



Universidad de Granada

Programa de Doctorado en Biomedicina

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL
Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE *MYCOPLASMA GENITALIUM***

TESIS DOCTORAL

Adolfo de Salazar González

Granada, 2022



Universidad de Granada

Programa de Doctorado en Biomedicina

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL
Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE *MYCOPLASMA GENITALIUM***

Director de Tesis:

Dr. Federico García García

Memoria presentada por **D. Adolfo de Salazar González** para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada
en el Programa de Doctorado en Biomedicina.

2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Adolfo de Salazar González
ISBN: 978-84-1117-249-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/73188>

El doctorando **Adolfo de Salazar González** y el director de la tesis, **Federico García García** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 18 de diciembre de 2021.

Director de la Tesis

GARCIA
GARCIA
FEDERICO -
28711062R

Firmado digitalmente por
GARCIA GARCIA
FEDERICO -
28711062R
Fecha: 2021.12.18
13:43:15 +01'00'

Fdo. Dr. Federico García García

Doctorando

DE SALAZAR
GONZALEZ
ADOLFO -
28843527D

Firmado digitalmente
por DE SALAZAR
GONZALEZ ADOLFO -
28843527D
Fecha: 2021.12.18
12:39:10 +01'00'

Fdo. Adolfo de Salazar González

Índice

Índice.....	2
Producción científica.....	6
Listado de abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Summary.....	12
Introducción.....	16
1. Infecciones de transmisión sexual.....	18
1.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	20
1.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	26
1.3. <i>Mycoplasma genitalium</i>	32
1.4. <i>Trichomonas vaginalis</i>	38
1.5. Otras Infecciones de Transmisión Sexual.....	40
2. Epidemiología actual de las Infecciones de Transmisión Sexual.....	44
2.1 Situación de las ITS en España, Europa y el Mundo.....	46
3. Diagnóstico microbiológico.....	50
Planteamiento e hipótesis de la tesis doctoral.....	58
Capítulo 1. Comparación entre diferentes técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual.....	60
1. Objetivos del capítulo 1.....	62
2. Materiales y métodos.....	64
3. Resultados.....	72
4. Discusión.....	76
Capítulo 2. Rendimiento y validación clínica de un nuevo método basado en microarrays para la detección de patógenos causantes de infecciones de transmisión sexual a partir de muestras clínicas directas.....	80
1. Objetivos del capítulo 2.....	82
2. Materiales y métodos.....	84
3. Resultados.....	90
4. Discusión.....	95
Capítulo 3. Análisis de la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en <i>Mycoplasma genitalium</i>	99
1. Objetivos del capítulo 3.....	101
2. Materiales y métodos.....	103
3. Resultados.....	109

4. Discusión.....	113
Conclusiones	119
Bibliografía	123
Índice de tablas	133
Índice de figuras	135
Anexos.....	137
Anexo 1. Aprobación del Comité Ético de Investigación de Granada del estudio llevado a cabo en el capítulo 1.	139
Anexo 2. Aprobación del Comité Ético de Investigación de Granada del estudio llevado a cabo en el capítulo 2.	140
Anexo 3. Aprobación del Comité Ético de Investigación de Granada del estudio llevado a cabo en el capítulo 3.	141

Producción científica

Los resultados de esta tesis doctoral han sido presentados a congresos nacionales e internacionales y finalmente han sido publicados en revistas internacionales:

Congresos nacionales:

- Resistencia a macrólidos y quinolonas en *Mycoplasma genitalium* en aislados de la provincia de Granada. Comunicación Oral. XXI Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). Sevilla. 23/11/2019
- Resistencia a macrólidos en *Mycoplasma genitalium* en el sur de España. Comunicación Poster. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid. 24/05/2019
- Evaluación de los kits del sistema Panther® (Hologic) para la detección de agentes infecciosos causantes de Enfermedades de Transmisión Sexual. Comunicación Poster Oral. IX Congreso del Grupo de Estudio del SIDA (GESIDA-SEIMC). Vigo. 1/12/2017

Congresos internacionales:

- Resistance to macrolides in *Mycoplasma genitalium* in southern Spain. Comunicación Poster. 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Amsterdam. 13/04/2019
- Performance of the new STD Direct Flow Chip kit for the detection of sexually transmitted disease agents. Comunicación Poster. 27th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Amsterdam. 25/04/2017

Publicaciones:

- **de Salazar A**, Barrientos-Durán A, Espadafor B, Fuentes-López A, Chueca N, García F. Macrolide and fluoroquinolone resistance of *Mycoplasma genitalium* in southern Spain, 2018-2019. Sex Transm Infect. 2021 Feb;97(1):8-10. doi: 10.1136/sextrans-2019-054386.
- **de Salazar A**, Espadafor B, Fuentes-López A, Barrientos-Durán A, Salvador L, Álvarez M, et al. Comparison between Aptima Assays (Hologic) and the Allplex STI Essential Assay (Seegene) for the diagnosis of Sexually transmitted infections. PLoS ONE 2019;14:e0222439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222439>.
- Barrientos-Durán A*, **de Salazar A***, Alvarez-Estévez M, Fuentes-López A, Espadafor B, Garcia F. Detection of sexually transmitted disease-causing pathogens from direct clinical specimens with the multiplex PCR-based STD Direct Flow Chip Kit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2020. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03686-w>.

Listado de abreviaturas

ARNr	ARN ribosómico
AZM	Azitromicina
BASHH	British Association for Sexual Health and HIV
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	ADN complementario
CFM	Cefixima
CIP	Ciprofloxacino
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CRO	Ceftriaxona
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DOX	Doxiciclina
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDO	Enfermedad de Declaración Obligatoria
EPI	Enfermedad Pélvica Inflamatoria
FDA	Food and Drug Administration
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
GEN	Gentamicina
GESIDA	Grupo de Estudio del SIDA-SEIMC
HPA	Hybridization Protection Assay
HSH	Hombres que tienen Sexo con Hombres
IC95	Intervalo de Confianza al 95%
IQR	Rango Intercuartílico
ITS	Infección de Transmisión Sexual
LGV	Linfogranuloma Venéreo
MG	<i>Mycoplasma genitalium</i>
MXF	Moxifloxacino
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QRDR	Región Determinante de la Resistencia a las Quinolonas

RGST	Terapia Secuencial Guiada por la Resistencia
RT-PCR	PCR en Tiempo Real
SE	Sensibilidad
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Especificidad
TAAN	Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos
TMA	Amplificación Mediada por Transcripción
TOC	Prueba de Curación
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
UDG	Uracilo-DNA-Glicosilasa
UNG	Uretritis No Gonocócica
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo

Resumen

A nivel global, los últimos datos de la OMS estiman que, en 2016, hubo unos 370 millones de nuevas infecciones de alguna de estas tres ITS: clamidiasis (127 millones), gonorrea (87 millones) y tricomoniasis (156 millones). Debido a su alto impacto en la salud de la población, recientemente, se ha producido el surgimiento de una amplia variedad de pruebas diagnósticas para el análisis de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) basados en distintas metodologías de amplificación de ácidos nucleicos. La OMS ha formulado la “Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra las Infecciones de Transmisión Sexual – Hacia el fin de las ITS” en el que especifica como uno de sus principales objetivos la evaluación de las pruebas de detección de ITS, la creación de plataformas múltiples que permitan el diagnóstico simultáneo de varias ITS al mismo tiempo, especialmente las provocadas por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis*, y la detección de resistencias a los antimicrobianos. Con el objetivo de profundizar y evaluar estos métodos antes de su implementación en la rutina de los servicios de Microbiología, se ha desarrollado esta tesis doctoral, que consta de tres capítulos:

En el primer capítulo se realizó una comparación entre técnicas basadas en PCR en tiempo real (RT-PCR) y Amplificación mediada por transcripción (TMA), para el diagnóstico de las ITS. Se analizaron un total de 622 muestras clínicas procedentes de diferentes localizaciones anatómicas utilizando ambos métodos. Se encontró un total de 88 (14,1%) y 66 (10,6%) muestras positivas para cualquiera de los ensayos TMA utilizados y para el ensayo RT-PCR, respectivamente. Los ensayos TMA mostraron una tasa ligeramente superior de resultados positivos para todos los patógenos, excepto para *T vaginalis*. El patógeno detectado con mayor frecuencia fue *C. trachomatis* (37 muestras; 5,9% con los ensayos TMA) y el lugar anatómico con mayor prevalencia de microorganismos fue un lugar no urogenital, la faringe (27 muestras positivas; 4,3%). Utilizando los ensayos TMA como método de referencia, la comparación mostró que la especificidad media de la RT-PCR multiplex era del 100% para los cuatro

patógenos. Sin embargo, se observó una sensibilidad media del 74,5%, mostrando un 95,2% (CI95%; 93,6-96,9) de concordancia global ($\kappa = 0,80$) de la RT-PCR frente a las técnicas por TMA.

En el segundo capítulo se evaluó el rendimiento clínico de un nuevo método de diagnóstico de ITS mediante el uso de microarrays (kit STD Direct Flow Chip), en dos etapas diferentes: (i) a partir de ADN purificado de trescientos cincuenta y ocho especímenes clínicos, con una sensibilidad y especificidad diagnósticas del 99,4% y el 100%, respectivamente, y una concordancia del 99% (índice kappa, $\kappa = 0,97$) con el método de referencia, y (ii) por PCR directa a partir de seiscientos treinta y tres especímenes, con valores de sensibilidad, especificidad y concordancia del 98,4%, 99,9% y 98,0% ($\kappa = 0,95$), respectivamente.

En el tercer capítulo nos centramos en el estudio de las resistencias a antimicrobianos en *M. genitalium* (MG), del cual se desconocen las tasas de resistencias en nuestro medio. Para ello, se analizaron muestras positivas para MG recogidas entre junio de 2018 y junio de 2019 mediante la secuenciación de los genes 23S ARNr y parC. Se incluyeron un total de 77 pacientes (24 hombres que tienen sexo con hombres (HSH), 30 hombres heterosexuales y 23 mujeres), que mostraron mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en el 36,4% (IC 95%: 25,7% a 48,1%) y el 9,1% (IC 95%: 3,7% a 17,8%) de los pacientes, respectivamente. Ser HSH y haber tenido otra ITS en el último año se asoció significativamente con la infección por MG resistente a los macrólidos, mientras que no se encontró ninguna asociación con la resistencia a las fluoroquinolonas.

Summary

Globally, the latest WHO data estimate that, in 2016, there were about 370 million new infections of one of these three STIs: chlamydia (127 million), gonorrhoea (87 million) and trichomoniasis (156 million). Due to their high impact on population health, a wide variety of diagnostic tests for the analysis of Sexually Transmitted Infections (STIs) based on different nucleic acid amplification methodologies have recently emerged. The WHO has formulated the "Global Health Sector Strategy on Sexually Transmitted Infections – Toward ending STIs" in which it specifies as one of its main objectives the evaluation of STI testing, the development of multiple platforms that allow simultaneous diagnosis of several STIs at the same time, especially those caused by *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* and *T. vaginalis*, and the detection of antimicrobial resistance. This doctoral thesis, which consists of three chapters, has been developed with the aim of deepening and evaluating these methods before their implementation in routine microbiology services:

In the first chapter, a comparison was made between tests based on real-time PCR (RT-PCR) and Transcription Mediated Amplification (TMA), for the diagnosis of STIs. A total of 622 clinical samples from different anatomical sites were analyzed using both methods. A total of 88 (14.1%) and 66 (10.6%) samples were found positive for either of the TMA assays used and for the RT-PCR assay, respectively. The TMA assays showed a slightly higher rate of positive results for all pathogens, except for *T. vaginalis*. The most frequently detected pathogen was *C. trachomatis* (37 samples; 5.9% with TMA assays) and the anatomical site with the highest prevalence of microorganisms was a non-urogenital site, the pharynx (27 positive samples; 4.3%). Using the TMA assays as the reference method, the comparison showed that the mean specificity of multiplex RT-PCR was 100% for all four pathogens. However, a mean sensitivity of 74.5% was observed, showing 95.2% (CI95%; 93.6-96.9) overall agreement ($\kappa = 0.80$) of RT-PCR versus TMA techniques.

The second chapter evaluated the clinical performance of a new STI diagnostic method using microarrays (STD Direct Flow Chip kit) in two different ways: (i) from purified DNA from three hundred and fifty-eight clinical specimens, with diagnostic sensitivity and specificity of 99.4% and 100%, respectively, and 99% concordance (kappa index, $\kappa = 0.97$) with the reference method, and (ii) by direct PCR from six hundred and thirty-three specimens, with sensitivity, specificity and concordance values of 98.4%, 99.9% and 98.0% ($\kappa = 0.95$), respectively.

In the third chapter, we focused on the study of antimicrobial resistance in *M. genitalium* (MG), for which resistance rates in our environment are unknown. For this purpose, MG-positive samples collected between June 2018 and June 2019 were analyzed by 23S rRNA and parC gene sequencing. A total of 77 patients (24 men who have sex with men (MSM), 30 heterosexual men and 23 women) were included, showing mutations associated with macrolide and fluoroquinolone resistance in 36.4% (95% CI: 25.7% to 48.1%) and 9.1% (95% CI: 3.7% to 17.8%) of patients, respectively. Being MSM and having had another STI in the past year were significantly associated with macrolide-resistant MG infection, while no association was found with fluoroquinolone resistance.

INTRODUCCIÓN

1. Infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS), también conocidas como enfermedades de transmisión sexual (ETS), son un conjunto de infecciones que se transmiten por la actividad sexual, especialmente el coito vaginal, el sexo anal y el sexo oral. Constituyen un problema de salud pública en aumento a nivel mundial, con un número estimado de un millón de nuevas infecciones cada día. Aunque en gran medida se pueden prevenir, tienen una amplia gama de consecuencias negativas en la salud individual, que van desde afecciones agudas o asintomáticas hasta complicaciones graves, secuelas a largo plazo y aumentar el riesgo de contraer otras infecciones. Más allá de la significativa morbilidad y mortalidad, las ITS también acarrearán una enorme carga económica para el sistema sanitario.

Más de 30 bacterias, virus y parásitos diferentes pueden transmitirse mediante un contacto sexual, sin embargo, nueve de estos patógenos constituyen la mayor incidencia de enfermedades en el mundo. De estas nueve infecciones, cinco son actualmente curables con un régimen antibiótico correcto, como son las producidas por *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Trichomonas vaginalis* (TV) y *Mycoplasma genitalium* (MG). Las otras cuatro son infecciones virales crónicas que, aunque tienen tratamiento, permanecen persistentes en el organismo, la hepatitis B, el herpes simple, el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus del papiloma humano.

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en cuatro patógenos en los que el diagnóstico por métodos moleculares ha supuesto uno de los mayores avances, para poder conocer las cifras reales de su incidencia y prevalencia.

1.1. *Chlamydia trachomatis*

1.1.1. *Biología y Patogenia*

Chlamydia trachomatis fue aislada por primera vez de pacientes con tracoma utilizando embriones de pollo por Tang et al. en 1946. Se engloba dentro del orden *Chlamydiales*, familia *Chlamydiaceae*, que constituyen bacterias intracelulares obligatorias con un genoma bacteriano muy pequeño debido a una evolución reductiva en la cual han perdido enzimas y vías metabólicas, dependiendo de la célula huésped para completar su ciclo de desarrollo. El genoma de *C. trachomatis* comprende un cromosoma de 1.0 megabases y un plásmido de 7.5 kilobases que codifica genes esenciales para la infección y la transmisión.

Las clamidias presentan un ciclo de vida peculiar, ya que pasan por formas infecciosas extracelulares e inactivas desde el punto de vista metabólico (Cuerpos elementales [CE]) y por formas no infecciosas con actividad metabólica intracelulares (cuerpos reticulados [CR]) (1).

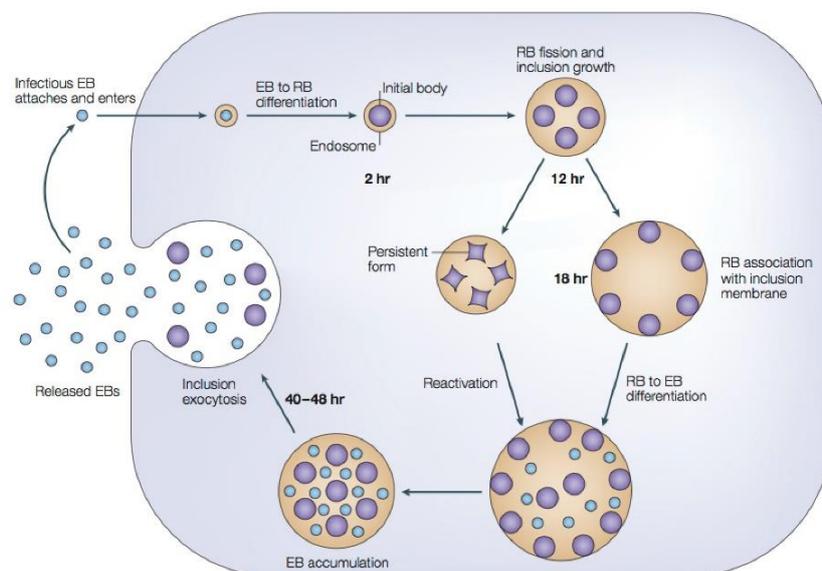


Figura 1. Ciclo de vida de *C. trachomatis*. A las 12 horas de la unión a la célula huésped, los CE han sufrido un proceso de reorganización a CR transformando la proteína MOMP de trimérica a monomérica. En condiciones de estrés, los cuerpos reticulados entran en un estado persistente y pasan a ser cuerpos aberrantes que pueden reactivarse al desaparecer el estrés. Fuente: Brunham et al. Copyright 2005 Nature Publishing Group.

En el ser humano, el espectro de células que puede infectar *C. trachomatis* es limitado. Los receptores para los CE se restringen fundamentalmente a las células del epitelio cilíndrico no ciliado, que se encuentran en las membranas mucosas de la uretra, el endocérvix, el endometrio, las trompas de Falopio, el ano y recto, el aparato digestivo y la conjuntiva del hospedador, logrando acceder a ellas a través de abrasiones o laceraciones diminutas.

Actualmente se reconocen 19 serovares o serotipos de *C. trachomatis* (A, B / Ba, C, D / Da, E, F, G / Ga, H, I / Ia, J, K, L1, L2, L2a y L3) según epítomos específicos de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) codificada por el gen *ompA*. Este gen codifica estructuras proteicas altamente conservadas que contienen cuatro dominios espaciados uniformemente cuyas secuencias varían entre los diferentes serovares (2). Existe una relación directa entre el serotipo y la forma clínica que producen las diferentes cepas de esta especie.

1.1.2. Manifestaciones clínicas

El tracoma, producida por los genotipos A-C, es una queratoconjuntivitis crónica que constituye la causa más común de ceguera evitable en el mundo (3). Afecta principalmente a niños de países en desarrollo de África subsahariana y Asia, siendo raro en Europa y América del Norte. Inicialmente se presenta mediante una conjuntivitis folicular, en la que, si no se instaura tratamiento, puede llegar a generar cicatrices en la conjuntiva y provocar la retracción del párpado evolucionando hasta ceguera.

En las infecciones urogenitales, causadas por los genotipos D-K, diferenciamos aquellas producidas en mujeres y en hombres. En mujeres, aunque la mayoría de infecciones por *C. trachomatis* son asintomáticas (70-95%) (4), en caso de no tratarse pueden ascender al tracto genital superior y causar enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) y secuelas como infertilidad y dolor crónico, además de constituir un importante reservorio para la diseminación de *C. trachomatis*. Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes se encuentran la disuria, cervicitis, endometritis, uretritis, y otras menos frecuentes como la salpingitis, perihepatitis

(síndrome de Fitz-Hugh-Curtis), y la anteriormente mencionada EPI (5). En mujeres embarazadas, la infección genital por clamidia durante el embarazo aumenta el riesgo de rotura prematura de membrana y parto prematuro (6,7). Aunque la incidencia de embarazo ectópico e infertilidad tubárica posterior es baja, la EPI causada por *C. trachomatis* sigue siendo la causa prevenible más importante de complicaciones reproductivas (8).

En hombres, el 50% de las infecciones por *C. trachomatis* son sintomáticas. Aproximadamente, entre el 40 y el 50% de las uretritis no gonocócicas (UNG) están producidas por *C. trachomatis*, siendo bastante frecuente las coinfecciones con *N. gonorrhoeae*. Cuando los varones presentan clínica, por lo general se presenta con una uretritis con secreción uretral acuosa o mucóide, siendo la disuria el síntoma más destacado. Las complicaciones de una infección por *C. trachomatis* en los hombres incluyen epididimitis y epididimoorquitis, siendo estas condiciones una posible causa de subfertilidad o infertilidad en los hombres. No existe una evidencia clara entre la infección por *C. trachomatis* y la infertilidad en hombres, sin embargo, *C. trachomatis* tiene un efecto directo en la calidad, concentración y motilidad del espermatozoides (9).

Tanto en hombres como en mujeres, las infecciones por *C. trachomatis* causadas por los serovares D-K, también pueden producirse en lugares anatómicos distintos como la faringe y el recto, siendo estas infecciones habitualmente asintomáticas y constituyendo un reservorio de infección (10). A su vez, las células epiteliales de la conjuntiva pueden ser infectadas por *C. trachomatis* D-K provocando una conjuntivitis de inclusión diferente al tracoma endémico.

El síndrome de Reiter (uretritis, conjuntivitis, artritis y lesiones mucocutáneas) o la artritis reactiva (más graves en pacientes con fenotipo HLA-B27) también se han asociado a las infecciones genitales por *C. trachomatis*, con una elevada proporción hombre/mujer (11).

La infección por Linfogramuloma venéreo, causada por los serovares L1, L2 y L3, es predominantemente una enfermedad del tejido linfático, provocando una reacción linfoproliferativa que tiende a ulcerarse. Anteriormente esta infección se encontraba con mayor

frecuencia en áreas tropicales y subtropicales del mundo causando úlceras genitales y linfadenopatías, sin embargo, actualmente se ha informado cada vez más entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) que presentan proctitis o tenesmo, secreción anorrectal (a menudo sanguinolenta) y malestar, diarrea o alteración de los hábitos intestinales, que en caso de no tratarse puede provocar fístulas y estenosis rectales (12). La presentación puede confundirse con una enfermedad inflamatoria intestinal (13).

Los recién nacidos de madres con infecciones por clamidia pueden infectarse en el momento del parto a través de las secreciones vaginales infectadas, provocando en un 30-50% de los casos conjuntivitis neonatal (ophthalmia neonatorum) y con menor frecuencia, neumonía del lactante.

1.1.3. Tratamiento y Resistencia a antibióticos

Los antibióticos usados para el tratamiento de la infección por *C. trachomatis* son aquellos que actúan sobre las formas metabólicamente activas y por tanto tienen buena penetración intracelular, como son las tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Las guías de tratamiento internacionales y nacionales recomiendan la doxiciclina 100 mg dos veces al día por vía oral durante 7 días o la azitromicina 1 gr en dosis única en el tratamiento de las infecciones urogenitales no complicadas y en la conjuntivitis por *C. trachomatis*. Recientes metaanálisis han demostrado la significativamente superioridad de la pauta de doxiciclina frente a azitromicina en las tasas de curación (97,4 frente al 96,2 por ciento, respectivamente) y en el fracaso microbiológico de azitromicina vs doxiciclina (RR 2.45, 95%CI 1.36-4.41), sin embargo la azitromicina puede administrarse como dosis única in situ asegurando la adherencia del tratamiento (14,15). En infecciones complicadas (epididimitis y EPI) el tratamiento con doxiciclina se extiende a 14 días. Para las infecciones rectales no complicadas por serovares D-K, se recomienda doxiciclina 7 días frente a azitromicina, mientras que en infecciones por serovares L1-L3, el tratamiento con doxiciclina se prolonga hasta 21 días.

La reinfección es la principal causa de los fallos clínicos al tratamiento. No existen hoy en día documentados cambios genéticos que confieran una resistencia estable a los antimicrobianos que dificulte el tratamiento en entornos clínicos. Se han descrito algunos fracasos del tratamiento clínico con azitromicina 1 g en dosis oral única (16), pero es más probable que se expliquen por la reinfección anteriormente mencionada, un mal cumplimiento al tratamiento, o la detección de *C. trachomatis* no viable mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tomada demasiado pronto, que por la existencia de resistencia antimicrobiana. En los genotipos invasivos de *C. trachomatis* tampoco hay evidencia genética de esos fracasos (17), sin embargo, se han descrito casos de resistencia al tratamiento relacionado con cargas bacterianas altas y por tanto, un más lento aclaramiento bacteriano (18).

1.2. *Neisseria gonorrhoeae*

1.2.1. Biología y Patogenia

Neisseria gonorrhoeae es un diplococo gram negativo perteneciente a la familia Neisseriaceae, dentro de la clase Beta Proteobacteria. Se encuentra estrechamente relacionada tanto genómica, morfológica y fenotípicamente con otras especies patógenas de *Neisseria*, como *N. meningitidis*. *N. gonorrhoeae* tiene un solo cromosoma circular de 2,1-2,3 megabases y aproximadamente unas 2200-2500 secuencias codificadoras de proteínas. Normalmente tiene un tamaño entre 0.6 y 1 µm, cuyos lados adyacentes se aplanan formando una morfología parecida a la de un grano de café debido a la división incompleta que se produce durante el proceso de fisión binaria. Es un microorganismo exigente y sensible a muchos factores ambientales como el oxígeno, las temperaturas no fisiológicas, la desecación y la presencia de sustancias tóxicas (como algunos ácidos grasos), por lo que la bacteria no sobrevive por mucho tiempo fuera del huésped humano (19). Puede crecer en medios selectivos enriquecidos como el agar chocolate a una temperatura de 35-37°C y una concentración del 5% de CO₂, pero su viabilidad se pierde tras 48-72 horas debido a fenómenos de autólisis.

N. gonorrhoeae es un patógeno humano obligado, siendo considerado siempre patógeno, incluso cuando no existen síntomas de la enfermedad. Tras el contacto sexual con una persona infectada, gonorrea necesita adherirse al epitelio de las mucosas del tracto urogenital, recto, orofaringe y/o conjuntiva, para lo cual, intervienen diversas estructuras y mecanismos que limitan los sistemas de defensa del huésped. Entre estas estructuras se encuentran, los *pili* de tipo IV, las proteínas Opa (proteínas de opacidad), el lipooligosacárido, la proteína Rmp (proteína de reducción modificable) y la porina porB. Estos antígenos son responsables de la adherencia a las células humanas no ciliadas, de la evasión inmunitaria del huésped, de la diseminación y del daño celular provocado por la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α.

1.2.2. Manifestaciones clínicas

Los signos y síntomas de la infección por *N. gonorrhoeae* varían en función del lugar de la infección.

La infección urogenital en hombres se restringe principalmente a la uretra, causando una uretritis purulenta a los 2-5 días de la exposición en el 90% de los casos. La secreción a menudo se presenta de manera espontánea en el meato uretral, en abundante cantidad, lo cual la diferencia de las uretritis no gonocócicas causadas por otros patógenos (*C. trachomatis*, *M. genitalium*, entre otros). Las complicaciones de la infección urogenital son infrecuentes, aunque pueden darse casos de epididimitis, prostatitis y abscesos periuretrales.

El principal sitio de infección en las mujeres es el cuello uterino, debido a que *N. gonorrhoeae* infecta las células del epitelio cilíndrico del endocérvix. La mayoría de las mujeres tienen una infección asintomática (hasta un 70%), presentándose en aquellos casos sintomáticos una cervicitis con prurito genital y/o secreción mucopurulenta. Dada la alta incidencia de infección asintomática en mujeres, es frecuente una complicación de la vías ascendentes, en forma de EPI, salpingitis, abscesos tubo-ováricos y graves secuelas reproductivas, como corioamnionitis, rotura prematura de membranas, parto prematuro, embarazo ectópico, infertilidad, etc. (20–22).

Tanto en hombre como en mujeres, *N. gonorrhoeae* puede infectar lugares extra-genitales, como la conjuntiva, el recto y la faringe. La infección de la conjuntiva debido al contacto directo con secreciones infectadas puede dar lugar a una conjuntivitis purulenta hiperaguda. Las infecciones producidas en la orofaringe son en su mayoría asintomáticas, aunque en algunos casos existen faringitis leves acompañadas con linfadenitis cervical. Es común la presencia de gonorrea orofaríngea y urogenital (10,23). Aunque la carga bacteriana en la faringe es baja, la gonorrea faríngea parece jugar un papel importante como reservorio donde se produce la adquisición de genes de resistencia por transmisión horizontal con otras especies de *Neisseria*

comensales que se encuentran en la orofaringe (24). Al igual que la infección faríngea, la infección del recto cursa de manera asintomática en el 90% de los casos (25). En el resto cursa con una proctitis aguda, que incluye tenesmo y dolor y/o prurito anorrectal. Este tipo de infección ocurre típicamente en HSH, siendo infrecuentes en hombres heterosexuales.

La infección gonocócica diseminada es una complicación poco frecuente que aparece debido a la diseminación hematógena de *N. gonorrhoeae* a partir de la 2ª o 3ª semana de una infección primaria asintomática de las mucosas. La diseminación a menudo conduce a uno de dos síndromes clínicos: artritis purulenta o una tríada de tenosinovitis, dermatitis y poliartralgias.

1.2.3. Tratamiento y Resistencia a antibióticos

El tratamiento antibiótico de la gonorrea ha ido evolucionando a lo largo de los años desde que se empezó a tratar con sulfonamidas a principio de 1930. La rápida aparición de resistencias a diversos antibióticos unida a la necesidad de un tratamiento eficaz para evitar la transmisión ha hecho que el régimen antibiótico cambie prácticamente cada década (Figura 2).

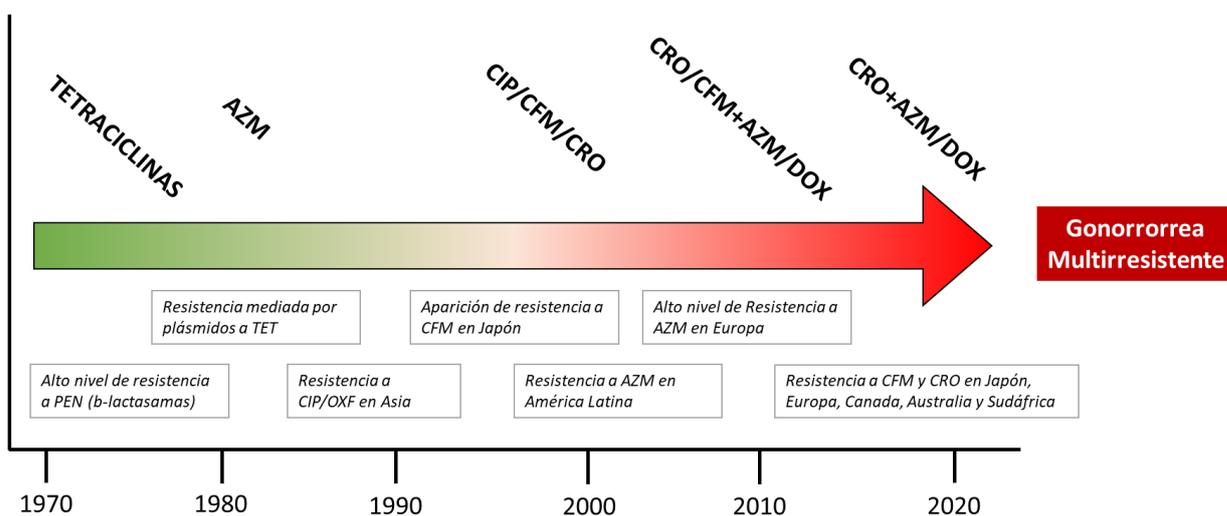


Figura 2. Evolución histórica del tratamiento a *N. gonorrhoeae*. Adaptado de Unemo et al. 2014.
 AZM: Azitromicina, CIP: Ciprofloxacino, CFM: Cefixima, CRO: Ceftriaxona, DOX: Doxiciclina

Actualmente el régimen terapéutico para el tratamiento de la infección por gonococo se basa en una cefalosporina de 3^o generación, la ceftriaxona, que cumple con los requisitos de eficacia en dosis única, pocos efectos adversos y una tasa relativamente baja de farmacorresistencia (26), tal y como señalan las principales guías clínicas resumidas en la tabla 1. La terapia dual para la infección gonocócica con ceftriaxona parenteral más azitromicina oral se recomienda actualmente como terapia empírica de primera línea por las guías globales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en las guías clínicas de una gran cantidad de países. La justificación para introducir la terapia dual fue abordar el problema de la coinfección por *C. trachomatis*, que ocurre en el 10-40% de las personas con gonorrea urogenital (27), así como el beneficio hipotético de reducir la aparición de una menor susceptibilidad a la ceftriaxona en *N. gonorrhoeae*; sin embargo, la preocupación por el daño potencial al microbioma y el efecto sobre otros patógenos (aumento de resistencia en *M. genitalium*) disminuye los beneficios de mantener la terapia dual. En consecuencia, países como Japón, Reino Unido desde 2019 y la nueva guía del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2021, recomiendan la ceftriaxona en monoterapia para el tratamiento de la gonorrea. En algunas pautas internacionales y nacionales, se recomienda cefixima más azitromicina como un régimen alternativo, pero solo si no se dispone de ceftriaxona o se rechaza la inyección.

		GESIDA 2017	BASHH 2019	CDC 2021
Infección gonocócica no complicada en Cérvix, Uretra, Recto o Faringe	De elección	CRO 500mg IM MD + AZM 1gr VO MD	- CIP 500mg VO MD (si sensible a FQ) - CRO 1g IM MD	CRO 500 mg IM MD *si peso >150 kg, CRO 1 gr
	Alternativo	CFM 400 mg VO MD + AZM 2 gr VO MD	CFM 400 mg VO MD + AZM 2 gr VO MD	- GEN 240mg IM MD + AZM 2g VO MD - CFM 800mg VO MD
Infección gonocócica resistente o fallos a tratamiento		CRO 1 gr IM MD + AZM 2 gr VO MD	- CRO 1 gr IM MD + AZM 2 gr VO MD - GEN 240mg IM MD + AZM 2g VO MD	- Retratamiento con CRO 500 mg IM MD

Tabla 1. Tratamiento de las infecciones gonocócicas según guías clínicas.
CRO: Ceftriaxona, AZM: Azitromicina, CIP: Ciprofloxacino, CFM: Cefixima, GEN: Gentamicina,
BASHH: British Association of Sexual Health and HIV

N. gonorrhoeae ha ido desarrollando de manera uniforme Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) crecientes a los antibióticos empleados para su tratamiento, reduciendo progresivamente las opciones terapéuticas disponibles. La resistencia a los antimicrobianos en NG es una amenaza para la salud mundial emergente. La OMS enumera a *N. gonorrhoeae* resistente a los antibióticos como un patógeno de alta prioridad, mientras que el CDC de EE. UU. lo clasifica como una amenaza urgente para la salud pública (28). Las razones de la aparición de resistencias antibióticas en gonococo son multifactoriales, desde el probable mal (y excesivo) uso de los antimicrobianos, que provoca concentraciones subóptimas causando una selección de cepas resistentes, hasta la capacidad del microorganismo por usar casi todos los mecanismos de resistencia antibiótica descritos. Entre los mecanismos de resistencia más destacados se encuentran las mutaciones puntuales (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) como las que se dan en el gen *penA* que codifica a la proteína de unión a la penicilina 2 (PBP2) (posiciones A501V/T, G542S, P551L/S) o mutaciones en mosaico (A311V, I312M, V316T/P, T483S, A501V, N512Y, G545S) y confieren resistencia tanto a penicilinas como a cefalosporinas; el incremento de la expulsión activa del antibiótico, como la sobreexpresión de la bomba de expulsión MtrCDE que afecta a penicilina, cefalosporinas, tetraciclinas y macrólidos; y la disminución de la

permeabilidad del antibiótico como sucede con los SNP G120L/A, A121D en el gen PorB1b que codifica a la porina de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*.

1.3. *Mycoplasma genitalium*

1.3.1. *Biología y Patogenia*

M. genitalium es una de las bacterias más pequeñas de vida libre existentes, siendo su genoma de sólo 580 kilobases y 512 genes codificantes de proteínas. Fue aislado por primera vez en 1981 a partir del exudado uretral de dos hombres diagnosticados con uretritis no gonocócicas (29). Se engloba dentro de la clase *Mollicutes*, bacterias con formas pleomorfas de pequeño tamaño (0.6x0.4 µm), que carecen de pared celular y cuyo genoma contiene un bajo contenido en Guanina+Citosina. Es capaz de metabolizar la glucosa, pero no la arginina ni la urea, y su crecimiento es óptimo en una atmósfera anaeróbica de nitrógeno con 5% de CO₂ a 37°C.

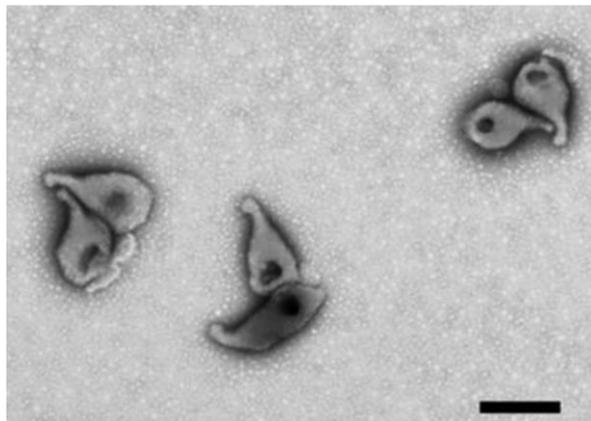


Figura 3. Microscopía electrónica de *M. genitalium* (bar: 500 nm). Fuente: Gnanadurai et al. 2020.

A pesar de su simplicidad genética, *M. genitalium* es un patógeno muy sofisticado. Su eficacia como patógeno se debe a la capacidad para adherirse y colonizar las células del huésped, constituyendo este su principal mecanismo de patogénesis. El orgánulo terminal que se puede apreciar en su estructura, desempeña un papel clave, ya que es donde se agrupan las principales moléculas de adhesinas, las proteínas transmembrana P140 (también conocida como MG191 o MgpB) y P110 (MG192 o MgpC), codificadas por el operón MgPa (30). Este orgánulo también es responsable del sistema de movilidad entre las células, contribuyendo a la colonización y diseminación de la infección (31).

1.3.2. Manifestaciones clínicas

M. genitalium ha sido clásicamente un patógeno infradiagnosticado y, por tanto, difícil de relacionar sus manifestaciones clínicas. Sin embargo, en los últimos años, la evidencia entre la asociación de este patógeno con diversas patologías, ha aumentado de manera significativa.

La infección por *M. genitalium* está asociado inequívocamente a la uretritis no gonocócica masculina, siendo responsable de en torno al 10-35% de estas (31). Los estudios que relacionaron a *M. genitalium* y la UNG masculina fueron los primeros en publicarse (32,33). Los síntomas típicos de uretritis causada por este microorganismo son similares a los producidos por otros patógenos como *C. trachomatis*, e incluyen disuria, prurito uretral, secreción mucopurulenta, balanitis y postitis. Aunque existe un porcentaje elevado de pacientes asintomáticos (34), la UNG por *M. genitalium* parece ser sintomática con más frecuencia que la infección producida por *C. trachomatis* (35,36).

En mujeres, *M. genitalium* puede cursar de manera asintomática (40-75% de los casos) o ser responsable de cervicitis mucopurulenta, alteración del flujo vaginal, disuria y complicaciones como la EPI (37–39). En un metaanálisis reciente, la detección del microorganismo se asoció significativamente con cervicitis (OR 1,66) y EPI (OR 2,14), además de parto prematuro (OR 1,89) y aborto espontáneo (OR 1,82) (40).

Tanto en hombres como en mujeres, las infecciones rectales y faríngeas por *M. genitalium* suelen ser asintomáticas, constituyendo un reservorio de transmisión. El papel de *M. genitalium* como causa de proctitis en HSH aún no está claro, existiendo estudios a favor (41,42) y en contra (43).

Es frecuente la persistencia de *M. genitalium* tras el tratamiento debido a un fracaso en la erradicación del patógeno, siendo hasta el 40% de las UNG persistentes, por lo que es necesario un diagnóstico y tratamiento óptimo (44).

1.3.3. Tratamiento y Resistencia a antibióticos

M. genitalium tiene una susceptibilidad limitada a los antibióticos debido a sus características intrínsecas, además, es extremadamente difícil de cultivar, lo que limita en gran medida la opción de pruebas de sensibilidad a antibióticos basadas en cultivos. La ausencia de pared celular confiere resistencia frente a todos aquellos antibióticos que interfieren en la síntesis de la pared celular, como los β -lactámicos y los glucopéptidos. Sólo unas pocas clases de antimicrobianos tienen actividad, como se refleja en los resultados de los estudios de sensibilidad in vitro disponibles de este patógeno, que se pueden ver en la tabla 2 (45).

Clase	Antibiótico	Rango de CMI, $\mu\text{g/mL}$
Aminoglucósidos	Todos	10–>50
Anfenicoles	Cloranfenicol	0.5–25
Aminoglicósidos	Espectinomicina	1–5
Cetólido	Telitromicina	≤ 0.00003 –0.015
	Solitromicina	≤ 0.0032 –16
Lincosamidas	Todos	0.2–25
Macrólidos	Eritromicina	≤ 0.001 - ≥ 16
	Claritromicina	0.0005–128
	Azitromicina	≤ 0.000032 –250
	Otros macrólidos	≤ 0.015 –1
Oxazolidinonas	Linezolid	4–128
Quinolonas	Segunda generación, clase I	1–64
	Segunda generación, clase II	0.063 - >16
	Tercera generación	0.03–4
	Cuarta generación	0.008 - >16
	Moxifloxacino	0.016 - >16
Rifamicina	Rifampicina	32–64
Estreptogramina	Pristinamicina	<0.01–0.02
Tetraciclina	Tetraciclina	≤ 0.01 –4
	Doxiciclina	≤ 0.008 –2.5
	Minociclina	≤ 0.01 –2.5

Tabla 2. Sensibilidad de *Mycoplasma genitalium* a varios antibióticos. Adaptada de Manhart et al., 2015. CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Los principales agentes activos son aquellos que interrumpen la síntesis proteica, como las tetraciclinas, los macrólidos y las estreptograminas, o bien, la replicación del ADN, como las fluoroquinolonas de 4º generación, aunque la resistencia a estos fármacos es un problema cada vez mayor. Este hecho ha provocado que en 2019 el CDC incluya a *M. genitalium* en la lista de vigilancia de amenazas para la resistencia antibiótica (28).

A continuación, se realiza una descripción de cada uno de estos antimicrobianos, al tratarse de uno de los objetivos del capítulo 3 de esta tesis doctoral:

1.3.3.1. Doxiciclina

La doxiciclina es un antimicrobiano bacteriostático perteneciente al grupo de las tetraciclinas, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica de las bacterias, fijándose con gran afinidad a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y bloqueando la unión del ARN de transferencia (t-RNA). Tiene una escasa eficacia en el tratamiento de *M. genitalium*, con unas tasas de curación que oscilan entre el 22% y el 45% tanto en hombre como en mujeres, a pesar de sus relativamente bajas CMI in vitro, hecho el cual se desconoce aún la razón (46). Estudios recientes han demostrado que la doxiciclina puede disminuir la carga bacteriana de *M. genitalium* en el lugar de la infección (47).

1.3.3.2. Azitromicina

La azitromicina es un antimicrobiano bacteriostático del grupo de los macrólidos, formado por un anillo de 15 átomos. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica, uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas en el dominio V del ARNr 23S, cerca del centro peptidil-transferasa y bloqueando la salida de la cadena peptídica naciente. Para el tratamiento de infecciones no complicadas por *M. genitalium*, la administración oral en dosis única de 1 gramo tiene unas tasas de curación del 85% en aquellas cepas sensibles a macrólidos, sin embargo, provoca la selección de cepas resistentes en más del 10% de los pacientes (48,49). El uso generalizado de esta pauta para el tratamiento de otras ITS ha provocado una emergencia

mundial en la propagación de cepas resistentes a macrólidos. Para disminuir este evento, actualmente se recomienda el tratamiento de azitromicina en régimen ampliado (500 mg el primer día, seguido de 250 mg días 2-5, dosis total: 1.5 gramos), sin embargo, esta pauta no es útil en aquellas cepas que presenten mutaciones de resistencia a macrólidos (50,51).

La resistencia a macrólidos esta mediada por mutaciones puntuales en la región V del gen 23S ARNr, principalmente las que afectan a las posiciones A2058 y A2059 (numeración *E. coli*). Estos cambios ocasionan una pérdida de afinidad del macrólido por la subunidad 50S del ribosoma, disminuyendo su unión y provocando un nivel alto de resistencia in vitro. La aparición de estas mutaciones está vinculada estrechamente con la exposición previa a macrólidos (52), sobre todo con la utilización de dosis subóptimas que han servido como presión selectiva sobre una población heterogénea. En infecciones con una alta carga microbiana de *M. genitalium*, el riesgo del fracaso a macrólidos es mayor, duplicándose la probabilidad de fallo cuando el tratamiento es con 1 gramo de azitromicina en monodosis (53).

1.3.3.3. Moxifloxacino

Moxifloxacino es un antimicrobiano perteneciente al grupo de las quinolonas de 4ª generación, cuyo mecanismo de acción implica la inhibición de las enzimas topoisomerasa IV y girasa bacterianas, necesarias para la duplicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano. Este antimicrobiano bactericida es usado habitualmente en el tratamiento de *M. genitalium* como fármaco de segunda línea para las UNG, en los fracasos de doxiciclina y azitromicina, consiguiendo unas tasas de curación superiores al 90%. La pauta para infecciones no complicadas se basa en 400 mg/día durante 7-10 días, mientras que en infecciones complicadas (EPI, epididimitis) se prolongan a 14 días, siendo la primera opción terapéutica en este tipo de infecciones. En la actualidad, la resistencia a moxifloxacino en *M. genitalium* está emergiendo rápidamente, sobre todo en regiones de Asia y Oceanía, llegando a alcanzar el 30%.

La resistencia a moxifloxacinó está asociada principalmente, a mutaciones en la región determinante de resistencias a quinolonas (QRDR) del gen *parC*, que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV, aunque existen pocos trabajos que correlacionen la presencia de estas mutaciones con la actividad in vivo e in vitro de moxifloxacinó (54). Las mutaciones que dan lugar a cambios en las posiciones de la Serina en la posición 83 (S83) y el Ácido Aspártico en la posición 87 (D87) (numeración *M. genitalium*) son la principal causa de insuficiencia o susceptibilidad reducida, debido a que se encuentran en la región diana del antibiótico (55–57). Mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB* y *parE* se han detectado en muestras clínicas de pacientes con uretritis por *M. genitalium*, sin embargo, parecen tener un efecto menos importante en la resistencia a moxifloxacinó (56).

1.4. *Trichomonas vaginalis*

1.4.1. Biología y Patogenia

T. vaginalis es un protozoo flagelado microaereotolerante de unos 10x7 µm, perteneciente al orden *Trichomonadida*. Posee cuatro flagelos anteriores y uno posterior, además de una estructura axial en forma de varilla, conocida como axostilo, que divide al protozoo longitudinalmente y sobresale del extremo posterior del parásito. Esta estructura ancla el patógeno a las células epiteliales provocando inflamación. En la mitad del cuerpo celular también tiene una membrana ondulada, que ayuda a barrer los nutrientes hacia la estructura "bucal" del patógeno, llamada citosoma. El núcleo en *T. vaginalis* está situado en su porción anterior y, como en otros eucariotas, está rodeado por una envoltura nuclear porosa (58). Está constituido por un genoma de más de 160 megabases organizados en 6 cromosomas, en donde más del 65% del genoma está compuesto por familias génicas repetidas y elementos transponibles.

En la actualidad, no se ha descrito claramente el ciclo vital de *T. vaginalis*. Los seres humanos constituyen los huéspedes naturales, por lo que el parásito vive en el tracto genital inferior femenino, y en la uretra y la próstata masculinas, donde se replica asexualmente por división mitótica y fisión binaria. Dado que *T. vaginalis* carece de quiste, es fundamental un entorno húmedo para que se produzca la transmisión, siendo el contacto sexual el principal modo de transmisión (59).

Existen una amplia variedad de mecanismos implicados en la patogénesis de *T. vaginalis*, entre los que se incluyen, la actividad beta-hemolítica (60), la citoadherencia (61), y/o la excreción de factores solubles (62), todos los cuales conducen al daño de las células epiteliales y a la inflamación.

1.4.2. Manifestaciones clínicas

T. vaginalis es un protozoo de vida libre que puede colonizar las superficies epiteliales de las mucosas produciendo la tricomoniasis. Existe una amplia diferencia entre la infección producida

en hombres o en mujeres. Mientras que la infección en los hombres suele persistir entre 2 semanas y 4 meses, en aquellas mujeres que no han sido tratadas puede persistir hasta 5 años (63). La infección en hombres suele cursar de manera asintomática o produciendo uretritis no gonocócica o prostatitis; Seña et al. observó que el 72% de las parejas sexuales masculinas de mujeres con tricomoniasis también estaban infectadas por *T. vaginalis*, siendo el 77% de estos hombres asintomáticos (64). Sin embargo, entre las mujeres la tricomoniasis se asocia a una amplia variedad de síntomas entre los que destaca el flujo vaginal purulento, olor vaginal anormal, prurito, disuria, dispareunia, dolor abdominal bajo, y la colpitis macular. La tricomoniasis se ha asociado a la infertilidad y a resultados adversos del embarazo, como el parto prematuro y el bajo peso al nacer (65,66). Además, las mujeres con tricomoniasis tienen un riesgo significativamente mayor de padecer EPI, neoplasia intraepitelial cervical y contraer el VIH, que las mujeres sin tricomoniasis (67–69).

1.4.3. Tratamiento y Resistencia a antibióticos

El tratamiento de elección para la tricomoniasis lo constituyen el Metronidazol y el Tinidazol, fármacos pertenecientes a los 5-nitroimidazoles, derivados de la Azomicina. Actualmente, las guías de tratamiento recomiendan Metronidazol 2 gr o Tinidazol 2 gr oral en dosis única (recomendado en caso de baja adherencia al tratamiento) o bien, Metronidazol 500 mg/12h oral durante 7 días, tanto a la persona infectada como a su pareja sexual (70).

La mayoría de las cepas de *T. vaginalis* son muy susceptibles a estos agentes. En aquellos casos refractarios al tratamiento, una vez descartado el incumplimiento de la medicación o la reinfección, puede existir la posibilidad de cepas de *T. vaginalis* resistentes, principalmente debido a la disminución o el cese de la actividad de la Piruvato Ferredoxina Oxidorreductasa. Esta enzima es necesaria para la actividad de los 5-nitroimidazoles ya que conduce a la producción de nitro-radicales, responsables del ataque al ADN de *T. vaginalis* (71). En estos casos, es recomendable realizar pruebas de susceptibilidad según la CDC (método de Meingassner) para determinar la concentración mínima lítica (CML) del fármaco (72).

1.5. Otras Infecciones de Transmisión Sexual

1.5.1. Virus de la inmunodeficiencia humana

Los virus de inmunodeficiencia humana son dos especies de lentivirus (un subgrupo de retrovirus) que infectan a los seres humanos, siendo la principal ruta de transmisión la vía sexual. Hay dos cepas o tipos principales de VIH, VIH-1 y VIH-2. VIH-1 es el causante de la epidemia mundial. La infección por el VIH provoca un síndrome pseudogripal breve e inespecífico que puede incluir fiebre, malestar, linfadenopatía, faringitis, artritis o erupción cutánea. La infección aguda se convierte en una enfermedad crónica de varios años que reduce progresivamente los linfocitos T CD4+, cruciales para el mantenimiento de una función inmunitaria eficaz. Las personas con infección por VIH no tratada experimentan una inmunodeficiencia sintomática que pone en peligro la vida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA) (73). Un tratamiento antirretroviral eficaz que suprima la replicación del VIH hasta niveles indetectables reduce la morbilidad, proporciona una vida prácticamente normal y previene la transmisión sexual del VIH a otras personas. El diagnóstico precoz del VIH y la rápida vinculación a la atención sanitaria son imprescindibles para alcanzar estos objetivos.

Desde los primeros días de la epidemia de VIH, se comprobó que las personas que adquirirían una ITS de tipo inflamatorio o ulcerativo (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, virus del Herpes, etc), parecían ser más susceptibles a la adquisición y transmisión del VIH que aquellas personas sin un patógeno identificado (74). Las lesiones causadas por estos patógenos causan un deterioro en la integridad de la mucosa y reclutan células portadoras de CD4, facilitando la infección por el VIH. Además, las ITS inflamatorias aumentan la concentración del VIH en la uretra, el semen y el líquido cervical (75). Por lo tanto, el tratamiento temprano de las ITS es vital como parte de una estrategia integral para prevenir la propagación del VIH.

1.5.2. *Treponema pallidum*

La espiroqueta *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* es el causante de la Sífilis debido a exposición sexual o por transmisión vertical durante el embarazo. *T. pallidum* se caracteriza por su capacidad de invasión e inmunoevasión, dando lugar a unas manifestaciones clínicas diversas, resultantes de la respuesta inflamatoria local del organismo a la replicación de las espiroquetas (76). Los individuos infectados sin tratamiento suelen seguir un curso de la enfermedad dividida en etapas primaria (úlceras indolores o chancros), secundaria (exantema disseminado, linfadenopatía), latente y terciaria o tardía (afectación cardíaca, lesiones gomatosas, etc) durante un período de ≥ 10 años. También puede infectar el sistema nervioso central, lo que puede ocurrir en cualquier etapa de la sífilis, dando lugar a neurosífilis. A pesar de la eficacia del tratamiento con penicilina G, la sífilis está resurgiendo como un problema de salud pública mundial, especialmente entre HSH.

1.5.3. *Virus del Papiloma Humano*

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus ADN de la familia *Papillomaviridae*, que se transmite principalmente a través del contacto sexual, pero también mediante el contacto directo sostenido de piel con piel y de manera vertical durante el embarazo. Se han identificado aproximadamente 170 tipos de VPH, de los cuales 40 de ellos infectan la zona genital. El tipo de virus de VPH que provoca la infección es un factor clave que condiciona la manifestación clínica. La mayoría de las infecciones son autolimitadas y de corta duración o bien se desarrolla una proliferación cutánea no cancerosa (verrugas) en la zona genital y/o anal. Sin embargo, las infecciones provocadas por los denominados tipos “de alto riesgo” de VPH pueden evolucionar a cáncer de orofaringe, cérvix, pene y ano. El VPH es tan frecuente en la población que, con raras excepciones, sólo las personas que no han tenido relaciones sexuales no han estado expuestas. La prevalencia es mayor en las mujeres jóvenes y a los 25 años de edad se sitúa en torno al 25%. Más allá de los 30 años la tasa de infección se reduce al 5-10 %.

1.5.4. Hepatitis virales

Las hepatitis virales agrupan a aquellas infecciones que producen inflamación del hígado debido a distintos tipos de virus, fundamentalmente, a los virus de la hepatitis A, B, C y E. Las hepatitis virales pueden transmitirse a través de vía fecal-oral (A, E), o bien, a través de sangre y fluidos corporales (B, C). La hepatitis B (VHB) se transmite eficazmente a través del contacto sexual entre hombres y mujeres y entre HSH, por exposición percutánea o de las mucosas a sangre infectada por el VHB o a fluidos corporales (semen, secreciones vaginales y saliva) que lo contienen. La infección por el VHB puede ser autolimitada o crónica. Entre los adultos, aproximadamente la mitad de las infecciones por VHB recién adquiridas son sintomáticas, y aproximadamente el 1% de los casos notificados dan lugar a una insuficiencia hepática aguda y a la muerte (77). En los últimos años, la hepatitis A (VHA) y la hepatitis C (VHC) han surgido como una ITS entre los HSH, siendo la transmisión heterosexual infrecuente. Varios factores se han relacionado con la transmisión del VHC entre HSH, incluida la coinfección por VIH, participación en prácticas sexuales que resulten en daño a las mucosas o resulten en exposición a sangre, presencia de ITS, particularmente aquellas de tipo ulcerativas, parejas sexuales múltiples y coito anal sin protección (78).

1.5.5. VHS

El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) y el tipo 2 (HSV-2) son grandes virus de ADN bicatenario de la familia *Herpesviridae*, que pueden ocasionar una gran variedad de episodios clínicos según la parte del cuerpo infectada. De todos ellos, la infección por herpes que afecta a la zona genital se clasifica como una ITS que afecta a más de 400 millones de personas en todo el mundo (79). La mayoría de los herpes genitales son causados por HSV-2, aunque HSV-1 representa aproximadamente la mitad de los casos nuevos en los países desarrollados. Se caracteriza por una infección de por vida y una reactivación periódica. Un brote visible consiste en vesículas únicas o agrupadas en los genitales, el perineo, las nalgas, la parte superior de los muslos o las áreas perianales que se ulceran antes de resolverse. Además de la aparición de vesículas, las

infecciones primarias por VHS pueden causar malestar, fiebre o adenopatía localizada. Los brotes posteriores suelen ser más leves y son causados por la reactivación de virus latente (80). La infección por HSV-2 también se ha relacionado con un riesgo tres veces mayor de contraer el VIH adquirido sexualmente (81). La alteración de la mucosa y la proliferación de linfocitos portadores de CD4 activados causada por las úlceras genitales, proporcionan una puerta de entrada para la adquisición del VIH.

1.5.6. Micoplasmas y Ureaplasmas genitales

El término “micoplasmas” se usa ampliamente para referir a cualquier microorganismo dentro de la clase Mollicutes, que engloba a especies del género *Mycoplasma* y *Ureaplasma* que pueden habitar el tracto genitourinario. Aunque *M. genitalium* se ha reconocido como un verdadero patógeno causante de ITS, otros micoplasmas como *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* (anteriormente *U. urealyticum* biovar 2) y *U. parvum* (anteriormente *U. urealyticum* biovar 1) se encuentran con frecuencia en el tracto urogenital humano tanto en individuos sanos como en pacientes sintomáticos. Actualmente, la relación de *M. hominis* y *U. parvum* como causantes de ITS es débil, asociándose su detección a la colonización asintomática (hasta un 80% en *U. parvum*), tanto en hombres como en mujeres (82). *U. urealyticum* está asociado a una pequeña proporción de casos de UNG, en particular en hombres jóvenes con una alta carga bacteriana, siempre y cuando se han descartado otros principales patógenos causante de UNG (83,84).

2. Epidemiología actual de las Infecciones de Transmisión Sexual

Las ITS muestran una gran variabilidad con respecto a su patrón epidemiológico, que son dependientes de variables de índole sociocultural, económicas y geográficas, como las prácticas sexuales de la comunidad, conocimientos de salud sexual, tasa de recambio de parejas sexuales, uso de medidas barrera (uso de preservativo), acceso a servicios preventivos, de diagnóstico y tratamiento (consultas de ITS), etc.

El reservorio de estas infecciones es humano, existiendo un mayor riesgo en determinados grupos poblacionales, en los cuales debe enfatizarse el diagnóstico, como son los adolescentes y adultos jóvenes sexualmente activos, los usuarios de drogas por vía parenteral, trabajadores y usuarios del sexo y HSH. Durante la última década, el aumento registrado en la incidencia de las ITS ha sido en parte a una relajación de las medidas de protección durante las relaciones sexuales debido al éxito de la terapia frente al VIH y a la “pérdida del miedo” a su contagio. Además, se ha visto favorecido por la emergencia y amplio uso de redes sociales que facilitan los contactos sexuales y por el uso de drogas recreativas durante el acto sexual (chemsex).

La OMS ha formulado la “Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra las Infecciones de Transmisión Sexual - Hacia el fin de las ITS” con el objetivo de disminuir la epidemia de ITS y reducir su impacto en la salud pública (85). En la estrategia se recogen un conjunto de principios, medidas y objetivos orientados a fomentar la prevención y control de las ITS a nivel mundial, entre los cuales destacan:

- Vigilancia de las tendencias de morbilidad y de la eficacia de las intervenciones a través de encuestas epidemiológicas, de vigilancia y etiológicas.
- Adaptación y validación de diagramas de flujo para las recomendaciones y directrices relativas al tratamiento clínico.
- Establecimiento de sistemas nacionales de competencia y control de la calidad para el diagnóstico de laboratorio.

- Evaluación del funcionamiento y del coste-eficacia de las nuevas pruebas diagnósticas.
- Recogida de datos sobre sensibilidad a los antimicrobianos y formulación de recomendaciones al respecto.
- Instauración y/o refuerzo de programas de detección precoz de las infecciones gonocócicas y las clamidiasis asintomáticas, especialmente en determinados sectores de la población, como los hombres y mujeres jóvenes sexualmente activos.
- Apoyar los sistemas de vigilancia epidemiológica a nivel nacional e internacional.
- Dar prioridad a intervenciones preventivas amplias y de alto impacto vinculadas a la salud sexual y reproductiva, la salud materno-infantil, la prevención del VIH y los programas de inmunización.

2.1 Situación de las ITS en España, Europa y el Mundo

A nivel global, los últimos datos de la OMS estiman que, en 2016, hubo unos 370 millones de nuevas infecciones de alguna de estas tres ITS: clamidiasis (127 millones), gonorrea (87 millones) y tricomoniasis (156 millones) (86). *M. genitalium* al ser un microorganismo emergente de diagnóstico reciente, no tiene actualmente tasas globales descritas, aunque se estima en una prevalencia mundial del 1-3% en la población general, y una prevalencia entre el 4-6% de los pacientes que acuden a clínicas de ITS en Europa (37,87,88). *T. vaginalis* es la ITS no viral más prevalente en todo el mundo, con fuertes disparidades por edad, etnia y localización geográfica (89). África y América están mucho más afectados que Europa, con 42,8 y 57,8 millones de adultos infectados respectivamente, frente a sólo 14,3 millones de adultos infectados en Europa en 2008 (90). La prevalencia de la infección por *T. vaginalis* en los países europeos, se sitúa entre el 0,8 y el 1,9% en pacientes que acuden a médicos de cabecera y clínicas de ITS (87,91), pero son necesarios más estudios para ajustar esta cifra.

El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) recoge anualmente los datos de vigilancia epidemiológica de las infecciones gonocócicas y por *Chlamydia trachomatis* (92). Los últimos datos referentes a 2019 (existen atrasos en las publicaciones debido al infradiagnóstico durante la pandemia de SARS-CoV-2) informan de una tendencia al alza tanto para *C. trachomatis* como para *N. gonorrhoeae* en los últimos 10 años, siendo *C. trachomatis* la ITS con mayor número de casos comunicados, con un total de 406.406 casos. La tasa de incidencia global para CT fue de 157,04 casos por 100.000 habitantes, siendo mayor en el grupo de edad de los 20 a 24 años, en comparación con otros grupos. En mujeres, la tasa fue superior que en los hombres (173,06 y 141,78 por 100.000 habitantes, respectivamente). Entre los hombres, destaca el incremento en la detección de casos en el colectivo HSH en los últimos diez años, como se representa en la Figura 4.

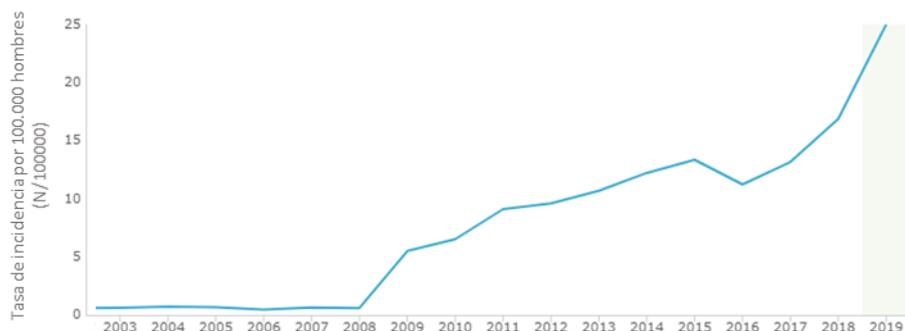


Figura 4. Tasa de incidencia de *C. trachomatis* en HSH. Fuente: ECDC 2019

La infección gonocócica constituye la segunda ITS más frecuente en Europa, con un total de 117.881 casos declarados según el ECDC. El 37.3% de los casos se encuentran en el grupo de edad de 25-34, y un 35% de los casos se asocian al colectivo HSH.

En España, la información epidemiológica poblacional sobre las ITS proviene de la unidad de vigilancia de VIH, ITS y Hepatitis B y C de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) que recoge los datos a nivel estatal de la infección gonocócica y, desde el año 2015, de la infección por *Chlamydia trachomatis* (serovares D-K) y el linfogranuloma venéreo (serovares L1-L3), además de la sífilis. Al igual que en Europa se observa una tendencia ascendente de las ITS, siendo la más frecuente en España la infección por *C. trachomatis*, notificándose en 2019, 17.718 casos. La mayoría de los casos se produjeron entre los 25-34 años (36,1%) y los 20-24 años (27,6%), siendo la prevalencia en mujeres más elevada que en hombres (47,89 vs 40,06). Con respecto a la infección por *N. gonorrhoeae*, se notificaron 12.359 casos, siendo la mayoría varones (79.7%) con una mediana de edad de 30 años (IQ, 24-38).

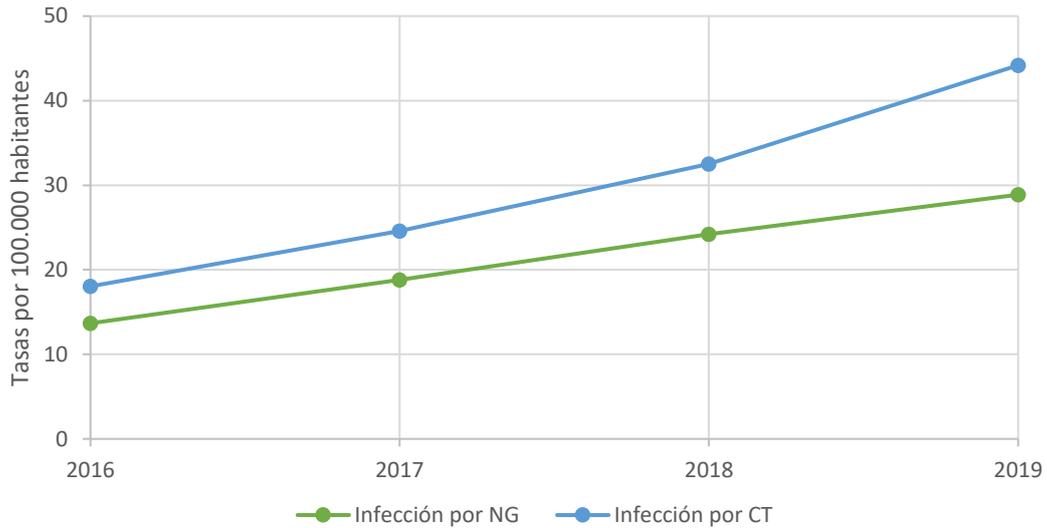


Figura 5. Evolución de las tasas por 100.000 habitantes por infección de transmisión sexual, 2016-2019.
Fuente: RENAVE

M. genitalium y *T. vaginalis*, a pesar de su importancia, no son consideradas Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO), por lo que es difícil obtener datos epidemiológicos certeros. Los datos de prevalencia estimados para *M. genitalium* en España se basan en estudios retrospectivos provinciales, comunicándose prevalencias heterogéneas en pacientes que acuden a centros de ITS en distintas ciudades (3.9% en Donostia, 6.6% en Madrid y 10% en Barcelona) (93–95). Para *T. vaginalis*, los escasos datos que existen en España, están en consonancia con los encontrados en el resto de Europa, situándose entre un 0.8% y un 1.5% de prevalencia (96,97).

3. Diagnóstico microbiológico

3. 1. Técnicas diagnósticas

Existe una amplia variedad de métodos para el diagnóstico etiológico de las ITS, por lo que su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para analizar una sola infección o ITS muy diversas pueden diferir significativamente.

Entre los métodos de laboratorio tradicionales para detectar los microorganismos causantes de las ITS encontramos el cultivo bacteriológico, análisis serológicos para detectar la presencia de anticuerpos específicos, la inmunohistoquímica, la detección de antígenos y la microscopía. Al igual que ocurre con el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas, la detección de ácidos nucleicos específicos de los microorganismos patógenos causantes de las ITS mediante diferentes tipos de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha convertido en la técnica de referencia en el diagnóstico, ya que tanto su sensibilidad como su especificidad son superiores a los métodos tradicionales (85,98,99).

Las TAAN ofrecen otras ventajas frente al diagnóstico clásico. Además de tener una sensibilidad y especificidad superiores, poseen un menor tiempo de respuesta, un gran rendimiento y posibilidad de automatización, de análisis simultáneo de varias dianas y de cuantificación. Estas técnicas son también efectivas en la detección de microorganismos en caso de infecciones asintomáticas o en una fase temprana de la infección (antes de la seroconversión), y pueden aplicarse a muestras obtenidas por el propio sujeto (auto-toma), como las muestras vaginales y las muestras de orina de la primera parte de la micción, lo que las hace muy útil como pruebas de screening o cribado (100,101). La alta sensibilidad de las TAAN permite que el transporte y conservación de las muestras no sea crucial, sin embargo, este hecho puede provocar que el microorganismo causante de la ITS no se encuentre viable para una posterior caracterización fenotípica como su antibiograma, como es necesario en el caso de *N. gonorrhoeae*. Esta alta

sensibilidad provoca también que las TAAN puedan detectar microorganismos no viables o en fase de eliminación, por lo que no son útiles como prueba de curación (TOC, del inglés “Test of cure”), a no ser que haya pasado un periodo de tiempo adecuado para la eliminación del material genético residual. Otro problema derivado de la alta sensibilidad de las TAAN es la posibilidad de contaminación que, aunque sea muy baja, puede dar lugar a resultados falsos positivos. Para disminuir esta posibilidad, aparte de contar con personal con alta experiencia en biología molecular, se añade uracilo-ADN-glicosilasa, una enzima que degrada los posibles amplicones que se encuentren en el material de laboratorio y el ambiente, siempre que estos se hayan generado utilizando dTUP en lugar de dTTP en las reacciones de PCR. Otra posibilidad es el uso de sistemas automatizados y cerrados que reducen la probabilidad de contaminación (100).

Un factor a tener en cuenta a la hora de usar TAAN y que se han ido corrigiendo con nuevos diseños de primers, es la posibilidad de reacciones cruzadas (falsos positivos) y/o falsos negativos debido a las secuencias diana utilizadas para detectar el microorganismo. Algunos ejemplos documentados son:

- Falsos positivos entre *Neisseria gonorrhoeae* y otras especies de *Neisseria* comensales (*N. subflava*, *N. cinerea*, *N. flavescens*) debido a la similitud de genomas (102,103).
- Falsos positivos de *Trichomonas vaginalis* cuando se detectan otras *Trichomonas* comensales (*T. tenax*, *Pentatrichomonas hominis*) cuando la concentración de estas supera las 10 células/mL debido a la similitud de genomas (61).
- Falsos negativos por la variante sueca de *Chlamydia trachomatis* debido a la presencia de una mutación en la diana de los kits diagnóstico (104).

Desde su introducción en la década de 1980, las técnicas moleculares han revolucionado el diagnóstico en microbiología clínica. Las TAAN son ahora un pilar en los laboratorios clínicos para la detección y seguimiento de patógenos microbianos como las ITS. Si bien la PCR sigue siendo

el pilar desde entonces, varias tecnologías alternativas de amplificación se han ido incorporando al arsenal de diagnóstico, como la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), la replicación de secuencia autosostenida (3SR), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación de desplazamiento de hebra (SDA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la amplificación de la polimerasa recombinasa, la amplificación dependiente de helicasa (HDA), la amplificación isotérmica de cebador único (SPIA), la amplificación isotérmica y quimérica iniciada por cebadores de ácidos nucleicos (ICAN), la amplificación de cadena isotérmica (ICA), y la amplificación de Ionian Technologies (105).

De todas ellas, la PCR en tiempo real (RT-PCR), una variante común de la PCR, ha aumentado la utilidad clínica al permitir la detección y cuantificación de los productos de la PCR durante el proceso de amplificación. En la RT-PCR, la presencia de ADN diana amplificado se monitorea continuamente mediante la detección de una señal fluorescente que aumenta en intensidad con la concentración de ADN amplificado. En los últimos años, se ha observado una expansión progresiva de pruebas de amplificación en el campo de la microbiología clínica, y en especial en el campo del diagnóstico de las ITS. Las tecnologías de amplificación sin PCR, como las antes mencionadas, están actualmente disponibles comercialmente y ofrecen numerosas ventajas frente a la PCR. Por ejemplo, las pruebas de amplificación isotérmica ofrecen una alta flexibilidad de diseño de dianas, un precio económico y un tiempo de respuesta rápido frente a los ensayos basados en PCR. Sin embargo, las pruebas basadas en RT-PCR siguen siendo el método mejor estudiado y utilizado actualmente. La competencia entre plataformas basadas en diferentes TAAN para el diagnóstico clínico, hace necesario una evaluación de las distintas tecnologías, para que cada servicio de microbiología o diagnóstico clínico pueda implementarla en función del perfil de sus pacientes, el volumen de pruebas, y los recursos económicos que disponga (106).

3.2. Indicaciones para el diagnóstico

El diagnóstico microbiológico de una ITS está indicado en todas aquellas personas con sintomatología compatible (cervicitis, uretritis purulenta o no purulenta, secreción vaginal, dispareunia, etc). Sin embargo, un alto porcentaje de las ITS se producen de manera asintomática, constituyendo el principal reservorio y fuente de infección a otras personas. Por ello, aparte del estudio de los pacientes sintomáticos, es necesario el cribado de ITS en personas asintomáticas.

Aunque todas las personas sexualmente activas tienen cierto riesgo de contraer una ITS, la detección de todas las ITS en todos los pacientes no es práctica, ya que no ha demostrado ser coste-eficaz. La detección selectiva, mediante la evaluación individual a través de historias clínicas sexuales de rutina, permite identificar adecuadamente a las personas con riesgo de tener una ITS. La historia debe ser sencilla, y con el asesoramiento adecuado sobre las conductas de riesgo, según sea necesario. Entre los factores de riesgo, encontramos (51,82,107):

- Edad joven (16 a 25 años)
- Hombres que tienen sexo con hombres (HSH)
- Historia de ITS previa
- Estado seropositivo
- Uso de drogas recreativas
- Nueva pareja sexual en los últimos 60 días
- Múltiples parejas sexuales o pareja sexual con múltiples parejas simultáneas
- Relaciones sexuales con parejas recientemente tratadas por una ITS
- Uso inconsistente o nulo de métodos barrera
- Contacto sexual con profesionales del sexo
- Víctima de violencia sexual

En mujeres y hombres heterosexuales, menores de 25 años, se recomienda realizar anualmente pruebas frente a CT y NG. Además, se puede considerar la detección de TV en entornos de alta prevalencia y/o mujeres con alto riesgo de infección. En aquellos pacientes mayores de 25 años, se indica siempre y cuando sean sexualmente activos con los factores de riesgos mencionados anteriormente.

En los HSH, se recomienda realizar anualmente pruebas frente a CT y NG, debido a las altas tasas de prevalencia de ITS en este colectivo. Para los HSH con un riesgo particularmente alto de contraer ITS (parejas múltiples o anónimas), el cribado puede realizarse cada 3 meses. En aquellas personas que hacen uso de la profilaxis previa a la exposición para el VIH (PrEP), se realiza cribado de ITS antes de iniciar PrEP, y posteriormente, cada 3 meses (108).

En los pacientes con infección VIH, se recomienda realizar anualmente pruebas frente a CT, NG y TV. Además de la elevada tasa de ITS en los pacientes VIH, se justifica su diagnóstico ya que las ITS pueden aumentar la transmisión del VIH (109).

En aquellas personas que acuden a la consulta buscando una evaluación de ITS, se recomienda el cribado frente a CT, NG y TV. Estos pacientes a menudo presentan una exposición previa con factores de riesgo (82).

Actualmente, *M. genitalium* no se recomienda dentro de las pruebas de cribado de ITS, ya que los beneficios y costes dedicados a la detección y tratamiento en personas asintomáticas no están claros. Las guías internacionales recomiendan realizar pruebas solo en pacientes sintomáticos, a menos que una persona asintomática haya tenido contacto sexual con alguien infectado con MG o vaya a someterse a una cirugía del tracto genitourinario que traspase la barrera cervical (51,110,111). Sin embargo, modelos de transmisión dinámicos estiman que la detección de MG en asintomáticos tendría grandes ventajas, como reducciones de un 31.1% (13.0%-52.0%) en la incidencia acumulada durante 20 años de EPI, y otras secuelas graves (112). Es posible que, en un futuro próximo, esta recomendación cambie.

3.3. Recogida y tipos de muestras

La recogida, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras constituyen factores claves en el rendimiento de las técnicas de diagnóstico microbiológico. Los agentes causales de las ITS son, en su mayoría, microorganismos con un crecimiento fastidioso y con una viabilidad escasa fuera del huésped humano. El uso de TAAN, capaz de detectar microorganismos no viables debido a su alta sensibilidad, ha permitido facilitar el transporte y almacenamiento de las muestras, ya que las condiciones de conservación no son tan estrictas como en la era pre-TAAN. Aun así, no se recomienda para las determinaciones de ITS mediante TAAN, un tiempo de transporte superior a las 48 horas, siempre y cuando se mantengan refrigeradas (4º C).

Las pruebas para el diagnóstico de las ITS generalmente implican muestras de diversas localizaciones anatómicas, en función de diversos factores como la edad, el sexo, las prácticas sexuales y las manifestaciones clínicas del paciente (113).

En cuanto a la recogida de muestras, debe realizarla un profesional sanitario entrenado, de acuerdo con las recomendaciones establecidas según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (tabla 3). Sin embargo, en los últimos años, el aumento de sensibilidad de las nuevas tecnologías de diagnóstico, permiten que el propio paciente recoja sus propias muestras de orina y/o hisopos vaginales, teniendo esta estrategia una gran aceptación entre las mujeres (114).

Una vez recibidas en el laboratorio de microbiología, las muestras deben encontrarse debidamente identificadas con un código único, y una solicitud acompañante, indicando los datos del paciente, el tipo de muestra recogida, además de la fecha y hora de la toma. Antes de su procesamiento, se determinará si la muestra, el recipiente y el volumen son adecuados para el examen solicitado, y se realizará una valoración general sobre las determinaciones solicitadas y el diagnóstico, para decidir el procesamiento más adecuado que ofrezca el mayor rendimiento diagnóstico posible, ampliando las determinaciones solicitadas o bien, restringiéndolas (113).

Muestra	Preparación	Comentario
Anal/Rectal	Introducir la torunda después del esfínter anal, rotar durante 10-30 segundos (si hay contaminación fecal, repetir).	
Cérvix	Espéculo no lubricado. Insertar la torunda 2-3 cm en el canal cervical y rotar durante 5-10 segundos.	No en prepuberales ni en mujeres hysterectomizadas.
Faringe	Con la ayuda de un depresor, frotar las amígdalas y faringe posterior.	No contaminar con microbiota de mucosas y lengua.
Orina	10-15 ml orina chorro inicial. No orinar en la hora previa. Preferiblemente 1º micción del día.	Preferible como método de cribado en asintomáticos.
Semen	No es una muestra adecuada para el estudio de ITS. Solo en casos concretos de sospecha de prostatitis cuando se descarte otros agentes causales.	La viscosidad y la abundancia de ADN humano en este tipo de muestra interfiere en el proceso de amplificación de las dianas.
Úlcera	Limpia la superficie con una gasa humedecida en salino. Si hay una vesícula, aspirar el contenido con jeringa. En ausencia de vesículas, frotar vigorosamente la base con la torunda (sin hacer sangrar).	En el caso de sospecha de LGV se puede realizar una punción de la adenopatía.
Uretra	Si hay secreción, o aparece a la presión, recoger en la torunda. Si no, insertar 2-3 cm una torunda fina y rotar 5-10 segundos.	El paciente no debe haber orinado en las 2 horas previa a la realización de la toma de muestra.
Vaginal	Auto-toma por la propia paciente. Separar los labios vulvares con la mano no dominante y con la mano dominante introducir suavemente el hisopo en la vagina frotando las paredes de esta.	Preferible como método de cribado en asintomáticos.

Tabla 3. Recogida de muestras para el diagnóstico de las ITS. Adaptada del procedimiento nº 24 de SEIMC.

Planteamiento e hipótesis de la tesis doctoral

Hoy en día, existen una amplia variedad de pruebas diagnósticas para el análisis de ITS basados en distintas metodologías de amplificación de ácidos nucleicos. La OMS ha formulado la “Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra las Infecciones de Transmisión Sexual – Hacia el fin de las ITS” en el que especifica como uno de sus principales objetivos la evaluación de las pruebas de detección de ITS, la creación de plataformas múltiples que permitan el diagnóstico simultáneo de varias ITS al mismo tiempo, especialmente las provocadas por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis*, y la detección de resistencias a los antimicrobianos. Con el objetivo de profundizar y evaluar estos métodos antes de su implementación en la rutina de los servicios de Microbiología, se ha desarrollado esta tesis doctoral, que consta de tres capítulos:

- En el primer capítulo se realiza una comparación entre técnicas basadas en PCR en tiempo real y Amplificación mediada por transcripción, para el diagnóstico de las ITS.
- En el segundo capítulo se evalúa un nuevo método de diagnóstico de ITS, mediante el uso de microarrays a partir de muestra clínica directa.
- Por otro lado, se ha reconocido la importancia de *M. genitalium* como patógeno causante de ITS, además de su elevada tasa de resistencias asociada, sin embargo, no existe ningún estudio en la actualidad donde se establezca las tasas de resistencia a macrólidos y quinolonas para *M. genitalium* en el sur de España, temática que se aborda en el tercer capítulo.

Con los resultados obtenidos se pretende discernir la utilidad de estas tecnologías en la rutina clínica y reforzar el conocimiento de MG.

CAPÍTULO 1.

Comparación entre diferentes técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual

1. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 1

Los objetivos de este capítulo han sido:

- Comparar dos técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, la amplificación mediada por transcripción (TMA) y la PCR en tiempo real (RT-PCR) para el diagnóstico de las ITS.
- Analizar la prevalencia de ITS en población que acude a consultas del centro de Enfermedades de Transmisión Sexual.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Pacientes y muestras

La recogida de muestras se realizó entre mayo de 2017 y noviembre de 2017 en Granada, España. Un total de 375 pacientes que acudieron a consultas del Centro de Enfermedades de Transmisión Sexual de Granada se inscribieron en el estudio, siendo el 65% de ellos hombres (n=243). La mediana de edad de los hombres fue de 31 años (IQR; 25-38), mientras que de las mujeres fue de 26 (IQR; 23-35).

El estudio se diseñó y realizó de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética local del Hospital Universitario San Cecilio (Anexo 1). Se obtuvo el consentimiento informado verbal de todos los participantes.

Se recogieron 622 muestras por duplicado de distintos puntos anatómicos (Tabla 4) en función a las prácticas sexuales de los participantes:

- Sexo oral: Muestra faríngea (Hombre / Mujer)
- Coito vaginal: Muestra de Orina (Hombre) – Muestra Endocervical (Mujer)
- Sexo anal insertivo: Muestra de orina (Hombre)
- Sexo anal receptivo: Muestra anal (Hombre / Mujer)

Para el análisis mediante RT-PCR, las muestras faríngeas, endocervicales, uretrales y anales se recogieron mediante hisopos secos estériles ClassiqSwabs™ (COPAN®) y fueron resuspendidas en 2 mL de buffer fosfato salino (PBS) en el lugar de la toma de muestra. Las muestras de orina fueron recogidas en un recipiente estéril y separadas en dos contenedores distintos; un contenedor estéril para el análisis mediante RT-PCR y un kit de recogida de orina Aptima (Hologic, San Diego, USA) para las pruebas de TMA. El kit Aptima Unisex Swab Specimen (Hologic, San Diego, USA) y el kit Aptima Multitest Swab Specimen Collection (Hologic, San Diego, USA) fue usado para el análisis mediante TMA de las muestras endocervicales y uretrales; y faríngeas y anales, respectivamente.

TIPO DE MUESTRA	HOMBRES. N (%)	MUJERES. N (%)
Faríngea	16 (6.6%)	23 (17.4%)
Endocervical	-	22 (16.7%)
Orina	130 (53.5%)	0
Faríngea y Orina	37 (15.2%)	0
Anal y Orina	1 (0.4%)	0
Anal y Faríngea	14 (5.8%)	2 (1.5%)
Anal y Endocervical	-	3 (2.3%)
Endocervical y Orina	-	1 (0.8%)
Endocervical y Faríngea	-	63 (47.7%)
Endocervical, Faríngea y Orina	-	1 (0.8%)
Anal, Endocervical y Faríngea	-	17 (12.9%)
Anal, Orina y Faríngea	45 (18.5%)	0
Total de pacientes	243 (64.8%)	132 (35.2%)
TOTAL DE MUESTRAS	385 (61.9%)	237 (38.1%)

Tabla 4. Distribución anatómica de las muestras recogidas para el estudio.

La distribución de los tipos de muestras clínicas (622) fue la siguiente: 218 (35%) hisopos faríngeos, 214 (35%) muestras de orina de primera evacuación, 107 (17%) hisopos endocervicales y 83 (13%) hisopos rectales. Tras la recogida, las muestras se almacenaron a 4°C hasta que se realizaron las pruebas, con un máximo de dos días después de la recogida de la muestra. Todas las pruebas fueron realizadas en paralelo.

2.2. Análisis mediante PCR multiplex en tiempo real

Las pruebas para el análisis mediante PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando el ensayo multiplex RT-PCR Allplex™ STI Essential (Seegene, Seúl, Corea). Este ensayo puede detectar simultáneamente 7 microorganismos (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum*) en un solo tubo mediante el uso de las tecnologías DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide) y TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage

Extension). La tecnología DPO mejora la especificidad y minimiza la amplificación inespecífica habitual en las PCR multiplex, utilizando unos cebadores que difieren estructural y funcionalmente del sistema de cebado convencional al incluir un enlazador de poli-desoxilinosina Poly(I). Este enlazador de poli(I) permite dividir el cebador DPO en dos segmentos perfectamente funcionales con diferentes temperaturas de hibridación (115). La elongación se realiza cuando los dos segmentos se hibridan correctamente dando lugar a una alta especificidad evitando la extensión inespecífica de los cebadores.

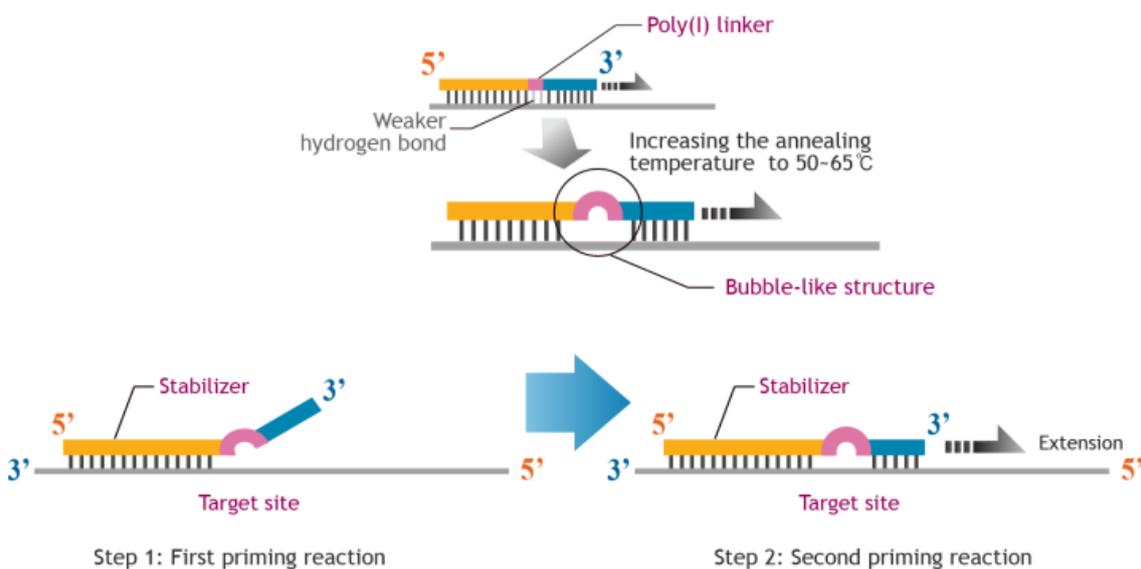


Figura 6. Ilustración gráfica del funcionamiento de DPO (Dual Priming Oligonucleotide). Fuente: Seegene Inc.

Por otro lado, la tecnología TOCE permite la detección simultánea de dos objetivos en un solo canal de fluorescencia mediante el análisis de la temperatura de fusión de moldes artificiales, incrementando la capacidad de multiplexado de la PCR.

Previamente a la amplificación, se realizó una extracción de ácidos nucleicos (400 µL de volumen de muestra) utilizando el sistema MagNA Pure 96 (Roche), el cual utiliza partículas magnéticas para la purificación y extracción; los ácidos nucleicos se eluyeron en 50 µL (volumen final). La PCR fue realizada en un termociclador CFX-96 Real-Time (Bio-Rad, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para este estudio, solo fueron analizados los resultados de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis*.

2.3. Análisis mediante amplificación mediada por transcripción

La amplificación mediada por transcripción es un sistema de amplificación de ácidos nucleicos en un solo tubo que utiliza dos enzimas, la ARN polimerasa y la transcriptasa inversa. Puede usarse para amplificar ADN o ARN (ARNm celular, ARN viral y ARN ribosómico (ARNr)), produciendo amplicones de ARN monocatenarios, a diferencia de la mayoría de las otras TAAN, que solo producen ADN. La amplificación mediada por transcripción es isotérmica; toda la reacción se realiza a la misma temperatura en un bloque térmico a 37-42º y no en un termociclador.

Antes de la TMA, se realiza un proceso de captura de dianas que utiliza micropartículas magnéticas para reducir la inhibición de la amplificación y evitar posibles contaminaciones. En este paso se usan oligómeros de captura que contienen secuencias complementarias a regiones específicas de la diana y una cadena de residuos de deoxiadenosina (poli-A). Estos oligómeros se unen a las regiones específicas de las moléculas dianas, y tras un paso de lavado puede hibridarse específicamente a la secuencia complementaria del ARN diana.

Durante el proceso de TMA, se amplifica la secuencia de ARN diana capturada, usando las enzimas retrotranscriptasa y ARN-polimerasa para la amplificación y dos cebadores que flanquean la región a amplificar. Uno de estos cebadores, el cual incluye la secuencia promotora para la RNA-polimerasa, se hibrida al ARN diana iniciándose la transcripción inversa de la retrotranscriptasa, que da lugar a una copia de ADN complementario (cDNA), formándose un heterodúplex ARN:ADN. La actividad RNasa H de la retrotranscriptasa degrada el heteroduplex dejando libre la cadena de ADN junto con la secuencia promotora de la ARN-polimerasa. Posteriormente, el segundo cebador se une a esta cadena de ADN y con ayuda de la RT se forma una molécula de ADN bicatenario que contienen secuencias del promotor para la RNA-polimerasa, y por lo tanto pueden usarse como plantilla para iniciar la transcripción, formando amplicones de ARN.

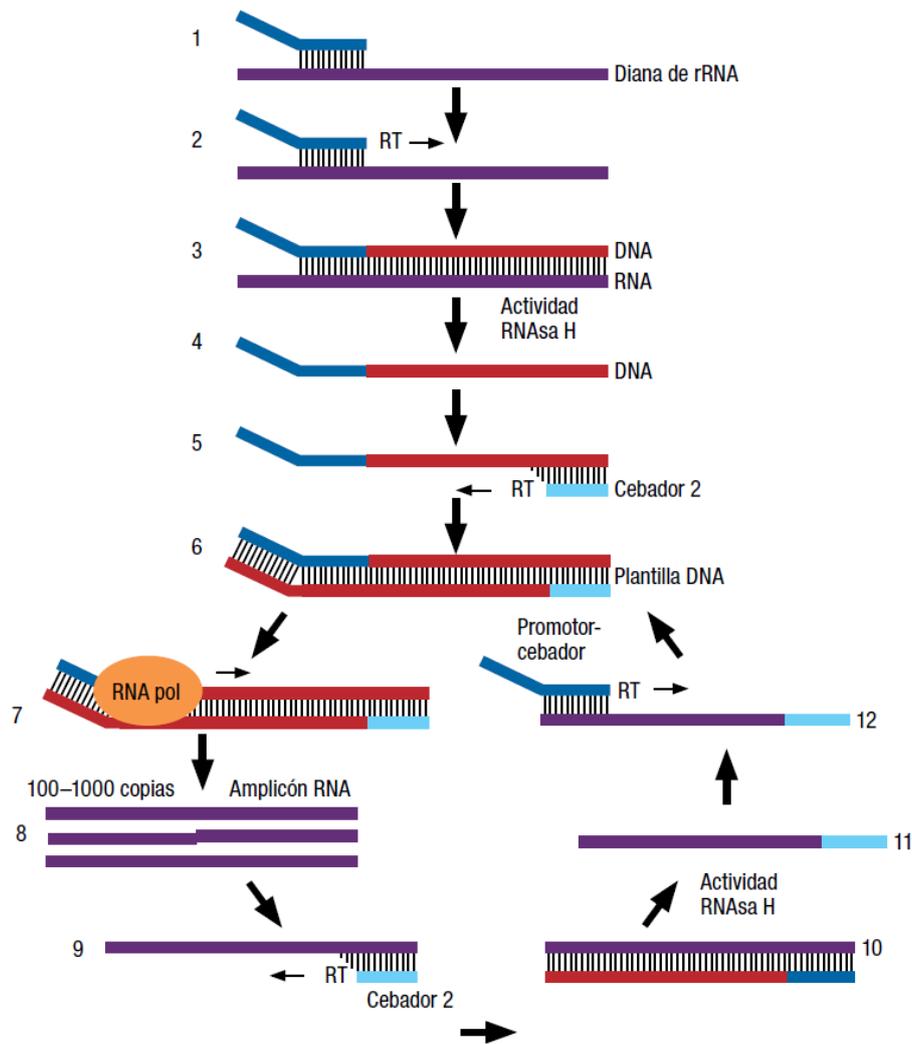


Figura 7. Ilustración gráfica del funcionamiento de TMA. Fuente: Hill CS. Gen-Probe Inc. (San Diego, California, EUA) (http://www.gen-probe.com/pdfs/tma_whitepr.pdf).

Posteriormente, cada uno de estos amplicones recién sintetizados vuelve a entrar en el proceso de amplificación mediada por transcripción y sirve como plantilla para un nuevo ciclo de replicación, lo que da lugar a una multiplicación exponencial de la secuencia diana de ARN. La amplificación mediada por transcripción puede producir 100-1.000 copias por ciclo de amplificación, a diferencia de la PCR, que solo produce 2 copias por ciclo. Estos amplicones de RNA producidos en la reacción de TMA pueden combinarse con sondas específicas mediante la técnica de protección de la hibridación (HPA).

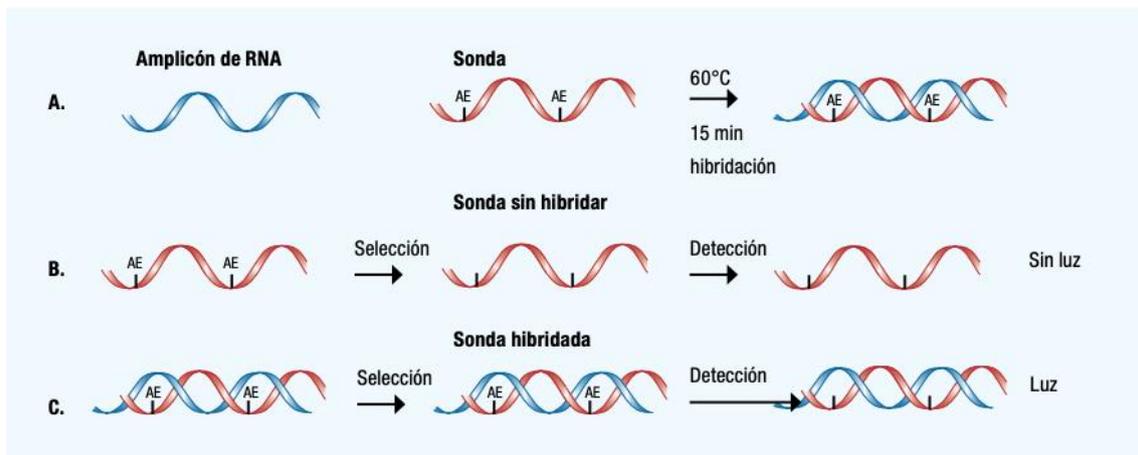


Figura 8. Funcionamiento HPA. Fuente: Hill CS. Gen-Probe Inc. (San Diego, California, EUA).

En la técnica HPA, se detectan las dianas de RNA o DNA monocatenario mediante el uso de sondas quimioluminiscentes de DNA, que son complementarias a una región del amplicón seleccionado, marcándose con una molécula de éster de acridinio. La sonda DNA marcada se combina con el amplicón para formar híbridos ARN:ADN estables. El reactivo de selección diferencia la sonda hibridada de la no hibridada, eliminando la generación de señal de la sonda no hibridada. Durante el paso de detección, la luz emitida por los híbridos ARN:ADN marcados se mide como señales de fotones en un luminómetro, y se notifican como unidades relativas de luz (RLU, por sus siglas en inglés).

Para el análisis mediante TMA, se utilizaron diversos ensayos:

- Aptima *M. genitalium*, cuya diana es una región específica del ARNr 16S de MG.
- Aptima Combo 2 (que detecta tanto *C. trachomatis* como *N. gonorrhoeae* en una muestra), cuyas dianas son una región específica del ARNr 23S de CT y una región del ARNr 16S de GC a través de intermediarios de ADN.
- Aptima *T. vaginalis*, cuya diana es una región del ARNr 18S de TV.

Los ensayos fueron analizados mediante el sistema Panther (Hologic, San Diego). Este sistema es una plataforma automatizada que permite realizar pruebas de muestras evitando así el paso de extracción de ADN por separado.

2.4. Análisis estadístico

Se calcularon la sensibilidad (SE), la especificidad (SP) y el coeficiente kappa (κ) de la RT-PCR multiplex, comparándose con los ensayos TMA para la detección de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis* utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 23 (IBM, Chicago, IL, EE.UU.). También se estimaron los correspondientes intervalos de confianza al 95%. Para el análisis, se consideraron los ensayos basados en TMA como métodos de referencia, debido a su demostrada mayor sensibilidad.

3. RESULTADOS

Se analizaron un total de 622 muestras utilizando ambos métodos. Un total de 88 (14,1%) de las 622 muestras fueron positivas mediante TMA. En cuanto al ensayo por RT-PCR, sólo 66 (10,6%) de las 622 muestras mostraron resultados positivos. La Tabla 5 muestra el rendimiento diagnóstico de los sistemas utilizados para la detección de los diferentes patógenos. Los ensayos basados en TMA realizados en la plataforma Panther mostraron resultados positivos ligeramente superiores para *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium*, mientras que los resultados para las muestras de *T. vaginalis* fueron similares para los ensayos de RT-PCR (Allplex™) y TMA (Aptima). El patógeno más frecuentemente detectado fue *C. trachomatis* (37 muestras; 5,9%).

	TMA	RT-PCR	Rendimiento diagnóstico		
	Positivo. N (%)	Positivo. N (%)	Sensibilidad % (CI 95%)	Especificidad % (CI 95%)	Kappa (k)
<i>C. trachomatis</i>	37 (5.9%)	31 (5.0%)	83.8% (67.3–93.2)	100.0% (99.2–100)	0.91
<i>N. gonorrhoeae</i>	29 (4.7%)	21 (3.4%)	72.4% (52.5–86.6)	100.0% (99.2–100)	0.83
<i>M. genitalium</i>	24 (3.9%)	10 (1.6%)	41.7% (22.8–63.1)	100.0% (99.2–100)	0.58
<i>T. vaginalis</i>	5 (0.8%)	5 (0.8%)	100.0% (46.3–100)	100.0% (99.2–100)	1

Tabla 5. Rendimiento diagnóstico de los ensayos RT-PCR en relación con los ensayos TMA para *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis*.

Las muestras positivas se analizaron además según su localización anatómica. Los resultados revelaron que una muestra no urogenital, la faringe, fue el lugar más frecuente con un resultado positivo (29 muestras positivas; 4,7%), seguido de la orina (27 muestras positivas; 4,3%), la muestra endocervical (22 muestras positivas; 3,5%) y la muestra anal (17 muestras positivas; 2,7%) (Tablas 6 y 7). El número de muestras positivas a *M. genitalium* mediante TMA (n = 24) fue superior al de las muestras positivas a *M. genitalium* identificadas con el ensayo por RT-PCR (n = 10); diez de estas muestras positivas mediante TMA procedían de frotis faríngeos. El rendimiento diagnóstico del ensayo RT-PCR se evaluó mediante el cálculo de los parámetros SE

y SP. La concordancia entre los ensayos por TMA y RT-PCR se determinó mediante el cálculo del índice Kappa de Cohen, coeficiente κ del ensayo RT-PCR (Allplex) en relación con los ensayos TMA de Aptima (método de referencia) para la detección de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* y *T. vaginalis* (Tabla 2). Se encontró una especificidad del 100,0% para los cuatro patógenos, sin embargo, se observó una sensibilidad media del 74,5% para el ensayo Allplex. Ambos métodos (TMA y RT-PCR multiplex) han mostrado una consistencia variable en función del microorganismo detectado, con valores κ que oscilan entre 0,58 para *M. genitalium* y 0,91 para *C. trachomatis*. En general, se obtuvo una concordancia del 95,2% (IC 95%; 93,6-96,9) y $\kappa = 0,80$ entre ambos métodos.

TMA	n	<i>C. trachomatis</i> n (%)	<i>N. gonorrhoeae</i> n (%)	<i>M. genitalium</i> n (%)	<i>T. vaginalis</i> n (%)
Anal	83	6 (7.2%)	6 (7.2%)	4 (4.8%)	1 (1.2%)
Endocervical	107	12 (11.2%)	2 (1.9%)	4 (3.7%)	4 (3.7%)
Faríngea	218	9 (4.1%)	10 (4.6%)	10 (4.6%)	0.0%
Orina	214	10 (4.7%)	11 (5.1%)	6 (2.8%)	0.0%

Tabla 6. Distribución anatómica y prevalencia de las muestras positivas mediante TMA.

RT-PCR	n	<i>C. trachomatis</i> n (%)	<i>N. gonorrhoeae</i> n (%)	<i>M. genitalium</i> n (%)	<i>T. vaginalis</i> n (%)
Anal	83	5 (6.0%)	6 (7.2%)	1 (1.2%)	1 (1.2%)
Endocervical	107	11 (10.3%)	1 (0.9%)	3 (2.8%)	4 (3.7%)
Faríngea	218	6 (2.8%)	8 (3.7%)	2 (0.9%)	0.0%
Orina	214	9 (4.2%)	6 (2.8%)	4 (1.9%)	0.0%

Tabla 7. Distribución anatómica y prevalencia de las muestras positivas mediante RT-PCR.

Entre las 622 muestras, hubo 28 discrepancias: 4 anales, 3 endocervicales, 13 faríngeas y 8 de orina (Tabla 8). Estas discordancias mostraron un aumento de la detección de TMA con respecto a la RT-PCR, sobre todo en muestras faríngeas y muestras de orinas.

Muestra (n)	TMA	RT-PCR
Anal (1)	CT GC	GC
Anal (2)	MG	Negativo
Anal (1)	MG CT	CT
Endocervical (1)	GC	Negativo
Endocervical (1)	MG	Negativo
Endocervical (1)	MG CT	MG
Faríngea (3)	CT	Negativo
Faríngea (2)	GC	Negativo
Faríngea (6)	MG	Negativo
Faríngea (2)	MG CT	CT
Orina (1)	CT	Negativo
Orina (5)	GC	Negativo
Orina (1)	MG	Negativo
Orina (1)	MG GC	GC

Tabla 8. Resultados discordantes entre RT-PCR y TMA en el estudio.

Además, se observaron 8 muestras de 8 pacientes distintos con co-infección por distintos patógenos:

- CT y MG: en 2 muestras faríngeas, una muestra endocervical y una muestra anal.
- CT y GC: en una muestra anal y una muestra endocervical.
- MG y GC: en una muestra de orina.
- CT, MG y GC: en una muestra uretral.

4. DISCUSIÓN

La prevalencia relativamente alta de las ITS y la necesidad de contar con una herramienta de diagnóstico rápida y precisa para su detección, justifica que cualquier nueva metodología deba ser evaluada a fondo antes de su implementación en la práctica rutinaria de laboratorio. En este estudio, evaluamos el rendimiento de los ensayos basados en TMA (Aptima Combo 2 (para *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*), Aptima *T. vaginalis* y Aptima *M. genitalium*) en la plataforma Panther para la detección simultánea de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis* y *M. genitalium* en comparación con un ensayo RT-PCR multiplex (Allplex™ STI Essential, Seegene). Aunque los ensayos mediante TMA han mostrado previamente buenos rendimientos en el diagnóstico de estos patógenos (103,116–118), esta es, hasta donde sabemos, la primera vez que se compara la detección de estos cuatro patógenos juntos con un ensayo basado en RT-PCR (Allplex™ STI Essential). La eficacia del ensayo RT-PCR Allplex™ también se ha demostrado anteriormente (119,120).

Ambos sistemas mostraron la mayor prevalencia de *C. trachomatis* en las muestras analizadas, lo que está en consonancia con que este patógeno es la ITS más frecuentemente notificada en Europa (121). La sensibilidad de los ensayos TMA fue mayor para la mayoría de los patógenos en comparación con la RT-PCR multiplex, lo cual es esperable ya que se dirigen directamente al ARN ribosómico, con la ventaja de un mayor número de copias por célula en comparación con las pruebas basadas en ADN, que se dirigen a una sola copia. En un reciente estudio publicado en Japón, se observó que la sensibilidad de la prueba TMA para *M. genitalium* fue casi 100 veces mayor en comparación con una prueba basada RT-PCR frente al gen MgPa, mediante la determinación de distintas diluciones seriadas de cepas viables de *M. genitalium* (122).

Es muy destacable que la mayoría de las muestras responsables de esta mayor sensibilidad fueran muestras de hisopos faríngeos, y que *M. genitalium* se detectara con mayor frecuencia en esta localización con los ensayos TMA. La explicación más probable se deba a que *M.*

genitalium y otros patógenos causantes de ITS, infectan la faringe con una carga bacteriana relativamente baja, dando lugar a señales débiles o negativas en sistemas basados en RT-PCR. De hecho, para la mayoría de las ITS bacterianas, la garganta es la localización anatómica con el menor número de muestras positivas según métodos basados en RT-PCR (123); sin embargo, nuestros hallazgos respecto al TMA, al menos en el caso de *M. genitalium*, confirman los resultados de informes recientes en la literatura (124). Además, nuestros resultados confirman que siempre hay que tener en cuenta otras localizaciones en función de los hábitos sexuales del paciente (125). De hecho, el uso exclusivo de muestras urogenitales pasa por alto una gran cantidad de infecciones, lo que hace que muchos pacientes no reciban el tratamiento adecuado (126). La sensibilidad y especificidad de los ensayos TMA han sido evaluados previamente, con sensibilidades y especificidades superiores al 98% (103,127), sin embargo, durante el periodo de realización de este estudio se reportaron falsos negativos de *Chlamydia trachomatis* usando los ensayos Aptima Combo2 en Finlandia y Suecia debido a la mutación C1515T del 23S ARNr, la cual afectaba a la diana del ensayo (128,129). Es importante señalar que el diagnóstico molecular, no se debe confiar en una única región genética diana, ya que puede llevar al infradiagnóstico de posibles mutantes, lo que podría ser una limitación de este ensayo que sólo amplifica el ARNr 23S de las clamidias.

La mayor sensibilidad de las pruebas de TMA pueden ser un punto débil en determinadas situaciones clínicas, como, por ejemplo, en la determinación de pruebas de curación para evaluar la eficacia del tratamiento, o en aquellas situaciones en las que una carga pequeña del microorganismo no requiera tratamiento antibiótico. Son necesarios más estudios para establecer límites de detección, y para evaluar la prueba de curación tras el tratamiento antimicrobiano mediante las pruebas de TMA.

Nuestro estudio tiene dos limitaciones importantes. En primer lugar, no pudimos resolver todos los resultados discordantes con una tercera prueba porque el volumen de muestra disponible

fue insuficiente, y no quisimos diluir la muestra para no perder sensibilidad. Por ello, no pudimos calcular el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de estas pruebas, y no pudimos descartar que la mayor sensibilidad de los ensayos TMA pudiera deberse a detecciones falsas positivas. Además, teniendo en cuenta que los ensayos de TMA tienen una mayor sensibilidad que los ensayos de PCR en tiempo real, la prueba de confirmación también debe ser un ensayo de TMA frente a una región distinta (130). En segundo lugar, los especímenes de *T. vaginalis* encontrados en hisopos faríngeos con la prueba RT-PCR no se incluyeron en el análisis final. De hecho, encontramos 19 muestras faríngeas que dieron positivo para *T. vaginalis* sólo con la prueba Allplex™; está bien documentado que los métodos basados en RT-PCR pueden carecer de especificidad para discriminar *T. vaginalis* de algunas otras especies de Trichomonas orales existentes en la microbiota faríngea, como *Trichomonas tenax* (131,132).

Los datos de prevalencia de cada patógeno de los pacientes que acuden a una consulta de ITS en nuestro estudio se encuentran en consonancia con los encontrados en Europa, 5.9% para *C. trachomatis*, 4.7% para *N. gonorrhoeae*, 3.9% para *M. genitalium* y 0.8% para *T. vaginalis* (Figura 9). La baja prevalencia de las infecciones por *T. vaginalis*, sólo 5 muestras de 622 en nuestro estudio, sugiere que no se considere un cribado sistemático de este microorganismo, al igual que ocurre en otros países vecinos, como Francia (133). Este hallazgo contrasta con otros países y con las sugerencias de las directrices de tratamiento de las ITS del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos, donde la prevalencia de *T. vaginalis* es alta y se recomienda el cribado para las mujeres que buscan atención por flujo vaginal alterado y personas en riesgo de infección.

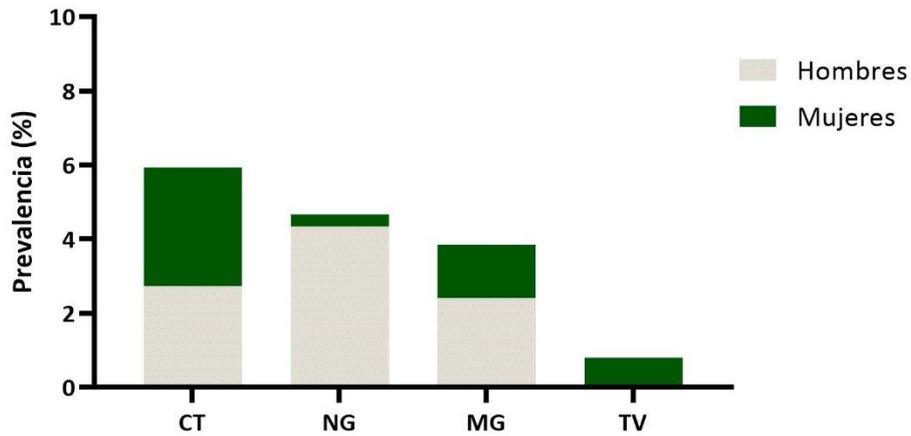


Figura 9. Prevalencia de patógenos encontrados en el estudio, diferenciados por sexo.

Nuestros resultados confirman la eficacia de los ensayos basados en TMA para el diagnóstico de las ITS, proporcionando pruebas adicionales que apoyan la implementación de esta metodología para las pruebas de rutina en el diagnóstico clínico. Es importante destacar que la tecnología TMA analizada proporciona importantes características para la automatización del laboratorio y la práctica clínica diaria. De esta manera, los pacientes podrían beneficiarse de esta tecnología, ya que pueden ser evaluados y diagnosticados en la misma visita médica.

CAPÍTULO 2.

Rendimiento y validación clínica de un nuevo método basado en microarrays para la detección de patógenos causantes de infecciones de transmisión sexual a partir de muestras clínicas directas

1. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2

Los objetivos de este capítulo han sido:

- Realizar una validación clínica de un nuevo kit para el diagnóstico de ITS basado en hibridación en microarrays, usando material genético previamente identificado.
- Evaluar el rendimiento del kit usando muestras clínicas directamente sin necesidad de extracción de ADN.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recogida de muestras

Una colección de setecientas cincuenta y cinco muestras clínicas diferentes, 500 caracterizadas como ITS-positivas y 255 como negativas mediante RT-PCR múltiplex, fueron analizadas en total con el kit STD Direct Flow Chip (Vitro, Master Diagnóstica, Granada). Todas las muestras clínicas se recibieron en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio (Granada) para diagnósticos de rutina, y se anonimizaron antes de las pruebas. El estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestra institución (Anexo 2).

La validación clínica se dividió en dos etapas:

- En primer lugar, se evaluó el rendimiento del kit STD Direct Flow Chip a partir del ADN purificado de trescientos cincuenta y ocho muestras clínicas de forma retrospectiva.
- En segundo lugar, se evaluó prospectivamente el rendimiento del kit STD Direct Flow Chip a partir de muestras clínicas directas -sin purificación de ADN- de seiscientos treinta y tres especímenes clínicos en una prueba paralela ciega.

En la validación se incluyeron seis muestras clínicas diferentes: orina, semen y frotis uretrales, faríngeos, endocervicales y anales.

Las muestras de orina y semen se dividieron en alícuotas de 1,5 ml del volumen original capturado, mientras que las muestras de frotis se resuspendieron en 2 ml de PBS 1X como medio de transporte, utilizando 1 ml para cada prueba.

2.2. Detección de ITS mediante STD Direct Flow Chip

El STD Direct Flow Chip (Vitro, Master Diagnóstica, Granada) es un kit de diagnóstico in vitro para la detección de organismos patógenos causantes de ITS en humanos. El kit STD Direct Flow Chip, permite la detección simultánea de 11 microorganismos: *Chlamydia trachomatis*

(Serovares A-K), *Chlamydia trachomatis* Biovar Linfogranuloma venéreo (LGV, Serovares L1-L3), *Haemophilus ducreyi*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis* y *Ureaplasma* (*U. urealyticum* / *U. parvum*). El sistema se basa en una metodología que consiste en la amplificación simultánea de ADN bacteriano, viral y protozoario mediante PCR multiplex, seguida de la hibridación en membranas con sondas de ADN específicas (microarrays) mediante la tecnología DNA-Flow automática (hybriSpot). Las plataformas colorimétricas basadas en el uso de hibridación en microarrays mediante la tecnología DNA-Flow (hibridación reversa por Flow-through) tiene la ventaja de producir señales más intensas, necesitar menos tiempo de incubación y reducir el tiempo total de procesamiento de horas a minutos, en comparación con la hibridación pasiva convencional, además de presentar precios competitivos y no requerir equipos altamente sofisticados.

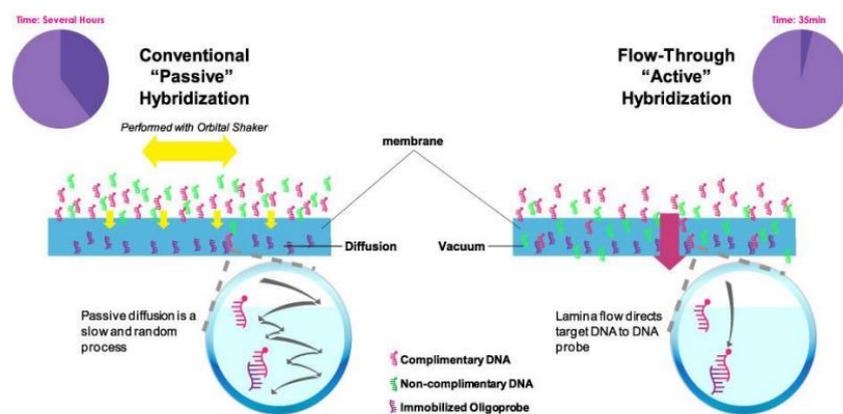


Figura 10. Comparación entre hibridación convencional e hibridación mediante Flow-Through.

El funcionamiento de este método consiste en que los amplicones biotinilados generados tras la PCR multiplex, se hibridaran en membranas que contienen un array de sondas específicas para cada patógeno humano, así como sondas de control de amplificación e hibridación. Los productos biotinilados de la PCR se detectan mediante una reacción inmunoenzimática colorimétrica con Estreptavidina-fosfatasa alcalina y el cromógeno NBT-BCIP, que genera precipitados insolubles en la membrana en aquellas posiciones en las que se ha producido la

hibridación. La señal se captura y analiza automáticamente, interpretando los resultados según la disposición de las sondas en el array (Figura 11). El kit incluye la enzima Uracilo-DNA-Glicosilasa (UDG) que previene la contaminación por productos de PCR que podrían dar resultados falsos positivos.

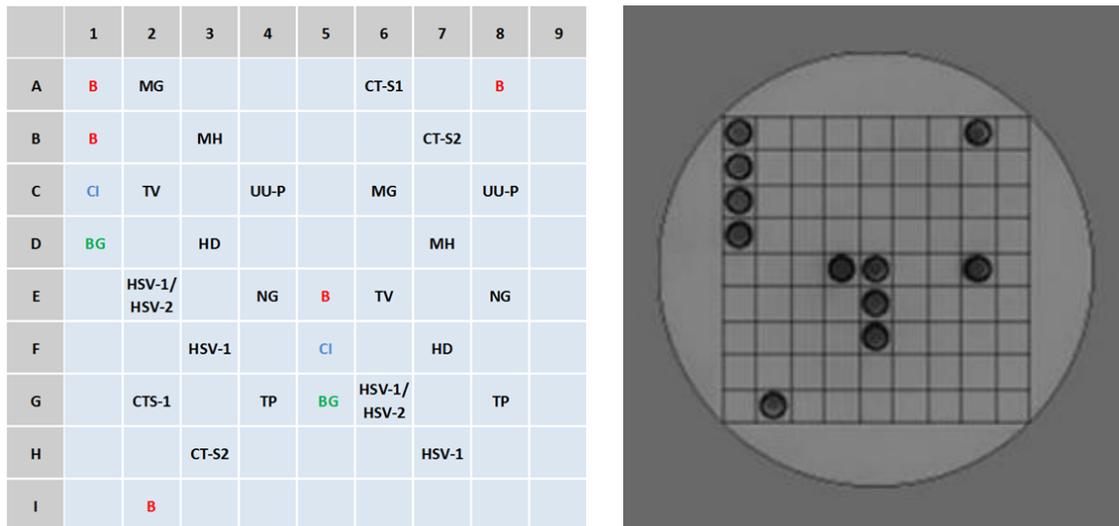


Figura 11. Distribución de las dianas en el microarray.
La imagen de la derecha muestra un array positivo para *N. gonorrhoeae*.
B: control de hibridación. CI: Control de amplificación exógeno. BG: Control de amplificación endógeno.

2.2.1. Análisis de muestra directa mediante STD Direct Flow Chip

Para analizar las muestras clínicas sin el paso de extracción de ADN, se validaron los siguientes protocolos según el tipo de muestra:

2.2.1.1. Muestras de orina

- Homogeneizar la muestra de orina mediante un vortex. Tomar 400 μ l del homogenizado y centrifugar durante 3 minutos a una velocidad de 12.000 rpm.
- Tras la centrifugación, descartar el sobrenadante y lavar el sedimento celular con 400 μ l de agua bidestilada libre de DNasa/RNasa. Repetir el paso de centrifugación y lavado.
- Usar 30 μ l de suspensión celular como ADN molde para la reacción de PCR.

2.2.1.2. Muestras en hisopos (uretrales, cervicales, vaginales, anales y faríngeos)

- Introducir el hisopo en 400 µl de agua bidestilada libre de DNasa/Rnasa y realizar un vortex intenso.
- Usar 30 µl de suspensión celular como ADN molde para la reacción de PCR.
- Para muestras clínicas anales, puede ser necesario un lavado adicional, dependiendo del grado de turbidez, a fin de minimizar los inhibidores de PCR que puedan encontrarse en este tipo de muestras.

2.2.1.3. Muestras de semen

- Homogeneizar la muestra de semen mediante un vortex. Tomar 400 µl del homogenizado y centrifugar durante 3 minutos a una velocidad de 12.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Añadir 100 µl de solución de lisis (kit Paraffin Tissue Processing, VITRO S.A) al sedimento celular e incubar a 55º durante 30 minutos, posteriormente incubar el homogeneizado a 95º durante 10 min y centrifugar a 2000 rpm durante 1 min.
- Usar 3 µl del sobrenadante con 27 de agua bidestilada para la reacción de PCR.

2.3. Detección de ITS mediante RT-PCR

Las pruebas de referencia se realizaron con un kit de RT-PCR multiplex (Allplex™ STI , Seegene, Seúl, Corea). Este ensayo permite detectar simultáneamente 7 microorganismos (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum*) mediante el uso de las tecnologías DPO™ y TOCE™. La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador en tiempo real CFX-96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Una descripción detallada de esta metodología está disponible en el capítulo 1 de esta tesis doctoral.

2.3.1. Extracción del ácido nucleico

La extracción del ácido nucleico es un paso necesario previo al análisis de las muestras clínicas con el kit de detección de PCR multiplex en tiempo real utilizado en el análisis (Allplex STI, Seegene). La extracción se realizó indistintamente con dos sistemas automatizados diferentes: Sistema MagNA Pure 96 (Roche) y EZ1 Advance XL (Qiagen). Se tomaron 400 µL de la muestra clínica y la purificación del ADN se eluyó finalmente en 50 y 60 µL, respectivamente.

2.5. Resolución de resultados discordantes

Las discordancias existentes entre ambos métodos de análisis se comprobaron mediante un tercer ensayo molecular (disponible en el mercado) y/o la secuenciación del ADN.

Igualmente, dado que ambos métodos de análisis difieren en el número total de patógenos detectados, los resultados positivos incluidos exclusivamente en el STD Direct Flow Chip Kit se confirmaron con terceros métodos. Los métodos comerciales incluían los siguientes kits

- Bacterial CNS Flow Chip Kit (CE-IVD, Master Diagnóstica) para confirmar los resultados positivos de *T. pallidum*.
- Viral CNS Flow Chip Kit (CE-IVD, Master Diagnóstica) y HSV 1/2 Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals) para confirmar los casos de HSV-1 y HSV-2.
- Cepheid GeneXpert CT/NG (CE-IVD-FDA, Cepheid) y RealQuality RQ-STI CT/NG (CE-IVD, ABAnalytica) para los casos de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.
- RealQuality RQ-STI MG/MH (CE-IVD, ABAnalytica) para confirmar los resultados positivos de *M. genitalium* y *M. hominis*.
- Secuenciación de ADN con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing en el 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para comprobar los resultados discordantes y confirmar los casos positivos de LGV y *U. urealyticum/parvum* cuando fue necesario (134).

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando la herramienta de software Clinical Calculator de VassarStats y el paquete estadístico SPSS, versión 23 (IBM, Chicago, IL, EE.UU.). Los intervalos de confianza (IC) fueron del 95% y se calcularon utilizando una distribución normal. La precisión diagnóstica del STD Direct Flow Chip Kit se evaluó calculando los parámetros de sensibilidad (SE; el número de casos verdaderos positivos / [verdaderos positivos + falsos negativos]) y especificidad (SP; el número de verdaderos negativos / [verdaderos negativos + falsos positivos]). Para determinar el grado de concordancia entre los métodos, se aplicó una prueba Kappa .

3. RESULTADOS

Para evaluar inicialmente el rendimiento clínico del kit STD Direct Flow Chip, se utilizaron muestras que fueron sometidas a una extracción previa de ácidos nucleicos. Así, los ADNp purificados (ADNp) de una colección de trescientos cincuenta y ocho (358) muestras clínicas caracterizadas previamente como casos de microorganismos positivos ($n = 302$, 84,36%) y negativos ($n = 56$, 15,64%) por el método de RT-PCR de referencia, fueron analizados con el ensayo STD Direct Flow Chip. La distribución de los microorganismos investigados según la naturaleza de las muestras analizadas junto con su incidencia se describe detalladamente en la Tabla 9. Una vez analizados los ADNp con el kit STD Direct Flow Chip, se calculó el rendimiento diagnóstico mediante la determinación de los parámetros de especificidad (SP) y sensibilidad (SE). Los resultados de SE y SP para cada patógeno se incluyen también en la Tabla 9. Como se observa (parte derecha de la tabla), los valores de SE oscilaron entre el 95,83% (valor más bajo obtenido para *M. genitalium*) y el 100%, mientras que los datos de SP fueron del 100% para todos los patógenos. Tomando en conjunto todos los resultados de SE y SP obtenidos para cada uno de los patógenos, el promedio de SE y SP fue de 99,45 y 100%, respectivamente. A continuación, se calculó el nivel de concordancia o acuerdo entre los resultados obtenidos por estos dos kits mediante la realización de una tabla 2x2 y el cálculo del índice kappa de Cohen. La concordancia entre los métodos fue casi perfecta: concordancia del 99% e índice Kappa (κ) = 0,969; IC 95% = 0,934-1,004.

Después de utilizar un tercer método comercial y/o de secuenciación para resolver las discrepancias iniciales en los resultados obtenidos por los dos métodos, se obtuvieron tres casos finales discordantes (tres falsos negativos, 3FN) mediante el kit STD Direct Flow Chip: 1 CT, 1 MG y 1 UU/P, en una muestra de orina, endocervical y de semen, respectivamente; representando cada una de estas discrepancias menos de un 1,6% (Tabla 11). Durante esta validación no se observaron casos discrepantes en relación con patógenos ajenos al kit de RT-PCR utilizado, pero

incluidos en cualquiera de los otros métodos comerciales o tras la estrategia de secuenciación del ARNr 16S/18S.

Una vez completada la validación clínica a partir del ADNp, centramos nuestro interés en el análisis directo de muestras clínicas (Direct-PCR), sin el paso inicial de extracción del ácido nucleico. En esta validación se utilizaron 633 muestras clínicas (n= 633). La distribución de los microorganismos según el tipo de muestra clínica y su incidencia se basa en los resultados obtenidos por el método de referencia se muestra en la Tabla 10. De forma similar a la realizada inicialmente, se calcularon los parámetros de SE y SP para cada uno de los microorganismos. Como se muestra, los valores de SE oscilaron entre el 89,30% (obtenido para MG) y el 100%, mientras que el SP osciló entre el 98,86% (obtenido para UU/P) y el 100% para los microorganismos remanentes. Una vez más, se calculó el promedio de las determinaciones de SE y SP para dar una visión general sobre el rendimiento clínico del kit STD Direct Flow Chip a partir del análisis de muestras clínicas por PCR directa: 98,06 y 99,88%, respectivamente. El nivel de concordancia entre los resultados obtenidos por ambos métodos de análisis fue del 98% con un índice Kappa (κ) = 0,954; IC 95% = 0,930-0,978.

En cuanto a los experimentos con ADNp, no se observaron casos discrepantes con patógenos ajenos al kit mediante RT-PCR, tras la comparación de resultados con otros métodos comerciales. Sin embargo, se detectaron trece casos finales discordantes para patógenos comunes en ambos kits: 8 falsos negativos [FNs: (3) MG, (1) UU/P, (1) CT y (3) MH]; y 5 falsos positivos [5 FPs: (4) UU/P y (1) MH]. El número y la clasificación de los casos discrepantes por tipo de muestra, incluidos en la Tabla 12, mostraron que la faringe fue el tipo de muestra más frecuente que dio FN (4), mientras que de nuevo las muestras de faringe y orina contribuyeron por igual a los FP (2 cada una).

MUESTRAS:	ORINA	SEMEN	ENDOCERVIX	ANAL	URETRA	FARINGE	TOTAL	RENDIMIENTO CLÍNICO	
	(N= 69)	(N= 67)	(N= 93)	(N= 74)	(N= 40)	(N= 15)	(N= 358)	ESPECIFICIDAD (SP)	SENSIBILIDAD (SE)
PATÓGENO (n) / INCIDENCIA (%):	(n / %)	(n / %)	(n / %)	% SP (C.I. 95%)	% SE (C.I. 95%)				
<i>N. gonorrhoeae</i>	3 / 4.35	0 / 0.00	3 / 3.22	13 / 17.58	9 / 22.50	1 / 6.67	29 / 8.10	100% (98.56-100)	100% (85.44-100)
<i>C. trachomatis</i>	31 / 44.93	8 / 11.94	24 / 25.81	35 / 47.30	25 / 62.50	6 / 40	129 / 36.03	100% (96.39-100)	99.56% (97.21-100)
<i>T. vaginalis</i>	0 / 0.00	0 / 0.00	2 / 2.15	3 / 4.05	0 / 0.00	2 / 13.33	7 / 1.95	100% (98.65-100)	100% (56.10-100)
<i>M. genitalium</i>	5 / 7.25	2 / 2.98	7 / 7.53	6 / 8.11	2 / 5.00	1 / 6.67	23 / 6.42	100% (98.10-100)	95.83% (82.19-100)
<i>U. urealyticum / parvum</i>	25 / 36.23	31 / 46.27	83 / 89.25	35 / 47.30	9 / 22.50	5 / 33.33	188 / 52.51	100% (96.27-100)	99.47% (97.5-100)
<i>M. hominis</i>	5 / 7.25	3 / 4.48	32 / 34.41	22 / 29.73	2 / 5.00	5 / 33.33	69 / 19.27	100% (98.36-100)	100% (93.43-100)
HSV-1	0 / 0.00	2 / 2.98	1 / 1.07	0 / 0.00	0 / 0.00	2 / 1.33	5 / 1.40	100% (98.65-100)	100% (46.30-100)
HSV-2	3 / 4.35	1 / 1.49	2 / 2.15	2 / 2.70	1 / 2.50	0 / 0.00	9 / 2.51	100% (98.64-100)	100% (62.90-100)
<i>T. pallidum</i>	0 / 0.00	1 / 49	0 / 0.00	1 / 1.35	1 / 2.50	0 / 0.00	3 / 0.84	100% (98.66-100)	100% (31.00-100)
<i>H. ducreyi</i>	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	100% (98.68-100)	NA

Tabla 9. Validación clínica a partir de ADN purificado con el kit STD Direct Flow Chip. En la parte superior izquierda de la tabla se muestra la distribución de los patógenos según el tipo de muestra clínica en función de los resultados obtenidos por el método de referencia. Los resultados de la incidencia de patógenos se muestran igualmente y se calculan como porcentaje de la relación $(n/N) \times 100$, donde (n) es el número de casos positivos causados por cada patógeno en un determinado tipo de muestra clínica y (N) el número total de muestras clínicas analizadas de un tipo determinado. Una línea horizontal discontinua define los patógenos que comparten ambos kits (parte superior) de los que sólo incluye el kit STD Direct Flow Chip (parte inferior). En la parte inferior, se indica la presencia e incidencia de cada patógeno tras el análisis con el STD Direct Flow Chip Kit. C.I 95%: El intervalo de confianza del 95% calculado como una distribución normal. *NA: No aplicable por falta de casos positivos de infección causada por este patógeno.

MUESTRAS:	ORINA	SEMEN	ENDOCERVIX	ANAL	URETRA	FARINGE	TOTAL	RENDIMIENTO CLÍNICO	
	(N= 138)	(N= 94)	(N=152)	(N= 71)	(N= 79)	(N= 15)	(N= 633)	ESPECIFICIDAD (SP)	SENSIBILIDAD (SE)
PATÓGENO (n) / INCIDENCIA (%):	(n / %)	(n / %)	(n / %)	(n / %)	(n / %)	(n / %)	(n / %)	% SP (C.I. 95%)	% SE (C.I. 95%)
<i>N. gonorrhoeae</i>	2 / 1.45	0 / 0.00	1 / 0.66	4 / 5.63	21 / 26.60	4 / 4.04	32 / 5.05	100% (99.21-100)	100% (86.65-100)
<i>C. trachomatis</i>	12 / 8.70	3 / 3.20	18 / 11.84	17 / 23.94	16 / 20.25	3 / 3.03	69 / 10.90	100% (99.15-100)	98.57% (91.23-99.92)
<i>T. vaginalis</i>	0 / 0.00	3 / 2.90	4 / 2.63	1 / 1.41	0 / 0.00	19 / 19.20	27 / 4.26	100% (98.93-100)	100% (84.49-100)
<i>M. genitalium</i>	4 / 2.90	4 / 3.80	9 / 5.92	3 / 4.22	5 / 6.33	0 / 0.00	25 / 3.95	100% (98.44-100)	89.30% (83.42-100)
<i>U. urealyticum / parvum</i>	31 / 22.46	37 / 36.50	121 / 79.60	33 / 46.48	24 / 30.38	37 / 37.37	283 / 44.71	98.86% (98.16-100)	99.65% (96.23-100)
<i>M. hominis</i>	9 / 6.52	4 / 4.80	40 / 26.31	15 / 21.12	7 / 8.86	11 / 11.11	86 / 13.58	99.81% (98.26-100)	96.67% (92.94-100)
HSV-1	1 / 0.72	2 / 2.12	2 / 1.31	1 / 1.41	1 / 1.26	3 / 3.03	10 / 1.58	100% (99.23-100)	100% (65.54-100)
HSV-2	0 / 0.00	0 / 0.00	1 / 0.66	0 / 0.00	2 / 2.53	1 / 1.91	4 / 0.63	100% (99.24-100)	100% (39.57-100)
<i>T. pallidum</i>	2 / 1.45	1 / 1.06	0 / 0.00	1 / 1.41	1 / 1.26	2 / 2.02	7 / 1.11	100% (99.24-100)	100% (56.09-100)
<i>H. ducreyi</i>	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	0 / 0.00	100% (99.35-100)	NA

Tabla 10. Análisis directo de muestras clínicas con el kit STD Direct Flow Chip. Al igual que en la Tabla 9, en la parte superior izquierda de la tabla se muestra la distribución de patógenos según el tipo de muestra clínica en función de los resultados obtenidos por el método de referencia. También se muestran los resultados de la incidencia de patógenos y se calculan como se ha indicado anteriormente. En la parte inferior, respecto a la línea discontinua, se indica la presencia e incidencia de los patógenos detectados de forma exclusiva por el STD Direct Flow Chip Kit. El rendimiento diagnóstico del STD Direct Flow Chip Kit para cada patógeno (SP, determinaciones SE más C.I. 95%) se indica después de la línea negra más gruesa. *NA: No aplicable por falta de casos positivos de infección causada por este patógeno.

TIPO DE MUESTRA (ADNp)	NÚMERO (N)	RESULTADOS DISCREPANTES POR STD DIRECT KIT			
		FN (n / %)	FN PATÓGENOS	FP (n / %)	FP PATÓGENOS
ORINA	69	1 / 1.44%	CT	0 / 0.00	-
URETRAL	40	0 / 0.00	-	0 / 0.00	-
ENDOCERVICAL	93	1 / 1.07%	MG	0 / 0.00	-
ANAL	74	0 / 0.00	-	0 / 0.00	-
SEMEN	67	1 / 1.50%	UU/P	0 / 0.00	-
FARINGE	15	0 / 0.00	-	0 / 0.00	-
TOTAL	358	3		0	

Tabla 11. Resultados discrepantes obtenidos cuando se analizó el ADNp.

TIPO DE MUESTRA (Direct-PCR)	NÚMERO (N)	RESULTADOS DISCREPANTES POR STD DIRECT KIT			
		FN (n / %)	FN PATÓGENOS	FP (n / %)	FP PATÓGENOS
ORINA	138	0 / 0.00	-	2 / 1.44%	(2) UU/P
URETRAL	79	0 / 0.00	-	1 / 1.26%	(1) UU/P
ENDOCERVICAL	152	2 / 1.31%	(1) MG, (1) CT	0 / 0.00	-
ANAL	71	1 / 1.41%	(1) MG	0 / 0.00	-
SEMEN	94	1 / 1.06	(1) MG	0 / 0.00	-
FARINGE	99	4 / 4.04%	(3) MH, (1) UU/P	3 / 3.03%	(1) MH (1) UU/P
TOTAL	633	8		5	

Tabla 12. Resultados discrepantes obtenidos cuando se analizaron muestras clínicas directas, sin extracción de ADN.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se ha evaluado el rendimiento clínico del kit STD Direct Flow Chip. Este kit ofrece un panel de detección superior entre los disponibles comercialmente, incluyendo virus y protozoos además de los agentes clásicos causantes de ITS con el plus de permitir el diagnóstico diferencial del Linfogramuloma venéreo (CT serovares L1-L3). Además, el STD Direct Flow Chip Kit permite la posibilidad de analizar directamente una amplia variedad de muestras clínicas (orina, semen, uretra, hisopos endocervicales, perianales y faríngeos) sin necesidad de un paso previo de extracción de ADN, lo que permite ahorrar costes y tiempo.

El análisis de las muestras clínicas a partir del ADN purificado (ADNp) con el STD Direct Flow Chip Kit cumplió con las recomendaciones descritas por diferentes organismos internacionales para realizar la evaluación de nuevas pruebas diagnósticas de enfermedades de transmisión sexual (135,136), que se sitúan entre el 90 y el 95% (SE) y el 98-100% (SP). De este análisis, sólo se encontraron 3 resultados de FN como discrepancias (Tabla 11). Estos casos podrían explicarse parcialmente por el hecho de una potencial menor integridad del ADN en las muestras almacenadas y congeladas. La aplicación de ciclos adicionales de congelación-descongelación sobre los ADNp que fueron analizados primero por el ensayo de RT-PCR y luego congelados hasta el análisis con el STD Direct Flow Chip Kit, incluyendo un uso adicional con otros métodos comerciales (es decir, como el análisis del caso CT con el Cepheid Xpert CT/NG Assay), podría causar una caída en la integridad del ADN. Junto con esto, se sabe que el diferente rendimiento de la detección representado según la fuente del espécimen podría ser otra posible explicación de dicha pérdida. Así, aunque las muestras de orina se han convertido en el tipo de muestra preferido para el análisis debido a su recogida menos invasiva, se ha demostrado que este tipo de muestra tiene un menor rendimiento diagnóstico en comparación con las muestras endocervicales o uretrales, los tipos de muestra preferidos para el diagnóstico de CT y NG entre otros (136). En este caso, el STD Direct Flow Chip Kit falló en la detección de CT a partir de una muestra de orina. Según los datos de sensibilidad analítica del fabricante del kit, MG tiene el

límite de detección (LoD) más bajo del panel de detección, situándose en 50 copias de una diana sintética por reacción de PCR (50 cop/rxn), mientras que, para el resto de los patógenos, el LoD se establece en 10 cop/rxn. Esta razón, junto con una vez más una menor integridad del ADN, podría explicar este resultado falso negativo de MG. Por último, la discordancia UU/P (UP después del ensayo de RT-PCR) se confirmó mediante la secuenciación del ARNr 16S. La repetición de la prueba con el Kit STD Direct Flow Chip resultó positiva. Una manipulación incorrecta de la muestra de ADN antes de la PCR en el primer análisis puede ser la razón de este resultado inicial falso negativo.

La principal ventaja que ofrece el STD Direct Flow Chip Kit con respecto a otros kits multiparamétricos de ITS es su capacidad para analizar directamente hasta seis muestras clínicas diferentes sin necesidad de extraer el ADN. Una vez más, los resultados del análisis por PCR directa también cumplieron los requisitos de SE y SP de partida para las pruebas de diagnóstico de las ITS (135,136). Se obtuvieron trece discordancias tras el uso de terceros métodos (Tabla 12). Por un lado, la existencia de 5 FPs [(4) UU/P y (1) MH] dadas por el STD Direct Flow Chip Kit podría deberse a la contaminación por productos de PCR. La inclusión de las unidades adicionales de la enzima UDG para inactivar los productos de PCR anteriores podría evitarlo. Por otro lado, el análisis dejó 8 FNs: (3) MG, (1) UU/P, (1) CT y (3) MH (Tabla 4). Considerando todo el conjunto, la explicación de estos FNs se puede explicar por: (i) pérdidas puntuales durante la manipulación de las muestras, (ii) proteasas que median en la degradación de las muestras clínicas, (iii) una baja carga de patógenos en las muestras, y (iv) a la presencia de coinfecciones que podrían provocar un desequilibrio durante la etapa de amplificación de la PCR perjudicando o complicando la detección de algunos microorganismos en la misma muestra haciendo que la sensibilidad sea menor. Esto último podría explicar la pérdida de resultados falsos negativos de los MG, ya que los ureaplasmas (UU/P) estaban presentes en todos estos casos discrepantes. Sobre las otras dianas incluidas en el panel de detección del kit STD Direct Flow Chip, cabe mencionar que:

- No se detectaron infecciones por *H. ducreyi* durante la validación clínica.
- Se detectaron dos casos de infecciones por LGV a partir de especímenes anales confirmados mediante secuenciación de un fragmento del gen *ompA*.
- Todas las muestras que resultaron positivas para patógenos fuera del panel de detección VHS-1, VHS-2 (HSV 1/2 Detection Kit, Roche Diagnostics) y *T. pallidum* fueron confirmadas por la comparación con un segundo método comercial y por la secuenciación del 16S ARNr.

El Kit STD Direct flow Chip tiene varias limitaciones: en primer lugar, incluye dentro de su panel de detección el grupo de bacterias constituido por *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum*, comensales humanos cuyo papel en el desarrollo de las ITS sigue siendo controvertido (137–139). Aunque puede parecer mejor para los pacientes detectar tantos microorganismos como sea posible al mismo tiempo, el uso de ensayos de PCR multiplex que detectan simultáneamente agentes de ITS "verdaderos" y bacterias colonizadoras no es exacto. De hecho, no hay pruebas de que sea realmente beneficioso detectar y tratar posteriormente estos patógenos, ya que podría provocar la selección de resistencia a los antimicrobianos, en estos microorganismos, en otros verdaderos patógenos de ITS y en la microbiota general (140). Por ello, recientemente, la Unión Internacional contra las Infecciones de Transmisión Sexual (IUSTI), no ha recomendado su cribado rutinario en hombres y mujeres asintomáticos, ni la realización de pruebas en individuos sintomáticos (83). Solo las cargas elevadas de *U. urealyticum* podrían ser responsables de unos pocos casos de uretritis no gonocócica masculina. Además, su alta prevalencia podría ser responsable de resultados falsos negativos en los otros patógenos verdaderos del kit. En segundo lugar, el kit también incluye la detección de *H. ducreyi*, patógeno bacteriano causante del chancro blando doloroso en la región genital o perianal. Debido a que la infección prevalece principalmente en partes de África y regiones del Pacífico, no hemos podido encontrar ningún caso positivo en nuestro medio, por lo que la detección de este patógeno no ha podido ser

evaluada. A medida que aumente la migración desde estas regiones, su detección puede ser relevante.

En conclusión, el kit STD Direct Flow Chip constituye una alternativa prometedora a los procedimientos de rutina en el diagnóstico, permitiendo el análisis directo de hasta seis tipos distintos de muestras clínicas con un amplio panel de microorganismos detectados. En este caso, el rendimiento diagnóstico mostró índices notables de especificidad y sensibilidad en cada uno de los estudios lanzados, obteniendo resultados que siempre estuvieron dentro de los recomendados para kits de diagnóstico molecular similares de esta categoría. Además, el kit demostró ser fácil de manejar y la interpretación de los resultados rápida, llevando al diagnóstico en menos de 4 h.

CAPÍTULO 3.

Análisis de la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en

Mycoplasma genitalium

1. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 3

A día de hoy, los datos de resistencia de *Mycoplasma genitalium* a macrólidos y fluoroquinolonas en España son escasos, limitándose todos ellos a la zona norte del país. Los objetivos de este capítulo han sido:

- Analizar la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencias de macrólidos en muestras de pacientes con infección por MG.
- Analizar la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencias de fluoroquinolonas en muestras de pacientes con infección por MG.
- Analizar los factores de riesgos asociados a estas mutaciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Pacientes y muestras

Para este estudio, se seleccionaron todas las muestras positivas a *Mycoplasma genitalium* mediante TMA por el ensayo Aptima *Mycoplasma genitalium* (Hologic, San Diego, Estados Unidos), o bien, mediante RT-PCR con el kit Allplex STI (Seegene, Seúl, Corea del Sur) que fueron recibidas en la Unidad de Microbiología Clínica del Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España) para el diagnóstico de ITS desde junio de 2018 hasta junio de 2019.

El estudio se diseñó y realizó de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética local del Hospital Universitario San Cecilio (Anexo 3).

2.2. Secuenciación de genes 23S y parC para estudio de la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas

A continuación, se detalla el procedimiento realizado para el estudio de las mutaciones asociadas a resistencia de macrólidos y fluoroquinolonas mediante secuenciación capilar o SANGER.

- Extracción de ácidos nucleicos: Las muestras positivas para *Mycoplasma genitalium*, fueron re-extraídas utilizando el sistema MagNa Pure 96 (Roche) anteriormente mencionado. El eluido se almacenó a -80°C hasta su análisis.
- Síntesis de cDNA: Para incrementar la cantidad de carga de DNA de *M. genitalium*, se realizó una síntesis de cDNA del ARNr presente en la muestra. Para ello se usó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

Este proceso consta de dos partes:

- Mezclar el DNA extraído con un oligo hexamérico comercial en proporción 11:1 durante 5 minutos a 65°C, obteniendo un total de 12 µL por muestra.

- Preparar una MasterMix con las siguientes cantidades dependiendo el número de muestras para la reacción de retrotranscripción:

Reactivos	Volumen/Rxn
Buffer de reacción 5x	4
RiboLock - Inhibidor RNAasa (20U/μL)	1
10mM dNTP Mix	2
RevertAid H Minus - Retrotranscriptasa	1
Total	8

- Mezclar los 8 μL con los 12 μL de cada muestra y llevar al termociclador con el siguiente programa:

Temperaturas	Tiempo
25°C	5 min
42°C	60 min
70°C	5 min
4°C	∞

- Obtenemos un volumen final de 20 μL de cDNA.
 - Reacción de amplificación de las dianas: Se realiza una PCR con distintos cebadores o primers en función de la región de interés a secuenciar (Tabla 13).

PRIMER	SECUENCIA (5'→3')	DIANA
Forward-Mg 23S	GAAGGAGGTTAGCAATTTATTGC	Dominio V del ARNr 23S
Reverse-Mg 23S	TTCTCTACATGGTGGTGTTTTG	
Forward-Mg parC	TGGGCTTAAACCCACCACT	Región QRDR parC
Reverse-Mg parC	CGGGTTTCTGTGTAACGCAT	

Tabla 13. Primers usados para la secuenciación de las dianas antibióticas de MG

- Para la amplificación se prepara una MasterMix con las siguientes cantidades dependiendo el número de muestras:

Reactivos	Vol/Rxn
H2O	12
Buffer 10X	2,5
Cloruro magnésico	1,5
Primer Forward	1,5
Primer Reverse	1,5
dNTPs	0,5
DNA polimerasa	0,5
Total	20

- Mezclar los 20 μ L de MasterMix con los 5 μ L del cDNA de cada muestra y llevar al termociclador con el siguiente programa:

Temperaturas	Tiempo	Ciclos
95°C	10 min	1
95°C	10 s	50
58°C	20 s	
72°C	20 s	
4°C	∞	1

- Visualización de resultados en gel de agarosa: Se comprueba la correcta amplificación mediante la visualización de bandas de peso molecular correspondiente al amplicón esperado:



Figura 12. Electroforesis con amplificación de muestras de MG para estudio del 23S ARNr.
Peso molecular esperado: 266 bp.

- Purificación del producto de PCR: Antes de la secuenciación Sanger, se realiza una purificación enzimática del amplicón. Para ello, utilizamos el kit Illustra ExoStar, la cual contiene una exonucleasa que permitirá eliminar los cebadores y nucleótidos no incorporados.
 - Se mezclan 2 μ L de exonucleasa con 5 μ L de cada uno de los amplicones generados y lo llevamos al termociclador con el siguiente protocolo:

Temperaturas	Tiempo
37°C	17 min
80°C	15 min
4°C	∞

- Secuenciación Sanger: La secuenciación se ha realizado mediante el analizador ABI Prism 3500 (Applied BioSystems – ThermoFisher Scientific). Este sistema requiere de un primer paso correspondiente a una PCR de secuenciación, partiendo del amplicón purificado previamente. La MasterMix usada para la PCR de secuenciación es la siguiente:

Reactivos	Volumen / Rxn
H2O	2,5
Enzima Sequencing RR-100	2
5X Sequencing Buffer	1
Primer Forward o Reverse	0,5
Total	6

- Para cada muestra se mezclan 4 μL del producto de PCR purificado con 6 μL de MasterMix y lo llevamos al termociclador con el siguiente protocolo:

Temperaturas	Tiempo	Ciclos
96°C	1 min	1
96°C	10 s	25
50°C	5 s	
60°C	2 min	
4°C	7 min	1
4°C	∞	1

- El producto de la PCR de secuenciación obtenido se purifica para eliminar nucleótidos y primers no incorporados que puedan interferir en la reacción de secuenciación. Este proceso se realiza con el kit de purificación XTerminator® BigDye (ThermoFisher Scientific), mezclando los 10 μL del producto de PCR de secuenciación con 45 μL de solución SAM® y 10 μL de solución Xterminator®.
- Esta mezcla se somete a un vortex de 30 minutos a 1800 rpm, seguidos de una centrifugación a 1000 g durante 2 minutos.
- Se recogen 20 μL del sobrenadante obtenido y se introducen en la placa de procesamiento del secuenciador. La secuenciación mediante electroforesis capilar en el equipo ABI Prism 3500 (Applied Biosystems – ThermoFisher Scientific) se realiza según protocolo.

2.3. Análisis de las secuencias e interpretación de las mutaciones

Tras la electroforesis capilar se obtiene un cromatograma que contiene los picos de fluorescencia correspondientes a cada nucleótido de nuestro amplicón secuenciado. El análisis de los cromatogramas se ha realizado con el software Chromas v.2.6.6 (Technelysium, Australia).

Los FASTA generados para el gen del 23S y para el gen parC fueron alineados con la secuencia de referencia de *Mycoplasma genitalium* G-37 (GenBank accession no. NC_000908) utilizando el software open source Jalview v.2 (141) y la herramienta de alineación de secuencias múltiples Muscle (EMBL-EBI).

- Análisis de los FASTA generados del gen 23S – Resistencia a macrólidos.

```
CCC GTTAGG CGCAAC GGGACGG AAAGACCCCGTGAAGCTTT - MG G37 23S rRNA
CCC GTTAGG CGCAAC GGGACGG AAGACCCCGTGAAGCTTT - MG A2058G
CCC GTTAGG CGCAAC GGGACGG AGAGACCCCGTGAAGCTTT - MG A2059G
CCC GTTAGG CGCAAC GGGACGG AAAGACCCCGTGAAGCTTT - MG Wild Type
```

- Análisis de los FASTA generados del gen parC – Resistencia a fluoroquinolonas

```
GGG AAATACCA CCCCCATGGTGATAGTTCCATTTATGATGCAATTATCAGAATGTCCC - MG G37 parC
GGG AAATACCA TCCCCATGGTGATAGTTCCATTTATGATGCAATTATCAGAATGTCCC - MG C234T
GGG AAATACCA CCCCCATGGTGATATTTCCATTTATGATGCAATTATCAGAATGTCCC - MG G248T: S83I
GGG AAATACCA CCCCCATGGTGATAGTTCCATTTATTATGCAATTATCAGAATGTCCC - MG G259T: D87Y
```

3. RESULTADOS

3.1. Características de los pacientes

Se incluyeron en el estudio un total de 77 pacientes con MG positiva. Los pacientes eran mayoritariamente hombres (n=54, 70%): 24 hombres HSH y 30 no HSH. La edad media de los 77 participantes era de 27 años (IQR: 23-31) [hombres: 27 años (IQR: 23-30); mujeres: 24 años (IQR: 22-31)]. Las muestras se recogieron de diferentes fuentes anatómicas: 38 (49,4%) muestras de orina de primera evacuación, 22 (28,6%) hisopos endocervicales, 16 (20,8%) hisopos rectales y un (1,2%) hisopo faríngeo.

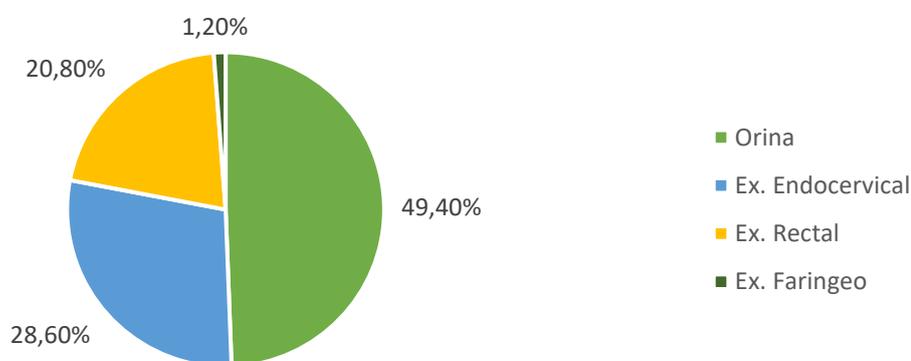


Figura 13. Distribución anatómica de las muestras analizadas.

De los casos identificados como MG positivos, dieciséis (21%) pacientes (9 de ellos hombres) estaban coinfectados con otro microorganismo causante de ITS: doce con *Chlamydia trachomatis*, cinco con *Neisseria gonorrhoeae*, uno con *Trichomonas vaginalis*. Diez pacientes estaban infectados en más de un sitio anatómico, con mayor frecuencia en recto+faringe (7/10); seguido de recto+orina (2/10) y cérvix+faringe (1/10).

Se detectaron mutaciones asociadas a la resistencia a los macrólidos en 28 de 77 [36,4%; (IC95%: 25,7%-48,1%)] de las muestras analizadas. Catorce (50%) muestras resistentes a los macrólidos portaban la mutación A2059G. Un paciente presentaba una doble mutación en las posiciones 2058 y 2059 (A2058G+A2059G). Se detectaron mutaciones clínicamente significativas en el QRDR de los genes parC en 7 de 77 [9,1%; (IC del 95%: 3,7%-17,8%)] especímenes, que afectaban

a los aminoácidos en la posición 83 y 87. El cambio más común encontrado en parC (10 de 77; 12,9%) fue Pro (62) -->Ser (C184T), que se acompañó de una sustitución sinónima en la posición nucleotídica 234 (C234T) en 4 casos. La tabla 9 muestra una descripción detallada de las mutaciones encontradas en los distintos genes (23S y parC).

Gen / Nucleótido afectado	Cambio aminoacídico	n (% Frecuencia)	Asociado con resistencia antibiótica
23S ARNr			
- A2058G	-	9 (11.7%)	Si
- A2058C	-	3 (3.9%)	Si
- A2058T	-	1 (1.3%)	Si
- A2058G + A2059G	-	1 (1.3%)	Si
- A2059G	-	14 (18.2%)	Si
parC			
- C184T	P62S	6 (7.8%)	No
- C234T	No cambio	3 (3.9%)	No
- C184T + C234T	P62S	4 (5.2%)	No
- G242C	G81A	1 (1.3%)	Desconocido
- G248T	S83I	2 (2.6%)	Si
- T250C	S84P	1 (1.3%)	Desconocido
- G259T	D87Y	3 (3.9%)	Si
- G259A	D87N	2 (2.6%)	Si

Tabla 14. Mutaciones encontradas para las dos dianas, y sus correspondientes cambios de aminoácidos en *Mycoplasma genitalium*. Los cambios de aminoácidos se informan de acuerdo con el genoma de MG G37

La resistencia a los macrólidos y a las fluoroquinolonas se encontró en el 62,5% (15 de 24) y el 16,7% (4 de 24) de la población de HSH estudiada, respectivamente; mientras que las tasas de

resistencia encontradas en los no HSH fueron del 26,6% (8 de 30) y el 10,0% (3 de 30), respectivamente. En las 23 mujeres infectadas, la resistencia a los macrólidos y a las fluoroquinolonas fue del 21,7% (5/23) y del 0% (0/23), respectivamente. Se realizaron análisis univariantes para identificar los factores asociados a la infección por MG mediante pruebas de chi-cuadrado, que pueden observarse en la Tabla 15. Los HSH ($p=0.005$) y el haber tenido otra ITS en el último año ($p=0.018$) se asociaron significativamente con la infección por MG resistente a los macrólidos. No se encontró ninguna asociación significativa para la resistencia de MG a las fluoroquinolonas (Figura 14).

Variable	R a Macrólidos n; %	P value	R a Fluoroquinolona n; %	P value
ITS en el último año		0.018		0.231
- Si	15; 53.6%		4; 57.1%	
- No	13; 46.4%		3; 42.9%	
Práctica sexual		0.005		0.136
- HSH	15; 53.6%		4; 57.1%	
- HSM	8; 28.6%		3; 42.9%	
- Mujer	5; 17.9%		0; 0%	
Localización muestra		0.166		0.350
- Orina	14; 50.0%		5; 71.4%	
- Endocervical	5; 17.9%		0; 0%	
- Anal	9; 32.1%		2; 28.6%	
- Faringe	0; 0%		0; 0%	

Tabla 15. Análisis univariante de factores de riesgos asociados a mutaciones de resistencias en MG

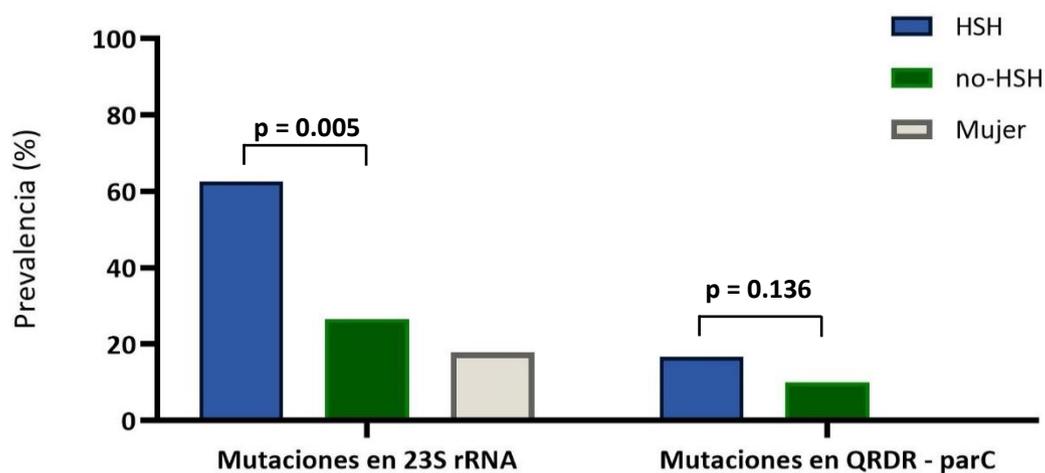


Figura 14. Prevalencia de mutaciones en las regiones 23S y QRDR

Cuatro pacientes (todos ellos varones) presentaron mutaciones asociadas a resistencias tanto para macrólidos, como para fluoroquinolonas. Estos cambios consistían en la combinación de A2058G+S83I, A2058T+S83I, A2059G+D87N y A2058G+D87Y. En la tabla 16 se encuentra una descripción detallada de estos pacientes.

Paciente	Muestra	Edad	Sexo	HSH	ITS previa	Co-Infección	RAM	RAFQ	Tratamiento	TOC
1	Orina	25	H	No	NA	No	A2058T	S83I	AZM 1 gr seguido de MXF 400 mg 7 días	ND
2	Orina	33	H	Si	Si	CT, GC	A2058G	S83I	DOX 100 mg/12h 7 días seguido de MXF 400 mg 7 días	Si
3	Orina	29	H	No	Si	No	A2059G	D87N	MXF 400 mg 7 días	ND
4	Anal	37	H	Si	Si	Sífilis	A2058G	D87Y	MXF 400 mg 7 días	si

Tabla 16. Descripción de los pacientes que presentaron mutaciones asociadas a resistencias para macrólidos (RAM) y fluoroquinolonas (RAFQ). ND: No disponible.

4. DISCUSIÓN

En nuestro estudio presentamos, por primera vez, datos de resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en el sur de España. Las tasas de mutaciones asociadas a resistencias encontradas para los macrólidos y las fluoroquinolonas fueron del 36,4% y del 9,1%, respectivamente.

La alta prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia para los macrólidos en el presente estudio, está en consonancia con las encontradas en otros países europeos (Figura 12) y en dos estudios realizados en el norte de España (94,142), y son concordantes con el creciente fracaso al tratamiento con azitromicina para *M. genitalium*. Este aumento de prevalencia se encuentra impulsada por varios factores:

- El uso generalizado de azitromicina desde la década de 1990 para el tratamiento etiológico de las ITS, debido a su vida media prolongada y a que puede administrarse como dosis única.
- La incorporación de azitromicina 1 gr en dosis única junto con ceftriaxona para el tratamiento estándar de la gonorrea adaptado por varios países.
- La tendencia de *M. genitalium* a desarrollar resistencias de novo en el 15% de los pacientes expuestos a azitromicina (143).
- Las pocas pruebas de *M. genitalium* realizadas en muchos laboratorios de Microbiología debido a la falta de medios, y al ser un microorganismo de reciente repercusión.

A pesar de que desde 2016, la guía de la Unión Internacional contra las Infecciones de Transmisión Sexual recomienda la doxiciclina como tratamiento de primera línea para la uretritis no gonocócica (144), el tratamiento empírico de las ITS con 1 g de azitromicina como dosis única ha contribuido sin duda al desarrollo de cepas resistentes a los macrólidos. En nuestro estudio, el hallazgo de la asociación entre haber tenido una ITS en el último año y la infección por MG resistente a los macrólidos ($p=0,018$) es también una prueba del desarrollo de resistencia a los

macrólidos en MG. Con respecto a la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en otros países, llama la atención Suecia, donde las guías nacionales recomiendan desde hace años, como primera opción, doxiciclina para el tratamiento de la UNG y la infección por *C. trachomatis*, provocando una de las prevalencias más bajas en resistencia a macrólidos en Europa.

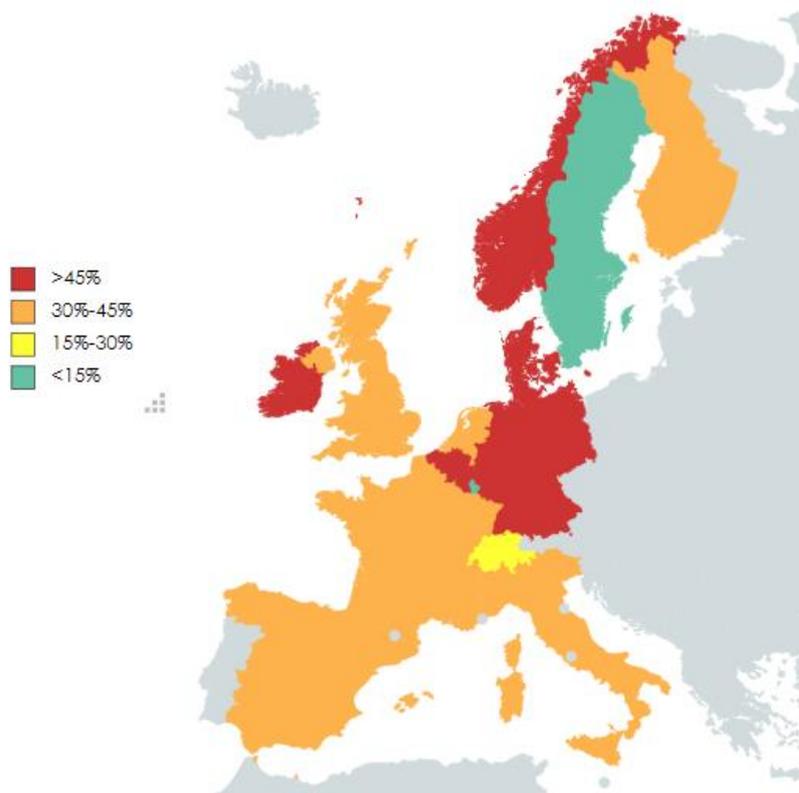


Figura 15. Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en Europa.
Fuente: Elaboración propia según literatura.

En nuestro estudio observamos también el hallazgo de una mayor prevalencia de resistencia a los macrólidos en la MG en la población de HSH, que es muy propensa a tener ITS, con respecto a la población no HSH ($p=0.005$). Esto puede ser otro marcador indirecto del efecto de la azitromicina empírica en el desarrollo de resistencia en la MG.

Además de las mutaciones a macrólidos, se estudió la presencia de mutaciones en la región diana de las fluoroquinolonas. La presencia de mutaciones en parC no siempre se asocia a un fracaso terapéutico de las fluoroquinolonas de cuarta generación. Tanto la alteración P62S

(C184T) como la presencia de P62S junto con la mutación sinónima C234T, frecuentes en nuestro estudio, fueron identificadas en la cepa M6282 de MG, que ha demostrado una susceptibilidad fenotípica in vitro a las fluoroquinolonas. Otro de los cambios que encontramos en parC fue el S84P (T250C), que sólo se ha descrito en MG en dos ocasiones (145,146), con una asociación desconocida con la resistencia a las fluoroquinolonas en la MG hasta el momento.

Otro de los cambios encontrados en el gen parC, fue la mutación G81A en la posición G242C, en una muestra rectal. Este cambio se encuentra cerca de la posición QRDR (aminoácidos 83-87), y hasta donde sabemos actualmente, no ha sido reportada previamente.

Existen pocos estudios en España que examinen la prevalencia de mutaciones asociadas con resistencia a las fluoroquinolonas en *M. genitalium*. Los datos de nuestro estudio, con un 9,1% (IC 95%: 3,7%-17,8%) de mutaciones clínicamente relevantes, están en consonancia con los del resto de Europa, donde se aprecia que moxifloxacino sigue teniendo una eficacia muy buena. En otros continentes, como Asia y la región del Pacífico, el uso de moxifloxacino está muy extendido, provocando unas tasas de mutaciones superiores al 30%. La prevalencia más alta se encuentra en Japón, debido al uso de distintas fluoroquinolonas (Levofloxacino, Gatifloxacina, Moxifloxacino y Sitafloxacino) para el tratamiento de uretritis no gonocócicas. Aunque el tratamiento con moxifloxacino en muchos países es eficaz, no se recomienda utilizarlo como primera línea en todos los casos de *M. genitalium* porque las opciones terapéuticas futuras son limitadas. Además, no hay que subestimar la preocupación por la posibilidad de efectos adversos derivados de uso de fluoroquinolonas.

Las infecciones por *M. genitalium* que tienen mutaciones asociadas con la resistencia a macrólidos y fluoroquinolona son potencialmente intratables con azitromicina y moxifloxacino. En nuestro estudio encontramos a 4 pacientes que portaban mutaciones en ambas dianas. En dos de ellos se disponía de una muestra posterior al tratamiento con moxifloxacino, y en ambas se seguía detectando la presencia de MG. El tratamiento de tercera línea para la infección

persistente por *M. genitalium* después de azitromicina y moxifloxacino, es doxiciclina o minociclina 100 mg dos veces al día durante 14 días (con unas tasas de curación del 40%) y la pristinamicina 1 g cuatro veces al día durante 10 días (con unas tasas de curación del 75%) (50). Como es evidente, es prioritario el estudio de nuevos antimicrobianos potenciales como son zoliflodacina, lefamulina y gepotidacina, que han demostrado ser efectivos in vitro contra *M. genitalium* resistente a los tratamientos de primera y segunda línea (147–149).

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral es pequeño, ya que se consideraron solo las muestras positivas a MG durante el periodo de estudio (Junio de 2018 a Junio de 2019). En segundo lugar, no hay datos de seguimiento de la mayoría de los pacientes que tenían infección por MG con mutaciones de resistencias, ya que, durante el periodo de estudio, la prueba de curación de MG no se realizaba de manera rutinaria. En tercer lugar, casi la mitad de los pacientes varones del estudio son HSH, lo que, junto con su mayor tasa de MG resistente a los macrólidos, puede sobreestimar la prevalencia de casos resistentes para los pacientes no HSH. Por último, no hemos analizado los cambios de aminoácidos en el gen de la girasa (*gyrA*), especialmente en las posiciones 80-90, que podrían tener un impacto menor en la resistencia a las fluoroquinolonas.

Debido a la observación de que las tasas de curación con azitromicina eran más bajas para las infecciones con una alta carga (150,151), se ha desarrollado el concepto de terapia secuencial guiada por la resistencia (RGST). Aunque la doxiciclina en monoterapia tiene una eficacia reducida y las tasas de erradicación son bajas, es eficaz en reducir la carga del organismo y, por tanto, el riesgo de que haya selección de cepas con mutaciones preexistentes a los macrólidos. En la RGST, los pacientes son tratados con doxiciclina durante 7 días, lo que reduce la carga bacteriana de *M. genitalium* mientras se esperan los resultados de las pruebas de resistencia a los macrólidos, y posteriormente, el paciente es tratado con una dosis de 2,5 g de azitromicina

(1 g el primer día seguido de 500 mg los días 2-4) o moxifloxacino durante 7-10 días (47,152) en función del resultado del test molecular de resistencia a macrólidos.

El RGST es ahora el tratamiento recomendado en las guías clínicas australianas y también en las directrices del Reino Unido sobre *M. genitalium* (51). Aunque el RGST ha mostrado tasas de curación más altas y una menor selección de resistencia en recientes estudios observacionales (47,152), ningún ensayo controlado lo ha confirmado y la administración de dos antimicrobianos durante un máximo de 17 días, dependiendo del régimen de dosificación, puede conducir a la selección de resistencia en otras ITS, así como en patógenos que no son ITS. Además, la eficacia de este método puede verse influenciada por reinfecciones y posibles fallos en la adherencia de los tratamientos prolongados.

Las alarmantes tasas de resistencia a los antibióticos de MG, como las encontradas en el presente estudio, sugieren que debería recomendarse el análisis de la resistencia a los fármacos de primera y segunda línea. Además, creemos que, dadas las mayores tasas de resistencia encontradas para la población de HSH, este análisis de resistencia debería ser obligatorio, al menos, para esta población. Los kits de diagnóstico basados en PCR en tiempo real, recientemente comercializados, facilitarán sin duda el tratamiento guiado por la resistencia en las infecciones por MG.

Nuestros datos enfatizan la necesidad de alejarse del uso generalizado de azitromicina en dosis única para tratar los síndromes de ITS y reconsiderar su uso en el tratamiento de las infecciones por clamidia y gonocócicas. En última instancia, se necesitarán nuevas clases de antimicrobianos, y probablemente la terapia de combinación de antimicrobianos, para mejorar la eficacia del tratamiento. Mientras tanto, se pueden realizar progresos sustanciales hacia la reducción de la propagación de *M. genitalium* mediante la reducción del uso de macrólidos, el uso de estrategias de tratamiento guiadas por resistencia y el establecimiento de una vigilancia nacional e internacional de *M. genitalium* y resistencia a los antimicrobianos.

CONCLUSIONES

1. Los ensayos basados en TMA para el diagnóstico de las ITS muestran un excelente rendimiento en comparación con aquellos basados en RT-PCR multiplex.
2. Durante el periodo de estudio, se observó una prevalencia de 5.9% para *C. trachomatis*, 4.7% para *N. gonorrhoeae*, 3.9% para *M. genitalium* y 0.8% para *T. vaginalis* entre aquellos pacientes que visitaban una consulta de ITS.
3. El rendimiento diagnóstico del kit STD Direct Flow Chip, mostró índices notables de especificidad y sensibilidad en cada uno de los estudios lanzados, obteniendo resultados que siempre estuvieron dentro de los recomendados para kits de diagnóstico molecular similares de esta categoría.
4. En *M. genitalium*, las mutaciones asociadas a la resistencia a los macrólidos en nuestro medio se sitúan en el 36,4% (IC95%: 25,7%-48,1%), mientras que las mutaciones asociadas a resistencias a fluoroquinolonas se sitúan en el 9,1%; (IC del 95%: 3,7%-17,8%).
5. La población HSH y el haber tenido otra ITS en el último año, se asociaron significativamente con la infección por *M. genitalium* resistente a los macrólidos. Sin embargo, no se encontró ninguna asociación significativa para la resistencia de *M. genitalium* a las fluoroquinolonas.
6. Debido a estas tasas de resistencias, se recomienda un tratamiento secuencial dirigido por estudio genotípico de resistencias para el tratamiento de *M. genitalium*, sobre todo en población HSH.

Bibliografía

1. Hafner L, Beagley K, Timms P. Chlamydia trachomatis infection: Host immune responses and potential vaccines. Vol. 1, Mucosal Immunology. Nature Publishing Group; 2008. p. 116–30.
2. Witkin SS, Minis E, Athanasiou A, Leizer J, Linhares IM. Chlamydia trachomatis: the Persistent Pathogen. Clin Vaccine Immunol. 2017 Oct 1;24(10).
3. Taylor H, Burton M, Haddad D, S W, H W. Trachoma. Lancet (London, England). 2014 Dec 13;384(9960):2142–52.
4. Peipert J. Clinical practice. Genital chlamydial infections. N Engl J Med. 2003 Dec 18;349(25):2424–30.
5. Tsevat D, Wiesenfeld H, Parks C, JF P. Sexually transmitted diseases and infertility. Am J Obstet Gynecol. 2017 Jan 1;216(1):1–9.
6. Rours G, Duijts L, Moll H, LR A, R de G, VW J, et al. Chlamydia trachomatis infection during pregnancy associated with preterm delivery: a population-based prospective cohort study. Eur J Epidemiol. 2011 Jun;26(6):493–502.
7. Adachi KN, Nielsen-Saines K, Klausner JD. Chlamydia trachomatis Screening and Treatment in Pregnancy to Reduce Adverse Pregnancy and Neonatal Outcomes: A Review. Front Public Heal. 2021 Jun 10;9.
8. Low N, Redmond S, Uusküla A, J van B, H W, B A, et al. Screening for genital chlamydia infection. Cochrane database Syst Rev. 2016 Sep 13;9(9).
9. Gimenes F, Souza R, Bento J, Teixeira J, SS M-E, MG B, et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. Nat Rev Urol. 2014 Dec 11;11(12):672–87.
10. Chan P, Robinette A, Montgomery M, A A, S C-U, JR L, et al. Extragenital Infections Caused by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: A Review of the Literature. Infect Dis Obstet Gynecol. 2016;2016.
11. Bébéar C, Barbeyrac B de. Genital Chlamydia trachomatis infections. Clin Microbiol Infect. 2009 Jan 1;15(1):4–10.
12. De Vries HJC. Lymphogranuloma venereum in the Western world, 15 years after its re-emergence: new perspectives and research priorities. Curr Opin Infect Dis. 2019 Feb 1;32(1):43–50.
13. Høie S, Knudsen L, Gerstoft J. Lymphogranuloma venereum proctitis: a differential diagnose to inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2011 Apr;46(4):503–10.
14. Kong F, Tabrizi S, Law M, LA V, M C, CK F, et al. Azithromycin versus doxycycline for the treatment of genital chlamydia infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. Clin Infect Dis. 2014 Jul 15;59(2):193–205.
15. Páez-Canro C, Alzate J, González L, JA R-R, A L, HG G. Antibiotics for treating urogenital Chlamydia trachomatis infection in men and non-pregnant women. Cochrane database Syst Rev. 2019 Jan 25;1(1).
16. Geisler WM, Uniyal A, Lee JY, Lensing SY, Johnson S, Perry RCW, et al. Azithromycin versus Doxycycline for Urogenital Chlamydia trachomatis Infection. N Engl J Med. 2015 Dec 23;373(26):2512–21.
17. Vall-Mayans M, Isaksson J, Caballero E, Sallés B, Herrmann B. Bubonic lymphogranuloma venereum with multidrug treatment failure: Int J STD AIDS. 2013 Aug 28;25(4):306–8.
18. Kong F, Tabrizi S, Fairley C, PHILLIPS S, FEHLER G, LAW M, et al. Higher organism load associated

- with failure of azithromycin to treat rectal chlamydia. *Epidemiol Infect.* 2016 Sep 1;144(12):2587–96.
19. Unemo M, Seifert HS, Hook EW, Hawkes S, Ndowa F, Dillon JAR. Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Prim.* 2019 Dec 1;5(1).
 20. Heumann C, Quilter L, Eastment M, R H, SE H. Adverse Birth Outcomes and Maternal Neisseria gonorrhoeae Infection: A Population-Based Cohort Study in Washington State. *Sex Transm Dis.* 2017;44(5):266–71.
 21. Adachi K, Klausner JD, Xu J, Ank B, Bristow CC, Morgado MG, et al. Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in HIV-infected pregnant women and adverse infant outcomes. *Pediatr Infect Dis J.* 2016 Aug 1;35(8):894–900.
 22. Callan T, Debattista J, Berry B, Brown J, Woodcock S, Hocking JS, et al. A retrospective cohort study examining STI testing and perinatal records demonstrates reproductive health burden of chlamydia and gonorrhoea. *Pathog Dis.* 2021;78(6).
 23. Allen C, Fairley CK, Chen MY, Maddaford K, Ong JJ, Williamson DA, et al. Oropharyngeal gonorrhoea infections among heterosexual women and heterosexual men with urogenital gonorrhoea attending a sexual health clinic in Melbourne, Australia. *Clin Microbiol Infect.* 2021;0(0).
 24. Unemo M, Shafer W. Antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):587–613.
 25. De Vries HJC, Zingoni A, White J, JD R, A K. 2013 European Guideline on the management of proctitis, proctocolitis and enteritis caused by sexually transmissible pathogens. *Int J STD AIDS.* 2014;25(7):465–74.
 26. Moran J, Levine W. Drugs of choice for the treatment of uncomplicated gonococcal infections. *Clin Infect Dis.* 1995;20 Suppl 1.
 27. Leonard CA, Schoborg R V., Low N, Unemo M, Borel N. Pathogenic Interplay Between Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae that Influences Management and Control Efforts—More Questions than Answers? *Curr Clin Microbiol Reports* 2019 63. 2019 Jul 12;6(3):182–91.
 28. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. And C for DC, Prevention. NC for EZ and ID (U. S). D of HQPARC and SU, editors. Atlanta, GA: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>; 2019.
 29. Tully J, Taylor-Robinson D, Cole R, DL R. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet (London, England).* 1981 Jun 13;1(8233):1288–91.
 30. Ma L, Jensen JS, Mancuso M, Hamasuna R, Jia Q, McGowin CL, et al. Genetic Variation in the Complete MgPa Operon and Its Repetitive Chromosomal Elements in Clinical Strains of Mycoplasma genitalium. *PLoS One.* 2010;5(12):15660.
 31. Taylor-Robinson D, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: From chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jul;24(3):498–514.
 32. Jensen JS, Orsum R, Dohn B, Uldum S, Worm AM, Lind K. Mycoplasma genitalium: A cause of male urethritis? *Genitourin Med.* 1993;69(4):265–9.
 33. Horner PJ, Gilroy CB, Thomas BJ, Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Thomas BJ, et al. Association of Mycoplasma genitalium with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet.* 1993 Sep 4;342(8871):582–5.
 34. Horner PJ, Martin DH. Mycoplasma genitalium Infection in Men. *J Infect Dis.* 2017 Jul 15;216(suppl_2):S396–405.
 35. Mena L, Wang X, Mroczkowski TF, Martin DH. Mycoplasma genitalium infections in asymptomatic men and men with urethritis attending a sexually transmitted diseases clinic in

- New Orleans. *Clin Infect Dis*. 2002 Nov 15;35(10):1167–73.
36. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Infect*. 2004 Aug;80(4):289–93.
 37. Sonnenberg P, Ison C, Clifton S, Field N, C T, K S, et al. Epidemiology of *Mycoplasma genitalium* in British men and women aged 16–44 years: evidence from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *Int J Epidemiol*. 2015 Dec 1;44(6):1982–94.
 38. Falk L, Fredlund H, Jensen J. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex Transm Infect*. 2005 Feb;81(1):73–8.
 39. Moi H, Reinton N, Moghaddam A. *Mycoplasma genitalium* in women with lower genital tract inflammation. *Sex Transm Infect*. 2009 Feb 1;85(1):10–4.
 40. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart L. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2015 Aug 1;61(3):418–26.
 41. Bissessor M, Tabrizi S, Bradshaw C, CK F, JS H, SM G, et al. The contribution of *Mycoplasma genitalium* to the aetiology of sexually acquired infectious proctitis in men who have sex with men. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Mar 1;22(3):260–5.
 42. Ong JJ, Aung E, Read T, Fairley C, SM G, G M, et al. Clinical Characteristics of Anorectal *Mycoplasma genitalium* Infection and Microbial Cure in Men Who Have Sex With Men. *Sex Transm Dis*. 2018 Aug 1;45(8):522–6.
 43. Read T, Murray G, Danielewski J, Fairley C, M D, K W, et al. Symptoms, Sites, and Significance of *Mycoplasma genitalium* in Men Who Have Sex with Men. *Emerg Infect Dis*. 2019 Apr 1;25(4):719–27.
 44. Jensen JS, Bradshaw C. Management of *Mycoplasma genitalium* infections – can we hit a moving target? *BMC Infect Dis* 2015 151. 2015 Aug 19;15(1):1–9.
 45. Manhart L, Jensen J, Bradshaw C, MR G, DH M. Efficacy of Antimicrobial Therapy for *Mycoplasma genitalium* Infections. *Clin Infect Dis*. 2015 Dec 15;61 Suppl 8:S802–17.
 46. Unemo M, Jensen J. Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and *Mycoplasma genitalium*. *Nat Rev Urol*. 2017 Mar 1;14(3):139–52.
 47. Read TRH, Fairley CK, Murray GL, Jensen JS, Danielewski J, Worthington K, et al. Outcomes of Resistance-guided Sequential Treatment of *Mycoplasma genitalium* Infections: A Prospective Evaluation. *Clin Infect Dis*. 2019 Feb 1;68(4):554–60.
 48. Ito S, Shimada Y, Yamaguchi Y, Yasuda M, Yokoi S, Ito SI, et al. Selection of *Mycoplasma genitalium* strains harbouring macrolide resistance-associated 23S rRNA mutations by treatment with a single 1 g dose of azithromycin. *Sex Transm Infect*. 2011 Aug;87(5):412–4.
 49. Horner P, Ingle S, Garrett F, Blee K, F K, P M, et al. Which azithromycin regimen should be used for treating *Mycoplasma genitalium*? A meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2018 Feb 1;94(1):14–20.
 50. Jensen J, Cusini M, Gomberg M, H M. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Oct 1;30(10):1650–6.
 51. Soni S, Horner P, Rayment M, N P-S, N N, A P, et al. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Mycoplasma genitalium* (2018). *Int J STD AIDS*. 2019 Sep 1;30(10):938–50.
 52. Bissessor M, Tabrizi S, Twin J, H A, CK F, MY C, et al. Macrolide resistance and azithromycin failure in a *Mycoplasma genitalium*-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. *Clin Infect Dis*. 2015 Apr 15;60(8):1228–36.

53. Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020 Nov 1;20(11):1302–14.
54. Fernández-Huerta M, Serra-Pladevall J, Esperalba J, Espasa M. *Mycoplasma genitalium* y resistencia a fluoroquinolonas: del genotipo al fenotipo. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020 Jan 1;38(1):44–5.
55. Couldwell D, Tagg K, Jeoffreys N, GL G. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *Int J STD AIDS*. 2013 Jul;24(10):822–8.
56. Hamasuna R, Le P, Kutsuna S, K F, M M, N O, et al. Mutations in ParC and GyrA of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. *PLoS One*. 2018 Jun 1;13(6).
57. Murray GL, Bradshaw CS, Bissessor M, Danielewski J, Garland SM, Jensen JS, et al. Increasing Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Emerg Infect Dis*. 2017 May 1;23(5):809.
58. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Vol. 11, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 1998. p. 300–17.
59. Crucitti T, Jaspers V, Mulenga C, Khondowe S, Vandepitte J, Buvé A. Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia. *PLoS One*. 2011;6(1):16310.
60. Krieger JN, Poisson MA, Rein MF. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun*. 1983;41(3):1291–5.
61. Alderete JF, Garza GE. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun*. 1988;56(1):28–33.
62. Mallinson DJ, Lockwood BC, Coombs GH, North MJ. Identification and molecular cloning of four cysteine proteinase genes from the pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology*. 1994 Oct 1;140(10):2725–35.
63. Bowden FJ, Garnett GP. *Trichomonas vaginalis* epidemiology: Parameterising and analysing a model of treatment interventions. *Sex Transm Infect*. 2000 Aug 1;76(4):248–56.
64. Seña AC, Miller WC, Hobbs MM, Schwebke JR, Leone PA, Swygard H, et al. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: Implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis*. 2007 Jan 1;44(1):13–22.
65. Hardy PH, Nell EE, Spence MR, Hardy JB, Graham DA, Rosenbaum RC. Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome. Vol. 324, *The Lancet*. *Lancet*; 1984. p. 333–7.
66. Pastorek JG, Cotch MF, Martin DH, Eschenbach DA. Clinical and microbiological correlates of vaginal trichomoniasis during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 1996 Nov 1;23(5):1075–80.
67. Moodley P, Wilkinson D, Connolly C, Moodley J, Sturm AW. *Trichomonas vaginalis* is associated with pelvic inflammatory disease in women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2002 Feb 15;34(4):519–22.
68. Zhang ZF, Begg CB. Is *trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? results from a combined analysis of 24 studies. *Int J Epidemiol*. 1994;23(4):682–90.
69. McClelland RS, Sangaré L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, et al. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis*. 2007 Mar 1;195(5):698–702.
70. Center for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines.

2015.

71. Vázquez F, García MJ, Pérez F, Palacio V. *Trichomonas vaginalis*: Tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. Vol. 19, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma; 2001. p. 114–24.
72. Meingassner JG, Thurner J. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;15(2):254–7.
73. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 Oct 1;1(1):1–22.
74. Mayer KH, Venkatesh KK. Interactions of HIV, other sexually transmitted diseases, and genital tract inflammation facilitating local pathogen transmission and acquisition. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Mar;65(3):308–16.
75. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Jan;2(1):33–42.
76. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS. Syphilis. *Nat Rev Dis Prim*. 2017 Oct 12;3(1):1–21.
77. Osella AR, Massa MA, Joeke S, Blanch N, Yacci MR, Centonze S, et al. Hepatitis B and C virus sexual transmission among homosexual men. *Am J Gastroenterol*. 1998 Jan;93(1):49–52.
78. Gorgos L. Sexual transmission of viral hepatitis. *Infect Dis Clin North Am*. 2013 Dec;27(4):811–36.
79. Groves MJ. Genital Herpes: A Review. *Am Fam Physician*. 2016 Jun 1;93(11):928–34.
80. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet (London, England)*. 2007 Dec 22;370(9605):2127–37.
81. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: Systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS*. 2006;20(1):73–83.
82. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, et al. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports*. 2021 Jul 23;70(4):1–187.
83. Horner P, Donders G, Cusini M, Gomberg M, Jensen JS, Unemo M. Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? - a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Nov 1;32(11):1845–51.
84. Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR, Jensen NL, Astete SG, et al. *Ureaplasma urealyticum* Is Associated With Nongonococcal Urethritis Among Men With Fewer Lifetime Sexual Partners: A Case-Control Study. *J Infect Dis*. 2011 Oct 15;204(8):1274.
85. World Health Organization. Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016-2021: toward ending STIs. 2016;
86. World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018. Geneva; 2018.
87. de Jong AS, Rahamat-Langendoen JC, van Alphen PTW, Hilt N, van Herk CMC, Pont SBEH, et al. Large two-centre study into the prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* in the Netherlands. *Int J STD AIDS*. 2016 Sep 1;27(10):856–60.
88. Le Roy C, Hénin N, Pereyre S, Bébéar C. Fluoroquinolone-Resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France - Volume 22, Number 9—September 2016 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*. *Emerg Infect Dis*. 2016 Sep 1;22(9):1677–9.

89. Meites E, Gaydos CA, Hobbs MM, Kissinger P, Nyirjesy P, Schwebke JR, et al. A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections. *Clin Infect Dis*. 2015 Dec 15;61(suppl_8):S837–48.
90. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected sexually transmitted infections– 2008. Geneva: WHO; 2012. 20 p.
91. Van Der Veer C, Van Rooijen MS, Himschoot M, De Vries HJC, Bruisten SM. *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma genitalium*: age-specific prevalence and disease burden in men attending a sexually transmitted infections clinic in Amsterdam, the Netherlands. *Sex Transm Infect*. 2016 Feb 1;92(1):83–5.
92. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. [cited 2021 Nov 9]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>
93. Piñeiro L, Idigoras P, de la Caba I, López-Olaizola M, Cilla G. Tratamiento antibiótico dirigido en infecciones por *Mycoplasma genitalium*: análisis de mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019 Jun 1;37(6):394–7.
94. Barberá MJ, Fernández-Huerta M, Jensen JS, Caballero E, Andreu A. *Mycoplasma genitalium* Macrolide and Fluoroquinolone Resistance: Prevalence and Risk Factors among a 2013-2014 Cohort of Patients in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis*. 2017 Aug 1;44(8):457–62.
95. Asenjo A, Kusters JG, Severs TT, Alós JI. *Mycoplasma genitalium* in Spain: prevalence of genital infection and frequency of resistance to macrolides. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018 Mar 1;36(3):169–71.
96. Bolumburu C, Zamora V, Muñoz-Algarra M, Portero-Azorín F, Escario JA, Ibáñez-Escribano A. Trichomoniasis in a tertiary hospital of Madrid, Spain (2013–2017): prevalence and pregnancy rate, coinfections, metronidazole resistance, and endosymbiosis. *Parasitol Res*. 2020 May 14;119(6):1915–23.
97. Aguirre-Quiñonero A, de Castillo-Sedano IS, Calvo-Muro F, Canut-Blasco A. Accuracy of the BD MAX™ vaginal panel in the diagnosis of infectious vaginitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 May 1;38(5):877–82.
98. Bignell C, Fitzgerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS*. 2011 Oct;22(10):541–7.
99. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014 [Internet]. *MMWR Recomm Rep*. 2014 [cited 2021 Nov 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6302a1.htm>
100. World Health Organization. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. 2014;
101. Rönn MM, Mc Grath-Lone L, Davies B, Wilson JD, Ward H. Evaluation of the performance of nucleic acid amplification tests (NAATs) in detection of chlamydia and gonorrhoea infection in vaginal specimens relative to patient infection status: a systematic review. *BMJ Open*. 2019 Jan 1;9(1).
102. Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, Herring AJ. Evaluation of the Specificities of Five DNA Amplification Methods for the Detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb 1;41(2):835.
103. Tabrizi SN, Unemo M, Limnios AE, Hogan TR, Hjelmevoll SO, Garland SM, et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *J Clin Microbiol*. 2011 Oct;49(10):3610–5.
104. Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid:

- implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill.* 2006 Nov 9;11(11):3076.
105. Otto C, Huang S. Real-Time Detection of Amplification Products Through Fluorescence Quenching or Energy Transfer. *Adv Tech Diagnostic Microbiol.* 2018;451–80.
 106. She RC, Schutzbank TE, Marlowe EM. Non-PCR Amplification Techniques. *Adv Tech Diagnostic Microbiol.* 2018;347–75.
 107. Grupo de expertos de GESIDA, Secretaria del plan nacional sobre el SIDA, Grupo de estudio GEITS, Grupo español para la investigación de ETS de la AEDV y SEIP. Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las Infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes. 2017;
 108. Plan Nacional Sobre el Sida-Grupo de expertos PrEP, Ministerio de Sanidad. Profilaxis Preexposición al VIH en España. 2018 Jan.
 109. Thompson MA, Horberg MA, Agwu AL, Colasanti JA, Jain MK, Short WR, et al. Primary Care Guidance for Persons With Human Immunodeficiency Virus: 2020 Update by the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 6;
 110. Jensen J, Cusini M, Gomberg M, Moi H, Wilson J, Unemo M. European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections [Internet]. 2021. Available from: <https://iusti.org/wp-content/uploads/2021/03/Mg-IUSTI-draft-guideline-2021.docx>
 111. Centers for Disease Control and Prevention. *Mycoplasma genitalium* - STI Treatment Guidelines [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/mycoplasmagenitalium.htm>
 112. Birger R, Saunders J, Estcourt C, Sutton AJ, Mercer CH, Roberts T, et al. Should we screen for the sexually-transmitted infection *Mycoplasma genitalium*? Evidence synthesis using a transmission-dynamic model. *Sci Rep.* 2017 Nov 23;7(1):1–13.
 113. Galán J, Lepe J, Otero L, Serra J, Vázquez F (coordinador). Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. 2018. (Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores)). Report No.: 24a.
 114. Doshi JS, Power J, Allen E. Acceptability of chlamydia screening using self-taken vaginal swabs. *Int J STD AIDS.* 2008 Aug 1;19(8):507–9.
 115. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res.* 2007 Mar;35(6).
 116. Boyadzhyan B, Yashina T, Yatabe JH, Patnaik M, Hill CS. Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2004 Jul;42(7):3089–93.
 117. Golparian D, Tabrizi SN, Unemo M. Analytical specificity and sensitivity of the APTIMA Combo 2 and APTIMA GC assays for detection of commensal *Neisseria* species and *Neisseria gonorrhoeae* on the Gen-Probe Panther instrument. *Sex Transm Dis.* 2013 Feb;40(2):175–8.
 118. Wroblewski JKH, Manhart LE, Dickey KA, Hudspeth MK, Totten PA. Comparison of transcription-mediated amplification and PCR assay results for various genital specimen types for detection of *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3306–12.
 119. Del Prete R, Ronga L, Lestingi M, Addati G, Angelotti UF, Di Carlo D, et al. Simultaneous detection and identification of STI pathogens by multiplex Real-Time PCR in genital tract specimens in a selected area of Apulia, a region of Southern Italy. *Infection.* 2017 Aug 1;45(4):469–77.
 120. Robinet S, Parisot F. [Accreditation of a multiplex real time PCR assay for detection and semi-quantitative determination of pathogens responsible of sexually-transmitted infections]. *Ann*

- Biol Clin (Paris). 2018 Jul 1;76(4):459–76.
121. European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia infection. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm; 2020.
 122. Hamasuna R, Aono H, Kawaguchi K, Matsumoto M, Fujimoto N. Sensitivity of a transcription-mediated amplification method (Aptima Mycoplasma genitalium assay) to detect *M. genitalium* in vitro. *J Infect Chemother*. 2021 Apr 1;27(4):573–7.
 123. Hananta IPY, De Vries HJC, Van Dam AP, Van Rooijen MS, Soebono H, Schim Van Der Loeff MF. Spontaneous Clearance of Pharyngeal Gonococcal Infections: A Retrospective Study in Patients of the Sexually Transmitted Infections Clinic; Amsterdam, the Netherlands; 2012 to 2015. *Sex Transm Dis*. 2018 Sep 1;45(9):594–9.
 124. Le Roy C, Pereyre S, Hénin N, Bébéar C. French Prospective Clinical Evaluation of the Aptima Mycoplasma genitalium CE-IVD Assay and Macrolide Resistance Detection Using Three Distinct Assays. *J Clin Microbiol*. 2017 Nov 1;55(11):3194–200.
 125. Whittles LK, Didelot X, Grad YH, White PJ. Testing for gonorrhoea should routinely include the pharynx. *Lancet Infect Dis*. 2018 Jul 1;18(7):716–7.
 126. Garner AL, Schembri G, Cullen T, Lee V. Should we screen heterosexuals for extra-genital chlamydial and gonococcal infections? *Int J STD AIDS*. 2015 Jun 9;26(7):462–6.
 127. Cheng A, Kirby JE. Evaluation of the Hologic gen-probe PANTHER, APTIMA Combo 2 assay in a tertiary care teaching hospital. *Am J Clin Pathol*. 2014 Mar 1;141(3):397–403.
 128. Rantakokko-Jalava K, Hokynar K, Hieta N, Keskitalo A, Jokela P, Muotiala A, et al. Chlamydia trachomatis samples testing falsely negative in the Aptima Combo 2 test in Finland, 2019. *Euro Surveill*. 2019 May 30;24(22).
 129. Unemo M, Hansen M, Hadad R, Lindroth Y, Fredlund H, Puolakkainen M, et al. Finnish new variant of Chlamydia trachomatis escaping detection in the Aptima Combo 2 assay also present in Örebro County, Sweden, May 2019. *Euro Surveill*. 2019;24(26).
 130. Le Roy C, Pereyre S, Hénin N, Bébéar C. French prospective clinical evaluation of the aptima mycoplasma genitalium ceivd assay and macrolide resistance detection using three distinct assays. *J Clin Microbiol*. 2017 Nov 1;55(11):3194–200.
 131. Chapin K, Andrea S. APTIMA® Trichomonas vaginalis, a transcription-mediated amplification assay for detection of Trichomonas vaginalis in urogenital specimens. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011 Sep;11(7):679–88.
 132. Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete JF. Genetic identity and differential gene expression between Trichomonas vaginalis and Trichomonas tenax. *BMC Microbiol*. 2009 Mar 18;9(1):1–7.
 133. Pereyre S, Laurier Nadalié C, Bébéar C, Arfeuille C, Beby-Defaux A, Berçot B, et al. Mycoplasma genitalium and Trichomonas vaginalis in France: a point prevalence study in people screened for sexually transmitted diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Feb 1;23(2):122.e1-122.e7.
 134. Wu HN, Nakura Y, Motooka D, Nakamura S, Nishiumi F, Ishino S, et al. Complete Genome Sequence of Ureaplasma parvum Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan. *Genome Announc*. 2014;2(3).
 135. Herring A, Ballard R, Mabey D, Peeling RW. Evaluation of rapid diagnostic tests: syphilis. *Nat Rev Microbiol* 2006 412. 2006 Dec;4(12):S33–40.
 136. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S17–29.
 137. Beeton ML, Payne MS, Jones L. The Role of Ureaplasma spp. in the Development of Nongonococcal Urethritis and Infertility among Men. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Oct 1;32(4).

138. Leli C, Mencacci A, Latino MA, Clerici P, Rassu M, Perito S, et al. Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018 Apr 1;51(2):220–5.
139. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1175–9.
140. Beeton ML, Spiller OB. Antibiotic resistance among *Ureaplasma* spp. isolates: cause for concern? *J Antimicrob Chemother*. 2017 Feb 1;72(2):330–7.
141. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009 May 1;25(9):1189–91.
142. Piñeiro L, Idigoras P, de la Caba I, López-Olaizola M, Cilla G. Guided antibiotic therapy for *Mycoplasma genitalium* infections: Analysis of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)*. 2019 Jun 1;37(6):394–7.
143. Horner P, Ingle SM, Garrett F, Blee K, Kong F, Muir P, et al. Which azithromycin regimen should be used for treating *Mycoplasma genitalium*? A meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2018 Feb 1;94(1):14–20.
144. Horner PJ, Blee K, Falk L, van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS*. 2016 Oct 1;27(11):928–37.
145. Hadad R, Golparian D, Lagos AC, Ljungberg J, Nilsson P, Jensen JS, et al. Macrolide and fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium* in two Swedish counties, 2011–2015. *APMIS*. 2018 Feb 1;126(2):123–7.
146. Shipitsyna E, Rummyantseva T, Golparian D, Khayrullina G, Lagos AC, Edelstein I, et al. Prevalence of macrolide and fluoroquinolone resistance-mediating mutations in *Mycoplasma genitalium* in five cities in Russia and Estonia. *PLoS One*. 2017 Apr 1;12(4).
147. Veve MP, Wagner JL. Lefamulin: Review of a Promising Novel Pleuromutilin Antibiotic. *Pharmacotherapy*. 2018 Sep 1;38(9):935–46.
148. Damião Gouveia AC, Unemo M, Jensen JS. In vitro activity of zoliflodacin (ETX0914) against macrolide-resistant, fluoroquinolone-resistant and antimicrobial-susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. *J Antimicrob Chemother*. 2018 May 1;73(5):1291–4.
149. Jensen JS, Nørgaard C, Scangarella-Oman N, Unemo M. In vitro activity of the first-in-class triazaacenaphthylene gepotidacin alone and in combination with doxycycline against drug-resistant and -susceptible *Mycoplasma genitalium*. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan 1;9(1):1388–92.
150. Bissessor M, Tabrizi SN, Twin J, Abdo H, Fairley CK, Chen MY, et al. Macrolide resistance and azithromycin failure in a *Mycoplasma genitalium*-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. *Clin Infect Dis*. 2015 Apr 15;60(8):1228–36.
151. Walker J, Fairley CK, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Twin J, Chen MY, et al. *Mycoplasma genitalium* incidence, organism load, and treatment failure in a cohort of young Australian women. *Clin Infect Dis*. 2013 Apr 15;56(8):1094–100.
152. Durukan D, Read TRH, Murray G, Doyle M, Chow EPF, Vodstrcil LA, et al. Resistance-Guided Antimicrobial Therapy Using Doxycycline-Moxifloxacin and Doxycycline-2.5 g Azithromycin for the Treatment of *Mycoplasma genitalium* Infection: Efficacy and Tolerability. *Clin Infect Dis*. 2020 Sep 15;71(6):1461–8.

Índice de tablas

Tabla 1. Tratamiento de las infecciones gonocócicas según guías clínicas.....	30
Tabla 2. Sensibilidad de <i>Mycoplasma genitalium</i> a varios antibióticos.....	34
Tabla 3. Recogida de muestras para el diagnóstico de las ITS.	56
Tabla 4. Distribución anatómica de las muestras recogidas para el estudio.	65
Tabla 5. Rendimiento diagnóstico de los ensayos RT-PCR en relación con los ensayos TMA para <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> y <i>T. vaginalis</i>	72
Tabla 6. Distribución anatómica y prevalencia de las muestras positivas mediante TMA.	73
Tabla 7. Distribución anatómica y prevalencia de las muestras positivas mediante RT-PCR.	73
Tabla 8. Resultados discordantes entre RT-PCR y TMA en el estudio.	74
Tabla 9. Validación clínica a partir de ADN purificado con el kit STD Direct Flow Chip.	92
Tabla 10. Análisis directo de muestras clínicas con el kit STD Direct Flow Chip.	93
Tabla 11. Resultados discrepantes obtenidos cuando se analizó el ADNp.....	94
Tabla 12. Resultados discrepantes obtenidos cuando se analizaron muestras clínicas directas, sin extracción de ADN.....	94
Tabla 13. Primers usados para la secuenciación de las dianas antibióticas de MG.....	104
Tabla 14. Mutaciones encontradas para las dos dianas, y sus correspondientes cambios de aminoácidos en <i>Mycoplasma genitalium</i>	110
Tabla 15. Análisis univariante de factores de riesgos asociados a mutaciones de resistencias en MG.....	111
Tabla 16. Descripción de los pacientes que presentaron mutaciones asociadas a resistencias para macrólidos y fluoroquinolonas	112

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>C. trachomatis</i>	20
Figura 2. Evolución histórica del tratamiento a <i>N. gonorrhoeae</i>	28
Figura 3. Microscopía electrónica de <i>M. genitalium</i>	32
Figura 4. Tasa de incidencia de <i>C. trachomatis</i> en HSH	47
Figura 5. Evolución de las tasas por 100.000 habitantes por infección de transmisión sexual, 2016-2019.	48
Figura 6. Ilustración gráfica del funcionamiento de DPO.	66
Figura 7. Ilustración gráfica del funcionamiento de TMA.	68
Figura 8. Funcionamiento HPA.....	69
Figura 9. Prevalencia de patógenos encontrados en el estudio, diferenciados por sexo.....	79
Figura 10. Comparación entre hibridación convencional e hibridación mediante Flow-Through.	85
Figura 11. Distribución de las dianas en el microarray	86
Figura 12. Electroforesis con amplificación de muestras de MG para estudio del 23S ARNr...	106
Figura 13. Distribución anatómica de las muestras analizadas.	109
Figura 14. Prevalencia de mutaciones en las regiones 23S y QRDR.....	112
Figura 15. Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en Europa.....	114

ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del Comité Ético de Investigación de Granada del estudio llevado a cabo en el capítulo 1.

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/D^a: CRISTINA LUCIA DAVILA FAJARDO como secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Evaluation of the Aptima MG, Combo 2 (CT/NG) and TV assays for the simultaneous detection of Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Trichomonas vaginalis on the Panther platform ,(Comparación ITS Panther-Seegene)
Protocolo, Versión: 1.1
HIP, Versión:
CI, Versión:

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en Granada a 28/11/2018



D/D^a: CRISTINA LUCIA DAVILA FAJARDO, como Secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada

Código Seguro De Verificación:	1029321256fc9bd080c093f1cf924c0e4fefe60f	Fecha	28/11/2018	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Cristina Lucia Davila Fajardo			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.i?face/code/1029321256fc9bd080c093f1cf924c0e4fefe60f	Página	1/2	

Anexo 2. Aprobación del Comité Ético de Investigación de Granada del estudio llevado a cabo en el capítulo 2.

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES
Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación
Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/D^a: Juan Morales Arcas como secretario/a del CEI de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Desarrollo de kit para identificación de un panel de patógenos responsables de enfermedades de transmisión sexual ,(KIT ETS)

Protocolo, Versión: 03

HIP, Versión:

CI, Versión:

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en GRANADA a 17/01/2018

D/D^a. Juan Morales Arcas, como Secretario/a del CEI de Granada



Código Seguro De Verificación:	929d3d39e3047b6ef47bd283ed27f7b1d001e6ba	Fecha	17/01/2018	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Juan Morales Arcas			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.i?face/code/929d3d39e3047b6ef47bd283ed27f7b1d001e6ba	Página	1/2	

Anexo 3. Aprobación del Comité Ético de Investigación de Granada del estudio llevado a cabo en el capítulo 3.

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/D^a. CRISTINA LUCIA DAVILA FAJARDO como secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Resistance to macrolides and quinolones of Mycoplasma genitalium ,(Resistencia Macrólidos Quinolonas Mycoplasma genitalium)
Protocolo, Versión: 1.0
HIP, Versión:
CI, Versión:

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en Granada a 30/10/2019

D/D^a. CRISTINA LUCIA DAVILA FAJARDO, como Secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada



Código Seguro De Verificación:	61f0dcad1929ada85ecde4a143b9b61f166ae65c	Fecha	30/10/2019	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Cristina Lucia Davila Fajardo			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.i?face/code/61f0dcad1929ada85ecde4a143b9b61f166ae65c	Página	1/3	

