativos y no oxidativos. Para combatir el estrés oxidativo, el gonococo expresa diferentes enzimas como la catalasa, citocromo C peroxidasa y la superóxido dismutasa que descomponen las especies reactivas de oxígeno.

1.3.3.3 Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria

N. gonorrhoeae ha desarrollado varios mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria de su huésped y así favorecer el contagio a otra persona y la reinfección.

1.3.3.3.1 Resistencia al efecto bactericida del suero

El gonococo también emplea mecanismos para limitar la deposición del complemento en su superficie, evitando así la opsonofagocitosis mediada por el complemento. En particular, la porina B se une a la proteína de unión a C4 y al factor H, que limitan las vías clásicas y alternativas de activación del complemento, respectivamente. Además, la sialilación del LOS mejora la deposición del factor H en la porina, lo que explica en parte la mayor resistencia del gonococo a la fagocitosis.³⁶

1.3.3.2 Variación de los antígenos de superficie

N. gonorrhoeae puede sobrevivir como organismo extracelular o como organismo intracelular dentro de una variedad de tipos de células diferentes. El estado en el que entra el organismo depende en gran medida de qué componentes de la superficie se expresan y si estos componentes están químicamente modificados o no. *N. gonorrhoeae* puede modular la expresión o el carácter químico de sus componentes superficiales por variación de fase o por variación antigénica, y esto dificulta el reconocimiento por parte de los anticuerpos del huésped y explica la falta de vacunas eficaces para proteger contra la infección gonocócica.

1.3.3.3 Inmunidad adaptativa

Los individuos con infección por *N. gonorrhoeae* pueden reinfectarse, ya que la infección gonocócica no provoca una respuesta inmune protectora ni genera memoria inmunológica.

N. gonorrhoeae modula la respuesta inmune adaptativa del huésped mediante la unión de las proteínas Opa con el receptor CEACAM-1, lo que suprime la activación de las células T e inhibe la producción de anticuerpos específicos por parte de los linfocitos B.

1.4 EPIDEMIOLOGÍA

1.4.1 Europa

Según los datos reportados por el “European Centre for Disease Prevention and Control”³⁷, en 2021 se notificaron 46.728 casos de infección gonocócica en 27 países europeos. Globalmente, esto representa una tasa de 13,7 casos por 100.000 habitantes. Las tasas más altas (>30/100.000 habitantes) se documentaron en Luxemburgo (66 casos por 100 000 habitantes) seguido de Dinamarca, Malta e Irlanda. Las tasas más bajas (<1/100.000 habitantes) fueron en Bulgaria, Croacia, Chipre, Polonia y Rumania (figura 3).

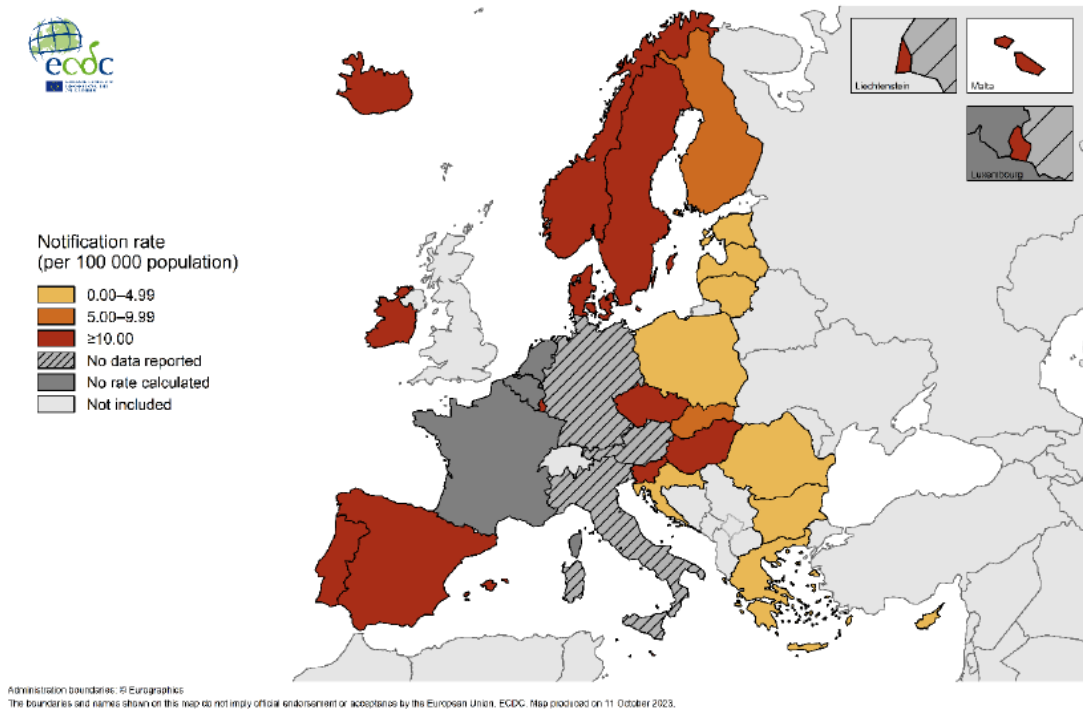


Figura 3: Número de casos confirmados de infección gonocócica por 100.000 habitantes por país, UE/EEE, 2021.³⁷

En cuanto al sexo de los pacientes, la proporción entre hombres y mujeres en 2021 fue de 4,8 frente a 1. El grupo de edad más afectado fue el de 25 a 34 años (35% de los casos), seguido del de 20 a 24 años (19 %) y del de 35 a 44 años (19 %). Con excepción del grupo de edad de 0 a 14 años (en el que las tasas son muy bajas), las tasas fueron más altas en los hombres en todos los grupos de edad.

En 2021, 18 países notificaron datos sobre el modo de transmisión para el 60% o más de sus casos. Entre estos países, el 62% de todos los casos fueron en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), el 37% se notificó entre heterosexuales (20% hombres y 16% mujeres) y en el 1% de los casos el grupo de transmisión se informó como "otro".

Entre 2010 y 2021, se notificaron 724.290 casos de infección gonocócica confirmada en 29 países. Durante este periodo, las tasas en los hombres fueron consistentemente más altas que en las mujeres. En la figura 4 se observa la evolución por sexo durante estos años. Desde 2012, las tasas de notificación aumentaron un 76% para los hombres y un 38% para las mujeres.

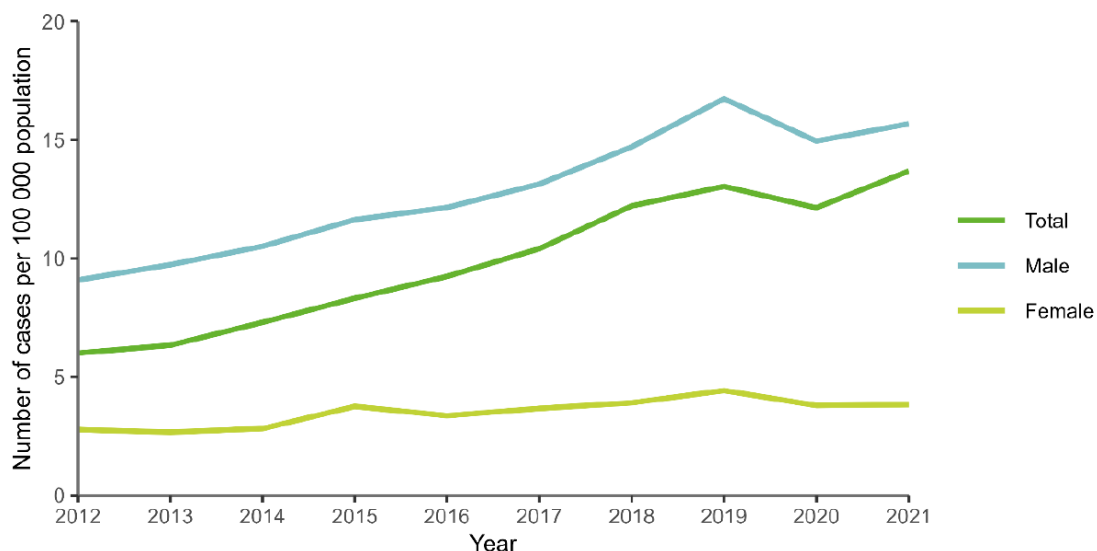


Figura 4: Tasas de notificación de casos confirmados de infección gonocócica por 100.000 habitantes en total y por género, UE/EEE, 2012-2021³⁷

En los 14 países que reportaron modo de transmisión, los casos notificados mostraron una tendencia creciente entre todos los grupos de 2012 a 2019, y disminuyó ligeramente en 2020. Entre los HSH y los hombres heterosexuales, los casos notificados aumentaron nuevamente en 2021. La transmisión en HSH aumentó un 286% durante este período y la transmisión heterosexual aumentó un 50% (Figura 5).

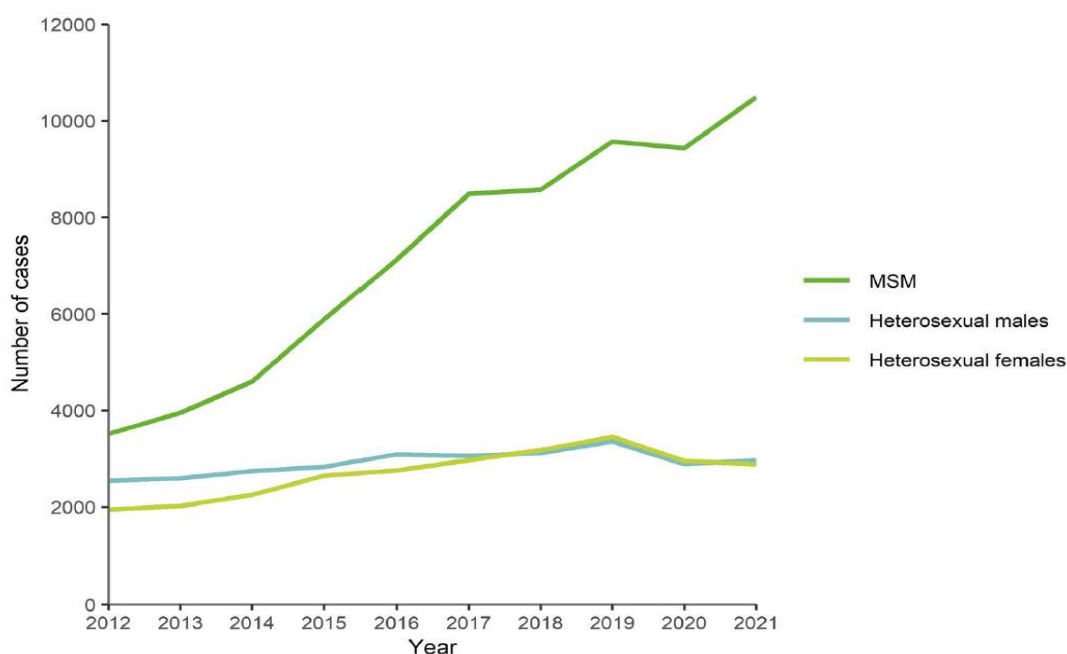


Figura 5: Número de casos confirmados de infección gonocócica por género, categoría de transmisión y año, UE/EEE, 2012-2021.³⁷

1.4.2 España

Según los datos de la “Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica” de España³⁸, en el año 2022 se notificaron 23.333 casos de infección gonocócica (tasa: 49,0 por 100.000 habitantes). Al analizar los datos en el periodo 1995-2022 (Figura 6), se observa un marcado descenso en las tasas hasta el año 2001 (desde 11,69 en 1995 hasta 2,04 en el 2001) seguido de un incremento continuado de la incidencia a partir de esa fecha.³⁸ El 79,9% (18.564 casos) fueron varones y la razón hombre: mujer fue de 4,0.



Figura 6: Incidencia de infección gonocócica. Número de casos y tasas por 100.000 habitantes. España, 1995-2022.³⁸

La incidencia de infección gonocócica por CCAA en 2022 presenta un rango muy amplio, oscilando entre 6,94 y 121,88 casos por 100.000 habitantes. Las tasas más elevadas se registraron en Cataluña (121,88), País Vasco (63,82), Madrid (58,89) y Baleares (48,91). Las más bajas se notificaron en Melilla (4,83), Extremadura (6,94), Castilla La Mancha (10,30) y Asturias (10,54). Ceuta no notificó ningún caso en 2022 (Figura 7).

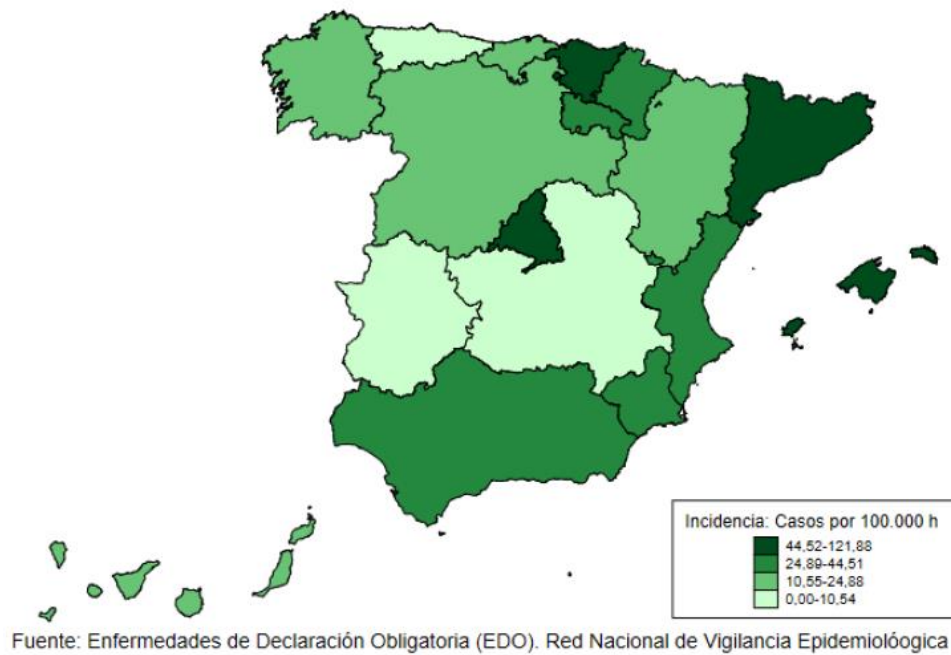


Figura 7: Incidencia de infección gonocócica por Comunidad Autónoma, España, 2022. Tasas por 100.000 habitantes.³⁸

1.4.3 Cataluña

Según los datos del *Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT)*³⁹, la tasa global de infección gonocócica en 2021 incrementó en un 44,1% respecto a 2020, con un incremento medio anual de los últimos diez años del 32,7%, pasando de los 8,9 casos por 100.000 habitantes en 2012 a los 86,2 casos por 100.000 habitantes en 2021, con un total de 6674 casos notificados en 2021 (Figura 8).



Figura 8: Evolución de la tasa per 100.000 habitantes de los casos de infección gonocócica en Cataluña, 2012-2021.³⁹

En 2021, los hombres representaron el 83,1% de los casos mientras que las mujeres el 16,9% restante, con una razón hombre: mujer de 5, la cual se ha mantenido estable durante el período 2012-2021. La edad media se situaba en 33 años, 28 años para las mujeres y 34 para los hombres. Según el grupo de edad, el número de casos notificados fue superior en el grupo de 20-29 años en el global y en las mujeres: 36,5% y 49,1%, respectivamente. En los hombres, el grupo de edad mayoritario se situó en los 30-39 años con el 37,4% de los casos notificados. Respecto al grupo de transmisión, el grupo mayoritario fueron los HSH (58,1%), seguido de mujeres y hombres heterosexuales, 27,1% y 14,0%, respectivamente. La coinfección por VIH se reportó en un 9,1% de los casos, alcanzando el 19,3% en los HSH.³⁹

1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1.5.1 Infecciones urogenitales

- **Infección en hombres**

En varones, la uretritis aguda es la manifestación clínica más frecuente. Los principales signos y/o síntomas son el exudado uretral y la disuria, normalmente sin polaquiuria ni tenesmo vesical. Durante las primeras horas de la infección, el exudado suele ser escaso y mucoide, pero al cabo de uno o dos días es francamente purulento. El período de incubación suele ser de 2 a 5 días, aunque puede oscilar entre 1 y 10.²⁸

La sintomatología puede variar en función de factores tanto del huésped como del microorganismo. Por ejemplo, algunas serovariedades PorB1A se asocian más frecuentemente a las infecciones asintomáticas en hombres. Se calcula que la prevalencia de la gonorrea urogenital asintomática en varones es del 10%.

Las complicaciones en hombres son poco frecuentes, siendo algunas de ellas la epididimitis aguda, linfangitis peneana, absceso periuretral, prostatitis aguda, vesiculitis seminal e infecciones de las glándulas de Tyson y de Cooper.

- **Infección en mujeres**

La manifestación clínica más frecuente en mujeres es la cervicitis. La infección afecta principalmente al epitelio columnar del endocérvix. En cambio, la mucosa vaginal no suele estar infectada por *N. gonorrhoeae* debido a la presencia del epitelio escamoso estratificado, con excepción de mujeres con deficiencia de estrógenos como las niñas prepúberes o las mujeres postmenopáusicas. En el 70-90% de los casos, suele haber infección uretral concomitante debido a su proximidad anatómica.

Los síntomas generalmente se desarrollan tras un período de incubación de 8 a 10 días. Los principales signos y síntomas son leucorrea, disuria, metrorragias y menorragias.

Entre el 50-95% de las infecciones gonocócicas en mujeres pueden ser asintomáticas, y la no detección o tratamiento inadecuado pueden provocar complicaciones y facilitar la diseminación de la enfermedad. Estas complicaciones se producen aproximadamente en un 10-20% de los casos,

pudiendo incluir endometritis, enfermedad pélvica inflamatoria, absceso tubo-ovárico e infertilidad. Además, es un cofactor para el aborto espontáneo, corioamnionitis, rotura prematura de membranas, parto prematuro y afectaciones fetales.

1.5.2 Infecciones extragenitales

- **Infección anorrectal**

La principal vía de la infección gonocócica rectal es el coito anal receptivo sin protección. En el 90% de los casos la infección es asintomática, causando proctitis aguda en los casos sintomáticos, que cursa con dolor, molestia o prurito anorrectal, tenesmo, secreción purulenta o sangrado rectal. Además, una anoscopia puede mostrar edema y eritema con presencia de exudado mucopurulento^{28,40,41}.

- **Infección faríngea**

Esta infección se adquiere por contacto orogenital sin protección y generalmente coexiste con una infección genital. Recientemente, se ha sugerido que los besos y el intercambio de saliva desempeñan un papel importante en la transmisión de *N. gonorrhoeae* y contribuyen de manera importante en la morbilidad de la infección gonocócica en la comunidad.⁴² Aunque hay poca evidencia para respaldar esto, genera una discusión sobre el papel potencial de la orofaringe en el control de esta infección.

Al igual que en la gonorrea rectal, los datos de prevalencia pueden estar infradiagnosticados, ya que más del 90% de las infecciones son asintomáticas⁴¹ y la mayoría de los casos se resuelven espontáneamente^{28,40}. El diagnóstico suele realizarse durante un cribado o en el estudio de contactos⁴⁰.

La infección faríngea juega un papel relevante en la adquisición de genes de resistencia, dado que es uno de los reservorios donde se produce más transferencia horizontal de genes con otras especies comensales de *Neisseria* ⁴.

- **Infección gonocócica diseminada (IGD)**

La IGD es una complicación infrecuente que se produce por la diseminación hematológica de *N. gonorrhoeae* a partir de una infección primaria de las mucosas. Normalmente aparece dentro de las primeras 2 o 3 semanas después de adquirir la infección y se estima que puede afectar aproximadamente al 3% de los casos ^{28,43}.

Los pacientes con IGD presentan la clásica tríada caracterizada por la aparición de dermatitis, tenosinovitis y poliartralgia o poliartritis migratoria. Los síntomas articulares pueden ser muy intensos y a menudo son asimétricos. La manifestación más frecuente es la artritis y, generalmente, afecta a una o dos articulaciones, con mayor frecuencia en la rodilla, el tobillo, el codo o la muñeca. Suele aparecer fiebre moderada, escalofríos y malestar general.

1.5.3 Infección en el embarazo

La infección gonocócica en el embarazo se asocia con aborto espontáneo, trabajo de parto prematuro, ruptura temprana de membranas y mortalidad infantil perinatal. Las manifestaciones clínicas no cambian en las mujeres embarazadas, excepto que la EPI y la perihepatitis son poco comunes después del primer trimestre, cuando los productos de la concepción obliteran la cavidad uterina²⁸.

1.5.4 Infección en el neonato

La conjuntivitis gonocócica del recién nacido (*oftalmia neonatorum*) es la manifestación clínicamente más común de la infección neonatal. La profilaxis mediante la instilación de antibióticos en la conjuntiva poco después del parto es muy eficaz, aunque ocasionalmente falla. La medida preventiva más importante es el cribaje sistemático y el tratamiento de la infección en

mujeres embarazadas antes del parto. El diagnóstico de *oftalmia neonatorum* debe sospecharse clínicamente cuando se desarrolla conjuntivitis aguda a los pocos días del parto y se confirma mediante la detección de *N. gonorrhoeae* en las secreciones conjuntivales. La enfermedad sistémica con septicemia y artritis también puede desarrollarse en recién nacidos, pero esto es muy poco frecuente.²⁸

1.6 DIAGNÓSTICO

1.6.1 Recogida, transporte y almacenamiento de la muestra

Para el diagnóstico microbiológico de la infección gonocócica, es esencial una correcta toma de la muestra, así como el transporte y posterior procesamiento de la misma, particularmente en el caso del cultivo, dado que *N. gonorrhoeae* es muy sensible a las condiciones ambientales. La realización correcta de estos procesos y la mínima demora entre la recogida y el procesamiento de la muestra, conserva la viabilidad del microorganismo y, por tanto, mejora el rendimiento diagnóstico⁴⁴.

La toma de muestra se hará en función de la clínica y prácticas sexuales del paciente. En todos los casos, debe recogerse una muestra del tracto genital. La recogida de muestras rectales y orofaríngeas deben ser rutinarias en HSH, consideradas en mujeres que son contactos sexuales de pacientes con infección gonocócica, y guiadas en función de la historia sexual, el riesgo y los síntomas o signos en todos los demás pacientes⁴⁵. Se deberá tener presente la recogida de muestras de hemocultivo y líquido articular ante la sospecha de infección diseminada⁴⁶.

Según las últimas recomendaciones del Center for Diseases Control and Prevention (CDC)⁴⁷ y de las guías europeas,⁴⁵ en las mujeres la muestra genital más recomendable para el diagnóstico de infección gonocócica mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAANs) es el escobillón vulvo-vaginal, ya que presenta la misma sensibilidad y especificidad que el endocervical y permite auto-toma de muestra. En las mujeres que, por su sintomatología, se requiere examen pélvico, el exudado endocervical recogido por el clínico es la muestra más indicada. Mientras que, en las mujeres, la sensibilidad de la detección de ácidos nucleicos en el primer chorro de orina es

un 10% inferior que en el escobillón vaginal o endocervical, en los hombres este es el tipo de muestra recomendada ya que su sensibilidad es equivalente al escobillón uretral.⁴⁵

La toma de la muestra debe realizarse antes de comenzar el tratamiento antibiótico. En el caso de recoger varias muestras de una misma localización anatómica, los escobillones destinados al cultivo se han de recoger primero con tal de obtener la mayor carga bacteriana. El procesamiento inmediato de las muestras tras la toma de la misma sería la situación óptima, sin embargo, en muchas ocasiones esto no es posible. En estos casos se recomiendan utilizar medios de transporte, preferiblemente líquidos, tipo Stuart o Amies con carbón activado que prolongan la viabilidad del microorganismo hasta un máximo de 48 horas. Por otro lado, durante mucho tiempo se ha pensado que la supervivencia del gonococo era superior a temperatura ambiente en comparación a la refrigeración y muchos libros de texto ofrecen recomendaciones contradictorias. En algunos estudios se demuestra que la conservación y supervivencia del gonococo es muy superior si los escobillones con medio de transporte se mantienen refrigerados (4°C)⁴⁴.

1.6.2 Microscopia

La microscopia es una técnica rápida, sencilla y económica. En hombres sintomáticos, observar ≥ 5 PMNs por campo y diplococos Gram negativos intracelulares permite diagnosticar la uretritis gonocócica con una sensibilidad y especificidad del 95% (figura 9). Sin embargo, en las muestras endocervicales la sensibilidad de la tinción de Gram es del 45-65%, por lo que no es una herramienta útil para descartar la infección⁴⁸.

Esta técnica está desaconsejada en muestras extragenitales debido a la presencia de flora saprófita, principalmente en muestras faríngeas.

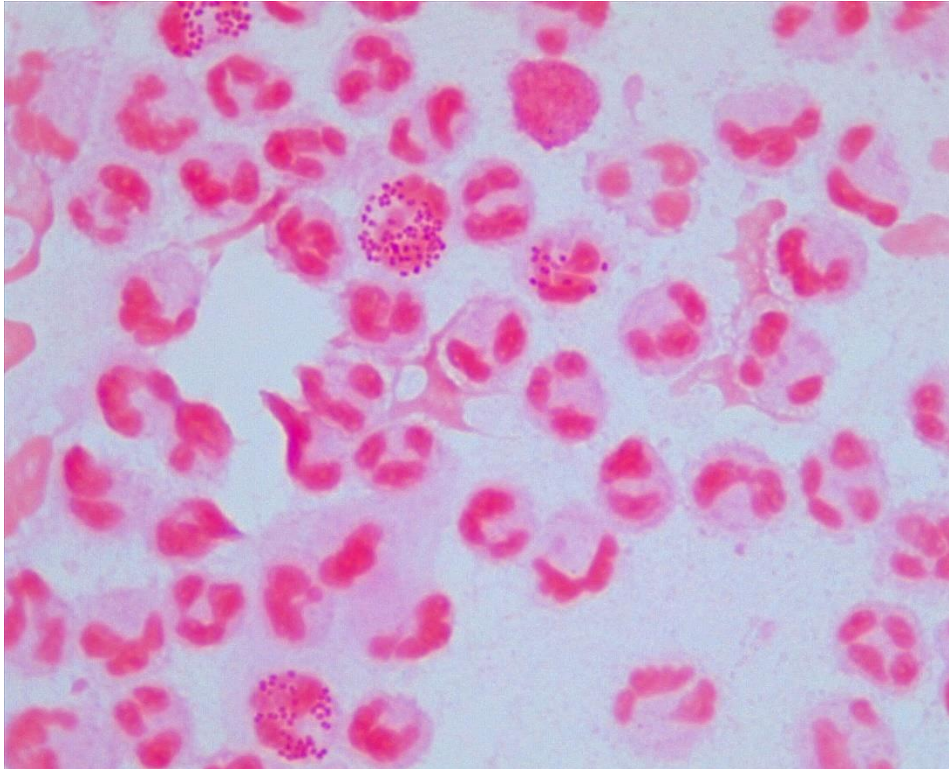


Figura 9: Tinción de Gram donde se puede observar diplococos Gram negativos intraleucocitarios (imagen propia).

1.6.3 Cultivo

Permite realizar estudios de sensibilidad antimicrobiana, esenciales para detectar y monitorizar las resistencias antimicrobianas. Además, proporciona la posibilidad de hacer estudios de tipificación bacteriana y es la técnica recomendada ante infecciones persistentes o sospecha de fracaso terapéutico.

Debido a la alta sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a las condiciones ambientales, los medios de cultivo deben inocularse lo antes posible e incubarse inmediatamente a 35-37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Dado que *N. gonorrhoeae* tiene altos requerimientos nutritivos, para su cultivo se utilizan medios enriquecidos, y en el caso de muestras no estériles, se utilizan medios selectivos como Thayer-Martin, Martin-Lewis o New York City, que contienen agentes antimicrobianos (vancomicina, colistina y nistatina u otros antifúngicos) que inhiben el crecimiento de otras bacterias y hongos. Si el cultivo es positivo se observarán colonias de color grisáceo (figura 10) a las que se les realizarán las pruebas de identificación.



Figura 10: Colonias de *N. gonorrhoeae* en agar Thayer-Martin (Imagen propia).

1.6.4 Identificación

Existen varios métodos disponibles para confirmar la identificación de *N. gonorrhoeae*, incluidos pruebas bioquímicas, pruebas serológicas, pruebas colorimétricas y métodos de detección de ácidos nucleicos. Más de un sistema puede ser requerido para confirmar la identificación.

1.6.4.1 Pruebas bioquímicas

En la tabla 1, se recogen las características bioquímicas utilizadas como métodos tradicionales de diagnóstico para diferenciar *N. gonorrhoeae* de otras especies de *Neisseria*, *Moraxella sp.* y *Kingella sp.* Actualmente, estas pruebas han quedado relegadas a un segundo plano por la introducción de técnicas basadas en espectrometría de masas.

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

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

* Certain strains grow on selective media for the isolation of *N. gonorrhoeae*.

[†] Includes biovars subflava, flava, and perflava. *N. subflava* biovar perflava strains produce acid from sucrose and fructose and produce polysaccharide from sucrose; *N. subflava* biovar flava strains produce acid from fructose; *N. subflava* biovar flava and *N. subflava* biovar subflava do not produce polysaccharide.

[‡] Rod or coccobacillus.

Tabla 1: Características bioquímicas de varias especies de *Neisseria* y otros microorganismos Gram negativos, oxidasa positiva⁴⁹

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

Una herramienta muy utilizada en la actualidad y que presenta una buena sensibilidad y especificidad, es la espectrometría de masas (MALDI-TOF). Hoy en día, MALDI-TOF es considerada una herramienta fiable para la detección y tipificación de bacterias y se ha integrado con éxito en los laboratorios de microbiología clínica.⁴⁴

1.6.5 Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAANs)

Actualmente es la técnica recomendada para la detección de las infecciones urogenitales en mujeres y varones con y sin síntomas, ya que se ha demostrado que son coste-eficaces⁵².

Estas técnicas poseen una serie de ventajas respecto al cultivo: el transporte y conservación de las muestras es más sencillo, ya que no necesitan que el microorganismo esté viable para el diagnóstico; son técnicas que se pueden automatizar, por lo que el tiempo de respuesta es muy inferior; permiten la detección simultánea de varias dianas en una sola reacción; gracias a la alta sensibilidad, se pueden utilizar en muestras no invasivas como la orina o el exudado vaginal.

Las TAANs son consideradas el “*gold-standard*” para la detección de *N. gonorrhoeae* y existen varias plataformas moleculares para este fin⁵³. La mayoría de estos ensayos pueden detectar también otros agentes causales de ITS como *C. trachomatis*, *M. genitalium* y *T. vaginalis*.

1.7 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR

1.7.1 *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST)

Esta técnica consiste en la secuenciación de un fragmento interno hipervariable de dos genes, *porB* (490 pb) y *tbpB* (390 pb), los cuales codifican la porina y la subunidad β de la proteína fijadora de transferrina, respectivamente⁵⁴.

La asignación del secuenciotipo (ST) se basa en la combinación de números de alelos de cada gen. Esto se realiza a través de la base de datos pública <http://www.ng-mast.net>.

Debido a la hipervariabilidad de los genes en los que se basa la tipificación mediante NG-MAST, podemos detectar muchos STs diferentes dentro de una misma población, aunque estén genéticamente relacionados.

El tipado mediante NG-MAST es una herramienta útil para identificar la variabilidad en las poblaciones gonocócicas, redes de transmisión o brotes, investigar fallos de tratamiento y predecir fenotipos específicos de resistencia antimicrobiana⁵⁵.

1.7.2 *Multilocus sequence typing* (MLST)

EL MLST se basa en el análisis de las secuencias de ADN de fragmentos de siete genes (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* y *pgm*), que están relativamente conservados, evolucionan lentamente, son evolutivamente más neutrales y están distribuidos por todo el genoma⁵⁵. A cada gen se le asigna un número de alelo y de la combinación de alelos en los 7 loci, se define un ST. El análisis MLST está respaldado por una base de datos en la que se pueden caracterizar y depositar los aislados (<http://www.mlst.net>).

El análisis MLST de aislados de *N. gonorrhoeae* presenta un alto nivel de reproducibilidad, tipificación y objetividad. Sin embargo, su capacidad discriminadora es subóptima para análisis epidemiológicos o detección de redes de transmisión⁵⁵.

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

El tipado mediante NG-STAR ofrece un método estandarizado para clasificar siete genes bien caracterizados asociados con la resistencia de *N. gonorrhoeae* a cefalosporinas, macrólidos y fluoroquinolonas (*penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC* y 23S rRNA).

A las secuencias de ADN únicas de cada gen de resistencia se les asigna un número de alelo y la combinación de alelos de los siete genes produce un tipo NG-STAR.

Se trata de una herramienta disponible on-line y de acceso público (<https://ngstar.canada.ca/>) que puede integrar y estandarizar la nomenclatura asociada con los determinantes de la resistencia y permite el seguimiento de la diseminación mundial de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a los antimicrobianos⁵⁶.

1.7.4 Secuenciación de genoma completo (WGS)

La secuenciación de genoma completo, WGS por sus siglas en inglés (*Whole Genome Sequencing*), es la técnica que proporciona una mayor resolución de las cepas para estudios comparativos y permite determinar con alta precisión la epidemiología de los microorganismos. Está enmarcada dentro de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS), también conocidas como secuenciación masiva.

La WGS es más discriminadora que las técnicas de genotipado anteriormente descritas y revela redes de individuos infectados con aislados genéticamente relacionados, alcanzando análisis filogenéticos más exactos. Esto se debe a que las comparaciones se realizan utilizando el genoma *core*, es decir, para realizar el análisis se usan los genes que están presentes en todos los aislamientos de una especie. Esto permite que las representaciones sean más precisas, ya que se

evitan las dificultades al interpretar la evolución de regiones genómicas complejas y diversas⁵⁷.

Combinado con datos epidemiológicos, la WGS tiene el potencial de arrojar luz sobre la epidemiología local y global de la infección gonocócica⁵⁸.

Por otro lado, la WGS permite predecir la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* en función de determinantes de resistencia conocidos, rastrear la propagación de estos determinantes en toda la población de *N. gonorrhoeae* e identificar nuevos loci que contribuyen a la resistencia⁵⁹.

1.8 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y TRATAMIENTO

1.8.1 Estudio de la sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana puede determinarse por métodos fenotípicos, basados en la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo, o por métodos genotípicos, que consisten en la detección de genes y mutaciones relacionados con la resistencia antimicrobiana.

Actualmente, los métodos fenotípicos basados en el cultivo son los más utilizados en la práctica clínica para determinar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*.

El método de la dilución cuantitativa en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) es el Gold standard, sin embargo, es una técnica laboriosa y poco idónea para el estudio rutinario de la sensibilidad antimicrobiana. De esta manera, el método que se utiliza con más frecuencia para determinar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* es la técnica de difusión en gradiente (Epsilon test o E-test) (figura 11), ya que es comparable al método de dilución en agar y más sencillo de interpretar.



Figura 11: Determinación de la sensibilidad de *N. gonorrhoeae* por la técnica de difusión en gradiente (imagen propia).

1.8.2 Historia de los regímenes de tratamiento y evolución de la resistencia

Durante la era preantibiótica, el tratamiento de la infección gonocócica consistía principalmente en llevar un estilo de vida más saludable, alimentación adecuada y descanso y abstinencia de alcohol y actividad sexual. Además de estos hábitos, se utilizaban como tratamiento sistémico diferentes tipos de bálsamos, hipertermia, irrigaciones uretrales y compuestos químicos como el arsénico, el antimonio, el bismuto, el oro, la palta y el mercurio.⁴

A principios del siglo XX, empezó a introducirse el uso de los antibióticos para el tratamiento de la gonorrea. Sin embargo, *N. gonorrhoeae* ha ido adquiriendo resistencia a todos los antimicrobianos utilizados para su tratamiento. La historia de los antimicrobianos utilizados y la evolución de la resistencia, se resumen en la figura 12⁴.

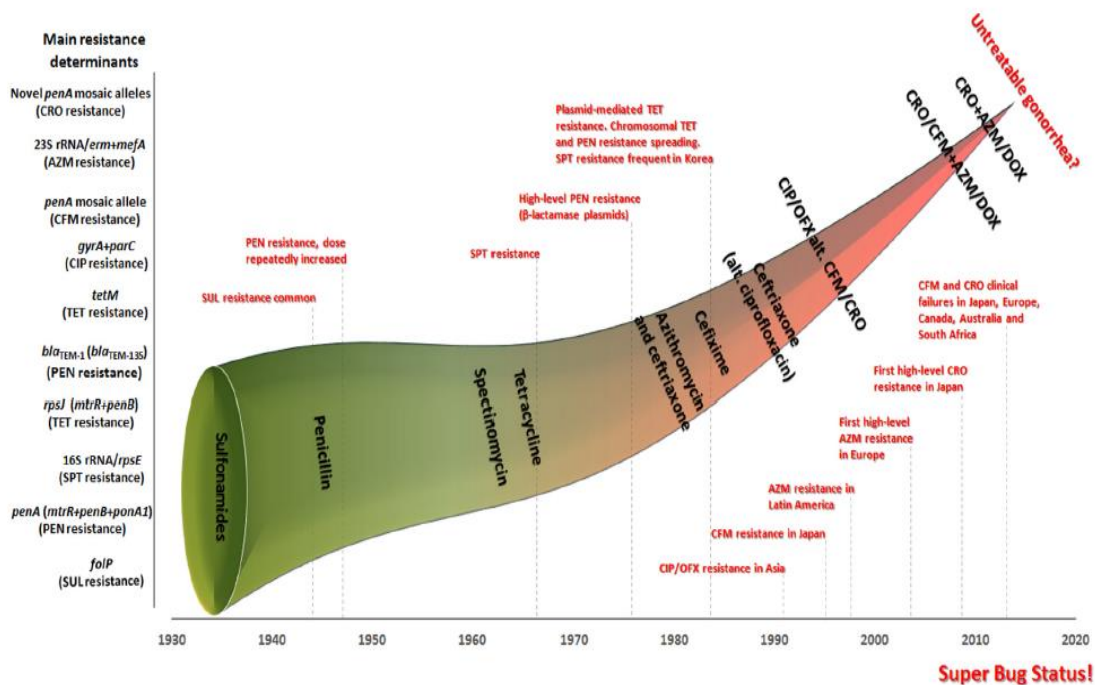


Figura 12: Historia de los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de la infección gonocócica y la evolución de la resistencia antimicrobiana en *Neisseria gonorrhoeae*.⁴

Sulfonamidas:

Las sulfonamidas fueron los primeros antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la infección gonocócica. Inicialmente curaban del 80 al 90% de los casos, sin embargo, a finales de la década de 1940, el 90% de los gonococos aislados eran resistentes a las sulfonamidas in vitro. Sin embargo, el sulfametoxazol se continuó utilizando en combinación con trimetropim durante décadas en países con pocos recursos.

Penicilinas:

En 1928, Alexander Fleming descubrió accidentalmente que un compuesto producido por un hongo podía lisar estafilococos y otras bacterias que causan muchas enfermedades infecciosas. No obstante, no fue hasta 1943 cuando se documentó la penicilina como tratamiento eficaz de la uretritis gonocócica, marcando una nueva era en el tratamiento de la infección gonocócica y otras enfermedades infecciosas. De hecho, la penicilina suplantó rápidamente a las sulfonamidas como tratamiento de primera línea para la gonorrea y curaba más del 95% de los casos a dosis bajas (45mg). Sin embargo, a lo largo de los años, las CMIs de la penicilina aumentaron debido a la acumulación de determinantes de resistencia cromosómica, y las dosis prescritas se aumentaron progresivamente para obtener tasas de curación adecuadas. En 1946 se reportaron cuatro casos de gonorrea resistentes a dosis “altas” de penicilina (0.6 a 1.6 millones de unidades) y durante las dos décadas siguientes, fue aumentando la proporción de cepas resistentes a penicilina. En 1976 se detectaron cepas productoras de dos tipos de betalactamas plasmídicas que conferían resistencia de alto nivel a penicilina, a pesar de ello, se siguió utilizando la penicilina como tratamiento de primera línea. No fue hasta una década después, cuando se abandonó esta terapia debido a la aparición de resistencias mediadas por mecanismos cromosómicos. Actualmente, las cepas resistentes a penicilina por mecanismos plasmídicos y/o cromosómicos son comunes en todo el mundo.

Tetraciclinas:

Las tetraciclinas se usaron especialmente en pacientes con alergia a la penicilina. Sin embargo, las CMIs aumentaron con el tiempo, debido a determinantes de resistencia cromosómica. La detección, a mediados de los años 80, de cepas con el determinante plasmídico *tetM*, que produce resistencia de alto nivel, fue el desencadenante de la eliminación de la tetraciclina de las guías de tratamiento de Estados Unidos y otros países.

Espectinomicina:

La espectinomicina actúa sobre la subunidad 30S ribosomal y está estrechamente relacionado con los aminoglucósidos. Este fármaco se sintetizó y comercializó a principios de la década de 1960 como tratamiento específico para la infección gonocócica. Con la aparición de la resistencia plasmídica a la penicilina, la espectinomicina empezó a utilizarse para el tratamiento de estos casos. Sin embargo, a principios de los años 80 se empezaron a detectar casos de resistencia a este compuesto en todo el mundo, de forma que dejó de utilizarse como tratamiento empírico de primera línea. Actualmente la tasa de resistencias a la espectinomicina es muy baja pero no está disponible en la mayoría de países. Además, este antimicrobiano no es adecuado para el tratamiento de la gonorrea faríngea, ya que su eficacia es de alrededor del 80%.

Quinolonas:

Las fluoroquinolonas, sobre todo ciprofloxacino, fueron ampliamente utilizadas para el tratamiento de la gonorrea desde finales de los años 80. Inicialmente se utilizaban dosis bajas (250 mg), pero en 1990 ya se empezaron a documentar casos de fracaso terapéutico. Por esa razón se aumentó la dosis a 500 mg, pero rápidamente se detectaron cepas resistentes. En algunos países asiáticos, las fluoroquinolonas dejaron de recomendarse como tratamiento de primera línea a mediados de los años 90. Las cepas resistentes a ciprofloxacino se diseminaron rápidamente a nivel mundial y, en 2007, las fluoroquinolonas dejaron de ser el tratamiento recomendado por las guías del CDC, así

como también por las guías europeas. Actualmente la tasa de resistencia a fluoroquinolonas es alta a nivel mundial.

Macrólidos:

Datos clínicos e in vitro demostraron que la eritromicina no era lo suficientemente eficaz para el tratamiento de la infección gonocócica. En cambio, la azitromicina tiene una actividad superior contra el gonococo. Sin embargo, a finales de los años 90, se notificaron cepas con sensibilidad disminuida y resistencia a azitromicina en América latina, donde la azitromicina era frecuentemente utilizada para el tratamiento de las ITS bacterianas. Posteriormente, se notificaron casos con resistencia de alto nivel (CMI \geq 256 mg/L) en Escocia⁶⁰, Inglaterra⁶¹, Argentina⁶², Italia⁶³, Estados Unidos⁶⁴, Suecia⁶⁵, Canadá⁶⁶, Australia⁶⁷ y España⁶⁸.

Por lo tanto, este antibiótico dejó de utilizarse en monoterapia, pero sí se siguió recomendando como uno de los dos antimicrobianos en la terapia dual de la infección gonocócica, junto con ceftriaxona.¹⁵ Actualmente, algunas guías internacionales han eliminado la azitromicina como primera opción terapéutica empírica debido al aumento de la tasa de resistencia en los últimos años.⁶⁹

Cefalosporinas:

Las cefalosporinas de tercera generación recomendadas para el tratamiento de la gonorrea son la ceftriaxona intramuscular y la cefixima oral. En algunos países donde la cefixima no está disponible, se han utilizado otras cefalosporinas orales, como cefditoreno, cefuroxima, cefpodoxima y ceftibuteno.

Durante las últimas dos décadas, la sensibilidad a las cefalosporinas de espectro extendido ha ido disminuyendo y se han documentado casos de fracaso terapéutico en todo el mundo. Las primeras cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación surgieron en Japón a finales de los años 90 y posteriormente se propagaron por varios países.

Un hecho relevante que alarmó a la comunidad científica fue la detección de las primeras cepas con resistencia de alto nivel a cefalosporinas. La primera fue detectada en Kyoto (Japón) en el año 2009. Esta cepa, conocida como H041, fue aislada de la faringe de una trabajadora del sexo y mostraba una CMI a cefixima y ceftriaxona de 8 y 2 mg/L, respectivamente^{10,70}. La segunda cepa, conocida como F89, se aisló en 2010 de un exudado uretral en un paciente HSH en Francia y presentaba una CMI a cefixima de 4 mg/L y a ceftriaxona de 2 mg/L.⁶ En 2011, se detectaron los primeros casos en España, concretamente en Cataluña, en una pareja HSH. Estas cepas presentaban una CMI de 1.5 mg/L tanto a ceftriaxona como cefixima y se aislaron en el exudado uretral de un paciente y en el rectal del otro⁵.

Con el propósito de frenar la propagación de cepas resistentes, las guías clínicas internacionales comenzaron a recomendar la terapia dual con ceftriaxona 250-500mg vía intramuscular junto con una dosis única de azitromicina 1-2 g por vía oral.^{1,14,15} Esto se debe a que el gonococo, al igual que otras bacterias, tiene dificultad para desarrollar resistencias a dos clases diferentes de antimicrobianos, y así se crea una barrera farmacológica que dificulta la aparición de resistencias a uno de los componentes del tratamiento dual.

Sin embargo, se han descrito casos de fracaso terapéutico con esta terapia dual,¹⁷ siendo especialmente alarmante la detección en 2018 de cepas de gonococo que mostraban resistencia combinada a ceftriaxona (CMI = 0.5 mg/L) y alto nivel de resistencia a azitromicina (CMI \geq 256 mg/L) en Inglaterra y Australia.^{11, 22}

La detección de estas cepas resalta la amenaza que representa la propagación de aislados MDR y XDR-NG en un contexto de alternativas terapéuticas limitadas y falta de vacuna. También pone de manifiesto la necesidad de implementar programas de vigilancia para detectar la aparición y propagación de resistencias,⁷¹ y así evitar que *N. gonorrhoeae* se convierta en una bacteria intratable.

1.8.3 Mecanismos de resistencia

Desde el comienzo de la era de los antimicrobianos, *N. gonorrhoeae* ha demostrado repetidamente su capacidad para desarrollar resistencia a todos los antimicrobianos introducidos para su tratamiento.⁷² El gonococo utiliza la mayoría de los mecanismos de resistencia antimicrobiana conocidos:

- a) Destrucción o modificación enzimática del antimicrobiano
- b) modificación de la diana terapéutica
- c) aumento de la expulsión del antibiótico al exterior de la bacteria
- d) disminución de la entrada del antibiótico al interior de la célula

La mayoría de los determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana en *N. gonorrhoeae* son cromosómicos, y sólo el gen *blaTEM* y el gen *tetM*, que dan lugar a un alto nivel de resistencia a la penicilina y la tetraciclina, respectivamente, se transmiten por plásmidos en los gonococos.

Algunos determinantes de resistencia por sí solos pueden dar lugar a altos niveles de resistencia tanto in vitro como in vivo. Sin embargo, en otras ocasiones es necesario que se acumulen diferentes determinantes para que el fenotipo de resistencia tenga significado clínico.

Un ejemplo claro de la capacidad del gonococo para adquirir material genético exógeno, es la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal a partir de neisserias saprófitas de la orofaringe. Probablemente, la infección gonocócica en la faringe, donde el *N. gonorrhoeae* y especies comensales de *Neisseria* pueden coexistir durante períodos prolongados de tiempo, favorece esta transferencia de genes. Es probable que la transferencia horizontal de genes haya jugado un papel fundamental en la propagación de los alelos del mosaico *penA*, lo que resultó en una disminución de la sensibilidad o resistencia a las ESCs.⁷²

Además, la adquisición de genes no afecta al fitness biológico del microorganismo, posiblemente debido a mutaciones compensatorias, por lo que las cepas multirresistentes persisten incluso en ausencia de presión antibiótica.^{4,73} En la tabla 2 se resumen los mecanismos de resistencia de *N. gonorrhoeae* a las distintas clases de antibióticos.

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

Tabla 2: Determinantes y mecanismos de resistencia de *N. gonorrhoeae*.⁴

Resistencia a sulfonamidas:

Las sulfonamidas son análogos estructurales del ácido paraaminobenzoico (PABA), que utilizan las bacterias para la síntesis de ácido fólico, y tiene un efecto bacteriostático. Esta familia de antibióticos bloquea la enzima bacteriana dihidropteroato sintasa (DHPS), inhibiendo así la síntesis de ácido fólico en la bacteria. La resistencia a sulfonamidas puede estar mediada por dos mecanismos, la síntesis excesiva de ácido p-aminobenzoico (PABA) que diluye el agente antimicrobiano, o por mutaciones en el gen *folP*, que codifica el DHPS. Las alteraciones de DHPS dan como resultado una afinidad significativamente menor por las sulfonamidas.

Resistencia a penicilinas:

Los antibióticos betalactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas, inhiben la síntesis del peptidoglucano mediante la unión del anillo betalactámico a las PBPs (penicillin-binding proteins), impidiendo así la reacción de transpeptidación. Esta familia de antibióticos tiene efecto bactericida. La resistencia a penicilina puede ser plasmídica o cromosómica.

- Resistencia plasmídica: Las cepas gonocócicas con alto nivel de resistencia a la penicilina mediada por plásmidos contienen tradicionalmente plásmidos con un gen *blaTEM-1*, que codifica una β -lactamasa de tipo TEM-1. Esta enzima hidroliza el anillo betalactámico inactivando a la penicilina. Todavía no se ha adquirido o desarrollado ninguna β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en los gonococos. Sin embargo, en muchas cepas que circulan actualmente, se ha encontrado el gen *blaTEM-135*, que difiere en un solo polimorfismo de nucleótido (SNP) de *blaTEM-1*, y solo un SNP adicional podría resultar en una BLEE capaz de hidrolizar y degradar las ESCs.
- La resistencia cromosómica está mediada por tres mecanismos: mutaciones en la diana del fármaco (PBPs), aumento del flujo de salida del β -lactámico y disminución de la entrada del antimicrobiano.

En los gonococos resistentes a la penicilina, existen entre 5 y 9 mutaciones en el gen *penA* (que codifica la PBP2, la principal diana de los β -lactámicos), lo que disminuye las tasas de acilación de PBP2 y, en consecuencia, disminuye la sensibilidad a la penicilina de 6 a 8 veces. Estas mutaciones en el gen *penA* se deben a la adquisición, mediante transformación, de secuencias procedentes de neisserias comensales que poseen una PBP2 modificada. En las últimas décadas, se han descrito varios genes *penA* en mosaico que contienen entre 60 y 70 cambios de aminoácidos y que confieren resistencia tanto a las penicilinas como a las cefalosporinas.

Aunque la alteración de PBP2 es el principal mecanismo cromosómico de resistencia a la penicilina, las cepas que exhiben un alto nivel de resistencia a la penicilina también albergan una única mutación de cambio de sentido en el gen *ponA* (denominado alelo *ponA1*) que se traduce en una alteración Leu421Pro en PBP1.

Otros mecanismos de resistencia que pueden incrementar las CMIs son: mutaciones específicas en el gen *mtrR* que da lugar a un mayor flujo de salida por sobreexpresión del sistema de bomba de expulsión de MtrC-D-E y exporta la penicilina fuera de la célula, y mutaciones en el gen *penB* que dan como resultado una disminución del flujo de entrada de penicilina por alteración de la porina PorB1b.

Resistencia a cefalosporinas:

Al igual que en el caso de la resistencia cromosómica a la penicilina, los principales determinantes de resistencia a ESCs en *N. gonorrhoeae* son alteraciones específicas del gen *penA* que codifica PBP2. La adquisición de alelos en mosaico produce un mayor incremento de las CMIs de cefixima que de ceftriaxona. En cepas resistentes a cefixima con el alelo *penA* en mosaico, se han detectado tres alteraciones aminoacídicas específicas en PBP2 (G545S, I312M y V316T). Estas tres mutaciones aumentan la CMIs sólo en presencia de mutaciones adicionales en el mosaico *penA* que por sí solas no tienen ningún efecto. La introducción de la mutación A501V en cepas con el alelo en mosaico, aumenta las CMIs de ceftriaxona y cefixima entre 2 y 4 veces. Algunas alteraciones puntuales en la PBP2, como G542S, P551S y P551L, también se han asociado con CMIs elevadas a ceftriaxona.

Respecto a las cepas con alto nivel de resistencia a todas las ESCs, el nuevo alelo mosaico *penA*_{H041} en la primera cepa XDR reportada en Kioto (Japón),¹⁰ conocida como H041 y que muestra un alto nivel de resistencia a la ceftriaxona y la cefixima, contenía 12 cambios de aminoácidos en comparación al mosaico *penA* alelo X, que se asoció con la mayoría de las primeras resistencias a la cefixima y los fracasos del tratamiento en Japón. De estas 12 mutaciones, las tres mutaciones A311V, V316P y T483S dieron como resultado aumentos significativos en las CMI de ceftriaxona y cefixima, produciendo una disminución en la tasa de acilación. Por otro lado, las cepas detectadas en Francia⁶ y Cataluña⁵ presentaban el alelo XXXIV en mosaico, el cual contenía un cambio adicional (A501P) que provocaba cambios en la estructura secundaria de la proteína, impidiendo la unión de las cefalosporinas a la PBP2.

Aunque el principal mecanismo de resistencia son las alteraciones en la diana terapéutica, el aumento de flujo de salida y la disminución de la entrada de las ESCs, por alteración en los determinantes *mtrR* y *penB*, respectivamente, aumentan las CMI tanto de ceftriaxona como de cefixima, aunque se ha visto que el efecto es superior en el caso de la ceftriaxona.

Por otra parte, las mutaciones en *ponA* (L421P) y *pilQ* (E666K) que son determinantes de resistencia a la penicilina, no parecen afectar a las CMI de las cefalosporinas.

Resistencia a tetraciclina:

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas bloqueando la unión de aminoacil-tRNA al complejo mRNA-ribosoma, principalmente al unirse a la subunidad ribosómica 30S. Presentan por tanto un efecto bacteriostático. Al igual que las penicilinas, el mecanismo de resistencia puede ser cromosómico o mediado por plásmidos.

- Resistencia plasmídica: La resistencia de alto nivel mediada por plásmidos (MIC \geq 16 μ g/ml) se debe al gen *tetM*, inicialmente descrito en el género *Streptococcus*. La proteína TetM, la cual posee gran similitud con el factor de elongación (EF-G), confiere un alto nivel de resistencia a la

tetraciclina al unirse a los ribosomas y provocar la liberación de la molécula de tetraciclina, lo que permite que continúe la síntesis de proteínas.

- **Resistencia cromosómica:** se debe a la mutación V57M en el gen *rpsJ*, que provoca una alteración en la estructura de la proteína ribosomal S10 y, por tanto, disminuye su afinidad por las tetraciclinas. Además, otros factores que aumentan la resistencia a este antibiótico, al igual que ocurre con la penicilina, un mayor flujo de salida y una menor entrada de tetraciclina, debido a mutaciones en los genes *mtrR* y *penB*, respectivamente.

Resistencia a espectinomicina:

La espectinomicina se une a la subunidad ribosómica 30S de la bacteria e inhibe la translocación de proteína. Tiene efecto bacteriostático.

La resistencia de alto nivel a la espectinomicina (CMI >1024 mg/L) se debe a la mutación C1192U en el 16S ARNr y por una delección de Val25 y una alteración de K26E en la proteína ribosomal S5, codificada por el gen *rpsE*. Por otro lado, la alteración T24P en el gen *rpsE* da lugar a resistencia de bajo nivel a la espectinomicina, ya que las mutaciones en este gen desestabilizan la unión del antibiótico al 16S ARNr⁴.

Resistencia a quinolonas:

La ADN girasa y la topoisomerasa IV bacterianas son topoisomerasas de tipo II altamente conservadas que son esenciales para el metabolismo del ADN. Actúan rompiendo y volviendo a unir el ADN de doble cadena en una reacción que se acopla con la hidrólisis de ATP. Las quinolonas actúan inhibiendo la ADN girasa y la topoisomerasa IV, por lo que tienen actividad bactericida. Las bacterias desarrollan resistencia a las quinolonas a través de mutaciones que alteran el reconocimiento de estas enzimas diana por parte de las quinolonas. La ADN girasa consta de un

heterotetrámero de dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB; en los gonococos, las mutaciones iniciales en el gen diana principal, *gyrA*, se asocian con resistencia. Las mutaciones de *gyrA* reducen la afinidad de unión de las quinolonas, lo que hace que la enzima (y las bacterias) sean resistentes a su efecto inhibidor. La topoisomerasa IV es un tetrámero de dos subunidades ParC y dos ParE, codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente. Las quinolonas también pueden inhibir la actividad enzimática de la topoisomerasa IV, aunque se requieren concentraciones más altas que las necesarias para inhibir la ADN girasa in vitro. Sólo la mutación sin sentido en el codón 91 del gen *gyrA* (S91F) proporcionan resistencia de nivel bajo a intermedio, pero la resistencia de alto nivel requiere una o varias mutaciones concomitantes específicas en *parC*.^{4,74} Las mutaciones en *gyrB* y *parE* no parecen tener un impacto significativo en la resistencia a ciprofloxacino.⁴

Resistencia a macrólidos:

Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica al unirse a la subunidad ribosomal 50S y haciendo que los ribosomas liberen polipéptidos incompletos. Esta familia de antibióticos interactúa con el 23S ARNr, por lo que se evita la translocación del peptidil-ARNt, bloqueando el canal de salida del péptido en la subunidad 50S.

La resistencia a los macrólidos puede deberse a la modificación de la diana ribosomal, bien asociada con la ARNr metilasa o por mutaciones específicas en el 23S ARNr y/o por un sistema de bomba de expulsión.^{4,75}

Las ARNr metilasas, codificadas por los genes *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC* y *ermF*) pueden causar resistencia a los macrólidos mediante el bloqueo de la unión de los macrólidos al 23S ARNr por la metilación de un residuo de adenosina en la posición 2058 (sistema de numeración de *E. coli*), que se encuentra en el dominio V de la peptidil transferasa. Estos genes pueden ser transportados por transposones conjugativos. En los gonococos, los genes *erm* pueden conferir un alto nivel de

resistencia a la eritromicina (CMI de 4 a 16 mg/L) y una sensibilidad disminuida o un bajo nivel de resistencia a la azitromicina (CMI de 1 a 4 mg/L) en ausencia de otros determinantes de resistencia.

Las mutaciones específicas C2611T y A2059G en el 23S ARNr, también pueden provocar resistencia de bajo y de alto nivel, respectivamente. Las CMIs de los macrólidos frente a estas cepas resistentes dependen de cuántos de los cuatro alelos del gen 23S ARNr contienen la mutación. Por ejemplo, las mutaciones A2059G en tres o los cuatro alelos del gen 23S ARNr dan como resultado una resistencia de alto nivel a la azitromicina⁷⁶ (CMI de 256 mg/L y hasta 4096 mg/L), mientras que las cepas con solo un alelo mutante A2059G pueden tener un CMI de azitromicina similar a la de las cepas de tipo salvaje.

La sobreexpresión de las bombas de expulsión, en particular la bomba MtrC-D-E, pero también las bombas de flujo codificadas por MacAB y *mef*, pueden afectar las CMIs de los macrólidos.

Otros mecanismos de resistencia:

Una vez comentados los determinantes de resistencia específicos para cada familia de antibióticos, se detallan otros mecanismos que pueden afectar a las CMIs de varias familias de antibióticos, independientemente de su mecanismo de acción. Estos mecanismos son los sistemas de expulsión y las porinas.

Por lo que respecta a los primeros, se han descrito varias bombas de expulsión en bacterias, las cuales se agrupan en función de su composición y estructura:

- a. familia MF (mayor facilitador)
- b. familia SMR (small multidrug resistance)
- c. familia RND (resistance nodulation-cell division)
- d. familia MATE (multidrug and toxic compound extrusion)
- e. familia ABC (ATP-binding cassette)

En el gonococo, se han identificado 4 sistemas de expulsión (MtrC-D-E, MacAB, NorM y FarAB) que pertenecen a las familias RND, ABC, MATE y MF, respectivamente. La bomba MtrC-D-E puede

expulsar a diferentes antimicrobianos hidrofóbicos, como macrólidos, beta-lactámicos, ciprofloxacino y tetraciclina. La bomba NorM exporta fluoroquinolonas y la MacAB los macrólidos. La bomba MtrC-D-E es una de las más estudiadas. Las cepas de gonococo con resistencia media a diferentes compuestos hidrofóbicos suelen presentar mutaciones en el dominio de unión al DNA del gen *mtrR*. Pero en las cepas con resistencia de alto nivel, se ha visto que lo más frecuente es una delección de una adenina en una zona repetitiva invertida de 13 pares de bases en la región del promotor del *mtrR*.

En cuanto a la penetración de los antimicrobianos en el interior de la célula, las cepas de gonococo producen una de dos formas mutuamente excluyentes de porina, PorB1a y PorB1b (anteriormente denominada proteína principal de membrana externa, proteína I o por). Las cepas que expresan PorB1a son ligeramente más sensibles a la penicilina y tetraciclina. Por otro lado, las alteraciones de aminoácidos en el loop 3 de la PorB1b disminuyen la sensibilidad del gonococo a penicilina, tetraciclina y ESCs. Curiosamente, la penicilina y la ceftriaxona se afectan más que la cefixima, lo que sugiere que la cefixima no difunde en el espacio periplásmico a través de PorB1b o que la difusión no se ve alterada por mutaciones en *penB*.

Las cepas bacterianas con resistencia a un antimicrobiano tienen una ventaja tanto in vitro como in vivo sobre las cepas sensibles en presencia del antimicrobiano dado. Por el contrario, el rendimiento biológico (fitness) de estas cepas es inferior al de las cepas sensibles en ausencia del antimicrobiano. Sin embargo, hay mutaciones compensatorias/estabilizadoras/reparadoras que restablecen el fitness mientras mantienen la resistencia antimicrobiana. Curiosamente, en el gonococo, los mecanismos de resistencia no necesariamente causan una disminución del rendimiento biológico de la bacteria, lo que resulta en la persistencia de cepas MDR o XDR incluso en ausencia de una presión antimicrobiana. De hecho, algunos determinantes de resistencia (mutaciones *mtrR* y *gyrA*) parecen incluso mejorar la aptitud biológica de al menos algunas cepas gonocócicas. En consecuencia, muchos años después de que se abandonaran la penicilina, la tetraciclina y las fluoroquinolonas del tratamiento recomendado para la gonorrea, las cepas

resistentes continúan representando un porcentaje significativo de aislamientos en todo el mundo.⁴

1.8.4 Regímenes de tratamiento

El objetivo del tratamiento de la infección gonocócica es erradicar dicha infección, prevenir complicaciones y evitar la transmisión a otras personas. Las recomendaciones de las principales guías internacionales están recogidas en las tablas 3-5.

Se recomienda una evaluación después del tratamiento para confirmar la erradicación de la infección, el cumplimiento del tratamiento, preguntar sobre los efectos adversos, la resolución de los signos y síntomas, realizar una historia sexual para explorar la posibilidad de una reinfección y recomendar la notificación a la pareja.

Un test de cura (TOC; por sus siglas en inglés, *test of cure*) debe realizarse en todos los casos para identificar una infección persistente (posible fracaso del tratamiento) y/o una RAM emergente. En los casos en los que persisten los síntomas y/o signos después del tratamiento, se recomienda realizar cultivo para identificar la infección persistente y realizar pruebas de resistencia a los antimicrobianos, entre 3 y 7 días después de finalizar el tratamiento, posiblemente complementado una semana después con una TAAN si el cultivo es negativo. En pacientes asintomáticos, el TOC se puede realizar mediante TAAN 2 semanas después de completar el tratamiento. Idealmente, todos los pacientes con TOC positivo deben ser cultivados y realizarse pruebas de RAM antes de administrar otro tratamiento.

Del mismo modo, se recomienda estudiar todos los contactos sexuales dentro de los 3 meses anteriores a la aparición de los síntomas o al diagnóstico y tratarse si son positivos.

GUIAS CLÍNICAS	Tratamiento recomendado para infecciones no complicadas de la uretra, el cuello uterino y el recto en adultos y adolescentes cuando se desconoce la sensibilidad antimicrobiana	
	De elección	Alternativo
IUSTI 2020 ⁴⁵	Ceftriaxona 1g IM DU + azitromicina 2g VO DU o Ceftriaxona 1g IM DU*	<ul style="list-style-type: none"> • Espectinomocina 2g IM DU + azitromicina 2g VO DU^a • Ciprofloxacino 500 mg VO DU^b • Gentamicina 240mg IM DU + azitromicina 2g VO DU • Cefixima 400mg VO DU + azitromicina 2g VO DU^c
BASHH 2019 ⁷⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g IM DU (si se <u>desconoce</u> la sensibilidad) • Ciprofloxacino 500mg VO DU^b (si se <u>conoce</u> la sensibilidad) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cefixima 400mg VO DU + azitromicina 2g VO • Gentamicina 240mg IM DU + azitromicina 2g VO • Espectinomocina 2g IM DU + azitromicina 2g VO • Azitromicina 2g VO DU
CDC 2021 ⁷⁸	Ceftriaxona 500mg IM DU	<ul style="list-style-type: none"> • Gentamicina 240mg IM DU + Azitromicina 2g VO DU^a • Cefixima 800mg VO DU
GESIDA 2017 ⁷⁹	Ceftriaxona 500mg IM DU + Azitromicina 1g VO DU	<ul style="list-style-type: none"> • Cefixima 400mg VO DU + Azitromicina 2g VO DU^d • Gentamicina 240mg IM DU + Azitromicina 2g VO DU^a
OMS 2021 ⁸⁰	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250 mg IM DU + Azitromicina 1g VO DU • Cefixima 400 mg VO DU + Azitromicina 1g VO DU 	<p>En función de las resistencias locales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250 mg IM DU • Cefixima 400 mg VO DU • Espectinomocina 2g IM DU

Tabla 3: Tratamiento recomendado para infecciones no complicadas de la uretra, el cuello uterino y el recto en adultos. IUSTI: *International Union against Sexually Transmitted Infections*; BASHH: *British Association for Sexual Health and HIV*; CDC: *Centers of Disease Control and Prevention*; GESIDA: Grupo de Estudio del SIDA-SEIMC; OMS: Organización Mundial de la Salud; IM: intramuscular; DU: dosis única; VO: vía oral; a: Pacientes con hipersensibilidad a β -lactámicos; b: Sensibilidad a ciprofloxacino confirmada; c: cuando la administración intramuscular está contraindicada o rechazada; d: cuando no se dispone de cefalosporinas IM.

* Solo recomendado en entornos donde:

(i) Las pruebas locales de sensibilidad a ceftriaxona in vitro, exhaustivas, recientes y de calidad garantizada han demostrado que no hay resistencia a ceftriaxona;

(ii) el TOC es obligatorio;

(iii) se considera que es muy probable que el paciente regrese para TOC;

(iv) se administra al mismo tiempo una dosis oral de 100 mg de doxiciclina dos veces al día durante 7 días para cubrir cualquier infección concomitante por *C. trachomatis*, si la infección por *C. trachomatis* no ha sido excluida por TAANs.

En otros entornos, la monoterapia con ceftriaxona 1 g IM es sólo una opción alternativa si no se dispone de azitromicina o si el paciente no puede tomar medicación oral.

GUIAS CLÍNICAS	Tratamiento de la infección gonocócica faríngea	
	De elección	Alternativo
IUSTI 2020 ⁴⁵	Ceftriaxona 1g IM DU + azitromicina 2g VO DU	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g IM DU^a • Ciprofloxacino 500 mg VO DU^b
BASHH 2019 ⁷⁴	Ceftriaxona 1g IM DU	Ciprofloxacino 500mg VO DU ^b
CDC 2021 ⁷⁵	Ceftriaxona 500mg IM DU	NA
GESIDA	NA	
OMS 2016 ¹	Terapia dual: <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250mg IM DU + azitromicina 1g VO DU • Cefixima 400mg VO DU + azitromicina 1g VO DU 	Monoterapia (En función de la resistencia local): <ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 250mg IM DU.

Tabla 4: Tratamiento de la infección gonocócica faríngea. a: Si la azitromicina no está disponible o si el paciente no puede tomar medicación oral. b: Sensibilidad a ciprofloxacino confirmada. IM: intramuscular; DU: dosis única; VO: vía oral; NA: No aplica

GUIAS CLÍNICAS	Tratamiento de la infección gonocócica resistente a ESCs
IUSTI 2020 ⁴⁵	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona* 1g IM DU + Azitromicina 2 g VO DU • Espectinomomicina 2g IM DU + azitromicina 2g VO DU • Gentamicina 240mg IM DU + azitromicina 2g VO DU
BASHH 2019 ⁷⁴	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g IM DU + Azitromicina 2g VO DU • Cefixima 400mg VO DU + Azitromicina 2g VO DU • Gentamicina 240mg IM DU + Azitromicina 2g VO DU • Espectinomomicina 2g IM DU + Azitromicina 2g VO DU (excepto en infecciones faríngeas)
CDC 2021 ⁷⁵	<ul style="list-style-type: none"> • Gentamicina 240mg IM DU + oral azitromicina 2g VO DU
GESIDA ⁷⁶	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 1g IM DU + Azitromicina 2g VO DU • Gentamicina 240mg IM DU + Azitromicina 2g VO DU
OMS 2016 ¹	<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxona 500mg IM DU + Azitromicina 2g VO DU • Cefixima 800mg VO DU + Azitromicina 2g VO DU • Gentamicina 240mg IM DU + Azitromicina 2g VO DU • Espectinomomicina 2g IM DU (si no infección orofaríngea) + Azitromicina 2g VO DU.

Tabla 5: Tratamiento de la infección gonocócica resistente a ESCs. IM: intramuscular; DU: dosis única; VO: vía oral

* cuando inicialmente se administró monoterapia con ceftriaxona, una dosis más baja de ceftriaxona u otro régimen de tratamiento.

Las guías europeas⁴⁵ sostienen que el manejo de pacientes con infección gonocócica resistente a ceftriaxona o fracasos verificados del tratamiento después de otros regímenes antimicrobianos recomendados requiere asesoramiento de médicos y microbiólogos especialistas en ITS, y debe incluir notificación de contacto sexual y seguimiento con TOC. Se recomiendan pruebas de detección de *N. gonorrhoeae* en tres localizaciones, incluyendo cultivos y pruebas de resistencia a los antimicrobianos, para todos los pacientes con infección gonocócica resistente a ceftriaxona. Las pruebas de resistencia a los antimicrobianos, cuando estén disponibles, deberían informar sobre el tratamiento posterior.

1.8.5 Nuevos tratamientos

En 2017, la Organización Mundial de Salud (OMS) incluyó a *N. gonorrhoeae* entre los patógenos con nivel de prioridad alta para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos debido a la aparición de resistencias y a los casos de fracaso al tratamiento dual de primera línea⁸¹. Además desarrolló un Plan de acción mundial para controlar la propagación y el impacto de la resistencia de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos, a fin de facilitar la adopción de medidas eficaces contra la propagación de las cepas multirresistentes de gonococo⁸².

Hay varios agentes prometedores en el horizonte para el tratamiento de *N. gonorrhoeae*, entre los que se incluyen tres nuevos antibióticos que han llegado a los ensayos clínicos de fase III:

- **Zoliflodacina:**

Es un antibiótico que tiene un nuevo mecanismo de acción que implica la inhibición de las topoisomerasas bacterianas tipo II⁸³. Estudios han demostrado que zoliflodacina es efectivo en cepas resistentes a ciprofloxacino y no muestra resistencia cruzada con ningún antibiótico desarrollado previamente, haciendo este antimicrobiano ideal para cualquier cepa de *N. gonorrhoeae* resistente a los antibióticos utilizados actualmente⁸⁴.

El 30 de diciembre de 2015 se completó en EEUU un ensayo clínico de fase II que utilizó una dosis oral única de zoliflodacina de 2 o 3 g para la infección gonocócica no complicada y mostraron unas tasas de curación del 98% y el 100% para la gonorrea urogenital, respectivamente, del 100% para la gonorrea rectal y del 67% y el 78% para la gonorrea faríngea.⁸³

- **Solitromicina:**

Es un macrólido de amplio espectro de cuarta generación. Los estudios in vitro han demostrado una actividad superior a los antibióticos utilizados actualmente (incluidas la ceftriaxona y la azitromicina) en 246 aislamientos de *N. gonorrhoeae*, incluidas las dos cepas multirresistentes H041 y F89.⁸⁵

Posteriormente, en ensayos clínicos de fase II usando dos dosis orales de solitromicina (1200 mg y 1000 mg) en un total de 59 participantes, se encontró una eficacia del 100% en las tres localizaciones (genital, oral, rectal) con ambas dosis.⁸⁶

- **Gepotidacina**

Se trata de un nuevo antibiótico que actúa inhibiendo la ADN girasa bacteriana y la topoisomerasa IV a través de un mecanismo que es diferente de los antibióticos anteriores, incluidas las quinolonas.⁸⁷ Los estudios in vitro mostraron una potente actividad de la gepotidacina contra todas las cepas de *N. gonorrhoeae*, incluidas las cepas multirresistentes. No se encontró resistencia cruzada con ningún otro antibiótico, aunque la mutación D86N en *ParC* asociada con la resistencia a las quinolonas se asoció con CMI de gepotidacina más altas. Un ensayo clínico de fase II que evaluó una dosis única de gepotidacina para el tratamiento de la gonorrea urogenital no complicada en dosis de 1500 o 3000 mg mostró una tasa de curación del 96 % (66/69) en la gonorrea urogenital, faríngea y rectal.⁸⁸

1.8.6 Vacuna

Debido a la elevada incidencia de la infección por *N. gonorrhoeae*, a la gran capacidad que tiene para desarrollar resistencia y a la complejidad del desarrollo de nuevos antimicrobianos, es urgente desarrollar una vacuna contra este patógeno.

El primer informe de posible inmunidad protectora contra la infección gonocócica fue de un estudio de casos y controles realizado por Petousis-Harris *et al.*⁸⁹, que involucró la vacuna MeNZB, compuesta por vesículas de membrana externa (OMV; outer membrane vesicle) de *N. meningitidis* del serogrupo B. Este estudio incluyó casos de gonorrea detectados en Nueva Zelanda de 2004 a 2016 y describieron que aquellos que recibieron la vacuna MenNZB tenían tasas de infección más bajas, con una efectividad estimada de la vacuna del 31%. Un estudio retrospectivo de cohorte realizado por Paynter *et al.*⁹⁰ descubrió que MeNZB tiene una efectividad del 24% contra las hospitalizaciones por infección gonocócica, lo que respalda la protección cruzada de la vacuna. Aunque la vacuna MeNZB ya no está disponible, la vacuna 4CMenB frente a *N. meningitidis* del serogrupo B, comercializada con el nombre de Bexsero, tiene los mismos componentes de vesícula de membrana externa que MeNZB. Además, posee tres proteínas recombinantes, entre las que se encuentra el antígeno de unión a heparina de Neisseria (Neisserial Heparin binding antigen; NHBA), importante para la colonización y supervivencia gonocócica y que se expresa en la superficie de *N. gonorrhoeae*. La vacuna no solo ha demostrado con éxito la inducción de anticuerpos antigonocócicos por las OMV, sino que también ha generado anticuerpos antigonocócicos NHBA, lo que presenta otra fuente de protección contra *N. gonorrhoeae*⁸⁴.

Además de las OMV y NHBA descritas anteriormente, existen muchas otras posibles dianas (tabla 4)⁸⁴. Un ejemplo es el epítipo 2C7 derivado del LOS. Aunque en general LOS varía ampliamente según la variación de fase, 2C7 es un determinante de virulencia ampliamente expresado y crítico para la colonización gonocócica.

Target	Rationale/progress	Literature
Six gonococcal proteins expressed during human mucosal infection	Antibody-generation with bactericidal activity against <i>N. gonorrhoeae</i> in mice	Zhu et al. [173]
L-methionine binding lipoprotein MetQ	Displayed on surface of ~97% <i>N. gonorrhoeae</i> worldwide, with promising results in mice	Sikora et al. [174]
Lipooligosaccharide-derived epitope 2C7	2C7 is broadly expressed amongst <i>N. gonorrhoeae</i> and is critical for gonococcal infection. Tetrapeptide derivative of derivative vaccine TMCP2 developed	Gulati et al. [163, 164]
MtrE protein and its Surface-expressed loop "Loop 2"	MtrE is part of the MtrCDE multidrug transporter system. Generated MtrE-dependent bactericidal activity when used to immunize mice	Wang et al. [175]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> adhesin complex protein (Ng-ACP)	Rabbit antiserum to recombinant Ng-ACP prevented inhibition of human lysozyme w/100% efficacy	Almonacid-Mendoza et al. [176]
Recombinant truncated <i>N. meningitidis</i> macrophage infectivity potentiator protein (rT-Nm-MIIP)	rT-Nm-MIIP induced cross-reactive antibodies with bactericidal activity against certain <i>N. gonorrhoeae</i> strains in mice	Humbert et al. [177]
Transferrin binding proteins A and B (tbpA and tbpB)	Both are ubiquitously expressed and induced systemic vaginal antibodies in mice, though weak immune response and negligible role in survival	Price et al. [178, 179]
Nitrite reductase AniA	Outer membrane glycoprotein essential for growth and survival under O ₂ -limited conditions	Shewell et al. [180]
Outer membrane porin protein B (PorB)	Highly conserved and of interest but has failed to show promising results in vaccine development. Correlates with protection with Th1 response but not antibody response	Zhu et al. [181]

Tabla 6: Dianas de interés para el desarrollo de vacunas contra *Neisseria gonorrhoeae*.⁸⁴

2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

La infección gonocócica constituye un problema de salud pública a nivel mundial, tanto por el aumento de la incidencia de esta infección, como por la capacidad de *Neisseria gonorrhoeae* de desarrollar resistencia a los antimicrobianos. Por consiguiente, resulta imperativo establecer una monitorización de la sensibilidad para detectar de forma precoz la aparición de resistencias y mantener actualizadas las guías terapéuticas.

En los países desarrollados, la escalada en la incidencia de esta infección ha sido especialmente notable en determinados colectivos de la población, como en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y en jóvenes. Barcelona es una ciudad cosmopolita con un alto flujo turístico y con diversos locales de ocio nocturno, además en los últimos años han proliferado las redes de encuentros sexuales y eventos de intercambio de pareja/s y consumo recreativo de drogas. Todo esto ha favorecido la propagación tanto de la infección gonocócica como de otras ITS en nuestra comunidad. Este aumento también se ha constatado en varias ciudades de España. Por otro lado, ha sido notorio el aumento de la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* a diversas familias de antibióticos. Actualmente, las cefalosporinas de espectro extendido son la última opción terapéutica para la infección gonocócica. De hecho, se han documentado casos de cepas de *N. gonorrhoeae* con resistencia a cefalosporinas y/o con resistencia de alto nivel a azitromicina en diversos países, incluso en Cataluña. Este auge de la resistencia a los antimicrobianos en *N. gonorrhoeae* supone un desafío para el tratamiento de esta infección.

Esta situación y las implicaciones clínicas inherentes a la infección han impulsado un esfuerzo para alcanzar un control efectivo en España. En este contexto, los estudios sobre sensibilidad antibiótica y epidemiología molecular cobran un papel esencial. Mientras que los primeros permitirían detectar de forma precoz la aparición de cepas multirresistentes y mantener actualizadas las guías de tratamiento, los segundos contribuirían a una mejor comprensión de los patrones de transmisión, permitiendo así la identificación de redes sexuales de alto riesgo. Hasta donde

alcanza nuestro conocimiento, la información disponible a nivel local y nacional en lo que respecta a la epidemiología molecular es parcial, y en lo que respecta a la sensibilidad antibiótica es limitada.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la tesis doctoral es determinar la sensibilidad antimicrobiana y la dinámica poblacional de *Neisseria gonorrhoeae*, tanto en el área de Barcelona como en 10 centros sanitarios representativos del Estado Español.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *N. gonorrhoeae* en Barcelona y en 10 centros sanitarios del Estado Español durante un periodo de un año y medio.
2. Describir la características clínico-epidemiológicas de los pacientes con infección gonocócica en la población de estudio.
3. Caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la resistencia antimicrobiana mediante la secuenciación de genoma completo.
4. Estudiar mediante la secuenciación de genoma completo la dinámica poblacional de *Neisseria gonorrhoeae* en las distintas regiones de España.
5. Correlacionar los datos de sensibilidad y de secuenciación con las características clínico-epidemiológicas de los pacientes, con el fin de obtener conocimiento sobre dinámicas de transmisión y dispersión.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

A continuación, se presentan las cuatro publicaciones que constituyen esta tesis doctoral por compendio de artículos:

4.1 Publicación 1: Sensibilidad antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en Barcelona en un período de cinco años, 2013-2017.

Título original: Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona during a five-year period, 2013 to 2017

Autores: P. Salmerón, B. Viñado, R. El Ouazzani, M. Hernández, MJ. Barbera, M. Alberny, M. Jane, N. Larrosa, T. Pumarola, Y. Hoyos-Mallecot, J. Serra-Pladevall.

Revista: Eurosurveillance

Factor impacto: 6.307 (año 2020)

Fecha de publicación: octubre 2020

DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.42.1900576

Introducción: El aumento de la resistencia a los antimicrobianos en *Neisseria gonorrhoeae* supone una amenaza para el tratamiento de la gonorrea.

Objetivo: Describir la sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* en Barcelona, España, entre 2013 y 2017.

Material y Métodos: Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de penicilina, cefixima, ceftriaxona, azitromicina, ciprofloxacino, espectinomicina, fosfomicina y gentamicina se determinaron mediante la técnica de difusión en gradiente (E-test). La sensibilidad se interpretó utilizando los puntos de corte clínicos definidos por EUCAST. Las tasas de resistencias de penicilina, cefixima, azitromicina y ciprofloxacino se analizaron junto con las variables clínico-epidemiológicas mediante regresión logística.

Resultados: De un total de 1979 pacientes con infección gonocócica (2036 aislados), 1888 (95,4%) eran hombres. La mediana de edad de los pacientes fue de 32 años. La tasa de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido fue baja, con 0,3% (5/1982) resistentes a ceftriaxona y 4,9% (98/1985) a cefixima. La prevalencia de resistencia a azitromicina fue del 2,7 % (52/1981), incluidos 16 aislados con resistencia de alto nivel detectados en 2016 y 2017. El 51,3% (1.018/1.986) de los aislados fueron resistentes a ciprofloxacino y el 20,1% (399/1.985) a penicilina. Todos los aislados fueron sensibles a espectinomicina. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de gentamicina fueron 4 y 6 mg/L y de fosfomicina 12 y 24 mg/L, respectivamente. Entre 2013 y 2017, las tasas de resistencia a penicilina y cefixima disminuyeron de 28,1% (92/327) a 12,2% (70/572) y de 8,3 % (27/327) a 4,4% (25/572) ($p \leq 0,0073$). Por el contrario, la prevalencia de la resistencia a azitromicina aumentó del 1,5% en 2014 (5/340) al 3,0% (17/572) en 2017. No se identificó ninguna tendencia para ciprofloxacino.

Conclusión: La vigilancia de la sensibilidad a los antimicrobianos es esencial para detectar nuevos fenotipos, la aparición de resistencias y así mantener actualizadas las guías de tratamiento.

Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona during a five-year period, 2013 to 2017

Paula Salmerón¹, Belén Viñado¹, Rachid El Ouazzani¹, Marta Hernández¹, María Jesús Barbera^{2,3}, Mireia Alberny⁴, Mireia Jané⁵, Nieves Larrosa^{1,6,7}, Tomás Pumarola^{4,6,7}, Yannick Hoyos-Mallecot^{1,6}, Judit Serra-Pladevall^{1,6,7}

1. Microbiology Department, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain

2. Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit, Department of Infectious Diseases, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain

3. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

4. Medical Management of Primary Care Services, Institut Català de la Salut (ICS), Barcelona, Spain

5. Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

6. Microbiology group, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain

7. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain

Correspondence: Yannick Hoyos (yhoyos@vhebron.net)

Citation style for this article:

Salmerón Paula, Viñado Belén, El Ouazzani Rachid, Hernández Marta, Barbera María Jesús, Alberny Mireia, Jané Mireia, Larrosa Nieves, Pumarola Tomás, Hoyos-Mallecot Yannick, Serra-Pladevall Judit. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona during a five-year period, 2013 to 2017. *Euro Surveill.* 2020;25(42):pii=1900576. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.42.1900576>

Article submitted on 16 Sep 2019 / accepted on 05 Mar 2020 / published on 22 Oct 2020

Introduction: Increasing rates of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* cause problems for treating gonorrhoea. **Aim:** This observational study aimed to describe isolates from all patients found infected with *N. gonorrhoeae*, in Barcelona, Spain, between 2013 and 2017, and with available antimicrobial susceptibility data. **Methods:** Minimum inhibitory concentrations (MICs) of penicillin (PEN), cefixime (CFM), ceftriaxone (CRO), azithromycin (AZM), ciprofloxacin (CIP), spectinomycin (SPT), fosfomicin (FOF) and gentamicin (GEN) were determined by E-test. Susceptibility was assessed using clinical breakpoints from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Time trends for PEN, CFM, AZM and CIP were investigated using logistic regression. **Results:** Of 1,979 patients with infection (2,036 isolates), 1,888 (95.4%) were men. Patient median age was 32 years. The proportions of isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins were low, with 0.3% (5/1,982) resistant to CRO and 4.9% (98/1,985) to CFM. AZM resistance prevalence was 2.7% (52/1,981), including 16 isolates detected in 2016 and 2017, with high-level resistance. For CIP, 51.3% (1,018/1,986) of isolates were resistant, and for PEN, 20.1% (399/1,985). All isolates were susceptible to SPT. MIC₅₀ and MIC₉₀ values of GEN were 4 and 6 mg/L and of FOF 12 and 24 mg/L, respectively. Between 2013 and 2017, PEN and CFM resistance rates each decreased from 28.1% (92/327) to 12.2% (70/572) and from 8.3% (27/327) to 4.4% (25/572) ($p \leq 0.0073$). In contrast, AZM resistance prevalence appeared to increase from 1.5% in 2014 (5/340) to 3.0% (17/572) in 2017. No trend was identified for CIP. **Conclusion:** Antimicrobial susceptibility surveillance is important to timely detect new phenotypes and trends.

Introduction

Gonorrhoea is the second most reported bacterial sexually transmitted infection (STI), after chlamydia. Untreated gonorrhoea can lead to pelvic inflammatory disease and infertility in women and epididymitis and orchitis in men. In the European Union/European Economic Area countries, a total of 89,239 confirmed cases of gonorrhoea were reported in 2017 with an overall rate of 22.2 cases per 100,000 population [1]. This represented a 17% increase over the previous year, which was particularly striking in certain groups, such as men who have sex with men (MSM), who represented almost half of the cases in 2017, and the 25–34-year-old population [1].

In Spain, 8,722 cases of gonococcal infection were reported in 2017 (rate: 18.74 per 100,000 inhabitants), with a very wide range of infection incidence among the different regions of the country, from 2.44 and 48.50 cases per 100,000 inhabitants. The highest rates were registered in Catalonia (48.50), Balearic Islands (41.79) and Madrid (28.48) [2]. Of the 3,622 cases reported in Catalonia in 2017, men accounted for 82% of the diagnoses. Data from 1,136 patients (31%) could be collected: 44% were MSM followed by heterosexual men (22%) and women (20%) [3].

Neisseria gonorrhoeae, the bacterial species responsible for gonorrhoea, has developed resistance to the different families of antibiotics used in the past, challenging future treatment. Currently, extended-spectrum cephalosporins (ESC) are the last-line treatment option for *N. gonorrhoeae* infection. Unfortunately, strains showing resistance to ESC have been reported worldwide [4–6]. In 2017, the European Centre for

TABLE 1

Characteristics of patients included in the study on antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates, Barcelona, Spain, 2013–2017 (n = 1,979 patients)

Characteristics	2013		2014 ^a		2015 ^b		2016		2017		TOTAL ^c	
	Number	%	Number	%	Number	%	Number	%	Number	%	Number	%
Numbers of patients and isolates ^d												
Isolates	329	100	340	100	339	100	447	100	581	100	2,036	100
Patients	321	100	326	100	328	100	423	100	581	100	1,979	100
Sex												
Men	303	94.4	306	93.9	320	97.6	400	94.6	559	96.2	1,888	95.4
Women	18	5.6	18	5.5	8	2.4	23	5.4	22	3.8	89	4.5
Unknown	0	0.0	2	0.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.1
Age in years												
<20	NA	NA	14	6.1	9	2.8	12	2.8	9	1.5	44	2.8
20–29	NA	NA	73	31.7	118	36.8	153	36.2	236	40.6	580	37.3
30–39	NA	NA	91	39.6	121	37.7	167	39.5	214	36.8	593	38.1
40–49	NA	NA	39	17.0	52	16.2	68	16.1	84	14.5	243	15.6
≥ 50	NA	NA	13	5.7	21	6.5	23	5.4	38	6.5	95	6.1
Median (range)	NA	NA	32 (14–74)	NA	32 (14–72)	NA	32 (4–75)	NA	31 (5–75)	NA	32 (4–75)	NA
Clinical setting												
Drassanes STI unit	214	66.7	232	71.2	209	63.7	275	65.0	362	62.3	1,292	65.3
Primary healthcare units	90	28.0	76	23.3	100	30.5	118	27.9	189	32.5	573	29
Other HUVH departments	17	5.3	18	5.5	19	5.8	30	7.1	30	5.2	114	5.8
Specimen												
Urethral/balanoprepucial	261	79.3	245	72.1	274	80.8	365	81.7	453	78.0	1,598	78.5
Rectal	38	11.6	53	15.6	48	14.2	56	12.5	88	15.1	283	13.9
Endocervical/vaginal	16	4.9	11	3.2	10	2.9	21	4.7	11	1.9	69	3.4
Pharynx	10	3.0	11	3.2	7	2.1	5	1.1	29	5.0	62	3.0
Other ^e	4	1.2	20	5.9	0	0.0	1	0.2	0	0.0	24	1.2

HUVH: Vall d'Hebron University Hospital; NA: not available; STI: sexually transmitted infection.

^a Age data available from 230 patients (from April 2014 to December 2014).

^b Age data available from 321 patients.

^c Age data available from 1,555 patients.

^d Number of isolates can be greater than number of patients because over the study period several patients had more than one episode of gonorrhoea.

^e Other includes: synovial fluid, abdominal abscess, perianal exudates.

The denominators for the percentages concerning patients' characteristics are the total numbers of patients with information available on the characteristic in question, for the year or period specified in the column header. Denominators for specimen percentages are total number of isolates.

Disease Control and Prevention (ECDC) reported a resistance rate to cefixime of 1.9% within the European Union/European Economic Area countries and no isolates showing resistance to ceftriaxone [7]. The resistance rate to azithromycin was 7.5%; and high-level resistance (minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 256 mg/L) was detected in seven isolates [7].

This pathogen has moreover been able to acquire or develop nearly all known mechanisms of antimicrobial resistance: target modification, inactivation of the antimicrobial by enzymatic means, decreased influx of antimicrobials, and increased efflux of antimicrobials [8]. This situation highlights the importance of carrying out resistance monitoring programmes, in order to update therapeutic guidelines and to timely detect the emergence of multidrug-resistant strains.

Nowadays, most of the treatment guidelines recommend dual antimicrobial therapy (500mg intramuscular ceftriaxone + 1g or 2g oral azithromycin) [9–12]. The rationale for gonococcal combination therapy using different antimicrobials with different mechanisms of action is to potentially mitigate the spread of antimicrobial resistance [13]. Combination therapy has been reported as possibly related to the decline in prevalence of *N. gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to ceftriaxone (DSC), defined as a MIC > 0.032 mg/L [14,15].

The aim of this study is to describe antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae* in isolates collected between 2013 and 2017 in Barcelona, Spain.

TABLE 2

Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in Barcelona, Spain, 2013–2017 (n=2,036)

Antimicrobial	MIC ₅₀ in mg/L	MIC ₉₀ in mg/L	MIC range in mg/L	Susceptibility category ^a					
				Susceptible		Intermediate		Resistant	
				Number	%	Number	%	Number	%
PEN ^b	0.25	12	0.002–>32	135	6.8	1,451	73.1	399	20.1
CRO ^c	0.016	0.047	<0.016–0.38	1,977	99.7	0	0.0	5	0.3
CFM ^b	0.016	0.094	<0.016–0.38	1,887	95.1	0	0.0	98	4.9
AZM ^d	0.125	0.25	<0.016–>256	1,929	97.4	0	0.0	52	2.6
CIP ^e	0.38	>32	<0.002–>32	965	48.6	3	0.2	1,018	51.3
SPT	8	12	1.5–64	2,036	100	0	0.0	0	0.0
GEN ^f	4	6	0.25–24	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FOF ^g	12	24	0.064–128	NA	NA	NA	NA	NA	NA

AZM: azithromycin; CIP: ciprofloxacin; CFM: cefixime; CRO: ceftriaxone; ECOFF: epidemiological cut-off value; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; FOF: fosfomicin; GEN: gentamicin; MIC: minimum inhibitory concentration; NA: not applicable; PEN: penicillin; SPT: spectinomycin.

^a According to EUCAST (2019) clinical breakpoints.

^b Antimicrobial susceptibility testing for PEN and CFM was performed on 1,985 isolates.

^c Antimicrobial susceptibility testing for CRO was performed on 1,982 isolates.

^d Antimicrobial susceptibility testing for AZM was performed on 1,981 isolates.

^e Antimicrobial susceptibility testing for CIP was performed on 1,986 isolates.

^f GEN was determined in the period from 2013 to 2016.

^g FOF was determined in 2015 and 2016.

Methods

Study population

The study population consisted of all patients who were diagnosed with a *N. gonorrhoeae* infection and with isolates for which antimicrobial susceptibility data were available. When patients tested positive for gonorrhoea on multiple sites and more than one culture was obtained, only the genital culture was included in the study.

Patients were attended in three different clinical settings: Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections unit, different medical departments of Vall d'Hebron University Hospital and primary healthcare units in Barcelona, Spain. Together these settings cover 1,200,000 of the 1,620,343 inhabitants of Barcelona (74.1%).

Culture

Urethral, rectal, vaginal, endocervical, and/or pharyngeal samples were cultured on selective Thayer-Martin medium and incubated at 35–37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24–48 hours. Probable *N. gonorrhoeae* strains were identified by oxidase reaction (oxidase-positive) and mass spectrometry (MALDI-TOF, Vitek MS system, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). *N. gonorrhoeae* strains were subcultured in order to obtain fresh colonies for antimicrobial susceptibility testing (AST) and frozen at –80°C in trypticase soy broth with 20% glycerol.

Antimicrobial susceptibility

AST was performed on fresh colonies (<24 hours). The MICs of penicillin, ceftriaxone, cefixime, ciprofloxacin,

azithromycin, spectinomycin, gentamicin, and fosfomicin were determined by means of the E-test method (bioMérieux, France), as described by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) [16]. Interpretation was performed using clinical breakpoints from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [17], except for gentamicin and fosfomicin, since cut-off points for these antibiotics are not established by EUCAST (nor by CLSI). *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 was used as a reference strain for antimicrobial susceptibility testing.

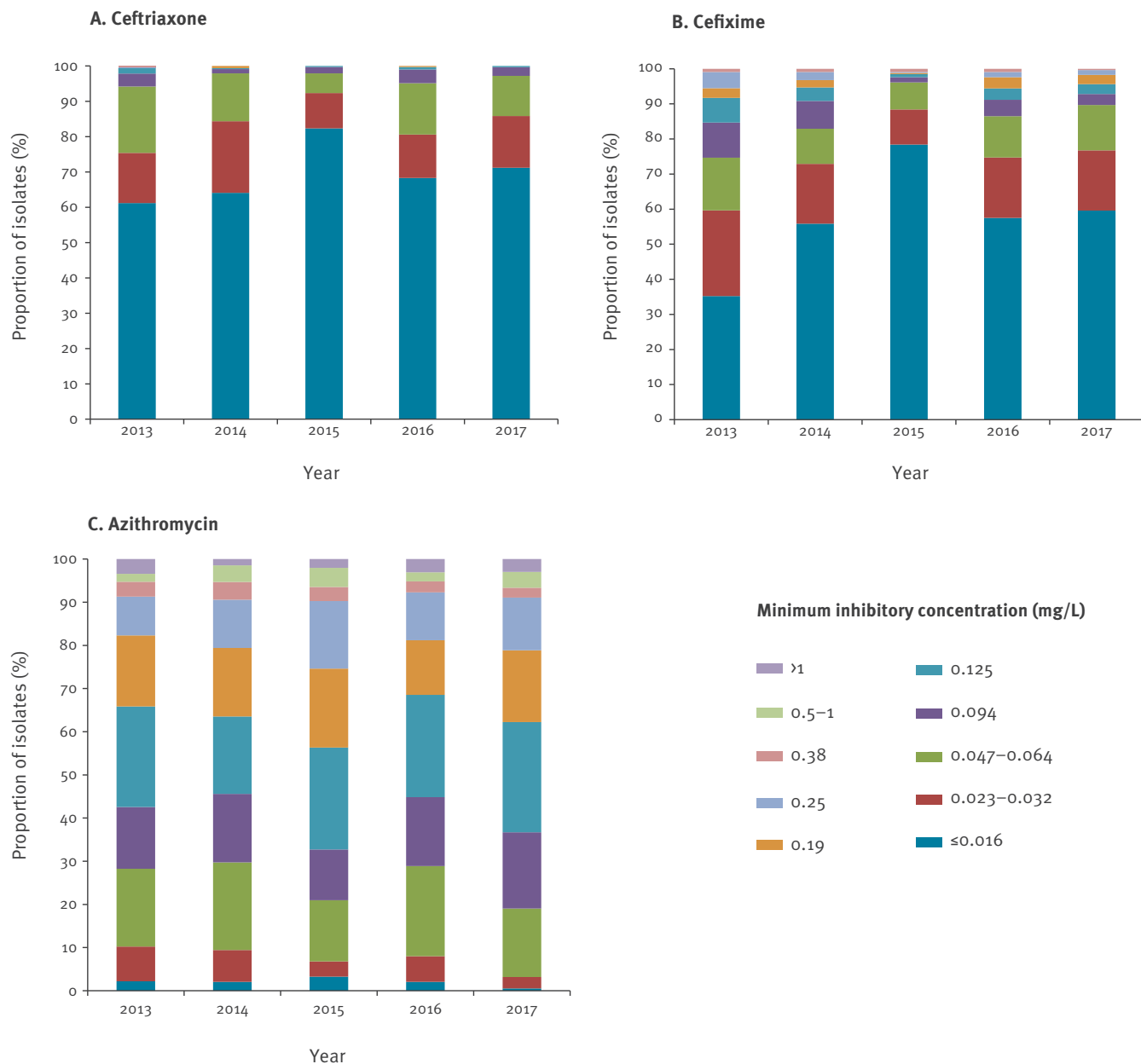
Descriptive and statistical analysis

Descriptive analyses of the study population were performed. Statistical analyses were conducted using Stata (StataCorp, College Station, Texas, US). Trends of penicillin, cefixime, azithromycin and ciprofloxacin resistance over the study period were calculated using logistic regression analyses.

Determinants for resistance for penicillin (MIC>1mg/L), cefixime (MIC>0.125mg/L), azithromycin (epidemiological cut-off (ECOFF)>1mg/L) and ciprofloxacin (MIC>0.06mg/L) were identified using logistic regression analyses. Univariable and multivariable analyses were performed. Differences with p<0.05 were considered statistically significant. As there were very few strains that reached the 0.125mg/L threshold of ceftriaxone resistance, we did not determine associations between potential factors for ceftriaxone resistance and resistance to this antibiotic.

FIGURE

Proportion of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with different minimum inhibitory concentrations (mg/L) for (A) ceftriaxone (n = 1,982 isolates), (B) cefixime (n = 1,985 isolates) and (C) azithromycin (n = 1,981 isolates), by year, Barcelona, Spain, 2013–2017



EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; MIC: minimum inhibitory concentration.

According to EUCAST, the MIC breakpoints for resistance to ceftriaxone and cefixime are identical and are MIC > 0.125 mg/L. The epidemiological cut-off for azithromycin is > 1 mg/L.

Ethical statement

As this was a retrospective study, no ethical approval was needed. All data related to patients were coded to maintain confidentiality.

Results

Between 2013 and 2017, 2,054 strains were isolated from 1,979 patients. Eighteen strains were excluded because, in 16 patients, *N. gonorrhoeae* was recovered from two different body sites, and in one patient, gonococcus was recovered from three different sites. In the end, susceptibility testing was performed on 2,036 *N. gonorrhoeae* strains isolated from 1,979 patients, because 47 patients presented two different episodes and five patients presented three episodes during the study period.

Of the 1,979 patients included, 1,888 (95.4%) were from men. 1,292 (65.3%) were treated in the Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit. Furthermore, 573 patients (29.0%) presented in primary healthcare units and 114 (5.8%) in other medical departments of Vall d'Hebron University Hospital. For 1,555 patients with data on age available, the median age was 32 years, and 1,173 (75.4%) were between 20 and 40 years old. A total of 1,598 (78.5%) of the 2,036 isolates studied were from urethral samples and 1,888 (95.4%) patients were men (Table 1).

Antimicrobial susceptibility data during the study period are shown in Table 2.

The distribution of MIC values by year for ceftriaxone, cefixime and azithromycin is shown in the Figure (panels A, B and C respectively). Most of the isolates (69.6%; 1,380/1,982) showed a ceftriaxone MIC \leq 0.016 mg/L. The percentage of ceftriaxone resistant isolates (defined as MIC $>$ 0.125 mg/L) appeared to decrease from 0.6% (2/324) in 2013 and 2014 to 0.2% (1/408) in 2016 ($p=0.4637$). No isolates resistant to ceftriaxone were found either in 2015 or 2017. The average prevalence of decreased susceptibility to ceftriaxone (DSC; $0.032 < \text{MIC} < 0.125$ mg/L) throughout the study period was 15.8% (314/1,982), seemingly declining from 2013 to 2015 (from 24.1% (78/324) to 7.4% (25/339)) but in 2016 and 2017 the proportions of isolates with DSC returned to higher levels, 19.1% (78/408) and 14.3% (82/572), respectively.

The average percentage of isolates with cefixime resistance (MIC $>$ 0.125 mg/L) at 4.9% was higher than the average percentage with ceftriaxone resistance at 0.3% (Table 2). Despite this, cefixime resistance rate decreased from 8.3% (27/327) in 2013 to 4.4% (25/572) in 2017 ($p=0.0073$). For both ESC, the proportion of isolates with MIC \leq 0.016 mg/L appeared to increase from 2013 to 2015, from 35.2% (115/327) to 78.5% (266/339) for cefixime and from 61.1% (198/324) to 82.3% (279/339) for ceftriaxone (Figure).

For azithromycin, most of isolates (54.6%; 1,082/1,981) showed MIC between 0.094 and 0.19 mg/L. Annual MIC₅₀ and MIC₉₀ values remain the same during the study period, 0.125 and 0.25 mg/L, respectively. Nevertheless, the proportion of resistant isolates, according to the EUCAST breakpoint (ECOFF $>$ 1 mg/L) seemed to increase slightly from 1.5% (5/340) in 2014 to 3.0% (17/572) in 2017 ($p=0.5295$). A total of 16 strains showed high-level azithromycin-resistance (MIC \geq 256 mg/L): seven in 2016 and nine in 2017. These 16 strains accounted for almost a third (16/52) of all azithromycin resistant strains. No high-level azithromycin-resistant gonococcal isolates were found from 2013 to 2015.

However, the proportion of isolates showing both DSC and azithromycin resistance appeared to decrease from 1.5% (5/329) in 2013 to 0.3% (2/581) in 2017.

The prevalence of resistance to ciprofloxacin and penicillin was 51.3% and 20.1%, respectively (Table 2). For penicillin, the resistance rate presented a statistically significant decline over the study years ($p=0.0000$), from 28.1% (92/327) in 2013 to 12.2% (70/572) in 2017. In addition, 14.7% (300/2,036) of isolates were penicillase-producing *N. gonorrhoeae* (PPNG). For ciprofloxacin, the resistance rate fluctuated between 48.8 and 56.8% during the study period, with no clear trend. All isolates were susceptible to spectinomycin (Table 2). The MIC₅₀ and MIC₉₀ values for gentamicin were 4 and 6 mg/L, while for fosfomicin these were 12 and 24 mg/L, respectively (Table 2).

Table 3 summarises the determinants of resistance to the different antibiotics tested during the study.

Antimicrobial resistance rates were compared between isolates from primary healthcare units and the Drassanes-Vall d'Hebron STI unit. Resistance rates of all antibiotics were higher in primary healthcare units than in Drassanes-Vall d'Hebron STI unit, being statistically significant for penicillin (odds ratio (OR): 1.53; 95% confidence interval (CI): 1.20–1.95; $p=0.0006$), cefixime (OR: 1.91; 95%CI: 1.22–3.01; $p=0.0050$), azithromycin (OR: 1.89; 95%CI: 1.07–3.31; $p=0.0272$) and ciprofloxacin (OR: 1.63; 95%CI: 1.33–1.99; $p=0.0000$) (Table 3).

Discussion

This study describes antimicrobial surveillance data from 2,036 *N. gonorrhoeae* isolates in Barcelona during a 5-year period. To our knowledge, this is the first report in Spain describing antimicrobial resistance of such a considerable number of *N. gonorrhoeae* isolates. Other studies have been published previously [18,19], but the amount of strains included was much lower. Our findings show that the rate of ceftriaxone resistance remains low and stable. These results agree with data from the ECDC [7]. From 2013 to 2015 the number of isolates with MIC \leq 0.016 mg/L of ceftriaxone and cefixime seemed to increase progressively. However, in 2016 and 2017 we observed an important decrease in

TABLE 3

Determinants, according to logistic regression analysis, of resistance to penicillin (MIC > 1 mg/L), cefixime (MIC > 0.125 mg/L), azithromycin (ECOFF > 1 mg/L) and ciprofloxacin (MIC > 0.06 mg/L) in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from primary healthcare units and Drassanes-Vall d'Hebron sexually transmitted infection unit, Barcelona, Spain, 2013–2017 (n = 2,036)

Variable	Number of resistant isolates	Total isolates tested	%	Univariable		Multivariable		Number of resistant isolates	Total isolates tested	%	Univariable		Multivariable	
				OR (95%CI)	p value	OR (95%CI)	p value				OR (95%CI)	p value		
Antibiotic	Penicillin							Cefixime						
Year														
2013	92	327	28.1	1 (ref)	0.0000	1 (ref)	0.0000	27	327	8.3	1 (ref)	0.0064	1 (ref)	0.0073
2014	88	339	26.0	0.93 (0.66–1.33)		0.97 (0.68–1.38)		18	339	5.3	0.63 (0.33–1.20)		0.67 (0.35–1.29)	
2015	73	339	21.5	0.73 (0.51–1.05)		0.70 (0.49–1.01)		5	339	1.5	0.19 (0.07–0.50)		0.20 (0.07–0.52)	
2016	76	408	18.6	0.61 (0.42–0.86)		0.59 (0.42–0.85)		23	408	5.6	0.60 (0.32–1.12)		0.61 (0.32–1.16)	
2017	70	572	12.2	0.34 (0.24–0.49)		0.33 (0.23–0.47)		25	572	4.4	0.43 (0.23–0.80)		0.43 (0.23–0.80)	
Total	399	1,985	NA	NA	NA	NA	NA	98	1,985	NA	NA	NA	NA	NA
Sex														
Male	388	1,895	20.5	1 (ref)	0.1786	1 (ref)	0.1067	88	1,896	4.6	1 (ref)	0.0074	1 (ref)	0.0303
Female	11	88	12.5	0.55 (0.23–1.31)		0.49 (0.20–1.17)		10	87	11.5	3.36 (1.38–8.16)		2.72 (1.10–6.72)	
Total	399	1,983 ^a	NA	NA	NA	NA	NA	98	1,983 ^a	NA	NA	NA	NA	NA
Clinical setting														
DVHSTI (n = 1,340 ^b)	242	1,303	18.6	1 (ref)	0.0041	1 (ref)	0.0006	46	1,303	3.5	1 (ref)	0.0064	1 (ref)	0.0050
PH (n = 579 ^b)	138	566	24.4	1.41 (1.12–1.79)		1.53 (1.20–1.95)		36	565	6.4	1.86 (1.19–2.92)		1.91 (1.22–3.01)	
Total	380 ^c	1,869 ^c	NA	NA	NA	NA	NA	82 ^c	1,868 ^c	NA	NA	NA	NA	NA
Antibiotic	Azithromycin							Ciprofloxacin						
Year														
2013	11	322	3.4	1 (ref)	0.5295	1 (ref)	0.5939	162	325	49.8	1 (ref)	0.0771	1 (ref)	0.0846
2014	5	340	1.5	0.42 (0.15–1.23)		0.45 (0.15–1.30)		167	340	49.1	1.01 (0.74–1.39)		1.06 (0.77–1.45)	
2015	7	339	2.1	0.60 (0.23–1.57)		0.60 (0.23–1.57)		192	338	56.8	1.45 (1.06–1.99)		1.44 (1.05–1.98)	
2016	12	408	2.9	0.81 (0.34–1.89)		0.81 (0.35–1.90)		213	407	52.3	1.11 (0.82–1.50)		1.11 (0.82–1.50)	
2017	17	572	3	0.87 (0.40–1.88)		0.85 (0.39–1.84)		284	576	49.3	1.002 (0.758–1.325)		0.98 (0.74–1.30)	
Total	52	1,981	NA	NA	NA	NA	NA	1,018	1,986	51.3	NA	NA	NA	NA
Sex														
Male	50	1,891	2.6	1 (ref)	0.5410	1 (ref)	0.6184	965	1,896	50.9	1 (ref)	0.9312	1 (ref)	0.9832
Female	2	88	2.2	1.57 (0.37–6.65)		1.45 (0.34–6.22)		53	88	60.2	0.98 (0.55–1.73)		0.99 (0.56–1.77)	
Total	52	1,979 ^a	NA	NA	NA	NA	NA	1,018	1,984 ^a	NA	NA	NA	NA	NA
Clinical setting														
DVHSTI (n = 1,340 ^b)	28	1,302	2.2	1 (ref)	0.0207	1	0.0272	612	1,303	47.0	1	0.0000	1 (ref)	0.0000
PH (n = 579 ^b)	23	563	4.1	1.94 (1.11–3.39)		1.89 (1.07–3.31)		332	567	58.6	1.63 (1.34–1.99)		1.63 (1.33–1.99)	
Total	51 ^c	1,865 ^c	NA	NA	NA	NA	NA	944 ^c	1,870 ^c	NA	NA	NA	NA	NA

CI: confidence interval; DVHSTI: Drassanes-Vall d'Hebron sexually transmitted infection unit; ECOFF: epidemiological cut-off value; MIC: minimum inhibitory concentration; NA: not applicable; OR: odds ratio; PH: primary healthcare unit.

^a There are two patients for whom sex is not known.

^b Number of isolates received by the setting.

^c Isolates from Vall d'Hebron University Hospital are not included in the statistical analyses relating to clinical setting.

the percentage of strains with MIC \leq 0.016 mg/L and an increase in strains with higher MICs, which concur with a report that isolates with DSC have been emerging in Europe in recent years [15].

In our work, we were able to observe a decrease in the resistance rate of both ESC throughout the study. The reason that this decrease is statistically significant only for cefixime may be due to the small number of ceftriaxone resistant strains.

Since dual therapy (ceftriaxone 500mg+azithromycin 1g) was implemented in Barcelona in 2012, resistance to ceftriaxone has started to decrease: 2.8% in 2012 (data not shown) to 0.0% in 2017. This could be explained by the change in treatment regimen whereby, until 2011, gonorrhoea was treated with ceftriaxone 250 mg. On the other hand, the resistance rate of azithromycin has increased slightly from 1.5% in 2014 to 3.0% in 2017 and high-level resistant isolates (MIC \geq 256 mg/L) were first detected in 2016 and 2017. An increase in azithromycin rate has been documented in several European countries [15].

Although the European and Spanish guidelines still recommend dual therapy [12,20], the increase in azithromycin resistance detected worldwide, not only in *N. gonorrhoeae* but also in other STIs such as *Mycoplasma genitalium* [21], brings into question the advisability of this therapeutic strategy. In fact, since 2019, the British Association for Sexual Health and HIV (BASHH) has recommended monotherapy with ceftriaxone 1g [22]. However, some studies support that the selection/induction of azithromycin resistance of *N. gonorrhoeae* by the use of the current dual therapy is limited [23], and it may be associated with the general use of azithromycin for respiratory infections or the treatment of non-gonococcal urethritis [13].

The overall azithromycin resistance rate in our study was 2.6% based on the EUCAST breakpoint (ECOFF is 1mg/L). This percentage is lower than that reported by other Spanish groups such as Cobo et al. [18], who showed a resistance percentage of 13.8% in Almería. On the other hand, Fuertes de Vega et al. reported a resistance rate of 5.2% in Barcelona [19], which is more similar to our results. We must bear in mind that the cut-off point used by these authors is that of prior EUCAST report versions (0.5 mg/L). If we analyse the azithromycin resistance rate of our study according to this cut-off, the percentage of resistance strains would be 4.1%.

The difference in the percentage of azithromycin resistance between different regions of Spain could be due to divergence in treatment patterns or the circulation of different genotypes with greater ability to develop antimicrobial resistance.

On other hand, the occurrence of extensively drug-resistant (XDR) strains of *N. gonorrhoeae* reported in

countries such as the United Kingdom and Australia in 2018 is concerning [24]. These strains show a high level of azithromycin resistance and they are also resistant to ceftriaxone, resulting in resistance to the first line dual therapy for gonorrhoea (ceftriaxone intramuscularly and azithromycin orally) recommended by European, Australian and World Health Organization guidelines. The appearance and dissemination of these type of strains compromises the successful treatment of this infection. This highlights the need to keep the capability to culture *N. gonorrhoeae*, in order to monitor antibiotic susceptibility and rapidly detect the emergence of XDR strains.

Although the resistance rate to ciprofloxacin observed in this study is similar to that of neighbouring countries [25], it is higher than that reported in eastern European countries such as Ukraine [26].

The breakpoints of gentamicin are not yet established by EUCAST. In this study it appears that *N. gonorrhoeae* does not have high MIC values for gentamicin (MIC₅₀=4mg/L and MIC₉₀=6mg/L). These values are similar to those reported previously and suggest that gentamicin can be a low-cost and efficacious alternative therapy [27]. In addition, other studies support the in vitro activity of gentamycin, used in combination with cefixime or ertapenem, to control the spread of multi-drug-resistant (MDR) and XDR *N. gonorrhoeae* strains [28].

Similar to gentamicin, no clinical breakpoints for fosfomycin exist. The review conducted by Tesh et al. suggests that fosfomycin can be an alternative treatment for gonococcal infection [29]. In this review, isolates with a MIC $<$ 16 mg/L were considered as susceptible, while those with MICs between 32 and 64 mg/L were moderately susceptible. These MICs are similar to those found by our study, but it is necessary to establish susceptibility breakpoints in order to understand how to appropriately dose fosfomycin to treat *N. gonorrhoeae* infections [29].

It is surprising that the resistance rates of almost all antimicrobials tested were higher in isolates from primary healthcare than in those from the STI unit. One reason that might explain this is that 70% of the Drassanes-Vall d'Hebron STI Unit patients are MSM. Although we do not have access to this information, we hypothesise by deduction that the majority of patients who attend primary healthcare units are men who have sex with women (MSW) and if so, this might suggest that there are different *N. gonorrhoeae* populations circulating in the two populations.

One limitation of this study is that antimicrobial susceptibility tests of *N. gonorrhoeae* were performed mainly in symptomatic patients, since they are the ones from whom a sample is collected for culture. Asymptomatic patients are diagnosed by nucleic acid amplification tests (NAAT). Another limitation

is that when *N. gonorrhoeae* was isolated in multiple sites in one patient, antimicrobial susceptibility was only performed on genital samples. This could lead to the loss of strains with higher MIC values in pharyngeal carriers and consequently to underestimate antimicrobial resistance. Moreover, due to the retrospective nature of the study, there is a lack of demographic and epidemiological information.

Although our results are only representative of Barcelona, the patients included in the current study represent 62.1% of those reported in Catalonia [30].

In conclusion, we analysed the susceptibility of 2,036 isolates in Barcelona from 2013 to 2017. We were able to observe that susceptibility to ceftriaxone remains high and resistance has decreased since dual therapy was implemented in 2012. However, azithromycin resistance increased during the study period and high-level azithromycin resistant strains were isolated for the first time in 2016.

Our study highlights the need to monitor antibiotic susceptibility and to perform molecular typing studies at a national level, which would allow identifying temporal and geographical changes, to detect the emergence and dissemination of new strains, and to maintain therapeutic guidelines updated.

Acknowledgements

We would like to thank all the Primary Health Centers included in the study, Drassanes-Vall d'Hebron STI Unit and laboratory of Vall d'Hebron University Hospital.

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

Salmerón P, Pumarola T, Larrosa N, Hoyos Y and Serra J contributed to the design and carrying out of the study.

Viñado B, El Ouazzani R and Hernández M were responsible for the susceptibility testing of the strains.

Jané M, Albery M and Barbera MJ were responsible for the review of the data.

References

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonorrhoea. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
- Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2017. [HIV and risk behaviors surveillance unit. Epidemiological surveillance of sexually transmitted infections, 2017]. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación; 2019.
- Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT). Vigilància epidemiològica de les infeccions de transmissió sexual a Catalunya. Informe anual 2017. [Center of Epidemiological Studies on Sexual Transmitted Infections and AIDS of Catalonia. Epidemiological surveillance of sexually transmitted infections in Catalonia. Annual report 2017] Badalona: CEEISCAT; 2018.
- Cámara J, Serra J, Ayats J, Bastida T, Carnicer-Pont D, Andreu A, et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):1858-60. <https://doi.org/10.1093/jac/dks162> PMID: 22566592
- de Curraize C, Kumanski S, Micaëlo M, Fournet N, La Ruche G, Meunier F, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates (2010 to 2014) in France characterized by using whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(11):6962-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.01568-16> PMID: 27600036
- Lahra MM, Ryder N, Whiley DM. A new multidrug-resistant strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. *N Engl J Med.* 2014;371(19):1850-1. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1408109> PMID: 25372111
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe – Results summary 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
- Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea - the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):364. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1029-2> PMID: 26293005
- Workowski KA, Bolan GA, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep.* 2015;64(RR-03):1-137. PMID: 26042815
- Public Health Agency of Canada (PHAC). Canadian Guidelines on Sexually Transmitted Infections. Ottawa: PHAC; 2013. Gonococcal Infections Chapter.
- Australian Sexual Health Alliance (ASHA). Australian STI Management Guidelines for Use in Primary Care. Sydney: ASHA. [Accessed 12 Jun 2019]. Available from: <http://www.sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/gonorrhoea#management>
- Bignell C, Unemo M, Radcliffe K, Jensen JS, Babayan K, Barton S, et al. European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2013;24(2):85-92. <https://doi.org/10.1177/0956462412472837> PMID: 24400344
- Unemo M, Workowski K. Dual antimicrobial therapy for gonorrhoea: what is the role of azithromycin? *Lancet Infect Dis.* 2018;18(5):486-8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30162-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30162-2) PMID: 29523498
- Hofstraat SH, Götz HM, van Dam AP, van der Sande MA, van Benthem BH. Trends and determinants of antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands, 2007 to 2015. *Euro Surveill.* 2018;23(36). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.36.1700565> PMID: 30205870
- Day MJ, Spiteri G, Jacobsson S, Woodford N, Amato-Gauci AJ, Cole MJ, et al. Euro-GASP network. Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):609. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3528-4> PMID: 30509194
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2019.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. Växjö: EUCAST; 2019.
- Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Cabeza-Barrera MI. Antimicrobial susceptibility and typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012-2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(1):3-7. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.01.017> PMID: 25735717
- Fuertes de Vega I, Baliu-Piqué C, Bosch Mestres J, Vergara Gómez A, Vallés X, Alsina Gibert M. Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhoea. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(3):165-8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.11.012> PMID: 28094065
- GESIDA. Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes. 2017. [Consensus document on diagnostic and treatment of adult and teenage/ adolescent sexually transmitted infections]. [Accessed 09 Jul 2019]. Available from: <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/otras-guias-vigentes/>
- 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;44(8):457-62. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000631> PMID: 28703723
22. Fifer H, Saunders J, Soni S, Tariq Sadiq S, FitzGerald M. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Neisseria gonorrhoeae*. 2019. [Accessed 04 Jul 2019]. Available from: <https://www.bashh.org/guidelines>
 23. Clifton S, Town K, Furegato M, Cole M, Mohammed H, Woodhall SC, et al. Is previous azithromycin treatment associated with azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*? A cross-sectional study using national surveillance data in England. *Sex Transm Infect.* 2018;94(6):421-6. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2017-053461> PMID: 29511067
 24. Jennison AV, Whiley D, Lahra MM, Graham RM, Cole MJ, Hughes G, et al. Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and high-level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(8):1900118. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1900118> PMID: 30808445
 25. Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, Sánchez-Busó L, Golparian D, Jacobsson S, et al. , Euro-GASP study group. Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(7):758-68. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30225-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30225-1) PMID: 29776807
 26. Boiko I, Golparian D, Krynytska I, Bezkorovaina H, Frankenberg A, Onuchyna M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates and treatment of gonorrhoea patients in Ternopil and Dnipropetrovsk regions of Ukraine, 2013-2018. *APMIS.* 2019;127(7):503-9. <https://doi.org/10.1111/apm.12948> PMID: 30903707
 27. Mann LM, Kirkcaldy RD, Papp JR, Torrone EA. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Gentamicin-Gonococcal Isolate Surveillance Project, 2015-2016. *Sex Transm Dis.* 2018;45(2):96-8. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000693> PMID: 29324629
 28. Singh V, Bala M, Bhargava A, Kakran M, Bhatnagar R. In Vitro Synergy Testing of Gentamicin, an Old Drug Suggested as Future Treatment Option for Gonorrhoea, in Combination With Six Other Antimicrobials Against Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strains. *Sex Transm Dis.* 2018;45(2):127-31. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000708> PMID: 28876284
 29. Tesh LD, Shaeer KM, Cho JC, Estrada SJ, Huang V, Bland CM, et al. *Neisseria gonorrhoeae* and fosfomicin: Past, present and future. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(3):290-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.007> PMID: 26145201
 30. Carmona G, Ruiz L, Fernández C, Jané M. Butlletí Epidemiològic de Catalunya. Març 2019. [Accessed 16 Jun 2019]. Available from: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_Actualitat/Butlletins/Promocio_proteccio_salut/bec_butlleti_epidemiologic_de_catalunya/2019/bec-mar-2019.pdf

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2020.

4.2 Publicación 2: Emergencia y diseminación de tres brotes de *Neisseria gonorrhoeae* con resistencia de alto nivel a azitromicina en Barcelona, 2016-2018.

Título original: Emergence and dissemination of three mild outbreaks of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Barcelona, 2016–18

Autores: P. Salmerón, A. Moreno-Mingorance, J. Trejo, R. Amado, B. Viñado, T. Cornejo-Sanchez, M. Alberny, M. J. Barbera, M. Arando, T. Pumarola, Y. Hoyos-Mallecot, J. Serra-Pladevall, J. J. González-López.

Revista: Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Factor impacto: 5.758 (año 2021)

Fecha de publicación: Marzo 2021

DOI:10.1093/jac/dkaa536

Introducción: En las últimas décadas se han detectado en todo el mundo aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) con alto nivel de resistencia a azitromicina (HL-AziR), lo que pone en riesgo la terapia antimicrobiana dual actual.




Objetivos: Este estudio tuvo como objetivo caracterizar los primeros 16 aislamientos de NG con HL-AziR en Barcelona entre 2016 y 2018.

Métodos: La secuenciación de genoma completo se utilizó para identificar los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos; establecer los secuenciotipos (ST) de MLST, NG MultiAntigen Sequence Typing (NG-MAST) y NG Sequence Typing for Antimicrobial Resistance (NG-STAR); e identificar la relación clonal de los aislados estudiados con otros estrechamente relacionados descritos previamente en otros países mediante el análisis de SNP de genoma completo. Las características sociodemográficas de los pacientes incluidos en el estudio se recogieron mediante revisión exhaustiva de sus historias clínicas.

Resultados: Doce de los 16 aislados de HL-AziR pertenecían al genotipo MLST ST7823/NG-MAST ST5309 y 4 al genotipo MLST ST9363/NG-MAST ST3935. Todos presentaban la mutación A2059G en los cuatro alelos del gen 23S del ARNr. Los aislados MLST ST7823/NG-MAST ST5309 solo se identificaron en hombres que tienen sexo con mujeres y los pertenecientes al MLST ST9363/NG-MAST ST3935 se encontraron en HSH. El análisis filogenético reveló la presencia de tres grupos de transmisión diferentes asociadas de forma independiente con el comportamiento sexual.

Conclusiones: Nuestros hallazgos respaldan la aparición de los tres primeros brotes de NG con HL-AziR en España. Estos resultados destacan la capacidad de NG para desarrollar resistencia antimicrobiana y transmitirse entre las redes sexuales. La alta resolución de WGS proporciona información valiosa para la investigación de brotes, complementando la implementación de medidas de salud pública centradas en la prevención de la diseminación de cepas multirresistentes de NG.

Emergence and dissemination of three mild outbreaks of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Barcelona, 2016–18

P. Salmerón ^{1,2,†}, A. Moreno-Mingorance^{2,3,†}, J. Trejo¹, R. Amado¹, B. Viñado^{1,2}, T. Cornejo-Sanchez³, M. Alberny⁴, M. J. Barbera^{5,6}, M. Arando⁵, T. Pumarola^{1,2,3}, Y. Hoyos-Mallecot¹, J. Serra-Pladevall ^{1,2,3*‡} and J. J. González-López ^{1,2,3‡}

¹Department of Microbiology, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain;

²Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Plaça Cívica, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; ³Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; ⁴Institut Català de Salut (ICS), Barcelona, Spain; ⁵Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain; ⁶Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding author. E-mail: jserrapladevall@gmail.com

†These authors should be considered joint first authors.

‡These authors contributed equally to this article.

Received 17 August 2020; accepted 2 December 2020

Background: *Neisseria gonorrhoeae* (NG) isolates with high-level azithromycin resistance (HL-AziR) have emerged worldwide in recent decades, threatening the sustainability of current dual-antimicrobial therapy.

Objectives: This study aimed to characterize the first 16 NG isolates with HL-AziR in Barcelona between 2016 and 2018.

Methods: WGS was used to identify the mechanisms of antimicrobial resistance, to establish the MLST ST, NG multiantigen sequence typing (NG-MAST) ST and NG sequence typing for antimicrobial resistance (NG-STAR) ST and to identify the clonal relatedness of the isolates with other closely related NG previously described in other countries based on a whole-genome SNP analysis approach. The sociodemographic characteristics of the patients included in the study were collected by comprehensive review of their medical records.

Results: Twelve out of 16 HL-AziR isolates belonged to the MLST ST7823/NG-MAST ST5309 genotype and 4 to MLST ST9363/NG-MAST ST3935. All presented the A2059G mutation in all four alleles of the 23S rRNA gene. MLST ST7823/NG-MAST ST5309 isolates were only identified in men who have sex with women and MLST ST9363/NG-MAST ST3935 were found in MSM. Phylogenomic analysis revealed the presence of three transmission clusters of three different NG strains independently associated with sexual behaviour.

Conclusions: Our findings support the first appearance of three mild outbreaks of NG with HL-AziR in Spain. These results highlight the continuous capacity of NG to develop antimicrobial resistance and spread among sexual networks. The enhanced resolution of WGS provides valuable information for outbreak investigation, complementing the implementation of public health measures focused on the prevention and dissemination of MDR NG.

Introduction

Neisseria gonorrhoeae (NG) is the second most prevalent cause of sexually transmitted bacterial infection, with 106 million new cases every year worldwide, according to the WHO.¹ This pathogen has developed resistance to all the antibiotics used over the years for its treatment and, therefore, gonorrhoea may become an untreatable infection.

Currently, extended-spectrum cephalosporins are the last-line treatment option for gonococcal infection, but, in recent decades, the first cases of broad-spectrum-cephalosporin-resistant strains have been detected in Japan,² Spain,³ France,⁴ Australia,⁵ Canada⁶ and the Netherlands.⁷ In order to prevent the spread of these strains, since 2012, most guidelines recommend dual therapy with ceftriaxone 250–500 mg as a single intramuscular

dose plus azithromycin 1–2 g as a single oral dose to treat non-complicated gonococcal infections.^{8–10} Unfortunately, the rate of resistance to azithromycin has risen in recent years^{11,12} and therapeutic failure with dual-antimicrobial therapy has been reported.^{13,14} In addition, the emergence of MDR and XDR isolates has recently been detected.¹⁵

High-level azithromycin resistance (HL-AziR) in NG is defined as an MIC of 256 mg/L or higher and is mainly associated with a A2059G mutation (*Escherichia coli* numbering) when present in three or four of the four alleles of the 23S rRNA gene.¹⁶ During recent decades the emergence of HL-AziR has been reported in Scotland,¹⁷ the UK,^{18,19} Ireland,²⁰ Italy,²¹ Sweden,²² China,^{23–25} Australia,²⁶ Argentina,²⁷ Canada^{28,29} and the USA,³⁰ threatening the sustainability of the current dual-antimicrobial therapy.

NG multiantigen sequence typing (NG-MAST) and MLST have been broadly used to investigate the population dynamics of gonococcal infections, but these are suboptimal for molecular epidemiology, since they do not provide enough resolution to identify clones and transmission events.³¹ In contrast, the use of WGS, in conjunction with epidemiological and phenotypical data, provides enhanced understanding of the distribution and spread of antimicrobial resistance clades and clones, allowing identification of short-term transmission chains.²⁹

This study aimed to characterize the first HL-AziR NG isolates detected in Spain. To do this, WGS was used to identify the mechanisms of antimicrobial resistance, to establish the genomic epidemiology and to identify the clonal relatedness of the isolates with other closely related NG previously described in other countries, including those with HL-AziR.

Methods

Study population

From January 2016 to December 2018, 1749 NG isolates were obtained in the Microbiology Laboratory of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain). The isolates were obtained from genital, pharyngeal and/or rectal samples collected from patients visited in three different clinical settings: the Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit (Drassanes-VH STIU), different medical departments of the Vall d'Hebron University Hospital and Primary Healthcare Units (PHUs) in Barcelona. These settings provide coverage to 1 200 000 of the 1 629 343 inhabitants of Barcelona (74.5%). When gonococci were detected in multiple sites, only the isolate obtained from the genital specimen was included in the study.

The sociodemographic characteristics of the patients included in the study were collected through comprehensive review of their medical records.

Culture, identification and antibiotic susceptibility

Urethral, endocervical, pharyngeal and/or rectal samples were collected in Amies broth (Deltalab, Spain) and cultured in Thayer-Martin medium. The cultures were incubated for 24–48 h at 35–37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Colonies suggestive of NG were identified by cytochrome oxidase test and MS (MALDI-TOF, Vitek MS system, bioMérieux, Spain). Antimicrobial susceptibility testing of azithromycin, penicillin, ceftriaxone, cefixime and ciprofloxacin was carried out using the gradient diffusion method (Etest, bioMérieux, France) in GC II AG/W IsoVitalX medium (Becton Dickinson, France). Quality control was performed using the NG reference strain ATCC 49226. The MICs were interpreted in accordance with the cut-off points of EUCAST.

WGS, genotyping, molecular antimicrobial analysis and genomic epidemiology of HL-AziR NG

Genomic DNA of HL-AziR NG was obtained with the Dneasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Spain) and whole-genome sequences were obtained using the Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina) for 2×300 bp paired ends and MiSeq (Illumina) according to the manufacturer's instructions. Raw reads were trimmed with Trimmomatic (version 0.38) and genome assemblies were obtained with Unicycler (version 0.4.7).

MLST ST, NG-MAST ST and NG sequence typing for antimicrobial resistance (NG-STAR) ST were determined by submitting genome assemblies to the PubMLST *Neisseria* database website (<http://pubmlst.org/neisseria/>).³²

Mutations and genes conferring resistance to azithromycin (23S rRNA, *mtrR*), benzylpenicillin (*penA*, *ponA*, *penB*, *bla*_{TEM}), ceftriaxone and cefixime (*penA*, *penB*) and ciprofloxacin (*gyrA*, *parC*) were identified in the PubMLST *Neisseria* database website and the Resistance Gene Identifier (version 4.2.2). Additionally, mutations in *penA* were identified in *de novo* draft assemblies using BLAST and were manually inspected with ClustalW. The number of 23S rRNA allele mutations associated with azithromycin resistance was detected with ng23S-mutations script (version 0.1) as described previously.³³

The genomic epidemiology of HL-AziR NG isolates from this study and from selected international HL-AziR isolates was determined based on whole-genome SNP analysis. To do this, 49 previously sequenced genomes were included: 13 HL-AziR isolates with an A2059G mutation in the 23S rRNA gene, representative of each clade identified in previous studies from the USA (*n* = 2),³⁴ Canada (*n* = 5),²⁹ the UK (*n* = 5)¹⁹ and Ireland (*n* = 1);²⁰ 20 isolates belonging to MLST ST7823 available in the PubMLST database in May 2020; and 16 isolates simultaneously belonging to MLST ST9363 and NG-MAST ST3935 available in the PubMLST database in May 2020 (see Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online). SNPs were identified using Snippy (version 4.3.6) with HL-AziR NG WHO V (GenBank accession no. NZ_LT592150) as the reference strain.^{35,36} In the initial whole-genome alignment, 5397 SNPs were identified. Afterwards, Gubbins (version 2.3.4) was used for recombination signal identification and removal. A total of 1300 SNPs were finally identified and used for the subsequent phylogenetic analysis. The maximum likelihood phylogenetic tree based on SNPs was obtained with IQ-Tree (version 1.6.10) with 1000 bootstrap replicates and tree annotation with relevant metadata was done with the interactive tree of life ('iTOL') tool (<http://itol.embl.de>).

Nucleotide sequence accession numbers

The complete genomes of the 16 HL-AziR NG isolates from this study are available at DDBJ/ENA/GenBank under Bioproject number PRJNA639402 (<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA639402?reviewer=8an99hp90t3gq3gv8hskjqe57e>).

Ethics

The study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital [reference number: PR(AG)414/2020]. The study was conducted in accordance with the principles laid out in the Declaration of Helsinki and in accordance with the principles of Good Clinical Practice.

All data related to patients was coded to maintain confidentiality. Each patient was identifiable only by a unique number and the principal investigator was the owner of this number.

Results

Between 2016 and 2018, 1749 NG isolates were obtained from 1685 patients, 1596 of whom were men (94.7%). Among the specimens, 73.1% (1278/1749) were urethral swabs, 18.6% (325/1749) were rectal, 4.4% (77/1749) were pharyngeal and

3.8% (67/1749) were vaginal swabs. Most of the patients (62.7%; 1056/1685) were visited at the Drassanes-VH STIU and at PHUs (30.8%, 519/1685) and a lower proportion were attended at different medical departments of the Vall d'Hebron University Hospital (6.5%; 110/1685).

Sixty-four out of 1749 isolates (3.7%) were resistant to azithromycin (MIC >1 mg/L), with 16 (25%) showing high-level resistance to this antibiotic (MIC >256 mg/L). Of these latter isolates, six were detected in 2016, nine in 2017 and one in 2018. No HL-AziR isolates were detected before 2016 in our setting.¹¹ None of the HL-AziR isolates was resistant to ceftriaxone or cefixime, and 85.7% were resistant to ciprofloxacin (see Table S2). All the HL-AziR isolates were obtained from urethral samples except for the isolate detected in 2018 that was obtained from a rectal sample. All these isolates were obtained from men with a median age of 34 years (range 24–48 years). Most patients were symptomatic and were treated empirically with ceftriaxone and azithromycin before antimicrobial susceptibility testing results were available. No confirmed treatment failures were reported. Ten out of the 16 patients were attended at PHUs and six at the Drassanes-VH STIU. Four of the 16 patients (25%) were MSM and 37.5% (6/16) were men who had sex with women (MSW). No information about sexual orientation was obtained from the remaining six patients.

Molecular typing showed that the 16 HL-AziR NG belonged to two different genotypes: G1, which consisted of 11 isolates simultaneously belonging to MLST ST 7823, NG-MAST ST5309 and NG-STAR ST2244, and 1 isolate belonging to MLST ST7823, NG-MAST ST19618 and NG-STAR ST2244 (which only differed from the former isolates by a SNP in *porB* of the NG-MAST typing scheme); and G2, which consisted of the four isolates belonging to MLST ST9363, NG-MAST ST3935 and NG-STAR ST1993 (Figure 1 and Table S2).

Regarding the sociodemographic data of the patients from which the HL-AziR NG were obtained, 50% of those with an isolate belonging to G1 were categorized as MSW (no information on sexual orientation could be obtained for the remaining patients) with a median age of 33.4 years (range 24–46 years), while all patients with an isolate belonging to G2 were MSM and had a median age of 36.5 years (range 26–48 years). All the HL-AziR isolates presented the A2059G mutation (*E. coli* numbering) in all four alleles of the 23S rRNA gene (associated with azithromycin resistance), as well as the D346 insertion and F504L, A510V and A516G mutations in PBP2 (associated with resistance to penicillin). Nevertheless, G1 presented the NG-STAR *penA* allele 23 and G2 presented the NG-STAR *penA* allele 166. In addition, isolates belonging to the G1 genotype showed the –35A deletion in the *mtrR* promoter (associated with azithromycin resistance), S91F and D95A substitutions in DNA gyrase (associated with quinolone resistance), the double PorB mutation G120K/A121D (associated with resistance to hydrophilic antibiotics, such as β -lactams and tetracyclines) and 91% carried the *bla*_{TEM} gene. In contrast, isolates belonging to the G2 genotype showed the double PorB mutation G120K/A121N, but did not show any deletion in the *mtrR* gene or a DNA gyrase mutation and did not carry the *bla*_{TEM} gene (see Table S2).

Whole-genome SNP-based phylogenetic analysis of the 16 HL-AziR NG isolates from this study and from the 49 additional isolates used for contextualization revealed that five clades were identified within the phylogeny (Figure 1). Clade 1 consisted of one representative HL-AziR isolate from the USA with an A2059G mutation in the 23S rRNA gene and a –35A deletion in the *mtrR* promoter.

Clade 2 consisted of five closely related isolates from the UK and one from Ireland, all showing HL-AziR, having the A2059G mutation and the G45D mutation in the 23S rRNA and the *mtrR* genes, respectively, and belonging to MLST ST1580. Clade 3 consisted of the 20 isolates simultaneously belonging to MLST ST9363 and NG-MAST ST3935, including the 16 isolates for which the genomes were retrieved from the PubMLST database and the 4 isolates with HL-AziR with the A2059G mutation in the 23S rRNA gene identified in Barcelona and belonging to the G2 genotype. Among the 16 isolates from clade 3 obtained from the PubMLST database, none showed the A2059 mutation, except for one Italian isolate, which was closely related to the 4 HL-AziR isolates from Barcelona and which belonged to the same genotype (i.e. MLST ST9363, NG-MAST ST3935 and NG-STAR ST1993). Clade 4 consisted of two HL-AziR Canadian isolates with an A2059G mutation in the 23S rRNA gene and a –35A deletion in the *mtrR* promoter from MLST ST1901 and ST1579, respectively. Finally, clade 5 consisted of 36 isolates, including the 20 isolates identified in the PubMLST database belonging to MLST ST7823, the 12 HL-AziR isolates identified in this study and belonging to the G1 genotype (i.e. MLST ST7823 and NG-MAST ST5309/ST19618) and four HL-AziR NG with an A2059G mutation in the 23S rRNA gene and a –35A deletion in the *mtrR* promoter, including three Canadian isolates belonging to MLST ST12515, ST7823 and ST1579, and one ST7822 American isolate. There were no additional isolates in clade 5 for which HL-AziR could be expected according to the genomic analysis and, interestingly, all the isolates belonging to this clade possessed the –35A deletion in the *mtrR* promoter (associated with decreased susceptibility to azithromycin).³⁷

Among clades, the shortest SNP difference was observed for isolates from clades 2 and 3, which differed by a mean SNP number of 122.8 (range 112–134). Regarding the 4 HL-AziR NG from Barcelona within clade 3 and belonging to the G2 genotype, all were highly similar (mean SNP number of 1; range 0–2) and to the putative HL-AziR Italian isolate (mean SNP number of 5.5; range 5–6) belonging to the same genotype (i.e. MLST ST9363, NG-MAST ST3935 and NG-STAR ST1993) and shared a recent common ancestor. The 12 HL-AziR NG from Barcelona within clade 5 clustered together (mean SNP number 5.8; range 0–11) and, interestingly, grouped into two subclusters among which the differences ranged from 10 to 11 SNPs. The first subcluster included six isolates collected in 2016 (mean SNP number 0.7; range 0–2) and the second included six isolates collected in 2017 (SNP distance = 0). The isolates most closely related to the HL-AziR NG within clade 5 from Barcelona were two putative HL-AziR Canadian isolates obtained in 2004 and 2009 (mean SNP number 20.5; range 15–26), which, however, did not belong to the same NG-MAST ST.

Discussion

We describe the emergence and spread of NG with HL-AziR in Spain during a 3 year period. The antimicrobial susceptibility of all the NG isolates has been studied in the Microbiology Laboratory of the Vall d'Hebron University Hospital since 2013, observing a progressive increase in the rate of azithromycin resistance,¹¹ although it was not until 2016 that HL-AziR isolates were detected. Twelve out of the 16 isolates belonged to the same G1 genotype (i.e. MLST ST7823 and NG-MAST ST5309/ST19618), sharing the same antibiotic susceptibility profile, and half of these strains were

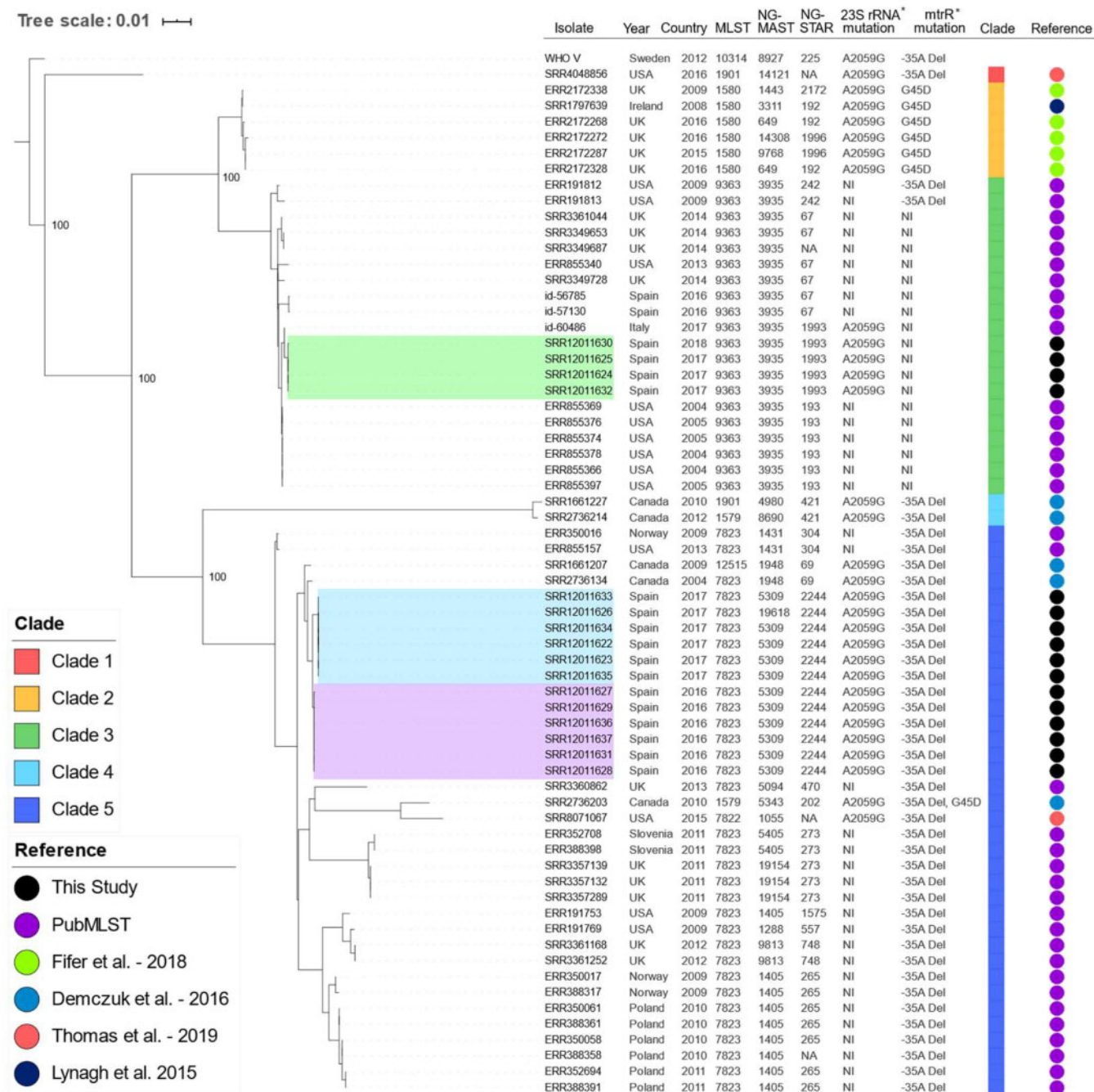


Figure 1. Maximum likelihood tree of the 16 HL-AziR NG isolates collected from 2016 to 2018 in Barcelona and the 49 selected international HL-AziR NG isolates. The tree was rooted with the NG WHO V strain. The percentage of bootstrap support value is represented in the tree branches of the different clades identified. The NG isolates of this study are highlighted in different colours according to the outbreak to which they belong. *Only mutations associated with azithromycin resistance in the genomic analysis are indicated. NA, not assigned, NI, not identified.

obtained from MSW. The remaining four strains belonged to the G2 genotype (i.e. MLST ST9363 and NG-MAST ST3935), sharing another identical antibiotic susceptibility pattern, and all were isolated from MSM.

To the best of our knowledge, these are the first three outbreaks of NG with HL-AziR detected in Spain. There is scarce information regarding NG antimicrobial susceptibility in Spain and data about

azithromycin resistance vary greatly. Thus, in 2011, Serra-Pladevall *et al.*³⁸ detected 3% azithromycin resistance (MIC >0.5 mg/L) in 100 isolates studied. Fuertes de Vega *et al.*³⁹ studied azithromycin susceptibility in 58 isolates between 2009 and 2014, and 5.2% showed resistance to this antibiotic (MIC >0.5 mg/L). Between 2012 and 2016, Cobo *et al.*⁴⁰ studied 134 NG isolates, of which 9.7% were resistant to azithromycin (MIC >0.5 mg/L). In contrast,

Guerrero-Torres *et al.*⁴¹ found 1.9% resistance among 104 gonococci studied in Madrid in 2016. It is of note that no HL-AziR strains were detected in any of these studies.

In contrast, HL-AziR isolates have been reported in several other countries.^{17–30,34} Furthermore, between November 2014 and May 2018, a persistent outbreak of gonorrhoea with HL-AziR was detected in England with 118 laboratory-confirmed cases.^{19,42} This outbreak emerged among young heterosexuals living in Leeds with no specific risk factors, but spread across England into sexual networks of MSM. The majority of these isolates were NG-MAST ST9768 (37 out of the 60 cases for which WGS was successful) and neither ST5309 nor ST3935 was detected. Some of these isolates were clustered in clade 2 of this study (see Figure 1).

The sequencing results show that isolates in this study were clearly grouped into two genotypes: G1 with 12 closely related isolates (0–11 core SNPs) and G2 with 4 strains (0–2 core SNPs). G1 isolates belonged to clade 5 and were subclustered in two groups. The first subcluster included six isolates collected in 2016 and the second included six isolates collected in 2017. Differences among the 2016 isolates ranged from 0 to 2 SNPs and isolates collected in 2017 differed by 0 SNPs. However, if we compare the SNP number among isolates belonging to these two subclusters, the SNP range rises to 10–11. Considering this genetic divergence among isolates and the temporal distance in which the isolates were obtained, we conclude that there were two independent outbreaks of two different NG clones. In addition, most of the G1 isolates were from MSW and all the isolates belonging to G2 were MSM, providing further evidence of sustained transmission of these strains amongst sexual networks.

When evaluating the contextualization of our isolates, it was found that all the strains from clade 3 belonged to MLST ST9363 and NG-MAST ST3935, and were isolates from different countries obtained over a long period of time. However, one isolate (id-60486) from Italy was highly similar (5–6 core SNPs) and shared a recent common ancestor, suggesting a common source of infection. Unfortunately, information regarding sexual contacts was not available. On the other hand, all the isolates from clade 5 belonged to MLST ST7823 and were from different countries and obtained over a long period of time, suggesting that isolates belonging to this clade may have greater dissemination capacity. In addition, all these isolates harboured the –35A deletion in *mtrR*, suggesting that they have enhanced ability to develop antimicrobial resistance. All these findings highlight the associated risk among sexually active international travellers and the potential dissemination of strains.

This study has several limitations. Firstly, it is likely that more HL-AziR isolates are circulating without detection due to the wide use of nucleic acid amplification tests for the diagnosis of sexually transmitted infections. Secondly, due to the retrospective design of the research, many demographic and epidemiological data are missing. Thirdly, when NG was isolated in multiple sites in one patient, only genital samples were studied and this may have led to a loss of strains. Finally, the NG genomic sequence data available are somewhat limited and this may have biased the contextualization of our isolates.

In summary, despite these limitations and the lack of direct links identified between cases, the timing, geographical clustering and genetic similarity of the isolates confirmed by WGS demonstrated that these cases belonged to three different mild

outbreaks. These outbreaks highlight the important ability of NG to develop antimicrobial resistance and demonstrate the potential for rapid transmission of highly resistant gonorrhoea, emphasizing the need to develop laboratory and epidemiologically linked surveillance systems. WGS is a very useful tool as it provides enhanced insight into the dynamics of NG strains, allowing the identification and characterization of transmission chains to consequently effectively target public health interventions in order to reduce the burden of the disease. Overall, these data provide evidence of the additional value that WGS can provide in NG outbreak investigations.

This study also reveals the need to maintain culture capacity, at least in the reference laboratories, to monitor antimicrobial susceptibility and for early detection of the emergence of antimicrobial-resistant strains.

Acknowledgements

We thank Ariadna Rando from the Microbiology Department of Vall d'Hebron University Hospital for providing helpful statistical advice.

Funding

This work was partially supported by the 'Ministerio de Economía y Competitividad' and the 'Instituto de Salud Carlos III' and was co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) 'A Way to Achieve Europe' [Spanish Network for Research in Infectious Diseases (grant number RD16/0016/0003)]. P.S. is supported by a grant from Hospital Universitari Vall d'Hebron. A.M.-M. is supported by a grant from the 'Fondo de Investigación Sanitaria' [Contratos Predoctorales de Formación en Investigación (grant number FI19/00315)].

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 and S2 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- 1 WHO. Emergence of Multi-Drug Resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Threat of Global Rise in Untreatable Sexually Transmitted Infections. 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70603/1/WHO_RHR_11.14_eng.pdf.
- 2 Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K *et al.* Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3538–45.
- 3 Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E *et al.* First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; **30**: 218–9.
- 4 Unemo M, Golparian D, Nicholas R *et al.* High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1273–80.
- 5 Lahra M, Ryder N, Whiley D. A new multidrug-resistant strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. *N Engl J Med* 2014; **371**: 1850–1.

- 6 Lefebvre B, Martin I, Demczuk W *et al.* Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017. *Emerg Infect Dis* 2018; **24**: 381–3.
- 7 van Dam AP, van Ogtrop ML, Golparian D *et al.* Verified clinical failure with cefotaxime 1g for treatment of gonorrhoea in the Netherlands: a case report. *Sex Transm Infect* 2014; **90**: 513–4.
- 8 Bignell C, Unemo M, European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS* 2013; **24**: 85–92.
- 9 WHO. *WHO Guidelines for the Treatment of Neisseria gonorrhoeae*.
- 10 Bignell C, Fitzgerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS* 2011; **22**: 541–7.
- 11 Salmerón P, Viñado B, El Ouazzani R *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona during a five-year period, 2013 to 2017. *Euro Surveill* 2020; **25**: pii=1900576.
- 12 ECDC. *Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Europe – Results Summary 2017*. 2019.
- 13 Fifer H, Natarajan U, Jones L *et al.* Failure of dual antimicrobial therapy in treatment of gonorrhoea. *N Engl J Med* 2016; **374**: 2504–6.
- 14 Eyre DW, Sanderson ND, Lord E *et al.* Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Euro Surveill* 2018; **23**: pii=1800323.
- 15 Jennison AV, Whitley D, Lahra MM *et al.* Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and high-level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. *Euro Surveill* 2019; **24**: pii=1900118.
- 16 Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3812–6.
- 17 Palmer HM, Young H, Winter A *et al.* Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 490–4.
- 18 Chisholm SA, Neal TJ, Alawattegama AB *et al.* Emergence of high-level azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 353–8.
- 19 Fifer H, Cole M, Hughes G *et al.* Sustained transmission of high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in England: an observational study. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 573–81.
- 20 Lynagh Y, Mac Aogáin M, Walsh A *et al.* Detailed characterization of the first high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases in Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2411–3.
- 21 Starnino S, Stefanelli P. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 1200–4.
- 22 Unemo M, Golparian D, Hellmark B. First three *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Sweden: a threat to currently available dual-antimicrobial regimens for treatment of gonorrhoea? *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 624–5.
- 23 Ni C, Xue J, Zhang C *et al.* High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2355–7.
- 24 Wan C, Li Y, Le WJ *et al.* Increasing resistance to azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* in Eastern Chinese cities: resistance mechanisms and genetic diversity among isolates from Nanjing. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: e02499–17.
- 25 Yuan LF, Yin YP, Dai XQ *et al.* Resistance to azithromycin of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from 2 cities in China. *Sex Transm Dis* 2011; **38**: 764–8.
- 26 Stevens K, Zaia A, Tawil S *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Australia. *J Antimicrob Chemother* 2014; **70**: 1267–8.
- 27 Galarza PG, Alcalá B, Salcedo C *et al.* Emergence of high level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain isolated in Argentina. *Sex Transm Dis* 2009; **36**: 787–8.
- 28 Allen VG, Seah C, Martin I *et al.* Azithromycin resistance is coevolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 2528–34.
- 29 Demczuk W, Martin I, Peterson S *et al.* Genomic epidemiology and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 1304–13.
- 30 Katz AR, Komeya AY, Soge OO *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: case report of the first isolate identified in the United States. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 841–3.
- 31 Harris SR, Cole MJ, Gianfranco S *et al.* Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 758–68.
- 32 Demczuk W, Sidhu S, Unemo M *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance, a novel antimicrobial resistance multilocus typing scheme for tracking global dissemination of *N. gonorrhoeae* strains. *J Clin Microbiol* 2017; **55**: 1454–68.
- 33 Kwong JC, Chow EPF, Stevens K *et al.* Whole-genome sequencing reveals transmission of gonococcal antibiotic resistance among men who have sex with men: an observational study. *Sex Transm Infect* 2018; **94**: 151–7.
- 34 Thomas JC, Seby S, Abrams AJ *et al.* Evidence of recent genomic evolution in gonococcal strains with decreased susceptibility to cephalosporins or azithromycin in the United States, 2014–2016. *J Infect Dis* 2019; **220**: 294–305.
- 35 Unemo M, Golparian D, Sánchez-Busó L *et al.* 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; **71**: 3096–108.
- 36 Unemo M, Fasth O, Fredlund H *et al.* Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 1142–51.
- 37 Cousin SL, Whittington WLH, Roberts MC. Acquired macrolide resistance genes and the 1 bp deletion in the *mtrR* promoter in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 131–3.
- 38 Serra-Pladevall J, Barberá-Gracia MJ, Roig-Carbajosa G *et al.* [*Neisseria gonorrhoeae*: antimicrobial resistance and study of population dynamics. Situation in Barcelona in 2011.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; **31**: 579–83.
- 39 Fuertes de Vega I, Baliu-Piqué C, Bosch Mestres J *et al.* Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhoea. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018; **36**: 165–8.
- 40 Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Avivar C. Typing and antimicrobial susceptibility of 134 *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain. *Rev Esp Quimioter* 2019; **32**: 114–20.
- 41 Guerrero-Torres MD, Menéndez MB, Guerras CS *et al.* Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016. *Epidemiol Infect* 2019; **147**: e274.
- 42 Smolarchuk C, Wensley A, Padfield S *et al.* Persistence of an outbreak of gonorrhoea with high-level resistance to azithromycin in England, November 2014–May 2018. *Euro Surveill* 2018; **23**: pii=1800287.

4.3 Publicación 3: Resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en España: estudio prospectivo multicéntrico

Título original: *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Spain: a prospective multicentre study.

Autores: P. Salmerón, B. Viñado, M. Arando, E. Alcoceba, B. Romero, B. Menéndez, S. Bernal, P. Idigoras, J. Colomina, G. Martin-Saco, A. Leal-Negredo, A. Torreblanca, O. Martínez, J. Serra-Pladevall

Revista: Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Factor de impacto: 5.758 (año 2021)

Fecha de publicación: Mayo 2021

DOI: 10.1093/jac/dkab037.



Objetivos: La infección gonocócica es una de las infecciones de transmisión sexual más reportadas y la resistencia antimicrobiana en *Neisseria gonorrhoeae* (NG) es un desafío para el tratamiento de esta infección. Este estudio observacional tuvo como objetivo describir la resistencia antimicrobiana de NG y los datos epidemiológicos de pacientes con infección gonocócica en ocho regiones de España, con el fin de actualizar las guías terapéuticas locales.

Métodos: se determinaron las CMI₅₀ de penicilina, cefixima, ceftriaxona, azitromicina, ciprofloxacino, fosfomicina y gentamicina mediante la técnica de difusión en gradiente (E-test) de todos los aislados de NG recuperados del 1 de abril de 2018 al 30 de septiembre de 2019 en 10 hospitales de España. Los determinantes clínico-epidemiológicos asociados a resistencia se identificaron mediante análisis de regresión logística. Las diferencias con un valor de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Resultados: Se realizaron pruebas de sensibilidad antimicrobiana de 2571 gonococos aislados de 2429 pacientes. El 44,5% (945/2124) de los pacientes eran HSH. La tasa de resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido fue baja, con el 0,2% (6/2561) de los aislados resistentes a ceftriaxona y el 1,7% (44/2517) resistentes a cefixima. La tasa general de resistencia a la azitromicina fue del 12,1% (310/2560), pero variaba mucho según la región. El 56,2% (1366/2429) de las cepas estudiadas fueron resistentes a ciprofloxacino. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de gentamicina y fosfomicina fueron 4 y 8 mg/L y 24 y 48 mg/L, respectivamente.

Conclusiones: Nuestro estudio muestra que la sensibilidad de NG a las cefalosporinas de espectro extendido sigue siendo alta en España. La tasa de resistencia a azitromicina observada abre el debate sobre el uso de la terapia dual. Este estudio proporciona datos de interés para la actualización de las guías nacionales de tratamiento y destaca la necesidad de desarrollar e implementar un programa nacional de vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana.

Neisseria gonorrhoeae antimicrobial resistance in Spain: a prospective multicentre study

Paula Salmerón ^{1,2,3}, Belén Viñado¹, Mainer Arando^{2,4}, Eva Alcoceba⁵, Beatriz Romero⁶, Blanca Menéndez^{2,7}, Samuel Bernal^{2,8}, Pedro Idigoras⁹, Javier Colomina¹⁰, Gloria Martín-Saco^{2,11}, Álvaro Leal-Negredo^{2,12}, Aurora Torreblanca^{2,13}, Olalla Martínez¹⁴ and Judit Serra-Pladevall ^{1,2,3*}

¹Microbiology Department, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain; ²Sexually Transmitted Infections Study Group (GEITS), Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC), Madrid, Spain; ³Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; ⁴Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain; ⁵Microbiology Department, Son Espases Hospital Universitari, Mallorca, Spain; ⁶Microbiology Department, Ramón y Cajal Hospital Universitari, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ⁷Sandoval Health Centre, San Carlos Hospital Clínico, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain; ⁸Microbiology Department, Virgen de Valme Hospital Universitario, Sevilla, Spain; ⁹Microbiology Department, Donostia Hospital Universitario, San Sebastián, Spain; ¹⁰Microbiology Department, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain; ¹¹Microbiology Department, Miguel Servet Hospital Universitario, Zaragoza, Spain; ¹²Microbiology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; ¹³Microbiology Department, Cabueñes Hospital Universitario, Gijón, Spain; ¹⁴Microbiology Department, La Ribera Hospital Universitario, Valencia, Spain

*Corresponding author. E-mail: jserrapladevall@gmail.com

Received 24 November 2020; accepted 19 January 2021

Objectives: Gonococcal infection is one of the most reported sexually transmitted infections and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* (NG) is challenging for the treatment of this infection. This observational study aimed to describe antimicrobial resistance of NG and epidemiological data from patients with gonococcal infection in eight regions of Spain, for updating the local therapeutic guidelines.

Methods: MICs of penicillin, cefixime, ceftriaxone, azithromycin, ciprofloxacin, fosfomicin and gentamicin were determined by Etest for all NG isolates recovered from 1 April 2018 to 30 September 2019 from 10 hospitals in Spain. Resistance determinants were identified using logistic regression analysis. Differences with a *P* value <0.05 were considered statistically significant.

Results: Antimicrobial susceptibility testing was performed for 2571 gonococci isolated from 2429 patients. 44.5% (945/2124) of patients were MSM. The resistance rate to extended-spectrum cephalosporins was low, with 0.2% (6/2561) of isolates resistant to ceftriaxone and 1.7% (44/2517) of isolates resistant to cefixime. The overall azithromycin resistance rate was 12.1% (310/2560), but differed greatly depending on the area. 56.2% (1366/2429) of the strains studied were ciprofloxacin resistant. MIC₅₀ and MIC₉₀ values of gentamicin and fosfomicin were 4 and 8 mg/L and 24 and 48 mg/L, respectively.

Conclusions: Our study shows that NG susceptibility to extended-spectrum cephalosporins remains high in Spain. The azithromycin resistance rate questions the suitability of dual therapy. This study provides data of interest for updating the national treatment guidelines and highlights the need to develop and implement a national sentinel gonococcal antimicrobial susceptibility programme.

Introduction

Neisseria gonorrhoeae (NG) is the second most reported sexually transmitted bacterial infection, after *Chlamydia trachomatis*, with 106 million new cases every year worldwide.¹ The ECDC reported 100 673 cases of gonococcal infection in the 28 EU/European Economic Area countries in 2018, which represents a rate of 26.4

cases per 100 000 inhabitants and an increase of 22% over the previous year.² In Spain, gonococcal infection is a notifiable disease and 11 044 cases were reported in 2018 (24.2 per 100 000 inhabitants). There are important differences in incidence among the country's regions, with the highest rates registered in Catalunya (61.21 cases per 100 000 inhabitants), the Balearic Islands (40.96

cases per 100 000 inhabitants) and Madrid (39.73 cases per 100 000 inhabitants).³ In addition, with the introduction of pre-exposure prophylaxis for prevention of HIV, a reduction in condom use and an increase in risk-related behaviours have been observed, with a subsequent increased risk of acquisition of sexually transmitted infection (STI) among users.⁴

If left untreated, NG can cause severe health complications, such as pelvic inflammatory disease, infertility and ectopic pregnancy in women and, less frequently, epididymitis in men. Gonococcal infection also facilitates the transmission and acquisition of HIV.^{5,6}

NG is currently a major public health problem worldwide, not only because of its increasing incidence, but also because NG bacteria have developed resistance to all of the antibiotics used over the years for the treatment of NG, making treatment of infection caused by NG challenging. After the detection of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone in Japan in 2009, ceftriaxone-resistant isolates have appeared in many countries in the last decade, including Japan, China, Australia, Singapore, Canada, Argentina and several European countries.⁷ In addition, the ceftriaxone-resistant clone FC428 has spread globally since 2015 and the first XDR strains presenting resistance to ceftriaxone plus high-level azithromycin resistance were isolated in 2018 in the UK and Australia.^{8–10}

Most of the treatment guidelines published since 2012 recommend dual therapy for the treatment of NG with 250–500 mg of ceftriaxone as a single intramuscular dose plus 1–2 g of azithromycin as a single oral dose.^{11,12} Spanish national guidelines also recommend dual therapy (500 mg of ceftriaxone + 1 g of azithromycin) as first-line treatment, although these guidelines have not been revised since 2017.¹³ Unfortunately, the azithromycin resistance rate has been increasing in recent years and therapeutic failures with dual antimicrobial therapy have been reported.^{8,14}

Due to this alarming situation, both the WHO and the ECDC have developed action plans to control the spread of antimicrobial resistance in NG,^{15,16} focusing on testing for this infection and monitoring the antimicrobial susceptibility pattern.

To the best of our knowledge, no extensive data have been published in Spain regarding the resistance rate of NG. Therefore, we present a wide, national-level, cross-sectional description of antibiotic resistance and epidemiological data from patients with gonococcal infection with the aim of determining the current situation of NG infection in Spain in order to update local therapeutic guidelines.

Methods

Study population

This was a prospective, cross-sectional, multicentre study involving 10 healthcare centres that cover most of Spain: (i) three from Eastern Spain [Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit/Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Catalunya), Hospital Universitario Clínico de Valencia (Valencia) and La Ribera Hospital Universitario (Valencia)]; (ii) two from Central Spain [Sandoval Sexually Transmitted Infections Unit/Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) and Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Aragón)]; (iii) one from Southern Spain [Virgen de Valme University Hospital (Sevilla, Andalucía)]; (iv) three from Northern Spain [Hospital Universitario Donostia (Donostia, Euskadi), Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Asturias) and Hospital

Universitario Cabueñes (Gijón, Asturias)]; and (v) one from the Balearic Islands [Hospital Universitario Son Espases (Palma de Mallorca, Illes Balears)]. Most of these centres are third-level public hospitals that also include primary care centres, some of which include specific STI units, such as CAITS in Palma de Mallorca (Balearic Islands), the Sandoval Centre (Madrid) and the Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit in Barcelona (Catalunya), which are STI reference centres located in the regions reporting more than 90% of the gonococcal infection in Spain.¹⁷

Antimicrobial susceptibility testing of all NG isolates collected between 1 April 2018 and 30 September 2019 was performed by the laboratories of the different participating centres, representing 51% of all NG infection detected by nucleic acid amplification tests (NAATs) and/or culture. When gonococci were isolated from multiple sites in the same patient, only the genital culture was included in the study.

Laboratory procedures

Urethral, endocervical, pharyngeal or rectal swabs were inoculated on selective medium. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 48 h. Probable NG strains were identified by oxidase reaction (oxidase positive) and MALDI-TOF MS. Strains were frozen at –80°C in trypticase soy broth with 20% glycerol.

The MICs (mg/L) of ceftriaxone, cefixime, azithromycin, ciprofloxacin, gentamicin and fosfomicin were determined using the gradient diffusion method (Etest, bioMérieux®, France) in GC II AG/W IsoVitaléX medium (Becton Dickinson, France) as described by the CLSI.¹⁸ Results were interpreted in accordance with EUCAST,¹⁹ except for gentamicin and fosfomicin, as there are no established EUCAST cut-off points for these antibiotics. Decreased susceptibility to ceftriaxone (DSC) was considered when the MIC ranged between >0.032 and 0.125.²⁰ NG ATCC 49226 was used as a reference strain for antimicrobial susceptibility testing. β -Lactamase production was detected using the nitrocefin biochemical test (Becton Dickinson, France).

Data collection

Epidemiological and clinical data, including age, gender, sexual behaviour, symptomatology and treatment, were collected from the medical records. Sexual behaviour was defined regarding the gender of sexual partners reported by the patients.

All data related to patients were coded to maintain confidentiality. Each patient was identifiable only by a unique number and the principal investigator of each centre was the owner of this number.

Statistical analysis

Descriptive results are presented as percentages for categorical variables. Baseline characteristics were compared between MSM, heterosexuals and men who have sex with men and women (MSMW) using the Pearson χ^2 test or Fisher's exact test. Crude and adjusted ORs were calculated using logistic regression analysis to identify risk factors for β -lactamase production, cefixime resistance (MIC >0.125 mg/L), azithromycin resistance [epidemiological cut-off (ECOFF) >1 mg/L] and ciprofloxacin resistance (MIC >0.06 mg/L). Variables showing statistically significant differences associated with resistance in the univariate analysis ($P < 0.2$) were then tested in multivariate models. All statistical tests were two-tailed and the threshold of statistical significance was $P < 0.05$. The statistical analyses were performed using Stata software (StataCorp, USA).

Ethics

The study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital (reference number: VHI-CEF-2018-01), as well as all the participating centres. The study was conducted in accordance with the

principles laid out in the Declaration of Helsinki and in accordance with the principles of Good Clinical Practice. Informed consent was not necessary.

Results

Between 1 April 2018 and 30 September 2019 susceptibility testing was performed for 2571 NG isolates from 2429 patients. Sixty-five patients presented two different episodes of infection and nine patients presented three episodes during the study period. Different episodes were established when one patient had a negative result (PCR and/or culture) between the different episodes.

Patient characteristics

Most of the isolates were collected from patients at the Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit/Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona) and the Hospital Universitario Son Espases (Palma de Mallorca) [50.6% (1229/2429) and 12.1% (294/2429), respectively], followed by the Sandoval Sexually Transmitted Infections Unit/Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) [6.8% (175/2249)], the Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla, Andalucía) [6.5% (167/2249)], the Hospital Universitario Donostia (Donostia, Euskadi) [5.6% (143/2249)], the Hospital Universitario Clínico de Valencia (Valencia) [5.5% (141/2249)], the Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Aragón) [4.6% (119/2249)], the Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Asturias) [3.5% (91/2249)], the Hospital Universitario Cabueñes (Gijón, Asturias) [2.6% (66/2249)] and the Hospital Universitario La Ribera (Valencia) [1.2% (31/2249)].

The characteristics of the patients are shown in Table 1. A total of 2124 (87.5%) patients were men with a median age of 31.5 years (range = 16–82), whereas 222 (9.1%) were women with a median age of 30.5 years (range = 15–75), and 44.5% (945/2124) were MSM. Of the 1062 patients for whom nationality data were available, 34.9% (371/1062) were not Spanish. Data about the number of sexual partners in the last 3 months were known for 1065 patients and the proportion of patients reporting >10 sexual partners was significantly higher among MSM (18.3%; 116/634) and MSMW (25.7%; 9/35) than among the heterosexual population (3.7%; 12/327) ($P < 0.0001$). Data about HIV status were known for 1822 patients and the overall prevalence of HIV coinfection was 17.2% (314/1822), being significantly higher in MSMW (17.7%; 11/62) and MSM (30.2%; 273/904) than in heterosexual patients (1.7%; 9/537) ($P < 0.0001$). The heterosexual population was less likely to present other STIs during the last year (19.5%; 93/476) compared with MSM (56.3%; 450/800) or MSMW (42.6%; 23/54) ($P < 0.0001$).

Overall, data about symptomatology were available for 1932 patients, with the vast majority [80.8% (1562/1932)] presenting symptoms, with urethritis being the most frequent clinical presentation (83.2%, 1299/1562). Screening tests performed in high-risk populations detected 14.4% (279/1932) of cases and 4.7% (91/1932) were detected by contact studies.

Sixty-five percent (1670/2571) of the gonococci were isolated from urethral swabs, 17.3% (445/2571) from rectal swabs, 7.0% (181/2571) from vaginal/endocervical swabs and 5.1% (131/2571) from pharyngeal swabs.

Antimicrobial susceptibility of NG isolates

The data on antimicrobial susceptibility are summarized in Table 2. Six out of 2571 isolates (0.2%) were resistant to ceftriaxone, 5 of which presented an MIC of 0.19 mg/L and were detected at the Hospital Universitario Vall d'Hebron (4) and the Hospital Universitario Clínico de Valencia (1) and 1 of which presented an MIC of 0.25 mg/L and was detected at the Hospital Universitario Virgen de Valme. All of the patients from whom these isolates were obtained presented symptoms and information about treatment was available for four: 500 mg of ceftriaxone + 1 g of azithromycin, 240 mg of gentamicin + 2 g of azithromycin, 500 mg of ceftriaxone alone and 2 g of ceftriaxone + 1 g of azithromycin. Follow-up data were not available. The overall proportion of isolates presenting DSC was 12.4% (318/2561).

Resistance to cefixime was found in 44 out of 2517 (1.7%) isolates and 310 (12.1%) showed resistance to azithromycin, while 56.2% (1366/2429) of the strains studied were ciprofloxacin resistant. In addition, 13.3% were penicillinase-producing NG (PPNG). The MIC₅₀ of ceftriaxone and cefixime was 0.016 mg/L for both and the MIC₉₀ was 0.047 and 0.064 mg/L, respectively.

Figure 1 shows the MICs of ceftriaxone (Figure 1a), cefixime (Figure 1b) and azithromycin (Figure 1c) in each geographical region, with 72.6% (1861/2562) and 61.0% (1536/2518) of the isolates presenting an MIC of ceftriaxone and cefixime ≤ 0.016 mg/L, respectively. In relation to azithromycin, the highest proportion of isolates had an MIC of 0.19 mg/L (15.6%).

For gentamicin, MIC₅₀ and MIC₉₀ were 4 and 8 mg/L, respectively, with 57.6% (1094/1899) of the isolates presenting an MIC ≤ 4 mg/L, 42.2% (802/1899) of the isolates presenting an MIC between 8 and 16 mg/L and only 0.2% (3/1899) of the isolates presenting an MIC ≥ 32 mg/L. The EUCAST ECOFF for gentamicin is 16 mg/L and, consequently, only 0.2% of the isolates presented MIC values higher than the ECOFF. The MIC₅₀ and MIC₉₀ of fosfomicin were 24 and 48 mg/L, respectively.

As shown in Figure 2, the resistance rate varied widely depending on the geographical region. The highest proportion of azithromycin-resistant isolates was detected in Euskadi, Madrid and Valencia, with 21.7% (31/143), 15.4% (27/175) and 15.1% (26/172), respectively, and Mallorca presented the highest proportion of cefixime-resistant isolates [3.6% (11/305)].

The proportion of isolates with high-level azithromycin resistance (MIC ≥ 256 mg/L) was 0.1% (3/2561), one of the isolates was from the Hospital Universitario Miguel Servet, one of the isolates was from the Hospital Universitario Vall d'Hebron and one of the isolates was from the Hospital Universitario Clínico de Valencia. Only one of the patients from whom these isolates were obtained reported having had a gonococcal infection in the previous 3 months.

Figure 3 shows that an increase in the proportion of azithromycin-resistant isolates was observed throughout the study period, with a peak in November 2018 and another important increase during the summer of 2019.

Determinants of resistance to cefixime, azithromycin and ciprofloxacin, and β -lactamase production

Univariate and multivariate logistic regression analyses showed that cefixime resistance was significantly less frequent in infections diagnosed in 2019 (OR = 0.26; 95% CI = 0.16–0.44), in MSM

Table 1. Characteristics of the 2429 patients with NG-positive culture grouped by sexual behaviour

		Sexual behaviour ^a				<i>P</i> ^b
		heterosexual (<i>N</i> = 660), <i>n</i> (%) [95% CI]	MSM (<i>N</i> = 945), <i>n</i> (%) [95% CI]	MSMW (<i>N</i> = 62), <i>n</i> (%) [95% CI]	Total (<i>N</i> = 2429), <i>n</i> (%) [95% CI]	
Age (years) ^c	<25	192 (29.31) [25.85; 32.96]	187 (19.89) [17.39; 22.59]	17 (27.87) [17.15; 40.83]	396 (23.91) [21.88; 26.04]	0.00062
	≥25 to <30	141 (21.53) [18.44; 24.88]	216 (22.98) [20.32; 25.80]	12 (19.67) [10.60; 31.84]	369 (17.22) [15.43; 19.12]	
	≥30 to <35	96 (14.66) [12.04; 17.60]	194 (20.64) [18.09; 23.37]	9 (14.75) [6.98; 26.17]	299 (22.28) [20.30; 24.37]	
	≥35	226 (34.50) [30.86; 38.28]	343 (36.49) [33.41; 39.66]	23 (37.70) [25.61; 51.04]	592 (35.75) [33.44; 38.11]	
HIV ^c	no	528 (98.32) [96.84; 99.23]	631 (69.8) [66.69; 72.78]	51 (82.26) [70.47; 90.80]	1,210 (80.51) [78.41; 82.48]	<0.0001
	yes	9 (1.68) [0.77; 3.16]	273 (30.2) [27.22; 33.31]	11 (17.74) [9.20; 29.53]	293 (19.49) [17.52; 21.59]	
STI in the last year ^{c,d}	no	383 (80.46) [76.61; 83.93]	350 (43.75) [40.28; 47.27]	31 (57.41) [43.21; 70.77]	764 (57.44) [54.73; 60.12]	<0.0001
	yes	93 (19.54) [16.07; 23.39]	450 (56.25) [52.73; 59.72]	23 (42.59) [29.23; 56.79]	566 (42.56) [39.88; 45.27]	
Number of sexual partners in the past 3 months ^c	1 to 10	315 (96.33) [93.68; 98.09]	518 (81.7) [78.47; 84.64]	26 (74.29) [56.74; 87.51]	859 (86.24) [83.95; 88.32]	<0.0001
	>10	12 (3.67) [1.91; 6.32]	116 (18.3) [15.36; 21.53]	9 (25.71) [12.49; 43.26]	137 (13.76) [11.68; 16.05]	
Concurrent STI ^{d,e}	no	511 (75.04) [71.61; 78.25]	760 (73.64) [70.84; 76.31]	48 (75) [62.60; 84.98]	1,319 (74.23) [72.13; 76.25]	0.8037
	yes	170 (24.96) [21.75; 28.39]	272 (26.36) [23.69; 29.16]	16 (25) [15.02; 37.40]	458 (25.77) [23.75; 27.87]	

^aPercentage calculated based on the total of heterosexuals, MSM and MSMW.

^b χ^2 test.

^cData relative to patients for which the data were known.

^dSTI in the last year and coinfection included *C. trachomatis* D–K, *C. trachomatis* L1–L3, NG, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma genitalium* and herpes virus.

^eData relative to total of episodes for which the data were known (heterosexual, *n* = 681; MSM, *n* = 1032; MSMW, *n* = 64).

Table 2. Antimicrobial susceptibility testing of NG isolates detected in 10 hospitals in Spain

Antimicrobial	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC range (mg/L)	Susceptibility category (%)					
				S		I		R	
				<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Ceftriaxone ^a	0.016	0.047	<0.016–0.25	2555	99.8	0	0.0	6	0.2
Cefixime ^b	0.016	0.064	<0.016–0.38	2473	98.3	0	0.0	44	1.7
Azithromycin ^c	0.25	1.5	<0.016 to >256	2250	87.9	0	0.0	310	12.1
Ciprofloxacin ^d	0.75	>32	<0.002 to >32	1050	43.2	10	0.4	1366	56.2
Gentamicin	4	8	0.002 to >256	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fosfomicin	24	48	0.094 to >1024	NA	NA	NA	NA	NA	NA

S, susceptible; I, susceptible, increased exposure; R, resistant; NA, not applicable.

^aAntimicrobial susceptibility testing of ceftriaxone was performed for 2561 isolates.

^bAntimicrobial susceptibility testing of cefixime was performed for 2517 isolates.

^cAntimicrobial susceptibility testing of azithromycin was performed for 2560 isolates.

^dAntimicrobial susceptibility testing of ciprofloxacin was performed for 2429 isolates.

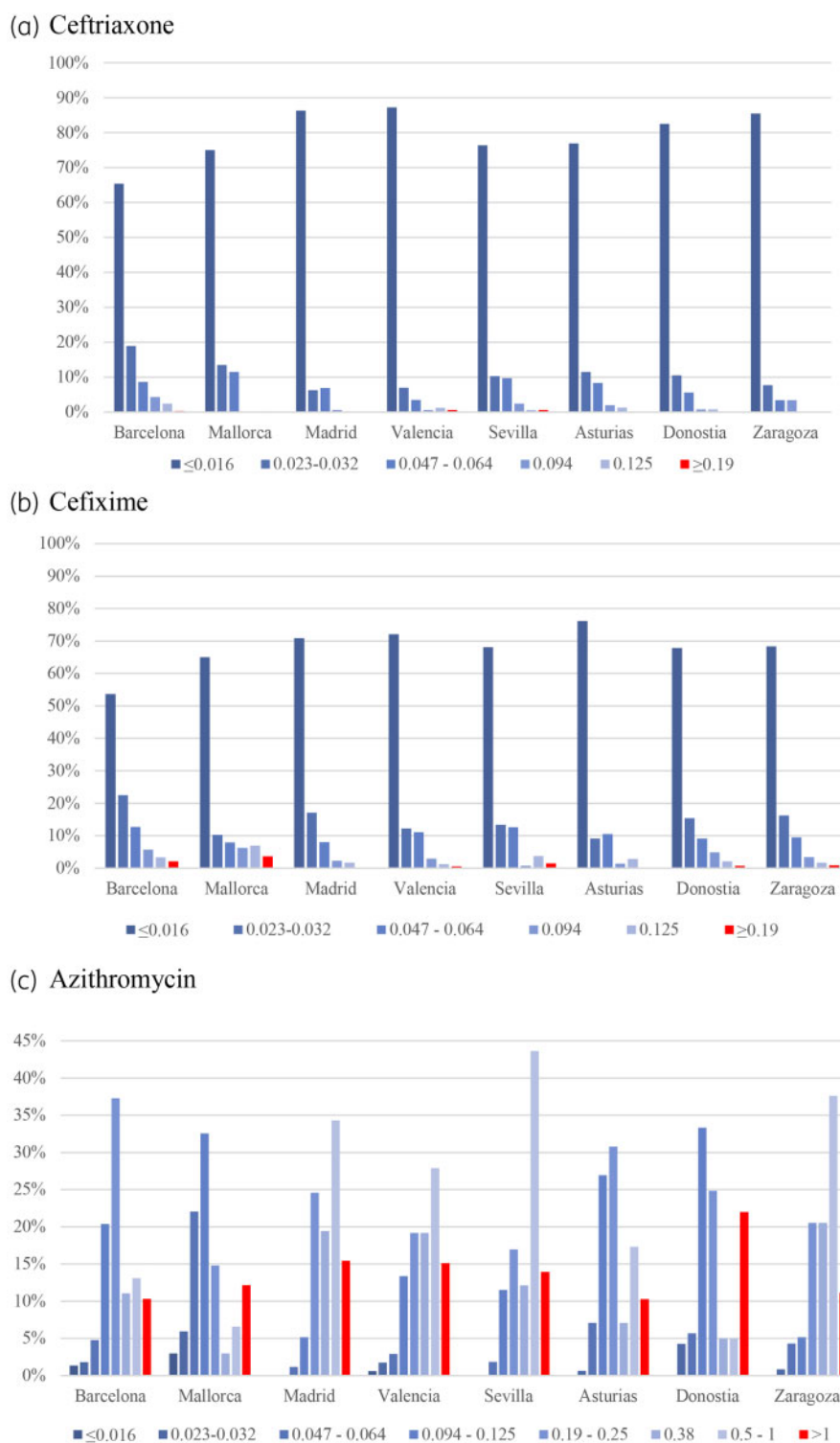
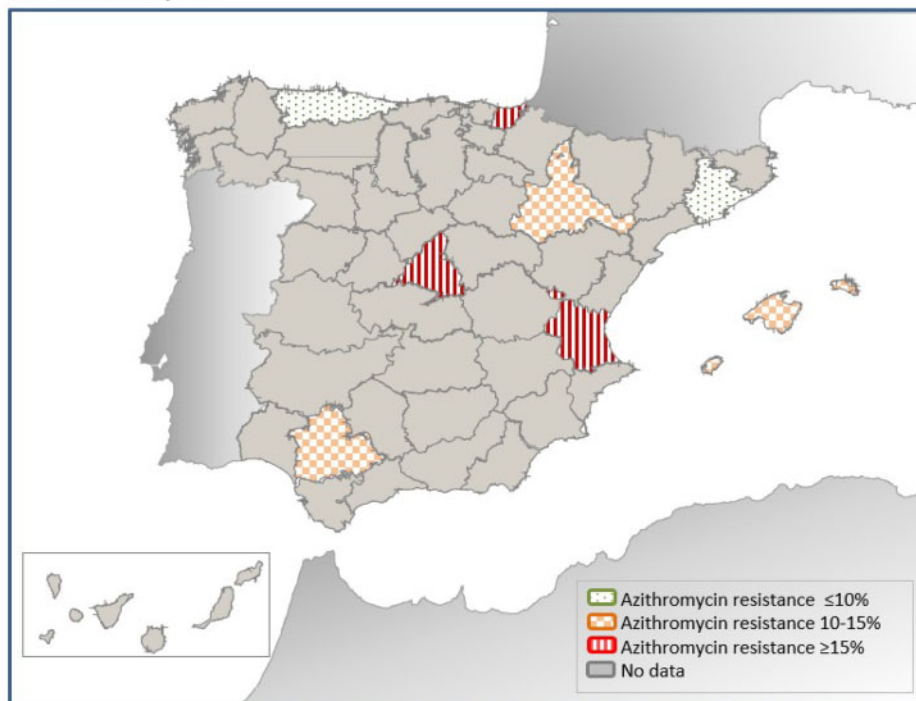


Figure 1. Proportion of NG isolates with different MICs (mg/L) of ceftriaxone (a), cefixime (b) and azithromycin (c) by hospital.

patients (OR=0.38; 95% CI=0.27-0.55) and in HIV-positive patients (OR=0.23; 95% CI=0.12-0.45) (see Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online).

As with cefixime resistance, azithromycin resistance was less frequent in MSM patients (OR=0.49; 95% CI=0.38-0.62) in the univariate and multivariate analyses (see Table S2).

(a) Azithromycin



(b) Cefixime

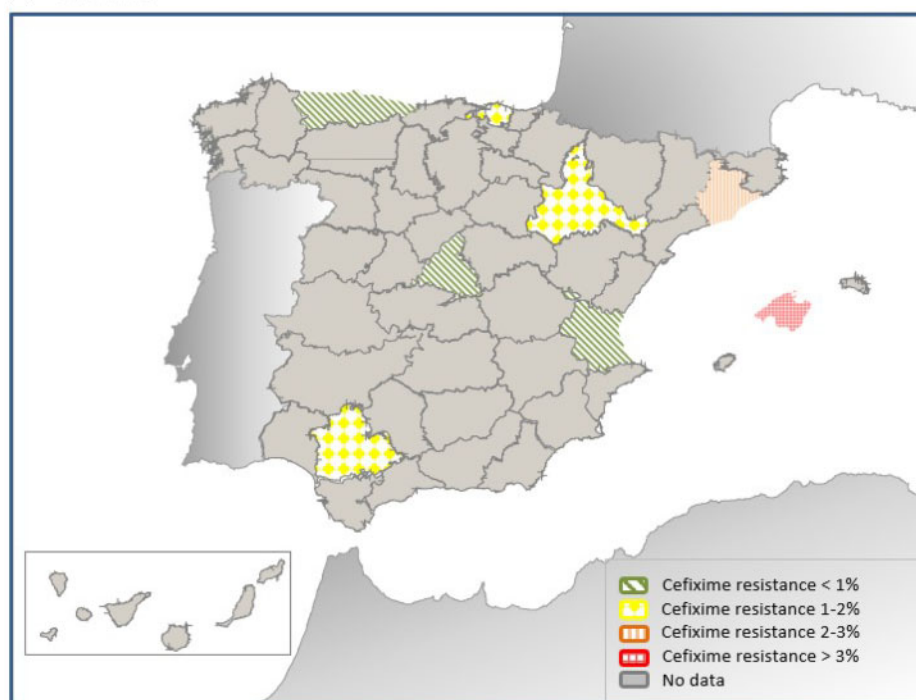


Figure 2. Proportion of NG isolates with azithromycin (a) and cefixime (b) resistance in Spain, April 2018–September 2019. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

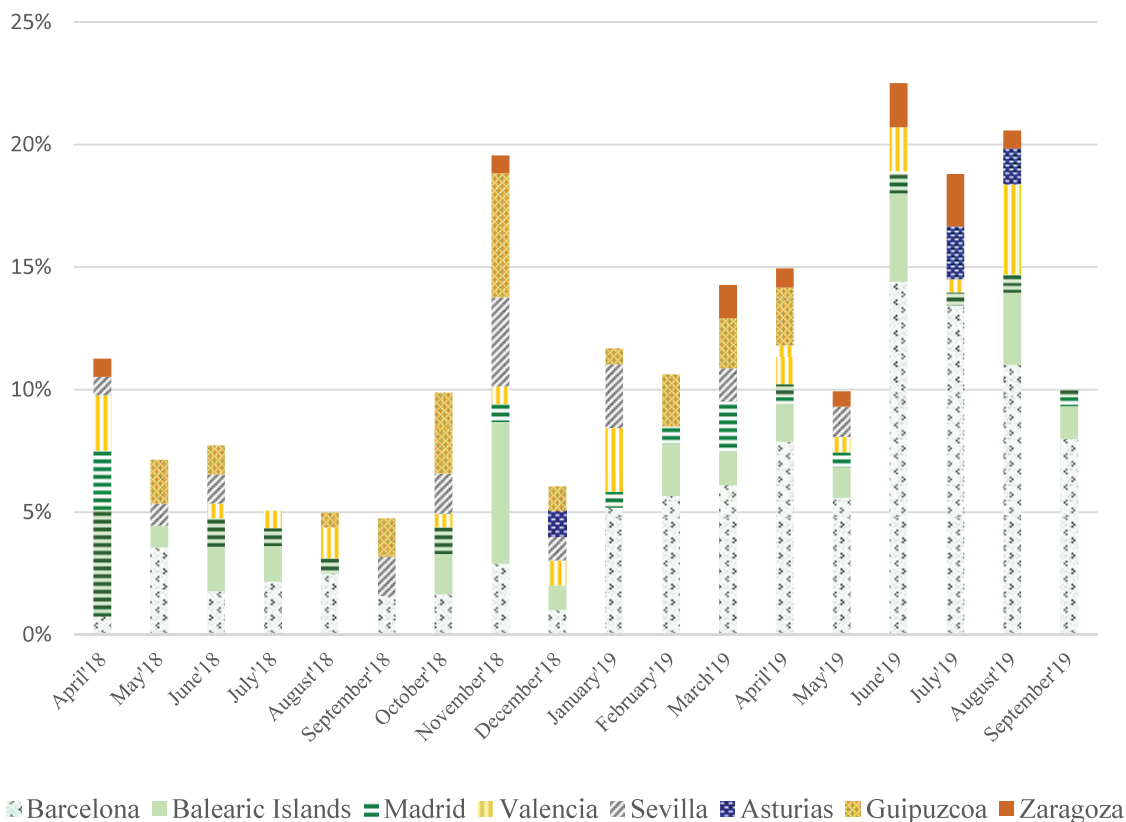


Figure 3. Proportion of NG isolates resistant to azithromycin during the study period. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

On the other hand, univariate and multivariate analyses showed that ciprofloxacin resistance was significantly associated with MSM patients (OR = 1.63; 95% CI = 1.18–2.26) and HIV status (OR = 1.45; 95% CI = 1.27–1.65) (see Table S3).

The PPNG rate was significantly higher in 2019 (OR = 1.29; 95% CI = 1.12–1.49) (see Table S4).

MDR

No isolate showed resistance to both ceftriaxone and azithromycin.

Thirty-seven isolates (11.6%; 37/320) presenting DSC were also resistant to azithromycin and 6.9% (22/320) presenting DSC were also resistant to cefixime.

Antimicrobial treatments

Of the total of 2571 infectious episodes, data on treatment regimens were recorded in 1865 cases (72.5%). Almost one-third of patients (32.8%; 844/2571) were treated with ceftriaxone + azithromycin, but 22.5% (579/2571) of patients were treated with ceftriaxone alone. Other treatment regimens included ceftriaxone + doxycycline (7.4%, 191/2571), cefixime + azithromycin (1.9%, 50/2571), azithromycin alone (1.8%, 47/2571) and others.

Discussion

The present study describes data on antimicrobial resistance of 2571 NG isolates from 10 healthcare centres over a period of 18 months. These centres cover most of Spain: one from Southern Spain (Andalusia), three from Eastern Spain (Valencia and Catalunya), two from Central Spain (Madrid and Zaragoza), three from Northern Spain (Asturias and Euskadi) and one from the Balearic Islands. To the best of our knowledge, this is the first national-level surveillance of antimicrobial resistance of NG in Spain.

Our findings show that the rate of extended-spectrum cephalosporin resistance remains low, being 0.2% for ceftriaxone and 1.8% for cefixime. These results are consistent with previously published data from several European countries.²¹

No high-level ceftriaxone resistance was detected in our study, since all ceftriaxone-resistant strains had MICs of 0.19 or 0.25 mg/L, which are values close to the cut-off point established by EUCAST (MIC >0.125 mg/L).¹⁹ The proportion of isolates presenting DSC in our study (12.5%) was lower than that reported by Day *et al.*²⁰ in 2016 (17.7%).

The overall rate of azithromycin resistance (12.1%) in this study is higher than that reported in previous studies^{21–23} and significant differences were observed between regions, with the lowest found in Asturias and Catalunya and the highest in Euskadi.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/article/76/6/1523/6132746 by guest on 10 January 2024

It is worth noting that although no strain with dual resistance to ceftriaxone and azithromycin was detected in the present study, one strain presented DSC and resistance to azithromycin and cefixime. These concerning antimicrobial susceptibility profiles, along with the detection in 2018 of the first three cases of XDR strains showing resistance to ceftriaxone and high-level resistance to azithromycin in the UK and Australia,¹⁰ and treatment failures using both ceftriaxone and azithromycin,^{8,14} reinforces the need for antimicrobial resistance surveillance programmes for early detection of the emergence of these isolates. Regarding ciprofloxacin, which would be a good treatment alternative if susceptibility can be determined,²⁴ our results show a resistance rate (56.4%) slightly higher than that reported in Europe (46.5%)^{20,21} and much higher than that of other countries, such as the USA (30.1%).²⁵

Although EUCAST has not established cut-off points for gentamicin, Brown *et al.*²⁶ applied criteria based on previous clinical cure and MIC comparisons to define MICs of ≤ 4 mg/L as susceptible, 8–16 mg/L as intermediate susceptibility and ≥ 32 mg/L as resistant for this drug. Based on these criteria, 57.6% of the strains included in our study were susceptible and 42% were intermediate. Even though gentamicin+azithromycin could be a suitable alternative in uncomplicated genital infections, Cole *et al.*²⁷ found a higher treatment failure rate in individuals randomized to receive gentamicin/azithromycin (25/292; 9%) compared with ceftriaxone/azithromycin (7/306; 2%), suggesting that different doses should be used based on the MIC and the site of infection to ensure clearance at all sites of infection.

Fosfomicin could be another therapeutic option for the management of this infection due to its single and oral formulation. In a study by Hauser *et al.*²⁸ in Switzerland, which determined the synergy of fosfomicin and ceftriaxone or azithromycin, fosfomicin was proposed as a strategy for the treatment of gonococcal infections in combination with one of these antimicrobials. It should be noted that the MIC₅₀ and MIC₉₀ for their strains (8 and 16 mg/L respectively) were lower than those of our study (24 and 48 mg/L respectively).

Although both cefixime and azithromycin resistance were less frequent in MSM, ciprofloxacin resistance was significantly associated with MSM. In addition, important differences were observed between the different centres, with the most relevant being those related to azithromycin resistance.

These differences could be due to divergence in treatment patterns or the circulation of different lineages with greater ability to develop antimicrobial resistance. It should be noted that previous studies on the genotyping of NG based on the NG multiantigen sequence typing (NG-MAST) method argue that the most prevalent NG-MAST ST in some regions of Spain, such as Catalunya or Southern Spain, is ST1407,^{29,30} which is associated with resistance or reduced susceptibility to cephalosporins or macrolides. However, Guerrero-Torres *et al.*²² noticed that the most prevalent STs in Madrid were ST5441, ST2318 and ST12547, and, in a European study involving 17 countries, it was reported that ST1407 was the third most prevalent, after ST1992 and ST553.³¹ Furthermore, Serra-Pladevall *et al.*³² found that antimicrobial resistance rates were higher in strains from heterosexual patients and a statistically significant association was observed for heterosexuals and genogroups G2992 ($P=0.0488$) and G1407 ($P=0.0002$).

Further studies on the population dynamics of NG isolates in Spain would help to reliably ascertain the distribution of different genotypes, identify transmission patterns, detect new sources of infection and characterize clones with greater capacity to develop antimicrobial resistance.

One limitation of this study is that antimicrobial susceptibility testing of NG was performed mainly for symptomatic patients, since they were the ones that were sampled for culture. Asymptomatic patients were diagnosed by NAATs. Another limitation is that when NG was isolated in multiple sites in one patient, antimicrobial susceptibility was only studied in genital samples. This is an important limitation as it could lead to the loss of strains with higher MIC values in pharyngeal carriers and, consequently, underestimate antimicrobial resistance. Moreover, there is a lack of demographic and epidemiological information.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first multicentre study in Spain to analyse the antimicrobial susceptibility of a large number of NG strains from different regions of the country. We found that susceptibility to extended-spectrum cephalosporins remains high, although the detection of six ceftriaxone-resistant isolates is of note [four in Barcelona (Hospital Universitari Vall d'Hebron), one in Valencia (Hospital Universitario Clínico de Valencia) and one in Sevilla (Hospital Universitario Virgen de Valme)].

On the other hand, the azithromycin resistance rate significantly increased during the study period, being higher than previously reported.²³ This high resistance rate to azithromycin (12.1%) questions the adequacy of the current empirical treatment recommended in Spain. The data obtained in the present study could be the basis to review and update the national treatment guidelines, which have not been updated since 2017.¹³ Furthermore, our results highlight the need to develop and implement a national sentinel gonococcal antimicrobial susceptibility programme as recommended by the ECDC.³³ Finally, the performance of molecular epidemiology studies at a national level would allow the identification of temporal and geographical changes for the early detection of the emergence and dissemination of new strains.

Acknowledgements

We would like to thank all members of the STI Study Group (GEITS) from Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). We also wish to acknowledge the members of the Statistics and Bioinformatics Unit in Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR).

Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI17/02017) and co-financed by the European Regional Development Fund.

P.S. is supported by a grant from Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Transparency declarations

None to declare.

Author contributions

P.S. and J.S.-P. were involved in the design of this study. B.V., M.A., E.A., B.R., B.M., S.B., P.I., J.C., G.M.-S., A.L.-N., A.T. and O.M. recruited patients

and collected data. P.S. and J.S.-P. were responsible for supervision of the study. All authors were involved in writing the paper and approved the final version.

Supplementary data

Tables S1 to S4 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- WHO. Emergence of Multi-Drug Resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Threat of Global Rise in Untreatable Sexually Transmitted Infections. 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70603/1/WHO_RHR_11.14_eng.pdf.
- ECDC. Gonorrhoea: Annual Epidemiological Report for 2018. 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2018.pdf>.
- Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. *Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones de Transmisión Sexual, 2017*. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación, 2019.
- Kojima N, Davey JK. Pre-exposure prophylaxis for HIV infection and new sexually transmitted infections among men who have sex with men. *AIDS* 2016; **30**: 2251–2.
- Wi T, Lahra MM, Ndowa F *et al*. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: global surveillance and a call for international collaborative action. *PLoS Med* 2017; **14**: e1002344.
- Cohen MS, Hoffman IF, Royce RA *et al*. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. *Lancet* 1997; **349**: 1868–73.
- Unemo M, Seifert HS, Hook EW 3rd *et al*. Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Primers* 2019; **5**: 79.
- Eyre DW, Sanderson ND, Lord E *et al*. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Euro Surveill* 2018; **23**: pii=1800323.
- Jennison AV, Whitley D, Lahra MM *et al*. Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and high-level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. *Euro Surveill* 2019; **24**: pii=1900118.
- ECDC. Extensively Drug-Resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom and Australia. 2018. [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-Gonorrhoea%2C Antimicrobial resistance-United Kingdom%2C Australia.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-Gonorrhoea%2C%20Antimicrobial%20resistance-United%20Kingdom%2C%20Australia.pdf).
- Unemo M, Ross JDC, Serwin AB *et al*. 2020 European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS* 2020; doi: 10.1177/0956462420949126.
- WHO. *WHO Guidelines for the Treatment of Neisseria gonorrhoeae*.
- GeSIDA. DOCUMENTO DE CONSENSO SOBRE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL EN ADULTOS, NIÑOS Y ADOLESCENTES (Marzo 2017). 2017. 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.
- Fifer H, Natarajan U, Jones L *et al*. Failure of dual antimicrobial therapy in treatment of gonorrhoea. *N Engl J Med* 2016; **374**: 2504–6.
- WHO. Global Action Plan to Control the Spread and Impact of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. 2012. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44863/9789241503501_eng.pdf;jsessionid=4F8FD25D4C480253E4A08A27E2966298?sequence=1.
- ECDC. Response Plan to Control and Manage the Threat of Multi- and Extensively Drug-Resistant Gonorrhoea in Europe. 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/multi-and-extensively-drug-resist-ant-gonorrhoea-response-plan-Europe-2019.pdf>.
- Centro Nacional de Epidemiología. ENFERMEDADES DE DECLARACIÓN OBLIGATORIA. CASOS NOTIFICADOS POR COMUNIDADES AUTÓNOMAS Y TASAS POR 100.000 Habitantes. ESPAÑA 2017. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/OTROS%20INFORMES/RENAVE_EDO_2017.pdf.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing—Twenty-Ninth Edition: M100*. 2019.
- EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 9.0. 2019. <http://www.eucast.org>.
- Day MJ, Spiteri G, Jacobsson S *et al*. Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC Infect Dis* 2018; **18**: 609.
- ECDC. *Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Europe – Results Summary 2017*. 2019.
- Guerrero-Torres MD, Menéndez MB, Guerras CS *et al*. Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016. *Epidemiol Infect* 2019; **147**: e274.
- Salmerón P, Viñado B, El Ouazzani R *et al*. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona during a five-year period, 2013 to 2017. *Euro Surveill* 2020; **25**: pii=1900576.
- Melendez JH, Hsieh YH, Barnes M *et al*. Can ciprofloxacin be used for precision treatment of gonorrhoea in public STD clinics? Assessment of ciprofloxacin susceptibility and an opportunity for point-of-care testing. *Pathogens* 2019; **8**: 189.
- CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017: Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP) Supplement & Profiles. 2019. https://www.cdc.gov/std/stats17/gisp2017/docs/gisp_2017_supplement_final_2019.pdf.
- Brown LB, Krysiak R, Kamanga G *et al*. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis* 2010; **37**: 169–72.
- Cole MJ, Tan W, Fifer H *et al*. Gentamicin, azithromycin and ceftriaxone in the treatment of gonorrhoea: the relationship between antibiotic MIC and clinical outcome. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 449–57.
- Hauser C, Hirzberger L, Unemo M *et al*. *In vitro* activity of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or azithromycin against clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 1605–11.
- Serra-Pladevall J, Barberá MJ, Rodríguez S *et al*. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Barcelona: *penA*, *ponA*, *mtrR*, and *porB* mutations and NG-MAST sequence types associated with decreased susceptibility to cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; **35**: 1549–56.
- Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Avivar C. Typing and antimicrobial susceptibility of 134 *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain. *Rev Esp Quimioter* 2019; **32**: 114–20.
- Jacobsson S, Golparian D, Cole M *et al*. WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC >2 mg/L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe from 2009 to 2014. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 3109–16.
- Serra-Pladevall J, Barberá MJ, Callarisa AE *et al*. Differences in *Neisseria gonorrhoeae* population structure and antimicrobial resistance pattern between men who have sex with men and heterosexuals. *Epidemiol Infect* 2017; **145**: 379–85.
- European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP). <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/euro-gasp>.

4.4 Publicación 4: Epidemiología molecular y resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en España: un estudio prospectivo multicéntrico

Título original: Genome-based epidemiology and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Spain: a prospective multicentre study

Autores: P. Salmerón, C. Buckley, M. Arando, E. Alcoceba, B. Romero, P. Clavo, D. Wwhiley, J. Serra-Pladevall

Revista: Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.

Factor de impacto: 9.2 (año 2023)

Fecha de publicación: Agosto 2023

DOI: 10.1111/jdv.19458

Introducción: La secuenciación del genoma completo de aislados de *Neisseria gonorrhoeae* junto con datos epidemiológicos de los pacientes y datos fenotípicos de sensibilidad proporciona una mejor comprensión de la dinámica de la población.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue investigar la epidemiología molecular de aislados de *N. gonorrhoeae* de tres centros en España y determinar su asociación con la resistencia antimicrobiana.

Métodos: La caracterización genética se realizó en 170 aislados de *N. gonorrhoeae*. WGS se realizó con la plataforma HiSeq (Illumina). Los ensamblajes del genoma se analizaron según la base de datos PubMLST *Neisseria* para determinar los secuenciotipos de NG-MAST, MLST y NG-STAR. Los genes de resistencia a los antimicrobianos y las mutaciones puntuales se identificaron con PubMLST *Neisseria*. La comparación filogenética se basó en el análisis de polimorfismo de un solo nucleótido de todo el genoma.

Resultados: Se detectaron 26 secuenciotipos MLST, 49 NG-MAST y 41 NG-STAR, siendo los más prevalentes MLST ST9363 (27,1%), NG-MAST ST569 (12,4%) y NG-STAR ST193 (14,7%). El análisis filogenético identificó 13 clados que agrupan el 69% de los aislamientos, dos de ellos de especial interés: uno contenía todos los aislados resistentes a cefixima de Barcelona que presentaban un mosaico X en el gen *penA* y pertenecían a MLST ST7363 y el otro formado por aislados resistentes a azitromicina de Mallorca que poseían la mutación C2611T en los cuatro alelos del gen 23S ARNr pertenecientes a MLST ST1901.

Conclusiones: La población de *N. gonorrhoeae* es bastante heterogénea en España. Nuestros resultados concuerdan con datos previos publicados en Europa, aunque con algunas diferencias en la distribución entre regiones. Este estudio describe la circulación de dos poblaciones gonocócicas con un perfil de resistencia específico y tipo de secuencia en un área geográfica específica. WGS es una herramienta eficaz para la vigilancia epidemiológica de la infección gonocócica y la detección de genes de resistencia.

ORIGINAL ARTICLE

Genome-based epidemiology and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Spain: A prospective multicentre study

P. Salmerón^{1,2,3}  | C. Buckley⁴ | M. Arando^{2,5} | E. Alcoceba⁶ | B. Romero^{7,8} | P. Clavo⁹ | D. Whiley⁴ | J. Serra-Pladevall^{2,10,11,12}

¹Microbiology Department, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

²Sexually Transmitted Infections Study Group (GEITS), Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Madrid, Spain

³Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

⁴University of Queensland, UQ Centre for Clinical Research (UQCCR), Herston, Queensland, Australia

⁵Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain

⁶Microbiology Department, Son Espases Hospital Universitari, Mallorca, Spain

⁷Microbiology Department, Ramón y Cajal Hospital Universitario, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

⁸CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain

⁹Sandoval Health Centre, San Carlos Hospital Clínico, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

¹⁰Clinical Laboratory, Hospital Universitari de Vic, Catalonia, Spain

¹¹Faculty of Health Sciences, Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya (UVIC-UCC), Vic, Spain

¹²Multidisciplinary Inflammation Research Group (MIRG), Fundació Institut de Recerca i Innovació en Ciències de la Vida i de la Salut de la Catalunya Central, Vic, Spain

Correspondence

J. Serra-Pladevall, Microbiology Department, Hospital Universitari de Vic, Carrer Francesc Pla el Vigatà, 1. Vic 08500, Spain.
Email: jserrapladevall@gmail.com

Funding information

Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: PI17/02017; Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Abstract

Background: Whole-genome sequencing (WGS) of *Neisseria gonorrhoeae* isolates combined with epidemiological and phenotypic data provides better understanding of population dynamics.

Aim: The objective of this study was to investigate the molecular epidemiology of *N. gonorrhoeae* isolates from three centres in Spain and determine associations of antimicrobial resistance.

Methods: Genetic characterization was performed in 170 *N. gonorrhoeae* isolates. WGS was carried out with the HiSeq platform (Illumina). Genome assemblies were submitted to the PubMLST *Neisseria* database website to determine NG-MAST, MLST and NG-STAR. Antimicrobial resistance genes and point mutations were identified with PubMLST. Phylogenomic comparison was based on whole-genome single nucleotide polymorphism analysis.

Results: Twenty-six MLST, 49 NG-MAST and 41 NG-STAR sequence types were detected, the most prevalent being MLST-ST9363 (27.1%), NG-MAST ST569 (12.4%) and NG-STAR ST193 (14.7%). Phylogenetic analysis identified 13 clusters comprising 69% of the isolates, with two of note: one involved cefixime-resistant isolates from Barcelona presenting a mosaic *penA* X and belonging to MLST-ST7363 and the other involved azithromycin-resistant isolates from Mallorca that possessed the C2611T mutation in the four 23S rRNA alleles belonging to MLST-ST1901.

Conclusion: The population of *N. gonorrhoeae* is quite heterogeneous in Spain. Our results agree with previous data published in Europe, albeit with some differences in distribution between regions. This study describes the circulation of two gonococcal populations with a specific resistance profile and sequence type in a specific geographic area. WGS is an effective tool for epidemiological surveillance of gonococcal infection and detection of resistance genes.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2023 The Authors. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of European Academy of Dermatology and Venereology.

INTRODUCTION

Gonococcal infection is a major public health problem. It is the second most reported sexually transmitted bacterial infection, after *Chlamydia trachomatis*, with 87 million new cases every year worldwide.¹ The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) reported 100,673 cases of gonococcal infection in the 28 European Union/European Economic Area (EU/EEA) countries in 2018, representing a rate of 26.4 cases per 100,000 inhabitants and an increase of 22% over the previous year.²

In Spain, 12,359 cases of gonococcal infection were reported in 2019 (28.88 per 100,000 inhabitants), with differences in incidence among the different regions of the country, with the highest rates registered in Catalunya (75.26 cases per 100,000 inhabitants) and the Balearic Islands (35.38 cases per 100,000 inhabitants). The incidence of gonococcal infection has increased almost 13-fold since 2004, when 980 cases were reported (2.47 cases per 100,000 inhabitants).³

NG has developed resistance to all the antibiotics used over the years for its treatment, and there are concerns that gonorrhoea may become an untreatable infection.⁴ Currently, extended-spectrum cephalosporins are the last-line treatment option for gonococcal infection. However, in the last two decades resistance has continued to emerge and cefixime is no longer recommended due to widespread resistance^{5–7} and numerous, albeit sporadic, cases of ceftriaxone-resistant strains have been detected in Japan,⁸ Spain,⁹ France,⁷ Australia¹⁰ and Canada.¹¹ In order to prevent the spread of ceftriaxone-resistant strains, since 2012 most guidelines recommend dual therapy with ceftriaxone 250–500 mg as a single intramuscular dose plus azithromycin 1–2 g as a single oral dose to treat non-complicated gonococcal infections.^{12–14} Unfortunately, the rate of resistance to azithromycin has subsequently risen in recent years,^{15,16} and therapeutic failure with dual-antimicrobial therapy has been reported.^{17,18} In addition, the emergence of a strain exhibiting ceftriaxone-resistance as well as high-level resistance to azithromycin has recently been detected.¹⁹ These trends raise questions over the ongoing utility of azithromycin for the treatment of gonorrhoea. Actually, most of current treatment guidelines recommend monotherapy with ceftriaxone as a single intramuscular dose.^{20–22}

A surveillance network for NG resistance is necessary for controlling the infection both nationally and internationally. Thus, the European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP) was implemented by the ECDC to analyse data from 25 EU/EEA member states, including Spain. Likewise, the study and surveillance of the molecular epidemiology of NG helps to understand the distribution of this bacterium and associate this information with the epidemiological characteristics of the patients and susceptibility data.

To date, data on the molecular epidemiology of NG in Spain are scarce and focused on regional data,^{23–25} and most data are only based on NG multi-antigen sequence typing (NG-MAST) which has important limitations, including insufficient resolution to identify closely related clones or to assess

transmission events.²⁶ In contrast, the use of whole-genome sequencing (WGS) in conjunction with epidemiological and phenotypical data enhances understanding of the distribution and spread of antimicrobial-resistant clades allowing the identification of short-term transmission chains.²⁷ Therefore, WGS is becoming the reference method for genomic surveillance of antimicrobial-resistant pathogens, including NG.

To our knowledge, no extensive data have been published in Spain regarding the molecular epidemiology of NG. Therefore, we present a wide, national-level, cross-sectional description of the genomic gonococcal population in Spain and the association with antimicrobial resistance and epidemiological and demographical data using WGS to identify the mechanisms of antimicrobial resistance and to establish the genomic epidemiology.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This study is part of a nationwide project carried out in Spain, with the aim to investigate the antimicrobial susceptibility of NG in Spain and characterize the population dynamics of this pathogen (PI-17/02017).

Whole-genome sequencing analysis was performed in isolates detected in three hospitals (Figure 1): the Drassanes-Vall d'Hebron Sexually Transmitted Infections Unit/Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Catalunya), Son Espases University Hospital (Palma de Mallorca, Illes Balears) and the Sandoval Sexually Transmitted Infections Unit/Ramón y Cajal University Hospital (Madrid). These hospitals include specific sexual transmission infection (STI) units located in the regions of Spain with the highest rates of gonococcal infection, which represents the 69.5% of the isolates included in the project. Moreover, the Drassanes-Vall d'Hebron STI Unit and the Sandoval STI Unit are reference centres for the management of STIs in Spain attending a large number of patients. Son Espases University Hospital is located on the island of Mallorca and has a STI Unit that cares for the entire population of the island.

From April 18 to September 19, 30 cefixime-resistant (MIC > 0.125 mg/L) and 57 azithromycin-resistant isolates (MIC > 1 mg/L) were included in the study; note these included 1 isolate resistant to both cefixime and azithromycin. The remaining isolates (N = 84) were selected in order to include representative isolates from both men and women and detected in the three centres.

The sociodemographic characteristics of the patients were collected by review of medical records.

Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations (MICs, mg/L) of ceftriaxone, cefixime, azithromycin and ciprofloxacin were determined using the gradient diffusion method (Etest,



FIGURE 1 Regions of Spain included in the study.

bioMérieux) in GC II AG/W IsoVitalEx medium (Becton Dickinson) as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute. MIC values were interpreted in accordance with the clinical breakpoints stated by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).²⁸ Quality control was performed using the NG reference strain ATCC 49226.

DNA extraction

A single colony from each isolate was cultured on chocolate agar PolyViteX (bioMérieux), incubated at 37°C and enriched with 5% CO₂ for 18–24 h. DNA extraction was performed using a DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Whole-genome sequencing

Sequencing libraries were prepared using the Illumina Nextera XT protocol and sequenced on the Illumina HiSeq2500 instrument (AGRF). The Illumina raw sequence reads were assessed for quality using FASTQC v0.72.²⁹ A minimum read length of 100 bp was maintained, and bases with an average quality of 30 were trimmed using Trimmomatic v0.36.6.³⁰ Sequencing reads were assembled de novo using SPAdes v3.12.0.³¹

Read mapping and phylogenetic analysis

Delineation of NG isolate phylogeny was achieved by read mapping to the NG NCCP11945 reference genome (GenBank accession NC_011035.1), and core single nucleotide

polymorphisms (SNPs) were subsequently identified using the variant calling tool Snippy 4.5.0.³² Recombinant regions were removed by Gubbins v0.1.0.³³ The maximum-likelihood phylogenetic tree based on SNPs was obtained with IQ-Tree (version 1.5.5.3), and tree annotation with relevant metadata was done with the interactive tree of life (ITOL) tool (version 6.5.8).

MLST, NG-MAST and sequence typing for antimicrobial resistance (NG-STAR) were determined by submitting genome assemblies to the PubMLST Neisseria database website (<http://pubmlst.org/neisseria/>).³⁴ A genotype (G) was defined when the combination of MLST, NG-MAST and NG-STAR sequence types was the same. A cluster (C) was defined as a group of three or more isolates that belong to the same MLST and have SNP differences < 180.

Nucleotide sequence accession numbers

The complete genomes of the 170 NG isolates from this study are available at DDBJ/ENA/Genbank under Bioproject number PRJNA752809.

RESULTS

Overview of isolates and patient information available

Between April 2018 and September 2019, WGS of 173 isolates was performed: 65 were detected in the Drassanes-Vall d'Hebron STI Unit/Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona), 48 in the Sandoval STI Unit/Ramón y Cajal University Hospital (Madrid) and 60 in Son Espases University

Hospital (Mallorca). Two were excluded from the study when WGS revealed that they were not NG but *Haemophilus influenzae* and another strain was removed due to sequencing failure. Finally, 170 samples from 170 patients were included. The gender of the patients was reported for 158 (92.9%), and the age of 156 (91.8%) patients was known. Among these patients, 137 (86.7%) were men. The median age was 31 years (range 16–66) for men and 28 years (range 17–48) for women. The sexual behaviour of 142 (83.5%) patients was reported, 76 (53.5%) of whom were heterosexual men and women, 62 (43.7%) were men who have sex with men (MSM) and 4 were men who have sex with men and women (MSMW).

Sequence analyses

Table S1 shows the MLST, NG-MAST and NG-STAR sequence types, as well as the sociodemographic characteristics of the patients, antimicrobial resistance and clustering information.

Twenty-six MLST, 49 NG-MAST and 41 NG-STAR sequence types were detected, grouped in 80 different genotypes. The most prevalent were MLST-ST9363, found in 46 isolates (27.1%), NG-MAST ST569, found in 21 (12.4%), and NG-STAR ST193, found in 25 (14.7%).

Phylogenetic analysis identified 13 clusters (C1 to C13) that comprised 68.8% (117/170) of the isolates (Figure S1). The maximum core SNP differences among genomes in each cluster, C1 to C13 respectively, were 141, 54, 178, 70, 91, 13, 126, 159, 120, 14, 39, 123 and 28 SNPs. Characteristics of these clusters are summarized in Table 1.

Thirty cefixime-resistant strains were included, 15 of which had the mosaic *penA* X and 10 isolates presented the mosaic *penA* XXXIV, with all presenting the amino acid mutations I312M, V316T and G545S. Regarding the other five isolates, two carried the non-mosaic *penA* XLIII and A501V mutation and the other three the non-mosaic *penA* V and A501V mutation. Six of the 30 isolates showed G120K and A121N/D mutations in *porB1b* and 23 a L421P mutation in the *ponA* gene.

We detected three clusters (C4, C5 and C10) formed by cefixime-resistant isolates. Cluster 4 was made up of four isolates from heterosexual patients from Barcelona who belonged to the MLST-ST7359/NGMAST-ST4186/NG-STAR-ST2171 (mean SNP number of 21.6; range 16–26), three of which showed resistance to cefixime. The remaining isolate presented a MIC of 0.125 mg/L. All four presented mosaic *penA* XXXIV and possessed I312M, V316T, N512Y and G545S mutations in *penA*. Cluster 5 was composed of 15 isolates resistant to cefixime and ciprofloxacin, which were susceptible to azithromycin but showed decreased susceptibility to ceftriaxone. All carried the mosaic *penA* X allele and possessed V316T; D345A; F504L; G545S mutations in the *penA* gene. Thirteen out of 15 were from Barcelona and 8 out of 10 in which information about sexual behaviour was available were MSM. All the isolates belonged to MLST-ST7363 and NG-STAR-ST710. Cluster 10 was formed

by three strains that showed the same susceptibility profile as C5 and were also isolated from heterosexuals in Barcelona but presented different mutations (the mosaic XXXIV *penA* allele and G120K, A121N in the *porB* gene) and belonged to different sequence types (MLST-ST1901/NGMAST-ST2212/NGSTAR-ST90).

Twenty-four strains showed decreased susceptibility to ceftriaxone (DSC; MICs=0.064–0.125). Fifteen were also cefixime-resistant since the mutations described above are responsible for broad-spectrum cephalosporin resistance and they were grouped in the same clusters (C5 and C10).

Cluster 2 was formed by four strains isolated from men in Barcelona (two MSM, one heterosexual and one man with unknown sexual behaviour) and belonged to MLST-ST7827 and NGSTAR-ST38. These four isolates with DSC contained the non-mosaic type XIII *penA* allele and all four carried the A501V mutation in the *penA* gene and G120K and A121D mutations in *porB1b* and L421P in the *ponA* gene.

Fifty-seven isolates were azithromycin resistant. Only one had high-level resistance (MIC \geq 256 mg/L) and presented the A2059G (*Escherichia coli* numbering) mutation in all four alleles of the 23S rRNA gene. At least, 45.6% (26/57) of azithromycin-resistant isolates (MIC 2–16 mg/L) presented the C2611T (*E. coli* numbering) mutation in all four alleles of the 23S rRNA gene and carried the –35A deletion in the *mtrR* promoter. Among the azithromycin-resistant isolates, 49.1% (28/57) belonged to MLST-ST9363, followed by ST1901 (38.6%; 22/57).

Cluster 13 consisted of 21 isolates from Mallorca with the same resistance profile, being resistant to azithromycin (MIC=1.5–12 mg/L) and ciprofloxacin and susceptible to cefixime and ceftriaxone. All belonged to MLST-ST1901 and NGMAST-ST569 and carried the S91F and D95G substitution in *gyrA* that confer resistance to fluoroquinolones and C2611T (*E. coli* numbering) mutation in the four alleles of 23S rRNA. In addition, all these isolates showed the –35A deletion in the *mtrR* promoter associated with azithromycin resistance. The sexual orientation of 14 patients belonging to this cluster was known, and all were heterosexual men or women.

Cluster 7 included 35 isolates, all of which belonged to MLST-ST9363. The antimicrobial resistance profile as well as the origin of isolates was more heterogeneous, but most of the patients (68.6%; 24/35) were heterosexual. Of the 35 isolates, 23 were azithromycin-resistant. Three had the C2611T mutation in all four 23S rRNA alleles while the remaining isolates presented the A39T mutation in the *mtrR* gene.

Ciprofloxacin resistance was detected in 88 isolates, all of which contained a *gyrA* S91F substitution.

Cluster 1 was made up of eight isolates from Barcelona and Madrid, and all but one were detected in MSM. These isolates were susceptible to the two antimicrobials used in dual empirical therapy (ceftriaxone and azithromycin) and were resistant to ciprofloxacin and two showed resistance to cefixime.

TABLE 1 Characteristics of clusters detected in the study.

Cluster (N)	MLST	Sexual orientation (N; %)	Region (N; %)	AZM (N; %)	CRO (N; %)	CFM (N; %)	CIP (N; %)
1 (8)	1583	MSM (7; 87.5) Unknown (1; 12.5)	Barcelona (4; 50) Madrid (4; 50)	S (8; 100)	S (8; 100)	S (6; 75) R (2; 25)	R (8; 100)
2 (4)	7827	MSM (2; 50) MSW (1; 25) Unknown (1; 25)	Barcelona (4; 100)	S (4; 100)	S (4; 100)	S (4; 100)	R (4; 100)
3 (3)	8143	MSM (2; 66.7) MSMW (1; 33.3)	Madrid (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)	R (3; 100)
4 (4)	7359	MSW (4; 100)	Barcelona (4; 100)	S (4; 100)	S (4; 100)	S (1; 25) R (3; 75)	S (4; 100)
5 (15)	7363	MSM (2; 13.3) MSW (8; 53.3) Unknown (5; 33.3)	Barcelona (13; 86.7) Mallorca (2; 13.3)	S (15; 100)	S (15; 100)	R (15; 100)	R (13; 86.7) Unknown (2; 13.3)
6 (3)	1599	MSM (3; 100)	Madrid (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)
7 (35)	9363	MSM (3; 8.6) MSW (18; 51.4) MSMW (1; 2.9) Women (6; 17.1) Unknown (7; 20)	Barcelona (3; 8.6) Madrid (8; 22.8) Mallorca (24; 68.6)	R (23; 65.7) S (12; 34.3)	S (32; 91.4) R (3; 8.6)	S (32; 91.4) R (3; 8.6)	R (7; 20) S (11; 31.4) Unknown (17; 48.6)
8 (3)	1599	MSM (2; 6.7) Women (1; 3.3)	Barcelona (1; 33.3) Madrid (2; 66.7)	S (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)
9 (4)	13,292	MSM (1; 25) MSW (1; 25) MSMW (1; 25) Women (1; 25)	Barcelona (3; 75) Madrid (1; 25)	S (4; 100)	S (4; 100)	S (4; 100)	S (4; 100)
10 (3)	1901	MSW (2; 66.7) Women (1; 33.3)	Barcelona (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)	R (3; 100)	R (3; 100)
11 (3)	11,706	MSM (3; 100)	Barcelona (2; 66.7) Madrid (1; 33.3)	S (3; 100)	S (3; 100)	S (3; 100)	R (3; 100)
12 (11)	7822	MSM (6; 54.5) MSW (4; 36.4) Women (1; 9.1)	Barcelona (7; 63.6) Madrid (4; 36.4)	R (3; 27.3) S (8; 72.7)	S (11; 100)	S (10; 90.9) R (1; 9.1)	R (11; 100)
13 (21)	1901	MSW (10; 47.6) Women (4; 19.1) Unknown (7; 33.3)	Mallorca (21; 100)	R (21; 100)	S (18; 85.7) Unknown (3; 14.3)	S (18; 85.7) Unknown (3; 14.3)	S (13; 61.9) Unknown (8; 38.1)

In bold: when 100% of the isolates in a cluster are resistant.

Abbreviations: AZM, Azithromycin; CFM, Cefixime; CIP, Ciprofloxacin; CRO, Ceftriaxone; MLST, multi locus sequence typing; MSM, men who have sex with men; MSMW, men who have sex with men and women; MSW, men who have sex with women; R, resistant; S, susceptible.

Finally, cluster 12 included seven isolates from Barcelona and four from Madrid. All carried mutations S91F and D65A in *gyrA* and belonged to MLST-ST7822. Three of these isolates were resistant to azithromycin and presented an adenine deletion within the *mtrR* promoter.

Genomic epidemiology

On analysing data from each region, we found that the distribution was much more heterogeneous in Madrid and Barcelona than in Mallorca. Seventeen different MLST-STs were detected in Madrid, with ST9363 (25.0%; 12/48) followed by ST1583 (10.4%; 5/48) being the most prevalent. The most prevalent NGSTAR-ST was ST193 (16.7%; 8/48). On the contrary, 24 different NGMAST-STs were detected without finding any dominant ST.

Barcelona was the region with the greatest heterogeneity, detecting a higher number of different NG-MAST, NG-STAR and MLST with 26, 24 and 19, respectively. The most prevalent MLST-ST was ST7363 (20.6%; 13/63) and NG-STAR-ST was ST710 (19%; 12/63).

On the contrary, in Mallorca we only detected seven different MLST-STs, being ST9363 the most prevalent (45.8%; 27/59) followed by ST1901 (39.0%; 23/59). We observed 15 different NGMAST-STs, the most frequent being ST569 (35.6%; 21/59). At least 25.4% (15/59) of the isolates detected in Mallorca belonged to NG-STAR ST193.

Regarding the distribution of NG according to the sexual orientation of the patients, 21.1% (16/76) of the strains detected in heterosexual men and women belonged to genotype 53 (MLST ST9363/NG-MAST ST6765/NGSTAR ST193). On the contrary, no predominant genotype was observed in MSM, with the distribution of NG in this group being more heterogeneous.

DISCUSSION

The present study describes data on the molecular epidemiology of 170 NG isolates from three healthcare centres from Spain over a period of 18 months. To the best of our knowledge, this is the first national-level surveillance of gonococcal molecular epidemiology in Spain.

Along the 170 isolates, we described 26 different MLSTs, 49 different NG-MAST-ST and 41 NG-STAR-STs. The most common MLSTs were ST9363 and ST1901, followed by ST7363. This is in agreement with data recently published by Sánchez-Busó et al.³⁵ who analysed 2375 gonococcal isolates from the Euro-GASP 2018 survey, and reported that the most prevalent MLST was ST9363.

Previous studies on the molecular epidemiology of NG published in Spain are based on NGMAST, with G1407, G2992 and G2400 being the most prevalent genotypes in Southern Spain,²⁵ Northern Spain²⁴ and Madrid,³⁶ respectively. The only study in which WGS was used was that by Francés-Cuesta et al.³⁷ (data not published), which included 342 isolates from several areas of the national territory. MLST-ST1901 and ST7363 were the most prevalent in agreement with our results.

In addition, in our study ST1901 and ST7363 were the most prevalent MLSTs along with cefixime-resistant strains (16.7% and 50%, respectively), which agrees with the data published by De Korne-Elenbaas et al.,³⁸ in which these STs were related to reduced susceptibility to ceftriaxone. On the contrary, MLST-ST9363 was related to an outbreak of high-level azithromycin resistance strains in Barcelona between 2016 and 2018, with this ST only being detected in MSM.³⁹

We detected a cluster from Barcelona formed by four strains belonging to MLST-ST7827, all of which contained a non-mosaic *penA* XIII determinant and showed decreased susceptibility to ceftriaxone. MLST-ST7827 was the most prevalent in China from 2012 to 2013, as reported by the China Gonococcal Resistance Surveillance Programme (China-GRSP).⁴⁰ A few years later (2016–2018), the sudden emergence of a clade of NG belonging to MLST-ST7827 was detected in Norway, infecting almost exclusively men and exhibiting uniform resistance to ciprofloxacin and reduced susceptibility to ceftriaxone and azithromycin.⁴¹ Furthermore, a Dutch study described the emergence of a MLST-ST7827 clade with reduced susceptibility to cephalosporins and resistance to ciprofloxacin in 2017–2019.³⁸

In relation to sexual behaviour, 50% of the isolates from heterosexual men and women were grouped in C7 and C13. Whereas among isolates from MSM and bisexual patients, no predominant cluster was detected, showing a very heterogeneous population.

The relationship between antimicrobial resistance and the sexual behaviour of the patients was reported by Salmerón et al.⁴² in a study describing the susceptibility of NG in Spain. These authors observed that cefixime and azithromycin resistance was less frequent in MSM while, on the contrary, ciprofloxacin resistance was significantly associated with MSM patients.

Of particular interest is C13: all the isolates included were from heterosexual men and women living in Mallorca and belonged to the same MLST (ST1901) and NG-MAST ST (ST569) and all were resistant to azithromycin and ciprofloxacin. In addition, this cluster had the least number of SNPs between samples, which may suggest that this cluster is spreading among heterosexual patients in Mallorca. To our knowledge, there is no previous study on the molecular epidemiology of NG on this island, but previous data published in Europe²⁶ and Canada²⁷ also related MLST1901 with resistance to azithromycin. To our knowledge, the association of NGMAST-ST-569 with heterosexual patients and resistance to azithromycin has not been previously described.

Regarding the distribution of NG in the three regions of the study, we observed important differences. While the most prevalent NG-STAR and MLST-STs in Madrid and Mallorca were ST193 and ST9363 respectively, and were, in turn, the most prevalent in the study, the most prevalent in Barcelona were NG-MAST-ST710 and MLST-ST7363. Furthermore, Barcelona was the region with the greatest number of different STs. This could be explained by Barcelona being a city with growing national and international tourism, which could assist a dynamic and heterogeneous population of NG. On the contrary, Mallorca was the region in which the distribution was more homogeneous, suggesting the existence of a sexual network in this territory, which is geographically isolated. Unfortunately, information about previous trips to determine whether there was a travel relationship between these areas was not available.

Some limitations of our study are that due to its retrospective design many demographic and epidemiological data are missing. For example, it was not possible to collect the data about the sexual behaviour of all the patients or about previous trips in order to fully correlate the different sequence types with the sexual behaviour of the patients and to establish some link between the different clades detected in the three regions. Another limitation is that when NG was isolated in multiple sites in one patient, antimicrobial susceptibility was only studied in genital samples. This is an important limitation as it could lead to the loss of strains with higher MIC values in pharyngeal carriers and, consequently, underestimate antimicrobial resistance. Lastly, it was not possible to include the same percentage of susceptible or resistant strains to cefixime and/or azithromycin from the different regions. This can result in obtaining biased data. However, it was observed that most of azithromycin-resistant strains from Mallorca (57%) were grouped into the cluster 13, which was formed exclusively by these strains.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first multicentre study to analyse the molecular epidemiology of a large number of NG isolates from different regions of Spain. We found that the NG population in Spain is quite heterogeneous, although MLST-ST9363, ST1901 and ST7363 predominate, comprising 53% of the strains in our study. We detected 13 clusters, with two being of note: one associated

with cefixime-resistance belonging to MLST-ST7363 and the other associated with azithromycin resistance belonging to MLST-ST1901.

This study highlights the need to maintain culture to monitor antimicrobial susceptibility and for early detection of the emergence of antimicrobial-resistant strains.

Although genotyping by MLST or NGMAST has been widely used previously and has helped to understand the population distribution of NG, these molecular techniques do not provide enough information on transmission networks or the detection of new clones. The resolution of WGS provides a means of easy learning about key characteristics regarding the composition of sexual networks which we would not otherwise be able to detect through the use of conventional genotyping methods. Therefore, WGS is an effective tool for the epidemiological surveillance of gonococci and the detection of resistance genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by an ‘Ayuda SEIMC’ grant from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). We also wish to acknowledge all members of STI Study Group (GeITS) from Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC).

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI17/02017) and co-financed by the European Regional Development Fund. PS is supported by a grant from Hospital Universitari Vall d’Hebron, and her stay in Australia has been partially financed by a ‘Ayuda SEIMC’ grant.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. All raw reads generated were deposited in the National Center for Biotechnology Information database under BioProject Number PRJNA752809. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA752809>).

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the Ethics Committee of the Vall d’Hebron University Hospital (reference number: VHI-CEF-2018-01). The study was conducted in accordance with the principles laid out in the Declaration of Helsinki and in accordance with the principles of Good Clinical Practice. All data related to patients were coded to maintain confidentiality. Each patient was identifiable only by a unique number, and the principal investigator of each centre was the owner of this number.

ORCID

P. Salmerón  <https://orcid.org/0000-0003-2115-7413>

REFERENCES

- World Health Organization. Emergence of multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Threat of global rise in untreatable sexually transmitted infections. 2012; 2: 1. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70603/1/WHO_RHR_11.14_eng.pdf. Accessed 25 February 2023.
- ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonorrhoea. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020 Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2018>. Accessed 7 February 2023
- Unidad de vigilancia de VIH, ITS y hepatitis B y C. Vigilancia Epidemiológica De Las Infecciones De Transmisión Sexual En España, 2019. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/ Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública; 2021. Available from: <https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/home.htm>. Accessed 27 January 2023.
- Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol.* 2012;7:1401–22.
- Unemo M, Golparian D, Syversen G, Vestrheim DF, Moi H. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Eurosurveillance.* 2010;15(47):19721. <https://doi.org/10.2807/ese.15.47.19721-en>
- Unemo M, Golparian D, Sary A, Eigentler A. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Eurosurveillance.* 2011;16(43):19998. <https://doi.org/10.2807/ese.16.43.19998-en>
- Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Galloway A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1273–80.
- Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:3538–45.
- Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homar E, Bastida MT, Gonococcus Antimicrobial Resistance Surveillance Working Group. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone in Catalonia Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:218–9.
- Lahra M, Ryder N, Whitley D. A new multidrug-resistant strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. *N Engl J Med.* 2014;371:1849–51.
- Lefebvre B, Martin I, Walter D, Deshaies L, Michaud S, Labbé A-C, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2018;24:381–3.
- Bignell C, Unemo M, ESGEB. The ‘2012 European Guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults’ recommends dual antimicrobial therapy. *Int J STD AIDS.* 2013;24:85–92.
- Bignell C, Fitzgerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS.* 2011;22:541–7.
- Guidelines WHO. WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549691>. Accessed 16 February 2023.
- Salmerón P, Viñado B, El Ouazzani R, Hernández M, Barbera MJ, Alberny M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona during a five-year time period (2013–2017). *Euro Surveill.* 2020;25(42):1900576.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe – results summary 2017. Stockholm: ECDC; 2019 Stock ECDC 2019. Accessed 14 February 2023.
- Fifer H, Natarajan U, Jones L, Alexander S, Hughes G, Golparian D, et al. Failure of dual antimicrobial therapy in treatment of gonorrhoea. *N Engl J Med.* 2016;374:2502–4.

18. Eyre DW, Sanderson ND, Lord E, Regisford-Reimmer N, Chau K, Barker L, et al. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Eurosurveillance*. 2018;23:1–6.
19. Jennison AV, Whiley D, Lahra MM, Graham RM, Cole MJ, Hughes G, et al. Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and high-level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. *Eurosurveillance*. 2019;24:1–4.
20. 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*. 2019;31:1, 4–15. Available from: <https://www.bashghuidelines.org/media/1208/gc-2019.pdf>
21. Unemo M, Ross JDC, Serwin AB, Gomberg M, Cusini M, Jensen JS. European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*. 2020;2020:1–17. <https://doi.org/10.1177/0956462420949126>
22. St Cyr S, Barbee L, Workowski KA, Bachmann LH, Pham C, Schlanger K, et al. Update to CDC's treatment guidelines for gonococcal infection, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69:1911–6.
23. Calatrava-Hernández E, Foronda-García-Hidalgo C, Gutiérrez-Fernández J. Resistance, molecular characterization and viability of *Neisseria gonorrhoeae* recent clinical isolates. *Med Clin (Barc)*. 2021;156:249–50. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.01.007>
24. Ibargoyen García U, Nieto Toboso MC, Azpeitia EM, Imaz Perez M, Hernandez Ragga L, Álava Menica JA, et al. Epidemiological surveillance study of gonococcal infection in northern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020;38:59–64.
25. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Avivar C. Typing and antimicrobial susceptibility of 134 *Neisseria gonorrhoeae* strains from southern Spain. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32:114–20.
26. Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, Sánchez-Busó L, Golparian D, Jacobsson S, et al. Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:758–68.
27. Demczuk W, Martin I, Peterson S, Bharat A, van Domselaar G, Graham M, et al. Genomic epidemiology and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014. *J Clin Microbiol*. 2016;54:1304–13.
28. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. Available from: <http://www.eucast.org>
29. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010 Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
30. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114–20.
31. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19:455–77. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy>
32. Dozmorov MG. GitHub statistics as a measure of the impact of open-source bioinformatics software. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:1–4.
33. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e15.
34. Demczuk W, Sidhu S, Unemo M, Whiley DM, Allen VG, Dillon JR, et al. *Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance, a novel antimicrobial resistance multilocus. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1454–68.
35. Sánchez-Busó L, Cole MJ, Spiteri G, Day M, Jacobsson S, Golparian D, et al. Europe-wide expansion and eradication of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* lineages: a genomic surveillance study. *Lancet Microbe*. 2022;3:e452–63.
36. Guerrero-Torres MD, Menéndez MB, Guerras CS, Tello E, Ballesteros J, Clavo P, et al. Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e274.
37. Francés-Cuesta C, Serra-Pladevall J, Fabregat A, Romero B, Menéndez B, Andreu Domingo A, et al. Epidemiología genómica y resistencia a antibióticos en gonococos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019;37(Espec Cong 1)113–489. 2018;30:25–31.
38. De Korne-Elenbaas J, Bruisten SM, De Vries HJC, Van Dam AP. Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* clone with reduced cephalosporin susceptibility between 2014 and 2019 in Amsterdam, The Netherlands, revealed by genomic population analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76:1759–68.
39. Salmerón P, Moreno-Mingorance A, Trejo J, Amado R, Viñado B, Cornejo-Sanchez T, et al. Emergence and dissemination of three mild outbreaks of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Barcelona, 2016–2018. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76:930–5.
40. Peng JP, Yin YP, Chen SC, Yang J, Dai XQ, Zheng HP, et al. A whole-genome sequencing analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in China: an observational study. *EclinicalMedicine*. 2019;7:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2019.01.010>
41. Osnes MN, Didelot X, de Korne-Elenbaas J, Alfsnes K, Brynildsrud OB, Syversen G, et al. Sudden emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* clade with reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins, Norway. *Microb Genomics*. 2020;6:mgen000480.
42. Salmerón P, Viñado B, Arando M, Alcoceba E, Romero B, Menéndez B, et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Spain: a prospective multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76:1523–31.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Salmerón P, Buckley C, Arando M, Alcoceba E, Romero B, Clavo P, et al. Genome-based epidemiology and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Spain: A prospective multicentre study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2023;37:2575–2582. <https://doi.org/10.1111/jdv.19458>

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La infección gonocócica continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial, tanto por su prevalencia como por la capacidad de *N. gonorrhoeae* de desarrollar o adquirir resistencia a todos los antimicrobianos utilizados para su tratamiento, incluidos los dos antibióticos recomendados por la mayoría de guías internacionales (ceftriaxona y azitromicina).

La propagación global de un clon resistente a ceftriaxona (FC428), el aumento de la tasa de resistencia a azitromicina en los últimos años, los reportes de casos de fracaso terapéutico en pacientes tratados con terapia antimicrobiana dual (ceftriaxona 500mg + azitromicina 1g) y la aparición de cepas de *N. gonorrhoeae* MDR y XDR son motivo de gran preocupación y suponen un reto en el tratamiento de la infección gonocócica. Este panorama subraya la necesidad de implementar programas de vigilancia para la monitorización de la resistencia de esta infección, así como la urgencia de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos.

Por otro lado, la vigilancia genómica mediante secuenciación del genoma completo junto con datos epidemiológicos y de resistencia antimicrobiana son esenciales para caracterizar los linajes circulantes de *N. gonorrhoeae* y su asociación con determinados grupos de población (definidos por factores demográficos y epidemiológicos).

Esta tesis doctoral, constituida por los cuatro estudios previamente descritos, presenta los primeros datos de sensibilidad antimicrobiana y de epidemiología molecular a nivel nacional. Dado que los hallazgos obtenidos en los cuatro estudios se complementan, se realiza una discusión conjunta.

5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

La incidencia de la infección gonocócica en Europa ha ido aumentando a lo largo de los últimos años³⁷, debido no sólo al número de casos, sino también a la implementación de técnicas diagnósticas moleculares. Este incremento lo hemos podido observar en el primer estudio de esta tesis doctoral, ya que desde el 2013 al 2017 el número de cepas aisladas en el Hospital Universitari Vall d'Hebron ascendió de 327 a 572, y alcanzó los 752 en el año 2021 (datos de la comunicación oral "*Sensibilidad antimicrobiana de Neisseria gonorrhoeae en Barcelona de 2013 a 2021*" del congreso XXV SEIMC 2022).

La infección gonocócica afecta mayoritariamente a hombres. En el último informe del ECDC, el ratio de infección hombre:mujer fue de 3,1:1 y el grupo de edad más afectado fue el de 25-34 años, seguido del grupo 15-24 años. Además, en aquellos casos en los que se disponía de información, el 12% presentaban infección por VIH y al menos el 54% de los casos se diagnosticaron en HSH.

En este sentido, los hallazgos detectados en nuestros trabajos arrojan datos muy similares. La mediana de edad de los pacientes estaba alrededor de los 32 años, siendo más del 87% hombres. La mayoría de los casos sintomáticos cursaron con uretritis (83,2%). El estado serológico frente al VIH de los pacientes incluidos en el estudio multicéntrico fue seropositivo en el 17,2%.

5.2 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Dos de los trabajos que componen esta tesis doctoral describen datos de sensibilidad antimicrobiana. En el primero de ellos se estudiaron 2.036 aislados de *N. gonorrhoeae* en Barcelona durante un período de 5 años. En el tercer trabajo que compone esta tesis doctoral, se estudió la sensibilidad antimicrobiana de 2571 aislados detectados en 10 centros localizados en distintas comunidades autónomas de España durante un año y medio. Hasta donde sabemos, se trata de la primera vigilancia a nivel nacional de la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* en España y

son los primeros informes que describen la resistencia antimicrobiana de un número tan considerable de aislados.

La tasa de resistencia a penicilina en el estudio realizado en Barcelona (2013-2017) fue del 20,1%, presentando una disminución estadísticamente significativa a lo largo de los años de estudio ($p=0,0000$): del 28,1% en 2013 al 12,2% en 2017. El 14,7% de estos aislados eran productores de penicilinas (PPNG). Por otro lado, el 13,3% de los aislados incluidos en el estudio multicéntrico (2018-2019) fueron PPNG, siendo este porcentaje significativamente superior en el año 2019 (OR = 1.29; 95% CI = 1.12–1.49). Estos datos son similares a los recogidos en el reporte del ECDC del año 2016, en el que el 14,9% de los aislados incluidos fueron PPNG⁹¹. Del mismo modo, se ha observado una tendencia en constante aumento en la prevalencia del PPNG desde 2010 en Europa.

Nuestros resultados exponen que la tasa de resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido permanece baja, siendo del 0,3% y 0,2 % para la ceftriaxona y del 4,9% y 1,8 % para la cefixima en el estudio realizado en Barcelona (2013-2017) y en el estudio multicéntrico (2018-2019), respectivamente. Además, se observó una reducción significativa en la tasa de resistencia de ambas cefalosporinas de espectro extendido a lo largo del periodo de estudio. Estos hallazgos guardan similitud con los datos publicados en diversos países europeos, que reportaron una tasa de resistencia a cefixima en 2018 del 1,4%⁹² habiendo disminuido al 0,5% en el reporte del Euro-GASP que recoge los datos del 2020⁹³.

Desde la implementación en 2012 de la terapia dual en Barcelona (ceftriaxona 500 mg IM + azitromicina 1 g VO), se ha observado un descenso en la resistencia a la ceftriaxona: del 2,8% en 2012 (datos no publicados) al 0% en 2017. Esta tendencia podría explicarse por el cambio en el régimen de tratamiento ya que, hasta 2011, se utilizaba únicamente ceftriaxona 250 mg⁹⁴.

En nuestro medio, entre los años 2013 y 2015, el número de aislados con CMI $\leq 0,016$ mg/L de ceftriaxona y cefixima pareció aumentar de forma gradual. Sin embargo, durante 2016 y 2017, se observó un marcado descenso en el porcentaje de estas cepas y un incremento en aquellas con CMI más elevadas, siendo el porcentaje de cepas con sensibilidad disminuida a cefalosporinas (DSC) del 15,8% en Barcelona y del 12,5% en el estudio multicéntrico. Este patrón concuerda con el informe del Euro-GASP, donde se describe la emergencia de aislados con DSC en Europa durante esos mismos años⁹⁵. No obstante, el informe más reciente del ECDC, que incluye los datos hasta el año 2020, refiere un cambio significativo en la distribución de las CMIs de ceftriaxona en comparación con 2019, con un incremento de los aislados altamente sensibles (CMI $\leq 0,016$ mg/L) y una disminución en aquellos con CMI de 0,032 mg/L y de 0,064 mg/L⁹³. Es importante destacar que en ninguno de los dos estudios se detectó resistencia de alto nivel a ceftriaxona, ya que todas las cepas resistentes a esta cefalosporina presentaban una CMI de 0,19 o 0,25 mg/L, valores cercanos al punto de corte establecido por EUCAST (CMI $> 0,125$ mg/L)⁹⁶.

Es importante destacar que, desde la implementación de la terapia dual (ceftriaxona 500 mg + azitromicina 1 g) en Barcelona en el año 2012, la tasa de resistencia de azitromicina ha incrementado del 1,5% en 2014 al 3,0% en 2017. Este incremento en la tasa de resistencia a azitromicina se ha documentado en varios países europeos⁹⁵.

La tasa global de resistencia a la azitromicina en Barcelona documentada en nuestro primer estudio fue del 2,6% de acuerdo con el actual punto de corte de EUCAST (ECOFF establecido en 1 mg/L). Este porcentaje es inferior al reportado por otros grupos de investigadores españoles durante el mismo periodo de estudio, como el de Cobo *et al*⁹⁷, donde documentaron un porcentaje de resistencia del 9,7% en Almería entre 2012 y 2016. Paralelamente, Fuertes de Vega *et al*.⁹⁸ reportaron una tasa de resistencia del 5,2% en Barcelona desde junio de 2009 a diciembre de 2014, un valor que guarda mayor similitud con nuestros resultados. En este contexto, es necesario tener en cuenta que los investigadores de dichos estudios utilizaron el anterior punto de corte

establecido por EUCAST (0,5 mg/L), lo que podría influir en las discrepancias observadas. Recientemente, han sido publicados dos estudios que tuvieron lugar en Valencia⁹⁹ durante el período comprendido entre 2013 y 2018, y en Galicia¹⁰⁰ entre los años 2014 y 2018. Estos estudios describieron una tasa de resistencia a la azitromicina (con punto de corte ECOFF>1 mg/L) del 6% y 7,2%, respectivamente. Cabe resaltar que dichas tasas resultan superiores a las observadas en nuestro propio estudio.

La tasa global de resistencia a este antimicrobiano en el trabajo multicéntrico fue del 12,1%, observándose diferencias significativas entre regiones, siendo las más bajas en Asturias y Cataluña y las más altas en Euskadi. Por lo que podemos concluir que la tasa de resistencia a azitromicina en España varía significativamente en función del área geográfica.

Durante las últimas décadas se ha reportado la aparición de aislados HL-AziR en Escocia⁶⁰, Reino Unido⁶¹, Irlanda¹⁰¹, Italia⁶³, Suecia⁶⁵, Argentina⁶², Canadá⁶⁶, Estados Unidos⁶⁴, Australia⁶⁷ y China¹⁰². Este perfil de resistencia, definido como CMI igual o superior a 256 mg/L, está asociado principalmente a la mutación A2059G (*Escherichia coli* numbering) presente en tres o cuatro alelos del gen 23S del ARNr.⁷⁶ En Barcelona, detectamos por primera vez 16 cepas que presentaron alto nivel de resistencia a azitromicina entre 2016 y 2018 (resultados de la segunda publicación que componen esta tesis): 6 en 2016, 9 en 2017 y uno en 2018. Durante este período de tiempo, el 3,7% (64/1749) de los aislados detectados en Barcelona fueron resistentes a azitromicina, representando estas 16 cepas el 25% del total de cepas resistentes. Ninguno de estos aislados HL-AziR fue resistente a ceftriaxona ni cefixima, no obstante, el 85,7% fueron resistentes a ciprofloxacino. La caracterización mediante secuenciación de genoma completo de estas 16 cepas se comentará en un apartado posterior de esta tesis doctoral.

A la luz de lo expuesto, se evidencia un incremento de la resistencia a la azitromicina tras la introducción de la terapia dual, planteando un debate en torno a las estrategias terapéuticas óptimas. Aunque las guías europea y española continúan recomendando la terapia dual,^{45,79} es

importante señalar que el aumento de la resistencia a azitromicina, no sólo en *N. gonorrhoeae*, sino también en otras ITS como *Mycoplasma genitalium*, pone en duda la idoneidad de esta estrategia terapéutica. De hecho, desde el año 2019, la Asociación Británica para la Salud Sexual y el VIH (BASHH) recomienda el tratamiento en monoterapia con ceftriaxona 1 g⁶⁹ y las recomendaciones más actuales de las guías europeas también contemplan la monoterapia en situaciones específicas⁴⁵. No obstante, algunos estudios¹⁰³ respaldan que la selección/inducción de la resistencia a la azitromicina en *N. gonorrhoeae* por el uso de la terapia dual es limitada, y posiblemente esté asociada al uso generalizado de este antibiótico en el tratamiento de infecciones respiratorias o de uretritis no gonocócicas.

Cabe señalar que, aunque en la presente tesis doctoral no se detectó ninguna cepa con resistencia dual a ceftriaxona y azitromicina, una cepa presentó DSC y resistencia a cefixima y azitromicina. La emergencia de estos perfiles de sensibilidad, junto con la detección en 2018 de los primeros tres casos de cepas XDR, que mostraron resistencia a la ceftriaxona y un alto nivel de resistencia a azitromicina en el Reino Unido¹¹ y Australia²², y los fracasos terapéuticos con ceftriaxona y azitromicina¹⁷, refuerza la necesidad de programas de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos para la detección temprana de estos aislados.

Nuestros resultados muestran una tasa de resistencia a quinolonas (51,3% en Barcelona y 56,4% en España) ligeramente superior a la cifra reportada en Europa (46,5%)^{93,95} y en Reino Unido (46,9%),¹⁰⁴ y significativamente más alta que en otros países, como EE.UU (35,4%)¹⁰⁵. Por consiguiente, este antimicrobiano no puede considerarse como opción de tratamiento empírico en nuestro entorno. No obstante, en situaciones en las que la sensibilidad es conocida antes de instaurar el tratamiento, ciprofloxacino puede constituir una alternativa terapéutica viable. Esta recomendación ya está incluida en las guías terapéuticas europea y británica vigentes^{45,69}. Por ende, en línea con estas guías, se sugiere considerar ciprofloxacino como una opción de tratamiento de primera línea solamente cuando los datos de sensibilidad a los antimicrobianos,

fenotípicos o genotípicos, indiquen sensibilidad a ciprofloxacino en todos los posibles focos infecciosos¹⁰⁶. La resistencia a ciprofloxacino está fuertemente asociada con una única mutación en el codón 91 del gen *gyrA*, y se ha demostrado que la detección de esta mutación es un excelente predictor de la resistencia a ciprofloxacino. Esto permite la caracterización de la sensibilidad a las quinolonas directamente de muestras clínicas mediante pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). En esta línea, Allan-Blitz *et al*¹⁰⁷ publicaron un estudio prospectivo basado en el tratamiento de la infección gonocócica guiado por resistencia con un 100% de eficacia en aquellos pacientes tratados con ciprofloxacino con cepas que no poseían dicha mutación en el *gyrA*.

A lo largo del periodo de estudio, no se ha detectado ningún aislado de *N. gonorrhoeae* resistente a la espectinomicina. La inclusión de este antimicrobiano como opción terapéutica se encuentra recogida en diversas guías de manejo de ITS^{45,69}, donde se considera como una alternativa viable a la terapia convencional, junto con azitromicina. Es relevante mencionar que, debido a su limitada eficacia, el uso de este antimicrobiano no es recomendado para el tratamiento de infecciones faríngeas y además en muchos países no está disponible.

Con el propósito de examinar alternativas terapéuticas adicionales para el tratamiento de la infección gonocócica, incorporamos la gentamicina y la fosfomicina en nuestros trabajos. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para gentamicina fueron de 4 y 6 mg/L en el caso del estudio en Barcelona, y en 4 y 8 mg/L en el estudio multicéntrico. Estos valores concuerdan con hallazgos previos¹⁰⁸ y sugieren que la gentamicina podría representar una alternativa terapéutica eficaz y económicamente viable.

Cabe destacar que EUCAST aún no ha definido puntos de corte para este antimicrobiano. Brown *et al.*¹⁰⁹ aplicaron criterios basados en registros de curación clínica previa y comparaciones de CMI para definir como sensibles las cepas con CMI ≤ 4 mg/L, como sensibilidad intermedia aquellas con

valores de 8 a 16 mg/L, y como resistentes aquellas con CMI de ≥ 32 mg/L. En base a estos criterios, el 57,6% de las cepas incluidas en nuestro estudio fueron sensibles y el 42% intermedias.

A pesar de que la combinación de gentamicina y azitromicina podría considerarse una alternativa adecuada en infecciones genitales no complicadas, se han publicado diversos estudios que ponen en tela de juicio su efectividad. Cole *et al.*¹¹⁰ encontró un índice de fracaso terapéutico más elevado en los individuos tratados con gentamicina y azitromicina (25/292; 9%) en comparación con aquellos que recibieron ceftriaxona y azitromicina (7/306; 2%). En esta línea, un estudio reciente en Reino Unido mostró un rendimiento subóptimo de gentamicina 240 mg en combinación con azitromicina 1g, particularmente en la infección extragenital (faríngea y rectal¹¹¹). En el último trabajo de Matoga *et al.*¹¹² se describe la sensibilidad a la gentamicina en *N. gonorrhoeae* y los resultados del tratamiento de la infección urogenital con gentamicina en combinación con doxiciclina y metronidazol. Estos autores concluyen que las CMIs de gentamicina no predicen adecuadamente el resultado del tratamiento de la infección gonocócica con este antimicrobiano ya que verificaron fracasos terapéuticos con cepas que mostraban sensibilidad *in vitro* a la gentamicina.

Por otro lado, un estudio de la República Checa mostró una tasa de eliminación del 100% con gentamicina 240 mg y azitromicina 2 g en infecciones extragenitales¹¹³. Del mismo modo, otros investigadores respaldan la actividad *in vitro* de la gentamicina, utilizada en combinación con cefixima o ertapenem, para controlar la propagación de cepas de *N. gonorrhoeae* MDR y XDR^{114,115}.

Todo ello sugiere la necesidad de adaptar la dosis de gentamicina según la CMI y el lugar de la infección, con el propósito de asegurar la erradicación de todos los focos de infección.

En cuanto a la fosfomicina, los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron en 12 y 24 mg/L en el caso del estudio en Barcelona, y en 24 y 48 mg/L en el estudio multicéntrico. Al igual que con la gentamicina, EUCAST no ha establecido puntos de corte para fosfomicina. La revisión realizada por Tesh *et al.*¹¹⁶ sugiere que la fosfomicina puede ser un tratamiento alternativo para la infección gonocócica debido a su mecanismo de acción único y su prometedora actividad *in vitro*. En esta revisión, se

consideraron como sensibles aquellos aislados con una CMI < 16 mg/L y aquellos que mostraron una CMI > 64 mg/L como resistentes. Otro estudio realizado por Hauser *et al.*,¹¹⁷ evaluó la actividad in vitro de fosfomicina en monoterapia y en combinación con ceftriaxona o azitromicina frente a aislados clínicos de *N. gonorrhoeae* y cepas MDR/XDR. Los autores de este estudio concluyen que, aunque la ceftriaxona sigue siendo el pilar actual del tratamiento de la infección gonocócica, fosfomicina puede ser un potencial antibiótico para una terapia dual, ya que demostró una acción bactericida fuerte y rápida para todas las cepas testadas. Además, todo ello respaldado por su alta biodisponibilidad oral, excelente seguridad y el buen historial de fosfomicina en el tratamiento de las infecciones urinarias. Por lo tanto, se necesitan más estudios para establecer un régimen de fosfomicina seguro, conveniente y eficaz para el tratamiento de la infección por *N. gonorrhoeae*¹¹⁶.

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral era correlacionar los datos de sensibilidad con las características clínico-epidemiológicas de los pacientes.

En el primer trabajo, se analizó la relación entre los datos epidemiológicos disponibles (año de aislamiento, sexo del paciente y centro de consulta) y la sensibilidad a los distintos antibióticos estudiados y se concluyó que las tasas de resistencia a penicilina, cefixima, azitromicina y ciprofloxacino fueron más altas en las unidades de atención primaria que en la unidad de ITS Drassanes-Vall d'Hebron. Sin embargo, no detectamos diferencias estadísticamente significativas respecto a los años de aislamiento ni el sexo de los pacientes. Aunque en este primer trabajo no disponíamos de la orientación sexual de los pacientes, hipotetizamos que la mayoría de los pacientes que acuden a las unidades de atención primaria de salud son mujeres y hombres que tienen sexo con mujeres, en cambio el 70% de los pacientes atendidos en la Unidad de ITS de Drassanes-Vall d'Hebron son HSH. Por tanto, estos resultados podrían sugerir que hay diferentes poblaciones de *N. gonorrhoeae* circulando en los dos grupos de población en Barcelona.

Respecto al trabajo multicéntrico (trabajo 3), observamos que la resistencia a cefixima fue significativamente menos frecuente en las infecciones diagnosticadas en 2019, en pacientes HSH y

en pacientes VIH positivos. Del mismo modo, la resistencia a azitromicina fue menos frecuente en pacientes HSH. Por otro lado, la resistencia a ciprofloxacino se asoció de forma estadísticamente significativa con los pacientes HSH y la coinfección con VIH. Además, se observaron diferencias importantes entre los distintos centros, siendo las más relevantes las relacionadas con la resistencia a azitromicina. Estas diferencias podrían deberse a divergencias en los patrones de tratamiento o a la circulación de diferentes linajes con mayor capacidad para desarrollar resistencia a los antimicrobianos.

5.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Los métodos tradicionales de genotipado para el estudio de la epidemiología molecular de *N. gonorrhoeae* tienen una utilidad limitada. No obstante, la secuenciación del genoma completo ofrece una mayor resolución para describir la dinámica de la población y predecir e inferir la transmisión de la resistencia a los antimicrobianos. Además, la secuenciación de genoma completo de grandes colecciones de aislados en todo el mundo ha revelado detalles sobre la evolución de la resistencia, pero también sobre la estructura poblacional de *N. gonorrhoeae*, la propagación intercontinental y la transmisión en diferentes grupos de riesgo.

La detección de los primeros aislados de *N. gonorrhoeae* en Barcelona que presentaban HL-AziR fundamentó el objetivo del segundo trabajo de esta tesis doctoral: la caracterización mediante secuenciación de genoma completo de las cepas citadas anteriormente para así identificar los mecanismos de resistencia, estudiar la epidemiología molecular e identificar la relación clonal de estos aislados con otras cepas de *N. gonorrhoeae* previamente descritos en otros países.

En este trabajo, los resultados del análisis por WGS nos permitieron concluir la aparición de 3 brotes de NG con HLAziR en Barcelona durante los años 2016-2018, dos brotes en 2016 pertenecientes al

genotipo G1 (MLST ST7823 y NG MAST ST5309/ST19618) y otro en 2017-2018 perteneciente al genotipo G2 (MLST ST9363 y NG MAST ST3935).

Como comentamos anteriormente, existe escasa información sobre la sensibilidad antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* en España y los datos sobre la resistencia a azitromicina varían mucho^{97,98,99,100}. Sin embargo, cabe destacar que en ninguno de estos estudios se detectaron cepas de HL-AziR. Por lo tanto, hasta donde sabemos, estos son los primeros aislados de *N. gonorrhoeae* con HL-AziR detectados en España.

Por el contrario, se han informado aislados de HL-AziR en otros países. De hecho, se detectó un brote persistente de *N. gonorrhoeae* con HL-AziR en Inglaterra con 118 casos confirmados entre noviembre de 2014 y mayo de 2018.^{118,119} Este brote surgió entre jóvenes heterosexuales que vivían en Leeds sin factores de riesgo específicos, pero se extendió por Inglaterra entre redes de HSH. La mayoría de estos aislados pertenecían al ST9768 de NG-MAST y no se detectaron aislados pertenecientes a los ST5309 y ST3935 de NG-MAST.

En el análisis filogenético de los 16 aislados de HL-AziR de nuestro estudio y de los 49 aislados adicionales utilizados para la contextualización, se identificaron cinco clados. El clado 3 estaba formado por 20 aislados pertenecientes a MLST ST9363 y NGMAST ST3935: 16 aislados de diferentes países y los 4 aislados pertenecientes al genotipo G2 de nuestro estudio. De hecho, un aislado procedente de Italia era muy similar (5–6 core SNP) y compartía un ancestro común, lo que sugiere una fuente común de infección. Desafortunadamente, la información sobre contactos sexuales no estaba disponible. Por otro lado, los 36 aislados del clado 5 pertenecían a MLST ST7823, dentro de los cuales se incluyeron los 12 aislados del G1 de nuestro estudio. Estos aislados fueron detectados en diferentes países y durante un largo período de tiempo, lo cual sugiere que los aislados vinculados a este clado pueden exhibir una mayor capacidad de propagación. Además, todos estos aislados presentaban la delección -35A en *mtrR*, indicando un mayor potencial de desarrollar resistencia antimicrobiana. Todos estos hallazgos recalcan el riesgo inherente de los viajeros internacionales sexualmente activos y la posible diseminación de cepas.

Por otro lado, con el objetivo de conocer la epidemiología molecular de *N. gonorrhoeae* en España, se estudió, mediante WGS, 170 aislados procedentes de tres regiones (Cataluña, Madrid y Mallorca). Este estudio constituyó el cuarto trabajo de esta tesis doctoral.

Entre los 170 aislados, describimos 26 STs diferentes de MLST, 49 NG-MAST-STs y 41 NG-STAR-STs. Los MLST-STs más comunes fueron ST9363 y ST1901, seguidos por ST7363. Esto concuerda con datos publicados recientemente por Sánchez-Busó *et al.*,¹²⁰ quienes analizaron 2375 aislados de *N. gonorrhoeae* detectados en Europa en 2018, y reportaron que el MLST más prevalente fue el ST9363. Como previamente expusimos, este ST se relacionó con un brote de aislados que presentaban HL-AziR en Barcelona entre 2016 y 2018, detectándose solo en HSH.

Los estudios previos sobre epidemiología molecular de *N. gonorrhoeae* publicados en España se basan en NG-MAST, siendo G1407, G2992 y G2400 los genotipos más prevalentes en el Sur de España¹²¹, Norte de España¹²² y Madrid¹²³, respectivamente. El único estudio basado en WGS fue el de Francés Cuesta *et al.*¹²⁴ (datos no publicados), que incluyó 342 aislamientos de varias zonas del territorio nacional. En este estudio, los MLST-ST1901 y ST7363 fueron los más prevalentes, datos que concuerdan con nuestros resultados.

En nuestro trabajo, los MLST-ST1901 y ST7363 representaban el 16,7% y 50% del total de cepas resistentes a cefixima, respectivamente. Un estudio previo publicado por de Korne-Elenbaas *et al.*,¹²⁵ describen una asociación entre estos STs y una sensibilidad reducida a ceftriaxona en cepas detectadas entre 2014 y 2016.

Nuestros resultados muestran la detección de un clado formado por cuatro cepas de Barcelona pertenecientes a MLST-ST7827, que presentaban las mutaciones A501V en *penA* y G120K/A121D en *porB1b* y mostraban sensibilidad disminuida a la ceftriaxona (CMI=0.064-0.125 mg/L). El MLST-ST7827 fue el más prevalente en China entre 2012 y 2013, según los datos del Programa de Vigilancia de la Resistencia Gonocócica de China (China-GRSP)¹²⁶. Unos años más

tarde (2016-2018), se detectó en Noruega¹²⁷ la aparición repentina de un clado de *N. gonorrhoeae* perteneciente a este ST, que afectaba casi exclusivamente a hombres y mostraba una resistencia a ciprofloxacino y sensibilidad reducida a cefalosporinas de espectro extendido y azitromicina. Además, el estudio holandés previamente comentado, publicado por de Korne-Elenbaas *et al.*¹²⁵ describió la emergencia de aislados MLST-ST7827 entre 2017 y 2019 con sensibilidad reducida a ceftriaxona, presentado las mismas mutaciones en *penA* y *porB1b* previamente comentadas, y resistencia a ciprofloxacino. Estos autores resaltan la agrupación genética de aislados MLST-ST7827 holandeses y otros europeos, sugiriendo la circulación de esta cepa en Europa y, por tanto, siendo necesaria una estrecha vigilancia de su propagación ya que presenta un perfil de sensibilidad alarmante.

En relación al comportamiento sexual, el 50% de los aislados de hombres y mujeres heterosexuales se agruparon en dos clados (C7 y C13). Por el contrario, no se detectó ningún grupo predominante entre los aislados de HSH y pacientes bisexuales, lo que muestra una población muy heterogénea.

En este último trabajo, se detectó un clado de particular interés (C13): todos los aislados incluidos procedían de hombres y mujeres heterosexuales residentes en Mallorca, pertenecían al mismo secuenciotipo de MLST (ST1901) y NG-MAST (ST569) y eran resistentes a azitromicina y ciprofloxacino. Además, este grupo tuvo el menor número de SNPs (3-28) entre muestras, lo que puede sugerir que se está extendiendo entre pacientes heterosexuales en Mallorca. Hasta donde sabemos, no existe ningún estudio previo sobre la epidemiología molecular de *N. gonorrhoeae* en esta isla, pero datos previos publicados en Europa¹²⁸ y Canadá⁶⁶ también relacionaron el MLST-ST1901 con la resistencia a la azitromicina. Del mismo modo, tras revisar la literatura disponible hasta la fecha, la asociación de NGMAST-ST569 con pacientes heterosexuales y la resistencia a la azitromicina no se ha descrito previamente.

En cuanto a la distribución de *N. gonorrhoeae* en las tres regiones del estudio, observamos algunas diferencias importantes. Los NG-STAR y MLST STs más prevalentes en Madrid y Mallorca fueron ST193 y ST9363, respectivamente, y fueron, a su vez, los más prevalentes en el estudio. En cambio,

en Barcelona los más prevalentes fueron NG-MAST-ST710 y MLST-ST7363. Además, Barcelona fue la región con mayor número de ST diferentes. Esto podría explicarse porque Barcelona es una ciudad con un turismo nacional e internacional creciente, lo que podría justificar la circulación de una población de *N. gonorrhoeae* dinámica y heterogénea. Por el contrario, Mallorca fue la región en la que la distribución fue más homogénea, lo que sugiere la existencia de una red sexual en este territorio geográficamente aislado. Desafortunadamente, la información acerca viajes anteriores no estaba disponible, con lo que no pudimos determinar si existía una relación de viaje entre estas áreas.

En conclusión, tras revisar la literatura disponible hasta la fecha, este es el primer estudio multicéntrico que analiza la epidemiología molecular de un gran número de aislados de *N. gonorrhoeae* procedentes de diferentes regiones de España. Nuestros resultados muestran que la población de *N. gonorrhoeae* en España es bastante heterogénea, aunque predominan los MLST-ST9363, ST1901 y ST7363, que engloban el 53% de las cepas de nuestro estudio. Detectamos 13 clados, destacando dos: el primero asociado con resistencia a cefixima perteneciente al MLST-ST7363 en Barcelona y el segundo asociado con resistencia a azitromicina perteneciente al MLST-ST1901 en Mallorca.

Los trabajos que componen esta tesis doctoral presentan algunas limitaciones. La primera es la falta de muchos datos demográficos y epidemiológicos debido al análisis retrospectivo. Por ejemplo, no fue posible recopilar datos sobre el comportamiento sexual de todos los pacientes o sobre viajes anteriores, con el fin de correlacionar los diferentes secuenciotipos con el comportamiento sexual de los pacientes y establecer algún vínculo entre los diferentes clados detectados en las tres regiones. Otra limitación es que cuando se aisló *N. gonorrhoeae* en múltiples localizaciones anatómicas en un paciente, la sensibilidad a los antimicrobianos solamente se estudió en la muestra genital. Esta es una limitación importante ya que podría provocar la pérdida

de cepas con valores de CMI más altos en portadores faríngeos y, en consecuencia, subestimar la resistencia a los antimicrobianos.

Finalmente, en el último trabajo no fue posible incluir el mismo número de cepas sensibles o resistentes a cefixima y/o azitromicina de las diferentes regiones, con lo que los resultados pueden estar sesgados. Sin embargo, se observó que la mayoría de las cepas resistentes a azitromicina procedentes de Mallorca (57%) se agrupaban en un mismo clado, el cual, estaba formado exclusivamente por estas cepas.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Todos los trabajos previamente comentados destacan la necesidad de mantener el cultivo de *N. gonorrhoeae* para monitorizar la sensibilidad a los antimicrobianos y detectar de forma temprana la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos
2. La sensibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* a las cefalosporinas de espectro extendido (la terapia antimicrobiana empírica de primera línea) permanece alta y estable a lo largo de los años, siendo la tasa de resistencia del 0,2% para ceftriaxona y 1,7% para cefixima.
3. La tasa global de resistencia a azitromicina en España fue del 12,1% y se observaron diferencias significativas entre regiones, siendo las más bajas en Asturias y Cataluña y la más alta en el País Vasco.
4. En Barcelona se observó un aumento preocupante en las tasas de resistencia a la azitromicina durante el período de estudio, detectándose los primeros aislados con HL-AziR entre 2016 y 2018, siendo, además, los primeros casos descritos en España.
5. Los 16 aislados con HL-AziR pertenecían a dos genotipos diferentes no asociados previamente a HL-AziR. El análisis filogenético reveló que surgieron como tres brotes discretos asociados de forma independiente con el comportamiento sexual de los pacientes y el año, la mayoría de ellos en hombres que tienen sexo con mujeres.
6. La resistencia a cefixima y azitromicina se observó con más frecuencia en varones heterosexuales y mujeres, mientras que la resistencia a ciprofloxacino se asoció significativamente con HSH.

7. Nuestros datos reflejan un aumento significativo en la proporción de cepas PPNG y en la tasa de resistencia a las fluoroquinolonas, siendo más de la mitad de los aislados resistentes a esta última familia de antimicrobianos.
8. El análisis filogenético de las cepas del estudio multicéntrico sugiere que la población de *N. gonorrhoeae* en España es bastante heterogénea, detectándose 13 clados que abarcaban el 69% de las cepas incluidas en el estudio.
9. La existencia de un clado de 21 cepas procedentes de Mallorca que presentaban resistencia a azitromicina y pertenecían al mismo MLST-ST1901 y NG-MAST-ST569 sugiere una red de transmisión de *N. gonorrhoeae* en un territorio más aislado.
10. En Barcelona, se detectó un clado de 15 cepas resistentes a cefixima pertenecientes al MLST-ST7363, que abarcan la mitad del total de cepas resistentes a cefixima del estudio, además de otro clado formado por cuatro cepas con sensibilidad disminuida a ceftriaxona que pertenecían al MLST-ST7827.
11. La secuenciación de genoma completo es una herramienta eficaz para la vigilancia epidemiológica de *N. gonorrhoeae* y la detección de genes de resistencia.
12. Estos resultados subrayan la necesidad de desarrollar e implementar un programa nacional de vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana que, junto con datos epidemiológicos, permitirá mantener las guías nacionales de tratamiento actualizadas, la detección temprana de aislados MDR y caracterizar los linajes circulantes de *N. gonorrhoeae* mediante secuenciación de genoma completo y su asociación con determinados grupos de pacientes.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Esta tesis contribuye a ampliar el conocimiento sobre la sensibilidad antimicrobiana y la epidemiología molecular de *Neisseria gonorrhoeae* en España. Las conclusiones de esta tesis doctoral abren nuevas líneas de investigación, de las cuales destacan:

- Analizar *in vitro* posibles interacciones positivas o antagónicas de combinaciones de antibióticos.
- Caracterizar mediante WGS las 12 cepas con HL-AziR detectadas en Barcelona entre 2021 y el 2023 y estudiar la relación clonal con las cepas detectadas entre 2016 y 2018 descritas en esta tesis doctoral.
- Evaluar la implementación de técnicas moleculares en los laboratorios de *point of care* que permitan detectar la presencia de mutaciones asociadas a resistencias a quinolonas. Eso permitiría tratar con ciprofloxacino las infecciones gonocócicas en las que no se detecten dichas mutaciones y así conservar las cefalosporinas de espectro extendido.
- Realizar estudios de epidemiología molecular a nivel nacional que, junto con datos epidemiológicos y fenotípicos, permitan conocer mejor la distribución de *N. gonorrhoeae* en el territorio nacional y ayuden a la detección de la posible propagación de cepas resistentes a los antimicrobianos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. World Health Organization. WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. 2016. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549691>.
2. Rowley J, Hoorn S Vander, Korenromp E, *et al*. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ* 2019; **97**: 548–62.
3. Unemo M, Lahra MM, Cole M, *et al*. World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): Review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. *Sex Health* 2019; **16**: 412–25.
4. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev* 2014; **27**: 587–613.
5. Cámara J, Serra J, Ayats J, *et al*. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1858–60.
6. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, *et al*. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: Novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1273–80.
7. Gianecini R, Oviedo C, Stafforini G, *et al*. *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxone and cefixime, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2016; **22**: 1139–41.
8. Lahra MM, Ryder N, Whiley DM. A New Multidrug-Resistant Strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. *N Engl J Med* 2014; **371**: 1849–50.
9. Nakayama S, Shimuta K, Furubayashi K, *et al*. New ceftriaxone and multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain with a novel mosaic penA gene isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 4339–41.
10. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, *et al*. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3538–45.
11. Eyre DW, Sanderson ND, Lord E, *et al*. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England,

February 2018. *Eurosurveillance* 2018; **23**: 1–6.

12. Unemo M, Golparian D, Potočnik M, et al. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. *Eurosurveillance* 2012; **17**: 1–4.

13. Read PJ, Limnios EA, McNulty A, et al. One confirmed and one suspected case of pharyngeal gonorrhoea treatment failure following 500 mg ceftriaxone in Sydney, Australia. *Sex Health* 2013; **10**: 460–2.

14. Workowski KA, Bolan G. Centers for Disease Control and Prevention Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep* 2015; **64**: 1–137. Available at: <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=393746ef-1669-5323-6e2d-c8293c125c97&documentId=4dd08ee1-6667-3a6c-a2eb-6620cda6bc06>.

15. Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS* 2013; **24**: 85–92.

16. Australian Sexual Health Alliance (ASHA). *Gonorrhoea In Australian STI management guidelines for use in primary care*. Sydney: ASHA. 2017. Available at: <https://sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/gonorrhoea/>.

17. Fifer H, Natarajan U, Jones L, et al. Failure of Dual Antimicrobial Therapy in Treatment of Gonorrhea. *N Engl J Med* 2016; **374**: 2502–4.

18. Lahra MM, Martin I, Demczuk W, et al. Cooperative recognition of internationally disseminated ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain. *Emerg Infect Dis* 2018; **24**: 735–40.

19. Lefebvre B, Martin I, Demczuk W, et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017. *Emerg Infect Dis* 2018; **24**: 381–3.

20. Golparian D, Rose L, Lynam A, et al. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate, belonging to the internationally spreading japanese FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, Ireland, August 2018. *Eurosurveillance* 2018; **23**: 1–4.

21. Eyre DW, Town K, Street T, et al. Detection in the United Kingdom of the *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, october to december 2018. *Eurosurveillance* 2019; **24**.

22. Whiley DM, Jennison A, Pearson J, et al. Genetic characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to both ceftriaxone and azithromycin. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 717–8. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30340-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30340-2).

23. Jennison A V., Whiley D, Lahra MM, *et al.* Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and highlevel azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. *Eurosurveillance* 2019; **24**: 1–4.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Response plan to control and manage the threat of multidrug- resistant gonorrhoea in Europe. Stockholm: ECDC; 2012. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/1206-ECDC-MDR-gonorrhoea-response-plan.pdf>.
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Response plan to control and manage the threat of mult multi- and extensively drug drug-resistant gonorrhoea in Europe – 2019 update . Stockholm: ECDC; 2019. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1206-ECDC-MDR-gonorrhoea-response-plan.pdf>.
26. Cole MJ, Day M, Jacobsson S, *et al.* The European response to control and manage multi- And extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Eurosurveillance* 2022; **27**.
27. Unemo M, Shafer WM. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1230**: 1–15.
28. Bennett J, Dolin R, Blaser M. Mandell, Douglas, and Bennett’s - Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica - 8º Ed. Vol 1. 2016.
29. Unemo M, Seifert HS, Hook EW, *et al.* Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Prim* 2019; **5**.
30. Chen A, Seifert HS. Structure-function studies of the *Neisseria gonorrhoeae* major outer membrane porin. *Infect Immun* 2013; **81**: 4383–91.
31. Fischer SH, Rest RF. Gonococci possessing only certain P.II outer membrane proteins interact with human neutrophils. *Infect Immun* 1988; **56**: 1574–9.
32. Garcia DL, Dillard JP. Mutations in ampG or ampD affect peptidoglycan fragment release from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 2008; **190**: 3799–807.
33. Fleming TJ, Wallsmith DE, Rosenthal RS. Arthropathic properties of gonococcal peptidoglycan fragments: Implications for the pathogenesis of disseminated gonococcal disease. *Infect Immun* 1986; **52**: 600–8.
34. Hill SA, Masters TL, Wachter J. Gonorrhea – An evolving disease of the new millennium. *Microb Cell* 2016; **3**: 371–89.
35. Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host-adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2018; **16**: 226–240.

36. Palmer A, Criss AK. Gonococcal defenses against antimicrobial activities of neutrophils. *Trends Microbiol* 2018; **26**: 1022–1034.
37. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonorrhoea. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2021. Stockholm: 2023. Available at: [https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2021#:~:text=In%3A ECDC.-,Annual epidemiological report for,Stockholm%3A ECDC%3B 2023.&text=In 2021%2C 27 EU%2FEEA,cases per 100 000 population.](https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2021#:~:text=In%3A%20ECDC%2C%20Annual%20epidemiological%20report%20for%20Stockholm%3A%20ECDC%3B%202023.&text=In%202021%2C%2027%20EU%2FEEA,cases%20per%20100%20000%20population.)
38. Unidad de vigilancia de VIH I y hepatitis B y C. Vigilancia Epidemiológica De Las Infecciones De Transmisión Sexual En España, 2022. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/División de Control de VIH, ITS, Hepatitis virales y Tuberculosis, Dirección General de Salud Pública. 2024. Available at: https://www.msbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/Vigilancia_ITS_1995_2017_def.pdf.
39. Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i sida de Catalunya (CEEISCAT). Vigilància epidemiològica de les Infeccions de Transmissió Sexual (ITS) a Catalunya. Informe anual 2021. Badalona: CEEISCAT; 2022. Available at: https://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_A-Z/S/sida/enllasos/anual_ITS.pdf.
40. Barberá MJ, Serra-Pladevall J. Gonococcal infection: An unresolved problem. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019; **37**: 458–66.
41. Chan PA, Robinette A, Montgomery M, *et al.* Extragenital Infections Caused by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: A Review of the Literature. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2016; **2016**.
42. Hook EW, Bernstein K. Kissing, saliva exchange, and transmission of *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet Infect Dis* 2019; **19**: e367–9.
43. Beatrous SV, Grisoli SB, Riahi RR, *et al.* Cutaneous manifestations of disseminated gonococemia. *Dermatol Online J* 2016; **23**: 0–6.
44. Serra-Pladevall J, Gulin Blanco C, Vila Olmo N, *et al.* Preservation of *Neisseria gonorrhoeae*: should swabs be refrigerated or not?: *Neisseria gonorrhoeae* preservation. *J Microbiol Methods* 2018; **145**: 37–9.
45. Unemo M, Ross JDC, Serwin AB, *et al.* 2020 European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS* 2020: 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1177/0956462420949126>.
46. Unemo M, Ballard R, Ison CA, *et al.* Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including

- human immunodeficiency virus. *World Heal Organ* 2013.
47. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, *et al.* Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* - 2014. *MMWR Recomm Reports* 2014; **63**.
48. Vázquez F, Antonio J, Otero L, *et al.* Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual (2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; **26**: 32–7.
49. Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; **16**: 15–25.
50. Pham CD, Pettus K, Nash EE, *et al.* Utility of MALDI-TOF MS for differentiation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with dissimilar azithromycin susceptibility profiles. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 3202–8.
51. Carannante A, De Carolis E, Vacca P, *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of *Neisseria gonorrhoeae*. *Clinical microbiology and vaccines. BMC Microbiol* 2015; **15**: 1–7.
52. Galán JC, Lepe JA, Otero L, *et al.* *Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales*. 2018. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/96349/9243592653_spa.pdf;jsessionid=8FE8504AB37A3A7DB4D2B0EEAA7193B3?sequence=1.
53. WHO. The diagnostics landscape for sexually transmitted infections. World Health Organization. 2023. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240077126>.
54. Martin IMC, Ison CA, Aanensen DM, *et al.* Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004; **189**: 1497–505.
55. Unemo M, Dillon JAR. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 447–58.
56. Demczuk W, Sidhu S, Unemo M, *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance , a Novel Antimicrobial Resistance Multilocus. *J Clin Microbiol* 2017; **55**: 1454–68.
57. Harrison OB, Schoen C, Retchless AC, *et al.* *Neisseria* genomics: Current status and future perspectives. *Pathog Dis* 2017; **75**: 1–11.
58. Peters J, Cresswell F, Amor L, *et al.* Whole genome sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* reveals transmission clusters involving patients of mixed HIV serostatus. *Sex Transm Infect* 2018; **94**: 138–43.
59. Abrams AJ, Tress DL. Genomic sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* to respond to the urgent threat

- of antimicrobial-resistant gonorrhoea. *Pathog Dis* 2017; **75**.
60. Palmer HM, Young H, Winter A, *et al*. Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 490–4.
61. Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3812–6.
62. Galarza PG, Abad R, Canigia LF, *et al*. New mutation in 23S rRNA gene associated with high level of azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1652–3.
63. Starnino S, Stefanelli P. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 1200–4.
64. Katz AR, Komeya AY, Soge OO, *et al*. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: Case report of the first isolate identified in the United States. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 841–3.
65. Unemo M, Golparian D, Hellmark B. First three *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-Level resistance to azithromycin in sweden: A threat to currently available dual-Antimicrobial regimens for treatment of gonorrhoea? *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 624–5.
66. Demczuk W, Martin I, Peterson S, *et al*. Genomic epidemiology and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 1304–13.
67. Stevens K, Zaia A, Tawil S, *et al*. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Australia. *J Antimicrob Chemother* 2014; **70**: 1267–8.
68. Salmerón P, Moreno-Mingorance A, Trejo J, *et al*. Emergence and dissemination of three mild outbreaks of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Barcelona, 2016-18. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 930–5.
69. Fifer H, Saunders J, Soni S, *et al*. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Neisseria gonorrhoeae* (2019). *Bashh* 2019: 1–25. Available at: <https://www.bashhguidelines.org/media/1208/gc-2019.pdf>.
70. Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, *et al*. Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 148–9.
71. European Centre for Disease Prevention and Control. Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom and Australia – 7 May 2018. Stockholm: ECDC 2018.

72. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol* 2012; **7**: 1401–22.
73. Alirol E, Wi TE, Bala M, *et al.* Multidrug-resistant gonorrhoea: A research and development roadmap to discover new medicines. *PLOS Med* 2017; **14**.
74. Unemo M, Golparian D, Eyre DW. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and Treatment of Gonorrhoea. 2019; **1997**: 37–58.
75. Unemo M, Rio C, Shafer WM. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. 2016: 1–18.
76. Demczuk W, Martin I, Peterson S, *et al.* Genomic epidemiology and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 1304–13.
77. Fifer H, Saunders J, Soni S, *et al.* 2018 UK national guideline for the management of infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J STD AIDS* 2020; **31**: 4–15.
78. CDC. Gonococcal Infections Among Adolescents and Adults - STI Treatment Guidelines. *Sex Transm Infect Treat Guidel Gonococcal Infect* 2021: 1–8. Available at: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/gonorrhoea-adults.htm>.
79. Grupo de estudio del SIDA - SEIMC. Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes. 2017. Available at: <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/otras-guias-vigentes/>.
80. World Health Organization. WHO Guidelines for the management of symptomatic sexually transmitted infections. 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240024168>.
81. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *WHO* 2017: 7. Available at: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
82. World Health Organization. Global Action Plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. WHO. 2012. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241503501>.
83. Batteiger BE, Hook EW, Seña AC, *et al.* Single-Dose Zoliflodacin (ETX0914) for Treatment of Urogenital Gonorrhoea. *N Engl J Med* 2018; **379**: 1835–45.
84. Lin EY, Adamson PC, Klausner JD. Epidemiology, Treatments and Vaccine Development for

Antimicrobial - Resistant *Neisseria gonorrhoeae*: Current Strategies and Future Directions. *Drugs* 2021; **81**: 1153–69.

85. Golparian D, Fernandes P, Ohnishi M, *et al.* In Vitro Activity of the New Fluoroketolide Solithromycin (CEM-101) against a Large Collection of Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates and International Reference Strains, Including Those with High-Level Antimicrobial Resistance: Potential Treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2739–42.

86. Edward W. Hook III, Matthew Golden, *et al.* A Phase 2 Trial of Oral Solithromycin 1200 mg or 1000 mg as Single-Dose Oral Therapy for Uncomplicated Gonorrhea. *Clin Infect Dis* 2015; **61**: 1043–8.

87. Farrell DJ, Sader HS, Rhomberg PR, *et al.* In Vitro Activity of Gepotidacin (GSK2140944) against *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: 1–7.

88. Taylor SN, Morris DH, Avery AK, *et al.* Gepotidacin for the Treatment of Uncomplicated Urogenital Gonorrhea: A Phase 2, Randomized, Dose- Ranging, Single-Oral Dose Evaluation. *Clin Infect Dis* 2018; **67**: 504–12.

89. Petousis-Harris H, Paynter J, Morgan J, *et al.* Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study. *Lancet* 2017; **390**: 1603–10.

90. Paynter J, Goodyear-Smith F, Morgan J, *et al.* Effectiveness of a Group B Outer Membrane Vesicle Meningococcal Vaccine in Preventing Hospitalization from Gonorrhea in New Zealand: A Retrospective Cohort Study. *Vaccines (Basel)* 2019; **7**.

91. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2016. Stockholm: ECDC 2018. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-europe-2016>.

92. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe - Results summary 2018. Stockholm: ECDC 2020. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-europe-2018>.

93. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe Union/European Economic Area. Summary of results 2020. Stockholm: ECDC 2022. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-2020>.

94. Bignell C, Jensen JS. 2009 European (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS* 2009; **20**: 453–7.

95. Day MJ, Spiteri G, Jacobsson S, *et al.* Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC Infect Dis* 2018; **18**: 1–8.
96. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Eur Comm Antimicrob Susceptibility Testing Break tables Interpret MICs Zo diameters Version 120, 2022* <http://www.eucast.org> 2011; **12,0**: 1–110.
97. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Cabeza-Barrera MI. Antimicrobial susceptibility and typing of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain, 2012–2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; **34**: 3–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.01.017>.
98. Fuertes de Vega I, Baliu-Piqué C, Bosch Mestres J, *et al.* Risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and characteristics of patients infected with gonorrhoea. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018; **36**: 165–8.
99. Fabregat Bolufer A, Bueno Ferrando F, Navarro Ortega D, *et al.* Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in the Comunidad Valenciana (Spain): GONOVig project. *Enfermedades Infecc y Microbiología Clin* 2023.
100. Carballo R, Pova MC, Abad R, *et al.* Large Increase in Azithromycin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Northern Spain. *Microb Drug Resist* 2022; **28**: 81–6.
101. Lynagh Y, Mac Aogáin M, Walsh A, *et al.* Detailed characterization of the first high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases in Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2411–3.
102. Ni C, Xue J, Zhang C, *et al.* High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2355–7.
103. Unemo M, Workowski K. Dual antimicrobial therapy for gonorrhoea: what is the role of azithromycin? *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 486–8.
104. Public Health England. Key findings from the ‘Gonococcal resistance to antimicrobials surveillance programme’ (GRASP) 2021’. Available at: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/476582/GRASP_2014_report_final_111115.pdf.
105. CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP) Supplement & Profiles. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/std/statistics/gisp-profiles/default.htm#print>.
106. Melendez JH, Hsieh YH, Barnes M, *et al.* Can ciprofloxacin be used for precision treatment of gonorrhoea in public STD clinics? Assessment of ciprofloxacin susceptibility and an opportunity for point-

- of-care testing. *Pathogens* 2019; **8**: 1–8.
107. Allan-Blitz L-T, Adamson PC, Klausner JD, *et al.* Resistance-Guided Therapy for *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Infect Dis* 2021; **73**: 298–303.
108. Mann L, Kirkcaldy R, Papp J, *et al.* Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Gentamicin—Gonococcal Isolate Surveillance Project, 2015–2016. *Sex Transm Dis* 2018; **45**: 96–8.
109. Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis* 2010; **37**: 169–72.
110. Cole MJ, Tan W, Fifer H, *et al.* Gentamicin, azithromycin and ceftriaxone in the treatment of gonorrhoea: The relationship between antibiotic MIC and clinical outcome. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 449–57.
111. Ross JDC, Brittain C, Cole M, *et al.* Gentamicin compared with ceftriaxone for the treatment of gonorrhoea (G-ToG): a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2019; **393**: 2511–20. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32817-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32817-4).
112. Matoga M, Chen JS, Krysiak R, *et al.* Gentamicin susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* and treatment outcomes for urogenital gonorrhoea after twenty-five years of sustained gentamicin use in Malawi. *Sex Transm Dis* 2022; **49**: 251–6.
113. Rob F, Klubalová B, Nyčová E, *et al.* Gentamicin 240 mg plus azithromycin 2 g vs. ceftriaxone 500 mg plus azithromycin 2 g for treatment of rectal and pharyngeal gonorrhoea: a randomized controlled trial. *Clin Microbiol Infect* 2020; **26**: 207–12.
114. Singh V, Bala M, Bhargava A, *et al.* In Vitro Synergy Testing of Gentamicin, an Old Drug Suggested as Future Treatment Option for Gonorrhoea, in Combination with Six Other Antimicrobials Against Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strains. *Sex Transm Dis* 2018; **45**: 127–31.
115. Armstrong BH, Limnios A, Lewis DA, *et al.* Is gentamicin a viable therapeutic option for treating resistant *Neisseria gonorrhoeae* in New South Wales? *Commun Dis Intell* 2021; **45**.
116. Tesh LD, Shaer KM, Cho JC, *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* and fosfomicin: Past, present and future. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 290–6.
117. Hauser C, Hirzberger L, Unemo M, *et al.* In vitro activity of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or azithromycin against clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 1605–11.
118. Fifer H, Cole M, Hughes G, *et al.* Sustained transmission of high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in England: an observational study. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 573–81.

119. Smolarchuk C, Wensley A, Padfield S, *et al.* Persistence of an outbreak of gonorrhoea with high-level resistance to azithromycin in England, November 2014–May 2018. *Eurosurveillance* 2018; **23**: 1–7.
120. Sánchez-Busó L, Cole MJ, Spiteri G, *et al.* Europe-wide expansion and eradication of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* lineages: a genomic surveillance study. *The Lancet Microbe* 2022; **3**: e452–63.
121. Cobo F, Cabezas-Fernández MT, Avivar C. Typing and antimicrobial susceptibility of 134 *Neisseria gonorrhoeae* strains from Southern Spain. *Rev Esp Quimioter* 2019; **32**: 114–20.
122. Ibarгойen García U, Nieto Toboso MC, Azpeitia EM, *et al.* Epidemiological surveillance study of gonococcal infection in Northern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2020; **38**: 59–64.
123. Guerrero-Torres MD, Menéndez MB, Guerras CS, *et al.* Epidemiology, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid, Spain, in 2016. *Epidemiol Infect* 2019; **147**: e274.
124. Francés Cuesta C, Serra-Pladevall J, Fabregat A, *et al.* Epidemiología genómica y resistencia a antibióticos en gonococos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019; **37**.
125. De Korne-Elenbaas J, Bruisten SM, De Vries HJC, *et al.* Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* clone with reduced cephalosporin susceptibility between 2014 and 2019 in Amsterdam, the Netherlands, revealed by genomic population analysis. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 1759–68.
126. Peng JP, Yin YP, Chen SC, *et al.* A Whole-genome Sequencing Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in China: An Observational Study. *EClinicalMedicine* 2019; **7**: 47–54.
127. Osnes MN, Didelot X, de Korne-Elenbaas J, *et al.* Sudden emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* clade with reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins, Norway. *Microb Genomics* 2020; **6**: 1–9.
128. Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, *et al.* Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 758–68.

9. ANEXOS

ANEXO I

Artículos de la doctoranda no incluidos en la tesis

***Neisseria gonorrhoeae* culture growth rates from asymptomatic individuals with a positive nucleic acid amplification test**

Patricia Nadal-Barón, Paula Salmerón, Jorge Nestor García, Jesús Trejo-Zahinos, Elena Sulleiro, Luis Lopez, Cristian Jiménez de Egea, Francesc Zarzuela, Edurne Ruiz, Albert Blanco Grau, Montserrat Llinas, M^a Jesús Barberá, M^a Nieves Larrosa, Tomàs Pumarola, Yannick Hoyos Mallecot; Drassanes Exprés Collaborative Group.

Lett Appl Microbiol. 2022 Nov;75(5):1215-1224

Abstract

La infección gonocócica se diagnostica con frecuencia en localizaciones extragenitales en individuos asintomáticos y se relacionan con una mala recuperación en el cultivo, lo que dificulta las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. El objetivo de este estudio fue evaluar las tasas de recuperación de *Neisseria gonorrhoeae* por cultivo entre individuos asintomáticos que dieron positivo en pruebas de amplificación de ácido nucleico entre 2018 y 2019 en Barcelona (España). En total, se realizaron pruebas de detección de *N. gonorrhoeae* a 10.396 personas en la primera orina y en hisopos rectales, faríngeos y/o vaginales, según su comportamiento sexual. La prevalencia general de infección fue del 5,5% (intervalo de confianza [IC] del 95%: 5,0-5,9). Setecientas diez muestras resultaron positivas correspondientes a 567 individuos. El sitio más común de infección fue la faringe (71,3%), seguida del recto (23,1%) y los genitales (4,7%) ($P < 0,0001$). Se calcularon la tasa de recuperación de *N. gonorrhoeae* en cultivo, el tiempo desde la detección positiva hasta la muestra de cultivo y el retraso de la inoculación. La tasa de recuperación fue del 21,7% en faringe, 66,9% en recto y 37,0% en genitales (25,0% vagina, 71,4% uretra) ($P < 0,0001$). El tiempo medio de recogida del cultivo fue de 1 [0; 3] días, y el retraso medio de la inoculación fue de 5,01 [4,99 7,99] h, sin impacto en la recuperación de *N. gonorrhoeae*, $P = 0,8367$ y $P = 0,7670$, respectivamente. A pesar de los esfuerzos por optimizar las condiciones preanalíticas, la tasa de recuperación de *N.*

gonorrhoeae en individuos asintomáticos es inaceptablemente baja (especialmente en la faringe), lo que representa un problema para el seguimiento de las infecciones resistentes a los antimicrobianos.

Impact of time of culture specimen collection on the recovery of *Neisseria gonorrhoeae* after a positive nucleic acid amplification test

Patricia Nadal-Barón, Jesús Trejo-Zahinos, Jorge Nestor García, **Paula Salmerón**, Elena Sulleiro, Mainer Arando, Vicente Descalzo, Patricia Álvarez-López, Rachid el Ouazzani, Luis López, Francesc Zarzuela, Edurne Ruiz, Montserrat Llinas, Albert Blanco-Grau, Adrian Curran, M^a Nieves Larrosa, Tomàs Pumarola, Yannick Hoyos Mallecot.

Sex Transm Infect. 2023 Dec;99(8):520-526.

Objetivos:

El cultivo de *Neisseria gonorrhoeae* es esencial para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana (RAM). El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto del retraso en la toma de muestra para cultivo tras un test de amplificación de ácido nucleico (TAAN) positivo en un programa de cribado.

Métodos:

Se evaluó retrospectivamente el rendimiento del cultivo de *N. gonorrhoeae* en individuos asintomáticos (en su mayoría hombres que tienen sexo con hombres) que acudieron a un cribado de salud sexual y obtuvieron un TAAN positivo. Dos sistemas de cribado estaban disponibles: cribado y notificación de resultados en el día (Drassanes Exprés) o cribado convencional

Resultados:

Se cribaron 10.423 personas, de los cuales, 809 (7,7%) obtuvieron una prueba positiva para *N. gonorrhoeae*. Se testaron un total de 995 localizaciones anatómicas. Se realizó el cultivo de 583 de

las 995 (58,6%) localizaciones anatómicas (Drassanes Exprés 278 de 347, 80,1%; cribado estándar 305 de 648, 47,1%; $p < 0,001$). La recuperación fue mayor cuando las muestras de cultivo se tomaron dentro de los 3 a 7 días posteriores al cribado, con solo una ligera caída en la recuperación cuando el intervalo se extendió a 7 días. La recuperación en faringe fue del 25,5% (38/149) en 3 días, del 23,4% (19/81) después de 4-7 días ($p = 0,7245$), del 10,7% (11/102) tras 8-14 días ($p < 0,0036$) y del 4,5% (1/22) con demoras más largas ($p = 0,00287$). La recuperación del recto fue del 65,3% (49/75) en los primeros 3 días, del 62,2% (28/45) tras 4-7 días ($p = 0,7318$), del 59,4% (41/69) después de 8-14 días ($p = 0,4651$) y del 33,3% (6/18) con retrasos mayores ($p = 0,0131$). El tiempo mediano de recogida de muestras para cultivo fue de 1 día en Drassanes Exprés frente a 8 días en el cribado estándar. En consecuencia, el rendimiento global del cultivo fue ligeramente superior en Drassanes Exprés (102/278, 36,6% vs 99/305, 32,5%; $p = 0,2934$).

Conclusiones:

La reducción del intervalo entre el cribado y la toma de muestras para cultivo aumentó la recuperación de *N. gonorrhoeae* en muestras extragenitales. La implementación de un programa de cribado y notificación de resultados en el mismo día aumentó la toma de muestras para cultivo y el rendimiento del cultivo en nuestro entorno, lo que puede ayudar a la vigilancia de la RAM.

ANEXO II

Posters y comunicaciones en congresos

- *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Spain. Should we keep using azithromycin for empirical treatment?

Paula Salmerón, Belén Viñado, Beatriz Romero María Jesús Alcaráz, O. Martínez-Macías, Isabel Ferrer, Noemí Sánchez Oliver, Eva Alcoceba, Ana Morilla, Aurora Torreblanca, Judit Serra-Pladevall

29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam 2019. **Presentadora poster**

- Resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en España. ¿Monoterapia o biterapia?

Paula Salmerón, Belén Viñado, Beatriz Romero, María Jesús Alcaráz, O. Martínez-Macías, Isabel Ferrer, Noemí Sánchez Oliver, Eva Alcoceba, Ana Morilla, Aurora Torreblanca, Judit Serra-Pladevall

XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid 2019. **Comunicación oral**

- Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona: from 2013 to 2018.

Paula Salmerón, Belén Viñado, Miriam Montero, Mireia Alberny, Mireia Jané, Tomàs Pumarola, Yannick Hoyos, Maider Arando, Judit Serra-Pladevall

33rd International Union Against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Estonia 2019.

Comunicación oral

- Resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en España: estudio multicéntrico prospectivo.

Paula Salmerón, Belén Viñado, Maider Arando, Beatriz Romero, Blanca Menéndez, Javier Colomina, Olalla Martínez, Gloria Martín-Saco, Samuel Bernal, Eva Alcoceba, Laura Villa, Aurora Torreblanca, Pedro Idigoras, Judit Serra-Pladevall

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Online 2020 (Abstract book) (**Premio a la mejor comunicación**).

- Estudio multicéntrico de la epidemiología molecular de *Neisseria gonorrhoeae* en España.

Paula Salmerón, Alberto Rojo, Maider Arando, Javier Colomina, Olalla Martínez, Gloria Martín-Saco, Samuel Bernal, Eva Alcoceba, Álvaro Leal-Negredo, Aurora Torreblanca, Pedro Idigoras, Judit Serra-Pladevall

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Online 2020 (Abstract book)

- Emergencia y diseminación de dos linajes de *Neisseria gonorrhoeae* con resistencia de alto nivel a azitromicina en Barcelona entre 2016 y 2017 en España.

Paula Salmerón, Albert Moreno-Mingorance, Jesús Trejo, Raquel Amado, Belén Viñado, Thais Cornejo, M^a Jesús Barberá, Mireia Alberný, Maider Arando, Juan José González-López, Judit Serra-Pladevall

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Online 2020 (Abstract book)

- *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Spain: a prospective multicentre study.

Paula Salmerón, Belén Viñado, Maider Arando, Beatriz Romero, Blanca Menéndez, Javier Colomina, Olalla Martínez, Gloria Martín-Saco, Samuel Bernal, Eva Alcoceba, Álvaro Leal-Negredo, Aurora Torreblanca, Pedro Idigoras, Judit Serra-Pladevall

34th International Union against Sexually Transmitted Infections Congress (IUSTI).

Comunicación oral. Online Septiembre 2020.

- Emergence and dissemination of three discrete outbreaks of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin in Barcelona, 2016-2018.

Paula Salmerón, Albert Moreno-Mingorance, Jesús Trejo, Raquel Amado, Belén Viñado, Thais Cornejo, M^a Jesús Barberá, Mireia Alberny, Maider Arando, Yannick-Hoyos, Juan José González-López, Judit Serra-Pladevall

34th International Union Against Sexually Transmitted Infections Congress (IUSTI). **Poster**.
Online Septiembre 2020.

- Evaluation of resistance plus GC assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and markers associated with ciprofloxacin-susceptibility and resistance

Paula Salmerón, Simon Bone, Patricia García, Belén Viñado, Beatriz Romero, Javier Colomina, Olalla Martínez-Macías, Gloria Martín-Saco, Noemí Oliver, Eva Alcoceba, Laura Villa, Aurora Torreblanca, Pedro Idigoras, Tomàs Pumarola, Yannick Hoyos, Judit Serra-Pladevall

34th International Union Against Sexually Transmitted Infections Congress (IUSTI). **Poster**.
Online Septiembre 2020.

- Genome-based epidemiology and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Spain: a prospective multicentre study

Paula Salmerón, Cameron Buckley, Maider Arando, Eva Alcoceba, Beatriz Romero, Blanca Menéndez, David Whiley, Judit Serra-Pladevall

31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Online. Julio 2021. **Póster**.

- Epidemiología genómica de *Neisseria gonorrhoeae* en tres centros de la geografía española.

Paula Salmerón, Cameron Buckley, David Whiley, Maider Arando, Beatriz Romero, Blanca Menéndez, Eva Alcoceba, Judit Serra-Pladevall

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) Virtual. Junio 2021. **Comunicación oral**

- Estudio coordinado sobre la infección por *Neisseria gonorrhoeae* en España: sensibilidad antimicrobiana y dinámica poblacional

Paula Salmerón, Belén Viñado, Mainer Arando, Eva Alcoceba, Beatriz Romero, Blanca Menéndez, Samuel Bernal, Pedro Idigoras, Javier Colomina, Gloria Martin-Saco, Álvaro Leal-Negredo, Aurora Torreblanca, Olalla Martínez, Judit Serra-Pladevall (IP)

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) Virtual. Junio 2021. **Ponente en reunión científica del Grupo de Estudio GEITS**

- Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Barcelona from 2013 to 2020.

Paula Salmerón, Yannick Hoyos, Belén Viñado, Miriam Montero-Martínez, Marta Hernández, Mireia Alberny, María Jesús Barberá, Tomàs Pumarola, Judit Serra-Pladevall

22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Lisboa 2022.

Póster

- Sensibilidad antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en Barcelona de 2013 a 2021.

Paula Salmerón, Yannick Hoyos, Belén Viñado, Nieves Larrosa, Miriam Montero-Martínez, Marta Hernández, Mireia Alberny, María Jesús Barberá, Tomàs Pumarola, Judit Serra-Pladevall

XXV Congreso nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Granada junio de 2022. **Comunicación oral**

- Impact of delaying *Neisseria gonorrhoeae* culture after positive nucleic acid amplification test in growth recovery rate.

Patricia Nadal-Barón, Jesús Trejo-Zahínos, Jorge Néstor García, **Paula Salmerón**, Elena Sulleiro, Mainer Arando, Vicente Descalzo, Patricia Álvarez, Rachid El Ouazzani, Luis López, Francesc

Zarzuela, Edurne Ruiz, Montserrat Llina, Albert Blanco-Grau, Adria Currán, Maria Nieves

Larrosa, Tomás Pumarola, Yannick Hoyos-Mallecot

33rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Copenhagen

2023. **Póster**