

APLICACIÓN DE KITS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIAS EN *MYCOPLASMA GENITALIUM* Y *NEISSERIA GONORRHOEA* Y DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES VAGINALES

GARCÍA GARCÍA, PATRICIA; MARQUÉS, ANA M.^a

Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Universidad de Barcelona
Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona

Abstract

Sexually transmitted diseases (STDs) are prevalent among the population and widely distributed, without a defined profile, and the appearance of resistances make it difficult to treat these pathologies. In relation, three research projects were carried out at the Sexually Transmitted Infections (STIs) Unit of the Microbiological Department at Vall d'Hebron University Hospital. The first two projects dealt with *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) and *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), and their resistance to azithromycin and ciprofloxacin, respectively. The third project looked into an alternative to the diagnostic process for vaginal infections. The method consisted of using three new kits that could be implemented within the hospital routine.

Keywords: STDs, *Mycoplasma genitalium*, azithromycin, *Neisseria gonorrhoeae*, ciprofloxacin, vaginal infections.

Resumen

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son muy prevalentes entre la población, de amplia distribución y sin perfil definido, y su tratamiento está dificultado por la aparición de resistencias. Con relación a este hecho, se elaboraron tres proyectos de investigación en la Unidad de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) del Servicio de Microbiología del Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus. Los dos primeros trataron sobre *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) y *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) y sus resistencias a los antibióticos azitromicina y ciprofloxacina, respectivamente. El tercero, sobre una alternativa al diagnóstico para infecciones vaginales. El método usado consistió en la aplicación de tres nuevos kits que se podrían implementar en la rutina del hospital.

Palabras clave: ETS, *Mycoplasma genitalium*, azitromicina, *Neisseria gonorrhoeae*, ciprofloxacina, infecciones vaginales.

Resum

Les malalties de transmissió sexual (ETS) són molt prevalents entre la població, de distribució àmplia i sense perfil definit, i el seu tractament està dificultat per l'aparició de resistències. Amb relació a aquest fet, es van elaborar tres projectes de recerca a la Unitat d'Infeccions de Transmissió Sexual (ITS) del Servei de Microbiologia del Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus. Els dos primers van tractar sobre *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) i *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) i les seves resistències als antibiòtics azitromicina i ciprofloxacina, respectivament. El tercer, sobre una alternativa al diagnòstic per a infeccions vaginals. El mètode utilitzat va consistir en l'aplicació de tres nous kits que es podrien implementar a la rutina de l'hospital.

Paraules clau: ETS, *Mycoplasma genitalium*, azitromicina, *Neisseria gonorrhoeae*, ciprofloxacina, infeccions vaginals

1. Introducción

1.1. Contextualización

Las ETS son enfermedades que afectan a la población sexualmente activa sin perfil específico. Clásicamente el diagnóstico de estas enfermedades era manual y complejo, ya que los microorganismos patógenos son muy exigentes; debía ser interpretado por los profesionales del laboratorio y tardaba varios días. Actualmente, con la introducción de la PCR, el proceso es más rápido y menos laborioso. En referencia al tratamiento, la aparición de resistencias está dificultando tratar estas patologías una vez diagnosticadas.

En este artículo se resumen los resultados de tres proyectos de investigación relacionados con la detección de resistencias de diversas especies de microorganismos capaces de producir ETS. Los resultados de los tres proyectos se exponen conjuntamente en cada apartado.

El primer proyecto trata sobre la identificación de *M. genitalium* y su resistencia al antibiótico azitromicina, a través de la utilización del kit comercial de PCR MG & AziR Assay. Este trabajo técnico fue realizado personalmente por mí (bajo supervisión) dada mi titulación (técnica de laboratorio) y vinculación profesional con el Laboratorio de Microbiología de Vall d'Hebron. Se utilizaron las instalaciones y los instrumentos de la sección de ITS de dicho centro.

El segundo proyecto trata sobre la identificación de *N. gonorrhoeae* y su resistencia al antibiótico ciprofloxacino, a través de la utilización del kit comercial de PCR ResistancePlus® GC. Este trabajo lo elaboré junto a una residente de Microbiología de cuarto año. Se utilizaron las instalaciones y los instrumentos de la sección de ITS de Vall d'Hebron.

El tercer proyecto trata sobre testar un nuevo kit de PCR llamado Vaginitis Screening Assay, utilizado en el diagnóstico rápido de las infecciones vaginales (*vaginitis* en inglés). Se planteó que, si los resultados obtenidos fueran similares o mejores a los del diagnóstico manual que se está empleando en el laboratorio, se propondría su implantación en la rutina habitual de diagnóstico de infecciones vaginales en el Hospital Vall d'Hebron. Este trabajo fue supervisado por la facultativa del servicio de Microbiología. Se utilizaron las instalaciones y los instrumentos de la sección de ITS de dicho centro.

Con el fin de dar un contexto común a todos los proyectos se presentará una parte teórica sobre qué son las ETS, cuáles son los microorganismos que las producen, su epidemiología, diagnóstico, tratamiento habitual y la aparición de resistencias para estas bacterias. Luego se procederá a explicar los resultados de los proyectos, sus discusiones y sus conclusiones.

1.2. Marco teórico

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las enfermedades de transmisión sexual, ETS o enfermedades venéreas, como enfermedades causadas por diferentes microorganismos tales como bacterias, virus y parásitos, contagiadas de persona a persona mediante un contacto sexual, aunque existen otros métodos de contacto como el transplacentario o durante el parto (Organización Mundial de la Salud —OMS—, 2019).

Todas estas patologías son problemas actuales que requieren soluciones a largo plazo. La OMS se plantea en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible afrontar el problema que suponen estas enfermedades a través de medidas específicas. Una de ellas es hacer énfasis en el enfoque de tres ETS que requieren acciones inmediatas y pueden monitorizarse: la gonorrea (*N. gonorrhoeae*), la sífilis (*Treponema pallidum* subesp. *pallidum*) y el papiloma genital (virus del papiloma humano) (OMS, 2016).

1.2.1. Microorganismos causantes de ETS

Existen más de treinta patógenos que pueden causar ETS. Algunas de ellas son tratables y curables como la sífilis, la gonorrea, la clamidiasis y la tricomoniasis. Otras, causadas por virus, como hepatitis B, herpes, VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y VPH (virus del papiloma humano), son incurables, pero pueden mitigarse o atenuarse mediante antivirales (OMS, 2019).

TABLA 1. CUADRO RESUMEN DE LAS PRINCIPALES ETS. TRADUCCIÓN Y ADAPTACIONES PROPIAS. INFORMACIÓN EXTRAÍDA DE CARMONA Y VIVES (2018) Y HOSPITAL VALL D'HEBRON (2018). LA TASA DE INCIDENCIA CORRESPONDE A LOS AÑOS 2016-2018 Y SE EXPRESA EN CASOS POR 100.000 HABITANTES.

	Principal síntoma	Complicaciones	Tratamiento	Prevención	Tasa de Incidencia Cataluña (2016-2018)
Sífilis	Llagas genitales y erupciones cutáneas	Neurosífilis o sífilis congénita	Antibióticos: Penicilina	Preservativos	23,3
Clamidia	Asintomático	Infertilidad	Antibióticos: Doxiciclina	Preservativos	93,5
Hepatitis B	Dolor abdominal e ictericia	Cáncer	Antivirales	Preservativos, vacuna y no compartir jeringas	0,9
Herpes	Llagas genitales	Recidivas	Antivirales: Valaciclovir	Preservativos	15,5
VIH	Síndrome pseudogripal e inmunodeficiencias	Sida	Antirretrovirales	Preservativos	8,2
VPH	Asintomático o verrugas genitales	Cáncer	No hay tratamiento para este virus	Preservativos y vacuna	7,2

A continuación, se presentan datos sobre diferentes ETS, a excepción de *N. gonorrhoeae* y *M. genitalium*, el síntoma principal que causan, sus complicaciones, tratamiento, prevención y tasa de incidencia en Cataluña para los años 2016-2018 (tabla 1)

Este trabajo se centra en dos agentes causantes de las ETS: *Mycoplasma genitalium* y la *Neisseria gonorrhoeae*. También se hablará de diversos microorganismos causantes de infecciones vaginales con más detalle.

1.2.1.1. *M. genitalium*

M. genitalium es una bacteria del género *Mycoplasma*. Los micoplasmas son microorganismos considerados filogenéticamente como grampositivos a pesar de no poseer pared celular y de teñirse ligeramente con el colorante cristal violeta (Piñeiro *et al.*, 2019) 2014-2017. *M. genitalium* es una bacteria pequeña y pleomórfica, muy difícil de cultivar *in vitro* por sus características. Son microorganismos cuyo crecimiento no se inhibe con el uso de antibióticos como las penicilinas o la vancomicina porque carecen de pared celular (Madigan *et al.*, 2009).

M. genitalium es el causante de entre el 10 y 35% de las uretritis no gonocócicas en hombres. En mujeres, causa cervicitis y enfermedad pélvica inflamatoria (EPI). La infección suele ser asintomática, pero puede cursar con alteraciones del flujo vaginal, disuria, uretritis, endometritis o síntomas de EPI en mujeres. En el caso de hombres cursa con uretritis y disuria (Jensen *et al.*, 2016).

1.2.1.2. *N. gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae o gonococo es el causante de la gonorrea. Es un diplococo gramnegativo no esporulado y aerobio estricto. No suele sobrevivir fuera de las mucosas genitourinarias y, debido a su sensibilidad a las condiciones ambientales, únicamente se transmite por contacto directo íntimo entre personas (Madigan *et al.*, 2009; Hill, Masters y Wachter, 2016).

Los síntomas de la gonorrea varían entre hombres y mujeres. En mujeres, el lugar primario de infección es el endocervix, produciendo un exudado purulento leve difícil de diferenciar de otras infecciones bacterianas, por lo que puede pasar desapercibida. En caso de que no se trate, puede acabar en EPI y causar esterilidad. En el hombre puede causar una uretritis dolorosa (Madigan *et al.*, 2009).

Si esta patología no se trata, puede generar daño en las válvulas cardíacas y articulaciones por acumulación de inmunocomplejos (Madigan *et al.*, 2009; Hill, Masters y Wachter, 2016).

En neonatos puede causar infecciones oculares. Los niños de madres infectadas pueden contraer el microorganismo en el momento del parto y para evitarlo se suele utilizar, como profiláctico, pomadas de eritromicina (Madigan *et al.*, 2009).

1.2.1.3. Infecciones vaginales

Las infecciones vaginales son una patología que afecta con frecuencia a las mujeres. Suele ir asociadas a inflamación de la vagina. La vagina tiene una biota normal formada mayoritariamente por *Lactobacillus* y, cuando estos disminuyen, otros microorganismos crecen y aparece la infección (Gaydos *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2019).

Como microorganismos que pueden generar infección encontramos *Candida albicans* y *Trichomonas vaginalis*. Otra causa común de infección es la vaginosis bacteriana (Schwebke *et al.*, 2018). La vaginosis bacteriana es una infección bacteriana causada por un sobrecrecimiento de microorganismos de la microbiota, sobre todo de *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*) (Roselletti *et al.*, 2020).

C. albicans es una levadura que forma parte de la microbiota de la vagina pero, cuando hay un sobrecrecimiento de este microorganismo, genera malestar, incremento del flujo vaginal y prurito (Madigan *et al.*, 2009).

T. vaginalis es un protozoo que se transmite por contacto sexual, pero sobreviven poco tiempo en superficies, en orina y semen. Esto hace que en ocasiones se pueda contagiar en aseos, saunas o por papel higiénico (Madigan *et al.*, 2009).

Estas infecciones afectan a la vagina en mujeres; en hombres puede afectar a la próstata y la vesícula seminal, y, en ambos, a la uretra (Madigan *et al.*, 2009).

1.2.2. Epidemiología

Los datos de la OMS indican que más de un millón de casos de ETS se contagian a diario. En el informe de la OMS de 2016 se informaba de 127 millones de casos de clamidia, 87 millones de casos de gonorrea, 6,3 millones de casos de sífilis y 156 millones de casos de tricomoniasis (OMS, 2018). Se muestra a continuación la distribución de una aproximación de los casos de ETS curables (gonorrea, sífilis, clamidia y tricomoniasis) alrededor del mundo, según la OMS (figura 1):

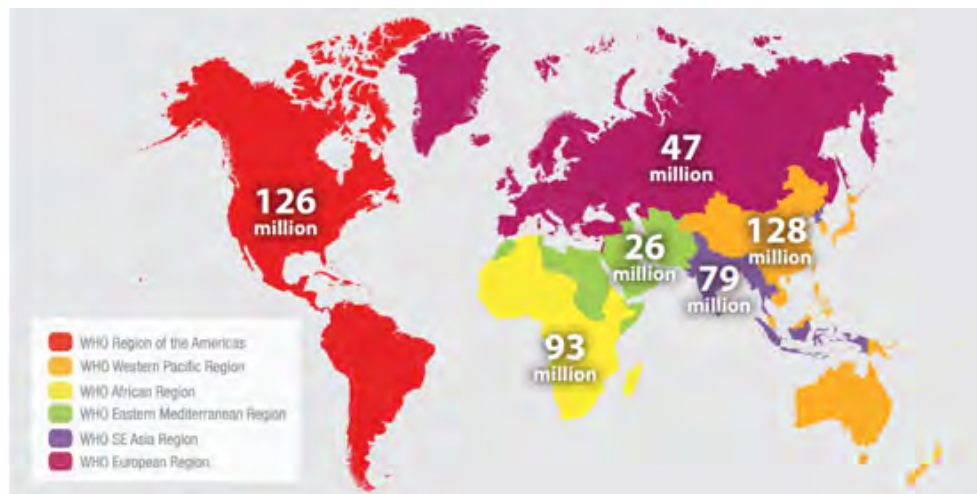


Figura 1. Aproximación de los casos de ETS curables alrededor del mundo según la OMS (2016).

No existe un grupo de riesgo específico para las ETS, ya que cualquier persona que tenga una relación sexual sin protección física (preservativo) puede ser considerada de riesgo (OMS, 2018).

Según los datos del Departament de Salut, en 2017 se notificaron en Cataluña 3.332 casos de gonorrea, 82% hombres y 18% mujeres. También se notificaron 1.015 casos de *T. vaginalis*, donde el 96% de los casos eran de mujeres y el 4% restantes, de hombres (Carmona y Vives, 2018).

1.2.3. Diagnóstico habitual

Las ETS se han diagnosticado clásicamente mediante métodos como el diagnóstico clínico o de laboratorio. El clínico, basándose exclusivamente en la sintomatología, y el de laboratorio, buscando los microorganismos causantes de las ETS (Madigan *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, el trabajo de laboratorio ha consistido en hacer crecer y aislar los microorganismos en placas de cultivo con medios generales (Agar Sangre) o bien en medios específicos (Thayer Martin) y su posterior identificación mediante pruebas y tinciones específicas (Madigan *et al.*, 2009). Esta técnica sigue siendo la prueba de referencia (gold standard) con la que se comparan otras técnicas diagnósticas más rápidas y modernas.

En la actualidad el diagnóstico habitual se hace mediante el test de la polimerasa en cadena de ácidos nucleicos (PCR múltiplex, polymerase chain reaction). La PCR se basa en la amplificación de regiones específicas de ADN de los microorganismos. En estos casos, se utiliza una ADN polimerasa, primers de oligonucleótidos, dNTP, cloruro de magnesio, tampón y el ADN específico. La PCR tiene tres fases consecutivas: desnaturalización, hibridación y elongación (Loeffelholz y Dong, 2018).

1.2.4. Tratamiento actual

La prevención para todas las ETS consiste en el uso de barreras físicas tales como preservativos para evitar el contacto directo entre personas durante las relaciones. El tratamiento de las ETS se hace mediante la utilización de antibióticos en función del microorganismo causante (OMS, 2016).

Otro método que puede ser útil en la prevención de ciertas ETS son las vacunas. Existen vacunas para algunas de estas enfermedades causadas por virus como es el caso de la hepatitis B y PVH. Estos métodos de protección no solo son útiles para evitar la infección, sino que ayudan a prevenir la aparición de complicaciones tales como el cáncer (OMS, 2016).

Frente a *M. genitalium*, el tratamiento de primera elección es el antibiótico macrólido azitromicina (Björnelius, Magnusson y Jensen, 2017; Piñeiro *et al.*, 2019). En el caso de la aparición de resistencias a este antibiótico, el tratamiento es moxifloxacino (Gilbert *et al.*, 2019). En la actualidad se observa un aumento creciente de resistencias al tratamiento y, en estos casos, no se dispone de una alternativa terapéutica eficaz (Gilbert *et al.*, 2019).

En casos de infección por *N. gonorrhoeae*, el tratamiento más utilizado es el antibiótico ceftriaxona. En caso de la aparición de resistencias a este antibiótico, el tratamiento alternativo es la azitromicina. En la actualidad el ciprofloxacino ha dejado de usarse por la rápida aparición de resistencias que ocasiona (Dong y Klausner, 2019; Ellis *et al.*, 2019; Gilbert *et al.*, 2019; De Korne-Elenbaas *et al.*, 2020).

En conjunto, entre las familias de fármacos resistentes a *N. gonorrhoeae* encontramos: tetracinas, macrólidos, quinolonas y cefalosporinas (Unemo y Shafer, 2014).

Cuando el diagnóstico clínico es de infección vaginal es preciso tratar el microorganismo causante. En las candidiasis el tratamiento puede variar entre los antifúngicos fluconazol o itraconazol y en caso de aparición de resistencias el antifúngico que se utiliza es el clotrimazol. En las tricomoniasis el tratamiento de elección es el antibiótico metronidazol. En el caso de tener vaginosis bacteriana, el tratamiento que se utiliza es el antibiótico metronidazol y, en el caso de aparición de resistencias, la alternativa es el antibiótico clindamicina (Gilbert *et al.*, 2019).

1.2.5. Resistencias

Las ETS son enfermedades que tienen un tratamiento accesible mediante antibióticos, pero, a causa del mal uso o uso excesivo de estos medicamentos, están apareciendo resistencias a los tratamientos habituales. Las resistencias aparecen debido a mutaciones que producen genes de resistencia o a la adquisición de estos a través de plásmidos. Las resistencias suelen ser debidas a que la bacteria genera enzimas que destruyen los antibióticos haciendo que no hagan efecto (Tenover y McGowan, 2008).

Según datos obtenidos por el Hospital Vall d'Hebron, en el 36% de casos de infección de *M. genitalium*, este es resistente a la azitromicina (Catalunya, 2019). Las resistencias a los antibióticos implican un problema de salud importante puesto que dificultan el control de las enfermedades, de forma individual y poblacional (Catalunya, 2019).

La azitromicina, fármaco ampliamente usado para tratar *M. genitalium*, forma parte de la familia de los macrólidos. El mecanismo de acción consiste en una actuación sobre la parte 50S del ribosoma, bloqueando la síntesis de proteínas. Esta resistencia se conoce desde hace tiempo, pero aun así se sigue utilizando este antibiótico ampliamente. La resistencia que se ha notificado respecto a este medicamento se debe a una mutación, a un polimorfismo, en el gen 23S del ARN ribosomal incluido en la subunidad 50S (Bradshaw, Jensen y Waites, 2017).

Se calcula que, actualmente, el 40% de cepas de *M. genitalium* son resistentes a azitromicina (Braam *et al.*, 2017; Nye *et al.*, 2020). Esto se debe a cambios en un solo nucleótido del gen 23S. Las mutaciones reciben diversos nombres: A2058G, A2058C, A2058T, A2059G, A2059C y A2059T. De entre estos, el A2059G es el más prevalente, seguido de A2058G (Braam *et al.*, 2018; Nye *et al.*, 2020). El hecho de que sea una mutación simple, producida por un cambio de nucleótido, puede explicar que la resistencia a azitromicina sea tan habitual (Braam *et al.*, 2017).

En el caso de *N. gonorrhoeae*, uno de los tratamientos utilizados es el ciprofloxacino. Este antibiótico forma parte de la familia de las fluoroquinolonas y el mecanismo de acción consiste en bloquear la enzima ADN girasa, bloqueando la síntesis de ADN y evitando el superenrollamiento de este. A altas concentraciones, pueden bloquear la topoisomerasa II, que es análoga al ADN (Murray *et al.*, 2017). La resistencia que se ha notificado con respecto a este antibiótico se debe a una mutación en el codón 91 del gen *gyrA* (Melendez *et al.*, 2019). Para el tratamiento habitual de la *N. gonorrhoeae*, la ceftriaxona, la tasa de resistencia se mantiene baja, en un 0,7%; el de la azitromicina es de un 5,8%, y el ciprofloxacino, que se usaba anteriormente, se ha dejado de utilizar a causa de las resistencias. Su

uso es exclusivo para casos en los que se sabe con certeza que no hay mutación, ya sea con antibiograma o con un test de PCR (Catalunya, 2019).

2. Objetivo del trabajo

Debido a que este trabajo engloba tres proyectos distintos, con objetivos similares, se diferenciarán los objetivos para cada uno de los proyectos.

Resistencias de *Mycoplasma* y *Neisseria*

- Evaluar un kit de detección de *M. genitalium* y *N. gonorrhoeae* y mutaciones asociadas a resistencias a azitromicina y ciprofloxacino.

Diagnóstico de infecciones vaginales:

- Comparar el funcionamiento de un nuevo kit de diagnóstico de infecciones vaginales para evaluar si puede ser una alternativa al diagnóstico de rutina actual.

Existen objetivos comunes para todos los proyectos elaborados:

- Integrar conocimientos de diferentes ámbitos de farmacia: microbiología, farmacología y salud pública.
- Profundizar en los conocimientos sobre diferentes microorganismos causantes de ETS.
- Estudiar la aparición de las resistencias a los antibióticos y cómo funcionan.
- Aprender cómo realizar correctamente el trabajo de investigación en el laboratorio.

3. Material y métodos

3.1. Resistencia en *Mycoplasma genitalium* a azitromicina

Muestras estudiadas. Para realizar este estudio se estudiaron 100 muestras confirmadas positivas para *M. genitalium* según la PCR de detección de enfermedades de transmisión sexual usada en el Hospital Vall d'Hebron. Estas muestras fueron recogidas y congeladas para su conservación. Las muestras eran variadas: exudados rectales, uretrales, endocervicales, vaginales, faringoamigdalares y muestras de orina. De todas las muestras se hizo la extracción de ADN para el posterior testaje del kit.

Las muestras se recogieron mayoritariamente de Atención Primaria, también de diferentes hospitales o dispositivos de atención como el Centre de Drassanes, con el servicio del Check Point (prueba gratuita dirigida a las personas que lo pidan para control de las enfermedades de transmisión sexual con muestras de exudados rectales), consultas externas del Hospital Vall d'Hebron y Atención Primaria (de diferentes Centros de Urgencia de Atención Primaria, CUAP). Las diferentes muestras estudiadas según su centro de recogida se muestran en la figura 2:

Método de detección de resistencia. Para la detección de las resistencias de *Mycoplasma genitalium*, se utilizó un nuevo test de PCR múltiple a tiempo real llamado MG & AziR Assay (Allplex™).

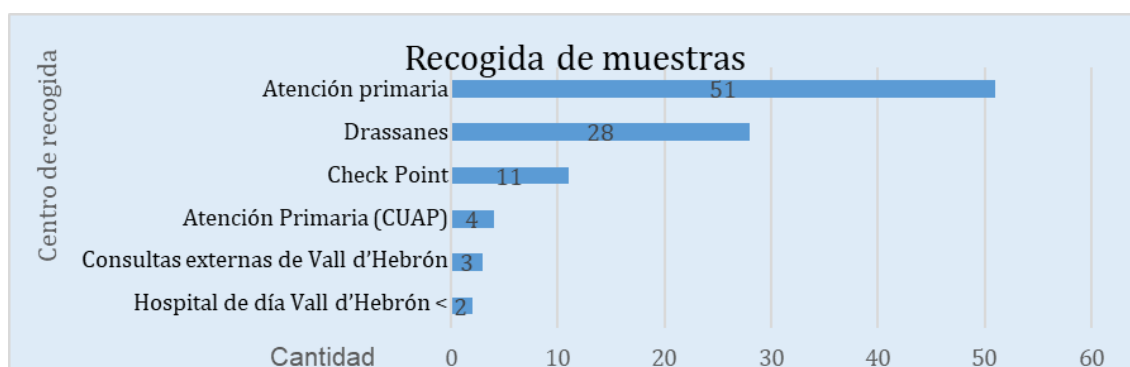


Figura 2. Origen de las muestras obtenidas para *M. genitalium* divididas por centro.

El ensayo se basa en la detección de *M. genitalium* y de sus mutaciones A2058G, A2058C, A2058T, A2059G, A2059C y A2059T en el gen 23S ARNr, responsable de la resistencia al tratamiento con antibiótico azitromicina. El test detectó la presencia de *M. genitalium* y la presencia del gen 23S mutado, e implica resistencia (Seegene Inc, 2019a).

La cantidad de Mastermix elaborada es directamente proporcional al número de muestras que se prueben a la vez, siendo necesarios 15 µl de Mastermix para 1 muestra. Una vez elaborada la Mastermix, los 15 µl se reparten en pocillos y se añaden 5 µl de muestra de ADN para obtener un volumen final de 20 µl/pocillo. Es importante que no queden burbujas por posibles interferencias que generan resultados anómalos (Seegene Inc, 2019a).

Los pocillos se introducen en un termociclador, donde pasan por las fases de desnaturalización, hibridación y elongación durante 30 ciclos y se obtienen los resultados. Para detectar los resultados, la prueba utiliza 4 fluoróforos que revelan las diferentes mutaciones.

Con estos resultados obtenemos un valor de Ct cualitativo. Un Ct o umbral de ciclo es el corte de la curva de amplificación sobre la línea del umbral en la interpretación de los resultados de la PCR (Loeffelholz y Dong, 2018). Se representa gráficamente un valor de Ct de ejemplo en la figura 3. En este caso encontramos que:

- $Ct \leq 45$ implica mutación detectada y resistencia a la azitromicina.
- $Ct \geq 45$ implica mutación no detectada y, por tanto, no resistente a azitromicina.

A partir de los valores de Ct se determinó cuántas muestras de las recogidas eran resistentes a azitromicina y se evaluó la eficacia del test comparando los resultados obtenidos con la base de respuestas correctas.

Para la recogida de datos se ha utilizado un Excel y para el análisis, el programa SPSS.

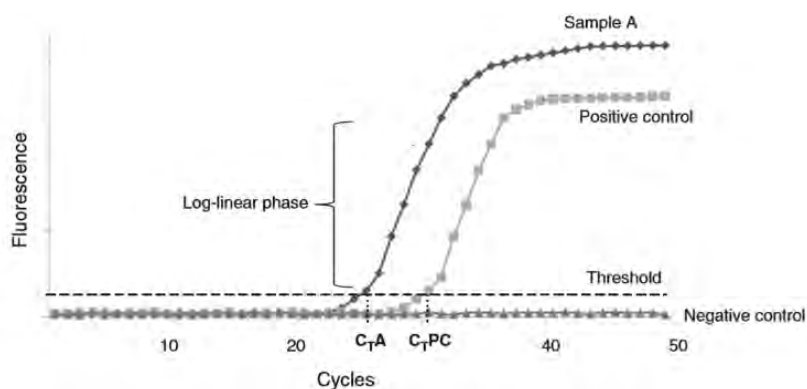


Figura 3. Ejemplo de PCR con el valor de Ct indicado (Loeffelholz y Dong, 2018).

3.2. Resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* a ciprofloxacino

Muestras estudiadas. Para realizar este trabajo se estudiaron 275 muestras de ADN confirmadas positivas para *N. gonorrhoeae* según la PCR de detección de enfermedades de transmisión sexual usada en el Hospital Vall d'Hebron. Además, se había hecho un antibiograma para detectar la resistencia a azitromicina a todas las muestras menos a 23. Las muestras se obtuvieron de varias fuentes:

- 100 muestras correspondían a muestras directas del banco de muestras de Vall d'Hebron.
- 175 correspondían a cepas guardadas en el departamento de investigación de Vall d'Hebron que provienen de diferentes hospitales.

Las muestras originales eran muy variadas: muestras de orina de hombres y mujeres e hisopos rectales, endocervicales, vaginales, uretrales, faríngeos y oculares, tanto de pacientes sintomáticos como asintomáticos.

Método de detección de resistencia. Para la detección de la resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* se utilizó un nuevo test de PCR múltiple a tiempo real llamado ResistancePlus® GC (Speedx) (Speedx / ResistancePlus® GC, 2019).

Este ensayo se basa en la detección de *N. gonorrhoeae* y sus diferentes marcadores: *gyrA* S91 natural y sensible a ciprofloxacina o *gyrA* S91F mutante y resistente a este antibiótico (Speedx / ResistancePlus® GC, 2019).

La cantidad de Mastermix elaborada es directamente proporcional al número de muestras que se prueben a la vez, siendo necesarios 15 µl de Mastermix para 1 muestra. Una vez elaborada la Mastermix, los 15 µl se reparten en pocillos y se añaden 5 µl de muestra de ADN para obtener un volumen final de 20 µl/pocillo. Es importante que no queden burbujas por posibles interferencias que darían resultados anómalos (Speedx / ResistancePlus® GC, 2019).

Los pocillos se introducen en un termociclador, pasan por las fases de desnaturalización, hibridación y elongación durante 30 ciclos y se obtienen los resultados. Para detectar los resultados, el test utiliza 5 dianas terapéuticas: gen GC *opa*, gen GC *porA*, gen *gyrA* S91 (tipo natural), *gyrA* S91F (mutante) y control interno. La detección se hace mediante el LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II, Roche) (Speedx / ResistancePlus® GC, 2019).

Para la interpretación de los resultados es necesario un software de análisis. Este automatiza la interpretación de los resultados de la amplificación y optimiza el flujo de trabajo.

Una vez obtenidos los resultados se identificaron las muestras resistentes y se comprobó la eficacia del kit probado con respecto a los antibiogramas hechos previamente a las muestras originales.

3.3. Diagnóstico de infecciones vaginales

Para el diagnóstico de infecciones vaginales se ha utilizado un nuevo kit de Allplex™ basado en la PCR múltiple a tiempo real llamado Vaginitis Screening Assay, que permite hacer el diagnóstico en menos de 4 horas (Seegene Inc, 2019b). Este kit se probó para poder implantarlo en un futuro en la rutina diaria para dar un diagnóstico mucho más rápido.

Muestras estudiadas. Para probar este kit, se recogieron 100 muestras de exudados vaginales, sobre las que se había realizado un diagnóstico etiológico de forma manual en el hospital. Se realizó la extracción de ADN, se pasó el kit y se compararon los resultados con los obtenidos en el hospital.

El diagnóstico manual consiste en hacer crecer los microorganismos en medios de cultivo, a los que se someten a diferentes pruebas como la tinción de gram para su identificación.

Método de detección. El kit permite la detección de diferentes microorganismos, tanto de la biota normal como patógenos. El kit, con un algoritmo interno, interpreta los resultados finales en función del patógeno detectado y la cantidad de *Lactobacillus spp.* Detecta los siguientes microor-

ganismos: *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus spp*, *Candida albicans*, *Candida others* y *Trichomonas vaginalis* (Seegene Inc, 2019b).

La cantidad de Mastermix elaborada es directamente proporcional al número de muestras que se prueben a la vez, siendo necesarios 15 µl de Mastermix para 1 muestra. Una vez elaborada la Mastermix, los 15 µl se reparten en pocillos y se añaden 5 µl de muestra de ADN para obtener un volumen final de 20 µl/pocillo. Es importante que no queden burbujas por posibles interferencias que darían resultados anómalos (Seegene Inc, 2019b).

Los pocillos se introducen en un termociclador, pasan por las fases de desnaturalización, hibridación y elongación durante 30 ciclos y se obtienen los resultados. Para detectar los resultados, el test utiliza 4 fluoróforos que revelan las diferentes mutaciones.

Como resultados obtenemos un valor de Ct cualitativo o bien un valor de Qt cuantitativo. La obtención de un valor de Ct o Qt depende del tipo de microorganismo que se detecta; para *Candida albicans*, *Candida others*, *Trichomonas vaginalis*, *Mobiluncus spp* y control interno se obtiene un valor de Ct, del resto se obtiene un valor de Qt (Seegene Inc, 2019b). Hay que tener en cuenta que:

- $Ct \leq 40$ implica microorganismo detectado.
- $Ct \geq 40$ implica microorganismo no detectado.
- $Qt > 0$ implica microorganismo detectado.
- $Qt < 0$ implica microorganismo no detectado.

Como análisis estadístico se ha utilizado un Excel para recoger todos los resultados y poder clasificarlos en función de la detección de los microorganismos.

Una vez obtenidos, se compararon los resultados del kit con los resultados manuales para infecciones vaginales elaborados en Vall d'Hebron.

4. Resultados

4.1. Resistencia en *Mycoplasma genitalium* a azitromicina

Las muestras estudiadas eran de 100 pacientes con un diagnóstico positivo de *M. genitalium* según el test de detección de ETS de Vall d'Hebron.

De las 100 muestras positivas que fueron analizadas con el kit testado, este solo detectó la presencia de *M. genitalium* en 60 de ellas. En los 40 restantes, el kit no fue capaz de detectar la presencia del microorganismo. Esta discrepancia fue debida a un error humano en el procedimiento de recogida de las muestras positivas de *M. genitalium* y en su conservación. En consecuencia, en los resultados para la detección de mutación solamente se tuvieron en cuenta las 60 muestras positivas. Los resultados para la presencia de *M. genitalium* según el kit se presentan seguidamente (figura 4):

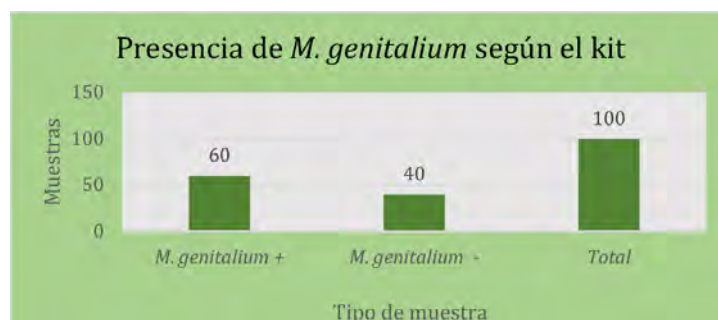


Figura 4. Resultados de detección de *M. genitalium* según el kit MG & AziR Assay, divididos en función de la presencia del microorganismo.

A continuación, se buscaron resistencias en las 60 muestras positivas para el nuevo kit. Para ello, se buscó si presentaban alguna mutación en el gen 23S, que proporciona resistencia frente a la azitromicina: 31 muestras no presentaron mutación y 29 muestras presentaron diferentes mutaciones en el gen, lo que supone un 48,33% de muestras resistentes. Los resultados de la detección de resistencia de *M. genitalium* se presentan a continuación (figura 5):

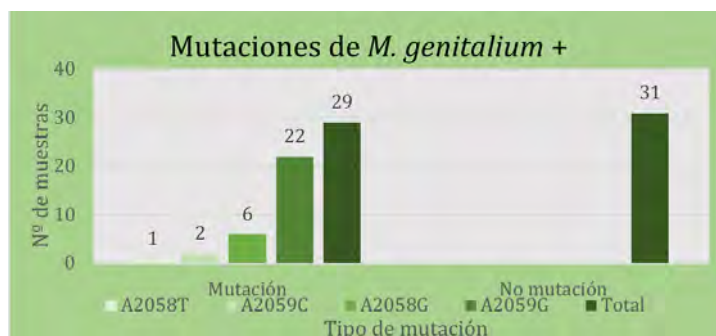


Figura 5. Resultados de la presencia de mutación para las muestras positivas de *M. genitalium* y distribución del tipo de mutación en caso de que la presente.

4.2. Resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* a ciprofloxacino

Del total de 275 muestras analizadas, en 100 de ellas se extrajo ADN directamente de la muestra de exudado y en 175 se extrajo ADN de diferentes cepas. Con el programa de interpretación se obtuvieron los siguientes resultados:

Dentro de las 275 muestras confirmadas positivas para *N. gonorrhoeae* según el departamento de ITS de Vall d'Hebron, se detectaron con el kit testado 267 muestras positivas para *N. gonorrhoeae*. En las 8 muestras restantes no se detectó el microorganismo. Se repitió la interpretación de las muestras negativas con el kit y dieron el mismo resultado, confirmando que no eran *N. gonorrhoeae*, por lo que se excluyeron del estudio. Estos resultados negativos pueden ser debidos a un error humano en la recogida de muestras o a una diferencia de sensibilidad entre el kit y el método de diagnóstico estándar. Los resultados de la identificación de *N. gonorrhoeae* se muestran a continuación (figura 6):



Figura 6. Resultados de la presencia de *N. gonorrhoeae* según el kit para las 275 muestras positivas de *N. gonorrhoeae* según el departamento de ITS de Vall d'Hebron.

En el caso de las 267 muestras positivas para *N. gonorrhoeae* según el kit se determinó la resistencia a ciprofloxacino buscando mutaciones en el gen *gyrA*. En 144 muestras el kit detectó la muta-

ción y, por tanto, son resistentes a ciprofloxacino; en 123 muestras el kit no detectó la mutación y, por tanto, no son resistentes a ciprofloxacino. Los resultados para la presencia de mutaciones de *N. gonorrhoeae* se muestran a continuación (figura 7):

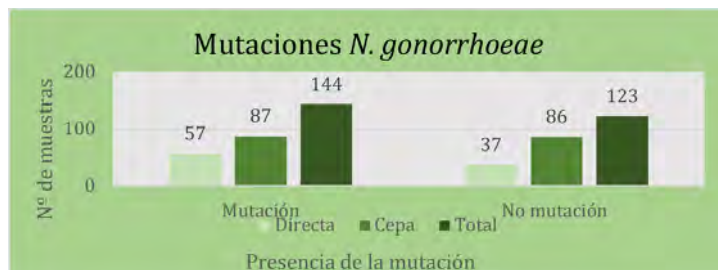


Figura 7. Resultado de la presencia de mutación en el gen *gyrA* de las 267 muestras confirmadas positivas para *N. gonorrhoeae* en función de si aparece o no la mutación y si se obtienen directamente o de cepas.

En las 275 muestras iniciales se realizó un antibiograma para determinar manualmente la resistencia a ciprofloxacino y poder compararla con los resultados del kit. Del total, 140 muestras presentaron resistencia a ciprofloxacino según el antibiograma, 112 no la presentaron y en 23 muestras este antibiograma no se realizó, por tanto, no se pudieron comparar. A las 275 muestras se les pasó el kit y se compararon con las muestras a las que se hizo el antibiograma. Se detectó una buena correlación entre los resultados del antibiograma y el kit, ya que se detectaron resultados similares. Para las muestras a las que se realizó el antibiograma y el kit se obtuvieron los siguientes resultados (figura 8):



Figura 8. Resultados de la comparación de 275 muestras a las que se les pasó el nuevo kit. Se han descartado las 23 muestras sin antibiograma.

4.3. Diagnóstico de infecciones vaginales

Para realizar este estudio se partió de 100 muestras de exudado vaginal que previamente habían sido analizadas en el laboratorio por personal especializado mediante las técnicas clásicas de cultivo. Tras el diagnóstico microbiológico manual (método estándar) se observó que: 39 muestras se diagnosticaron como vaginosis bacteriana, 15 muestras fueron positivas en el aislamiento de *C. albicans*, 5 muestras fueron positivas en el aislamiento de *Candida spp* y 5 muestras fueron positivas en el aislamiento de *T. vaginalis*; en 30 muestras se consideró que los microorganismos que se detectaron pertenecían a la microbiota normal y 6 muestras fueron consideradas como microbiota alterada (no presentaban biota normal, pero tampoco presentan microorganismos patógenos). Es decir, 36 muestras se dieron como negativas para patógenos y 64 como positivas. Todos los resultados se muestran a continuación (figura 9):

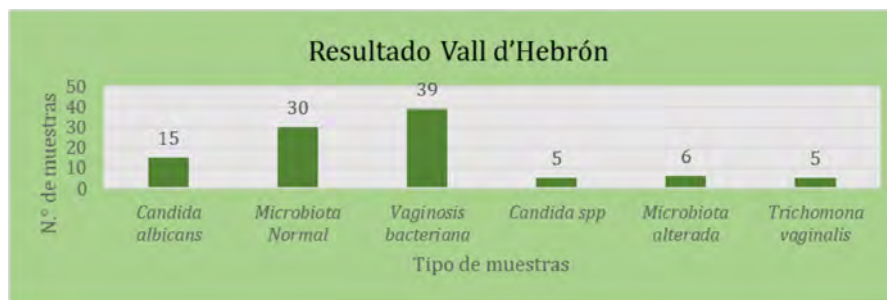


Figura 9. Resultados de las pruebas de diagnóstico manual elaboradas en Vall d'Hebron.

Una vez hecha la primera interpretación, el kit hace la clasificación final de la biota y, en caso de que esté alterada, del microorganismo que detecta. En esta clasificación final se obtuvieron los siguientes resultados para las 100 muestras: 35 como vaginosis bacteriana, 15 muestras se clasificaron como *C. albicans*, 5 como *Candida spp*, 5 como *T. vaginalis*, 37 como microbiota normal y 3 como microbiota alterada. Es decir, 60 muestras fueron consideradas positivas y 40 negativas. Estos resultados se expresan a continuación (figura 10).



Figura 10. Resultados de la clasificación final del kit para las posibles causas de infecciones vaginales, ya sea por el aislamiento de algún microorganismo causante o por vaginosis bacteriana.

Después de hacer la clasificación final para el kit, se compararon estos resultados de clasificación final con los resultados de Vall d'Hebron para comprobar la concordancia entre ambos y ver si el nuevo kit podía ser una alternativa viable en el diagnóstico. Es preciso comentar que la diferencia encontrada entre los resultados de microbiota normal, vaginosis bacteriana y microbiota alterada puede deberse a la dificultad del análisis de estas muestras y la subjetividad a la hora de interpretar un resultado de forma manual. Los resultados de la comparación entre los resultados de Vall d'Hebron y el kit se muestran a continuación (figura 11):



Figura 11. Comparación entre los resultados obtenidos en Vall d'Hebrón y el kit testado para evaluar la concordancia entre resultados. Las diferencias observadas entre microbiota normal, vaginosis bacteriana y microbiota alterada pueden deberse a diferencias subjetivas a la hora de interpretar el resultado o a un error humano en la recogida de muestras.

En la comparación, el porcentaje de correlación es de 89,7% para vaginosis bacteriana, 50% para microbiota alterada y 100% para *Candida spp*, *C. albicans* y *T. vaginalis*.

Como puede observarse se detecta un alto grado de concordancia diagnóstica entre el método diagnóstico clásico y el nuevo kit probado.

5. Discusión

Las ETS son un grupo de enfermedades muy prevalentes en la población activa que se tratan mediante el uso de diferentes antibióticos. El problema que se encuentra en la actualidad es la creciente aparición de las resistencias a los tratamientos actuales.

Por otra parte, las infecciones vaginales suelen ser una patología importante en las mujeres, pero actualmente su diagnóstico es manual y subjetivo.

Conocidos estos problemas, este estudio se ha realizado para conocer los niveles de resistencia a los antibióticos y mejorar el diagnóstico de las infecciones vaginales.

5.1. Resistencia en *Mycoplasma genitalium* a azitromicina

A partir de los resultados encontrados, después de eliminar las muestras negativas debidas a un error humano, se puede afirmar que este kit tiene una sensibilidad elevada para identificar la presencia de *M. genitalium* y detectar sus resistencias al antibiótico azitromicina.

En lo referente a la detección de *M. genitalium*, para estas muestras no se puede dar un veredicto concreto con seguridad debido a que se han obviado las muestras negativas por un error humano y de conservación, ya que el proceso de congelar y descongelar repetidamente puede desnaturalizar el ADN. Para las 60 muestras positivas, se puede considerar que el test detecta correctamente el microorganismo.

En lo referente a detectar mutaciones en el gen 23S, el kit demostró unos resultados similares a los estudios de Fernández-Huerta *et al.* (2020) en los que se detecta una frecuencia de mutaciones del 36,1% en Barcelona entre los años 2016-2017. En el estudio realizado, la frecuencia de aparición de mutaciones era del 48,33%, lo que supone una tasa mayor que los otros resultados.

Otros estudios como el de Piñeiro *et al.* (2019) y el de Braam *et al.* (2018) utilizan otras técnicas para determinar la resistencia a azitromicina y detectaron una frecuencia de mutaciones del 16,35% y del 21,6%, respectivamente. El kit, por tanto, detectó un mayor número de resistencias que estos estudios.

Esta diferencia con respecto a los resultados obtenidos puede deberse a que se ha eliminado una parte importante de las muestras por un error humano y se ha evaluado un tamaño de muestra más pequeño que la de los otros estudios.

En lo referente a las mutaciones del gen 23S, ambos estudios detectaron el cambio de nucleótido A2059G como la más frecuente, como se indica en la Figura 5, debido a ello se supone una alta correlación entre los resultados con respecto a las mutaciones; la identificación de mutaciones es independiente a la identificación del microorganismo, lo que puede explicar la alta correlación en estos resultados y la baja correlación en los resultados de identificación.

5.2. Resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* a ciprofloxacino

A partir de los resultados encontrados, se acepta que este kit es capaz de identificar correctamente la aparición de *N. gonorrhoeae* y sus resistencias al antibiótico ciprofloxacino.

En lo referente a la identificación de *N. gonorrhoeae*, el test se ha demostrado muy eficaz a la hora de identificar el microorganismo, como se muestra en la Figura 6, ya que prácticamente todas las muestras confirmadas positivas se detectaron como *N. gonorrhoeae* según el kit.

En lo referente a detectar mutaciones en el gen *gyrA*, el kit demostró una correlación muy buena con el antibiograma elaborado en Vall d'Hebron, como se muestra en la figura 8. A partir de las muestras comparadas se vio que los resultados del kit y del antibiograma eran muy similares, de manera que correlacionaban casi a la perfección.

Por tanto, se podría decir que el nuevo kit presenta una sensibilidad y especificidad similar a los antibiogramas con la ventaja de que el kit requiere de 4 horas y el antibiograma, de 48 horas, por lo que los resultados se tendrían antes y el tratamiento se adaptaría mejor.

Las técnicas de PCR son más costosas económicamente que los antibiogramas, pero la dificultad de realizarlas es menor gracias a los extractores de ADN, que realizan la PCR a la vez.

Los resultados de Ebeyan *et al.* (2020), que elaboraron un estudio similar a este y con el mismo kit de PCR, se correlacionan muy bien con los resultados obtenidos. La sensibilidad de detección de *N. gonorrhoeae* de los resultados consultados es del 99,04%, mientras que la sensibilidad de detección de *N. gonorrhoeae* para este estudio es del 97,09% (Ellis *et al.*, 2019).

Otros estudios, como el de de Korne-Elenbaas *et al.* (2020) y el de Ellis *et al.* (2019), utilizan otras técnicas para detectar la resistencia a ciprofloxacino y obtienen unos resultados de sensibilidad del microorganismo en un 98% y un 95%, respectivamente. Estos estudios permiten determinar que, con respecto a los resultados obtenidos, el kit detecta *N. gonorrhoeae* con una sensibilidad muy elevada.

En el primer y tercer estudios consultados también se compararon los datos de resistencias encontradas con una secuenciación de genotipo y fenotipo, de forma muy similar a los resultados obtenidos en este estudio y presentan una correlación muy alta entre resultados. Se evidencia que el kit obtiene resultados muy similares a los métodos de referencia en menos tiempo en ambos casos. El segundo resultado consultado es parecido: compara dos técnicas de PCR que presentan una correcta correlación entre sí y de forma similar con los resultados obtenidos en este estudio (Dong *et al.* 2019, loeffelholz and Dong, 2018; Ellis *et al.* 2019).

5.3. Diagnóstico de infecciones vaginales

A partir de los resultados encontrados, se acepta que este kit es capaz de realizar un diagnóstico correcto de infecciones vaginales y de sus posibles causas, ya sea un microorganismo o vaginosis bacteriana. Por tanto, se puede considerar una alternativa viable para el diagnóstico de rutina de Vall d'Hebron.

En lo referente a las causas de infección bacteriana, se ha determinado la vaginosis bacteriana como causa principal tanto para el diagnóstico de rutina como para el diagnóstico del kit, como se muestra en las figuras 9 y 10.

En lo referente a la interpretación de las infecciones bacterianas, se ha observado una correlación muy buena entre el diagnóstico de rutina de Vall d'Hebron y la clasificación final del kit, como se muestra en la figura 11, en la que se observa que el test de rutina y el kit concuerdan en los microorganismos causantes de las infecciones vaginales casi a la perfección. Se observa una discrepancia en los casos de biota normal y vaginosis, ya que el kit detectaba más microbiota normal que el método manual y menos vaginosis bacteriana.

Este cambio puede deberse a que el diagnóstico de estas infecciones vaginales es manual y subjetivo y a que el diagnóstico del kit es objetivo, por lo que da resultados más precisos. Por tanto, se podría decir que el nuevo kit funciona igual de bien que el diagnóstico de rutina manual, pero con la ventaja de que el kit requiere de 4 horas frente al diagnóstico manual, de 24-72 horas. Las técnicas de PCR son más costosas económicamente que los métodos manuales, pero la dificultad de realizarlas es menor gracias a la existencia de nuevos extractores de ADN, que hacen la PCR una vez realizada la extracción.

Los resultados de Lynch *et al.* (2019) y Schwebke *et al.* (2018), que utilizan diferentes kits de PCR para el diagnóstico de las infecciones vaginales y se comparan con métodos de referencia de forma similar a este estudio, se correlacionan muy bien con los resultados obtenidos. Las causas de infección vaginal en común para los tres estudios son la vaginosis bacteriana y *Candida spp.* La correlación entre método de referencia y PCR para vaginosis bacteriana en los estudios consultados es del 76.9% y 76% respectivamente, mientras que la correlación para vaginosis bacteriana en este estudio es del 89,74%. La correlación para *Candida spp.* en los estudios consultados es del 92,7% y 94% respectivamente, mientras que la correlación para *Candida spp.* en el estudio realizado es del 100%. En ambos casos, la correlación es mayor en el kit testado en estudio y los resultados se correlacionan muy bien, ya que son similares (Schwebke *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2019).

6. Conclusiones

- 1) En las ETS, debido a sus características clínicas y epidemiológicas, la accesibilidad a las técnicas de diagnóstico rápido por parte de la población es muy útil para poder resolver las consultas ágilmente e instaurar precozmente los tratamientos. Estos dos aspectos permiten controlar la diseminación de las enfermedades entre la población, siendo útil tanto para los pacientes como desde el punto de vista de Salud Pública.
- 2) Las resistencias a los antibióticos son un problema frecuente y muy importante para el tratamiento de diferentes ETS, por lo que poder discriminar su presencia en diferentes microorganismos tiene mucha utilidad para poder tratarlos adecuadamente.
- 3) Los dos test sobre detección de resistencias permiten realizar un diagnóstico rápido del microorganismo y son capaces de orientar sobre la aparición de resistencias antibióticas. En concreto, el kit de *N. gonorrhoeae* es fiable para ambas cosas. Por otro lado, el de *M. genitalium* es fiable para la detección de resistencias y, obviando el error humano, es fiable para la identificación del microorganismo.
- 4) El test de diagnóstico de las infecciones vaginales es una alternativa muy viable para la sustitución de la técnica manual que se está utilizando. Esto puede ser una mejora en el diagnóstico de esta patología, ya que en la actualidad el tiempo de detección es de 24-48 horas y con este kit se podría reducir a 4 horas.

7. Bibliografía

- BJÖRNELIUS, E., MAGNUSSON, C., JENSEN, J. S. (2017) «Mycoplasma genitalium macrolide resistance in Stockholm, Sweden». *Sexually Transmitted Infections*, 93(3), pp. 167-168. doi: 10.1136/sextrans-2016-052688.

- BRAAM, J. F. *et al.* (2017) «Multidrug-resistant Mycoplasma genitalium infections in Europe». *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Springer Verlag), 36(9), pp. 1565-1567. doi: 10.1007/s10096-017-2969-9.
- BRAAM, J. F. *et al.* (2018) «Sensitive and specific assay for the simultaneous detection of Mycoplasma genitalium and macrolide resistance-associated mutations». *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Springer Verlag), 37(11), pp. 2137-2144. doi: 10.1007/s10096-018-3350-3.
- BRADSHAW, C. S., JENSEN, J. S., WAITES, K. B. (2017) «New Horizons in Mycoplasma genitalium Treatment». *Journal of Infectious Diseases* (Oxford University Press), 216, pp. S412-S419. doi: 10.1093/infdis/jix132.
- CARMONA, G., VIVES, N. (2018) *Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 2016*. Barcelona. Disponible en: https://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_Actualitat/Butlletins/Promocio_proteccio_salut/bec_butlleti_epidemiologic_de_catalunya/2018/bec_febrer_2018.pdf.
- CATALUNYA, G. DE (2019) *L'atenció primària de l'ICS es referma com a referent clau en la prevenció, el diagnòstic i l'atenció de les persones amb infeccions de transmissió sexual*. Disponible en: http://ics.gencat.cat/es/detall/noticia/ICS_IX_Jornada ITS (acceso: 15 marzo 2020).
- DONG, H. V., KLAUSNER, J. D. (2019) «Neisseria gonorrhoeae resistance driven by antibiotic use». *Nature Reviews Urology* (Nature Publishing Group), 16(9), pp. 509-510. doi: 10.1038/s41585-019-0206-2.
- ELLIS, O. *et al.* (2019) «A multisite implementation of a real-time polymerase chain reaction assay to predict ciprofloxacin susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae*». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (Elsevier Inc.), 94(3), pp. 213-217. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.12.018.
- FERNÁNDEZ-HUERTA, M. *et al.* (2020) «Mycoplasma genitalium macrolide resistance update: Rate among a 2016–2017 cohort of patients in Barcelona, Spain». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Elsevier Doyma), 38(3), pp. 99-104. doi: 10.1016/j.eimc.2019.06.008.
- GAYDOS, C. A. *et al.* (2017) «Clinical Validation of a Test for the Diagnosis of Vaginitis». *Obstetrics and Gynecology* (Lippincott Williams and Wilkins), 130(1), pp. 181-189. doi: 10.1097/AOG.0000000000002090.
- GILBERT, D. *et al.* (2019) *The Sanford guide to antimicrobial therapy 2019*. 50th edn. USA: Antimicrobial Therapy, Inc.
- HILL, S. A., MASTERS, T. L., WACHTER, J. (2016) «Gonorrhea – An evolving disease of the new millennium». *Microbial Cell* (Shared Science Publishers OG), 3(9), pp. 371-389. doi: 10.15698/mic2016.09.524.
- HOSPITAL VALL D'HEBRON (2018) *Virus del papiloma humano (VPH)*. Disponible en: <https://hospital.vallhebron.com/es/enfermedades/virus-del-papiloma-humano-vph>.
- JENSEN, J. S. *et al.* (2016) «2016 European guideline on Mycoplasma genitalium infections». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (Blackwell Publishing Ltd), 30(10), pp. 1650-1656. doi: 10.1111/jdv.13849.
- KORNE-ELENBAAS, J. *et al.* (2020) «Simultaneous Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and Fluoroquinolone Resistance Mutations to Enable Rapid Prescription of Oral Antibiotics». *Sexually Transmitted Diseases* (Lippincott Williams and Wilkins), 47(4), pp. 238-242. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001141.
- LOEFFELHOLZ, M., DONG, J. (2018) «PCR and Its Variations». En: TANG, Y. W., STRATTON, C. W. (eds.) *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Cham: Springer International Publishing, pp. 273-291. doi: 10.1007/978-3-319-33900-9.
- LYNCH, T. *et al.* (2019) «Molecular diagnosis of vaginitis: Comparing quantitative PCR and microbiome profiling approaches to current microscopy scoring». *Journal of Clinical Microbiology* (American Society for Microbiology), 57(9). doi: 10.1128/JCM.00300-19.
- MADIGAN, M. *et al.* (2009) *Brock, biología de los microorganismos*. Madrid : Pearson Educación. Disponible en: https://cercabib.ub.edu/iii/encore/record/C__Rb1941986_Sbrock_12_Orightrresult_U_X1?lang=cat (Accessed: 23 April 2020).
- MELLENDEZ, J. H. *et al.* (2019) «Can ciprofloxacin be used for precision treatment of gonorrhea in public STD clinics? Assessment of ciprofloxacin susceptibility and an opportunity for point-of-care testing». *Pathogens* (MDPI AG), 8(4). doi: 10.3390/pathogens8040189.

- MURRAY, G. L. *et al.* (2017) 'Increasing macrolide and fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*', *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 23(5), pp. 809-812. doi: 10.3201/eid2305.161745.
- NYE, M. B. *et al.* (2020) «Prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection in women with bacterial vaginosis». *BMC Women's Health* (BioMed Central Ltd.), 20(1). doi: 10.1186/s12905-020-00926-6.
- OMS (2016) *Estrategia mundial del sector de la salud contra las infecciones de transmisión sexual 2016-2021*. Suiza. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250253/WHO-RHR-16.09-spa.pdf;jsessionid=C6E4AD09ACAFB3D2FAACB939A75BAD6E?sequence=1>.
- OMS (2018) *WHO | Report on global sexually transmitted infection surveillance 2018*, World Health Organization. World Health Organization. Disponible en: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/stis-surveillance-2018/en/> (acceso: 10 abril 2020).
- OMS (2019) *Sexually transmitted infections (STIs)*, World Health Organization. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)) (acceso: 11 abril 2020).
- PIÑEIRO, L. *et al.* (2019) «Guided antibiotic therapy for *Mycoplasma genitalium* infections: Analysis of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Elsevier Doyma), 37(6), pp. 394-397. doi: 10.1016/j.eimc.2018.10.003.
- ROSELLETTI, E. *et al.* (2020) «Apoptosis of vaginal epithelial cells in clinical samples from women with diagnosed bacterial vaginosis». *Scientific Reports* (Nature Research), 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-58862-2.
- SCHWEBKE, J. R. *et al.* (2018) «Diagnostic performance of a molecular test versus clinician assessment of vaginitis». *Journal of Clinical Microbiology* (American Society for Microbiology), 56(6). doi: 10.1128/JCM.00252-18.
- Seegene Inc* (2019a). Disponible en: http://www.seegene.com/assays/allplex_mg_n_azir_assay# (acceso: 4 octubre 2020).
- Seegene Inc* (2019b). Disponible en: http://www.seegene.com/assays/allplex_vaginitis_screening_assay (acceso: 4 octubre 2020).
- SpeeDx | ResistancePlus® GC* (2019). Disponible en: <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-gc/> (acceso: 4 octubre 2020).
- TENOVER, F. C., MCGOWAN, J. E. (2008) «Antimicrobial resistance». *International Encyclopedia of Public Health*, 25(11), pp. 211-219. doi: 10.1016/B978-012373960-5.00452-4.
- UNEMO, M., SHAFER, W. M. (2014) «Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future». *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), pp. 587-613. doi: 10.1128/CMR.00010-14.