



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DETECCIÓN DE FRECUENCIA DE
MUTACIONES EN LOS GENES *23S ARNr* Y
penA QUE CONFIEREN RESISTENCIA A
AZITROMICINA Y CEFIXIME EN *Neisseria*
gonorrhoeae EN MUESTRAS RECTALES DE
HOMBRES QUE TIENEN SEXO CON
HOMBRES

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN MICROBIOLOGÍA

FRANCESCA ROSALIA DE MARIA VASQUEZ
VASQUEZ

LIMA – PERÚ

2025

ASESORA:

Dra. Maria Lisseth Eguiluz Moya

JURADO DE TESIS

Dr. Holger Maita Malpartida

PRESIDENTE

Dra. Maritza Mercedes Calderon Sanchez

VOCAL

Dra. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño

SECRETARIA

DEDICATORIA

A mi madre Consuelo, por su gran amor y apoyo incondicional

A mi mamita María, a quien aún tengo la dicha de tener a mi lado

A Josue, Deku y Yampi, ustedes son mi fuerza y motivación

A mis hermanos, que siempre me apoyan emocionalmente

AGRADECIMIENTOS

A Gabriel, por apoyarme en mis estudios y siempre confiar en mis capacidades.

A mi asesora, Dra. María Eguiluz, por el tiempo invertido en guiarme, las enseñanzas y el apoyo constante, en quien he encontrado una amiga y ejemplo a seguir

A mis colegas y amigos de la universidad y de la maestría por estar siempre a mi lado compartiendo momentos inolvidables

A los participantes de los estudios Prospero-OMS y Picasso por su colaboración en los estudios y al equipo de laboratorio de las sedes involucradas

Al laboratorio de Salud Sexual de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y sus integrantes, por las oportunidades y los conocimientos brindados durante mi formación profesional.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO:

Este trabajo de investigación fue financiado por dos entidades: el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) mediante el contrato número PE501085441-2023, en el marco de la convocatoria de Tesis de pregrado y Posgrado en ciencia, tecnología e innovación tecnológica E073-2023-01 y el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID; R01AI099727-01)



DETECCIÓN DE FRECUENCIA DE
MUTACIONES EN LOS GENES *23S ARN^r* Y
penA QUE CONFIEREN RESISTENCIA A
AZITROMICINA Y CEFIXIME EN *Neisseria*
gonorrhoeae EN MUESTRAS RECTALES DE
HOMBRES QUE TIENEN SEXO CON
HOMBRES

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN MICROBIOLOGÍA

FRANCESCA ROSALIA DE MARIA VASQUEZ
VASQUEZ

LIMA – PERÚ

2025

Informe estándar ⓘ
Informe en inglés no disponible Más información

7% Similitud estándar Filtros

Fuentes
Mostrar las fuentes solapadas ⓘ

1 Internet	hdl.handle.net	2%
17 bloques de texto		251 palabra que coinciden
2 Trabajos del estudiante	Universidad Peruana Cayetano Her...	1%
3 bloques de texto		166 palabra que coinciden
3 Internet	repositorio.unne.edu.ar	<1%
2 bloques de texto		46 palabra que coinciden

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	3
2. MARCO TEORICO	5
2.1. Gonorrea.....	5
2.2. El agente etiológico: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	7
2.2.1. Requerimientos nutricionales y cultivo de <i>N. gonorrhoeae</i>	8
2.2.2. Métodos de diagnóstico	9
2.2.3. Método de detección molecular Aptima para <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	10
2.3. Resistencia antimicrobiana.....	12
2.3.1. Historia de la resistencia en <i>N. gonorrhoeae</i>	12
2.3.2. Resistencia a azitromicina por mutaciones C2611T y A2059G en el gen 23S ARNr	15
2.3.3. Susceptibilidad disminuida o resistencia a cefixime por mutaciones en el gen <i>penA</i>	16
2.3.4. Susceptibilidad disminuida o resistencia a ceftriaxona por mutaciones en el gen <i>penA</i> mosaico y no-mosaico	17
3. HIPOTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos específicos.....	20
5. MATERIALES Y METODOS.....	21
5.1. Diseño de estudio	21
5.2. Procedimientos y técnicas	22
5.2.1. Extracción de ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> a partir de la muestra resuspendida en tubo de colección de AC2.....	22

5.2.2.	Detección de cepas mutantes en los genes 23S ARNr y <i>penA</i> mediante el ensayo “Mismatch Amplification Mutation Assay por PCR cuantitativo en tiempo real” (MAMA-qPCR).....	27
5.2.3.	Secuenciamiento por Sanger del gen 23S ARNr de <i>N. gonorrhoeae</i>	29
5.2.4.	Secuenciamiento por Sanger del gen <i>penA</i> de <i>N. gonorrhoeae</i> y alineamiento múltiple	31
5.2.5.	Cepas control utilizadas	32
5.3.	Análisis estadístico de los datos	34
6.	RESULTADOS	35
6.1.	Selección del método de extracción de ADN por columnas mediante amplificación del gen <i>gyrA</i>	35
6.2.	Amplificación del gen 23S ARNr en muestras positivas para <i>N. gonorrhoeae</i> extraídas por el método de fenol – cloroformo	37
6.3.	Detección de mutaciones en el gen 23S ARNr por el ensayo MAMA-qPCR	38
6.4.	Detección de mutaciones en los codones D345 del y G545S en el gen <i>penA</i> por el ensayo MAMA-qPCR.....	39
6.5.	Análisis del secuenciamiento de muestras mutantes en la posición A2059G para el gen 23S ARNr de <i>N. gonorrhoeae</i>	40
6.6.	Análisis del secuenciamiento de muestras con mutaciones en el gen <i>penA</i> de <i>N. gonorrhoeae</i> que confieren resistencia a ceftriaxona y a cefixime	41
6.7.	Comparación de resultados entre el ensayo MAMA-qPCR y el secuenciamiento por Sanger para mutaciones en mosaico del gen <i>penA</i>	44
6.8.	Variabilidad de nucleótidos en el codón 542 y 551 del gen <i>penA</i>	46
6.9.	Proporción de mutaciones en los genes <i>penA</i> y 23S ARNr entre periodo de años 2013 – 2016 vs 2019 – 2021	47
7.	DISCUSION.....	49
8.	CONCLUSIONES.....	55
9.	LIMITACIONES.....	56
10.	RECOMENDACIONES	57

11. ASPECTOS ETICOS	58
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	59
13. ANEXOS	73

RESUMEN

Neisseria gonorrhoeae produce infecciones de transmisión sexual a nivel mundial. El aumento de cepas resistentes a los antibióticos de primera línea – azitromicina y cefalosporinas – la han convertido en una preocupación de importancia global. Las mutaciones puntuales en los genes 23S ARNr y *penA* de *N. gonorrhoeae* confieren resistencia a antibióticos y pueden ser detectadas mediante ensayos moleculares; sin embargo, en Perú aun no existía información sobre la frecuencia de estas mutaciones.

Se analizaron 124 muestras rectales de hombres que tienen sexo con hombres (HSH), colectadas en dos periodos (2013 – 2016 y 2019 – 2021), mediante el ensayo MAMA-qPCR que detecta las mutaciones C2611T y A2059G en el gen 23S ARNr para resistencia a azitromicina y mutaciones en el gen *penA* para susceptibilidad reducida a ceftriaxona. Además, 27 de estas muestras se sometieron a secuenciamiento por Sanger para identificar mutaciones en los codones del gen *penA* relacionadas a resistencia a cefixime.

Los resultados mostraron que 2 muestras (3.8%) portaban la mutación relacionada a elevada resistencia a azitromicina (A2059G), siendo confirmada en una de las muestras mediante secuenciamiento por Sanger; adicionalmente, no se detectaron mutaciones relacionadas a baja resistencia a azitromicina (C2611T). En el gen *penA*, D345del y G545S fueron encontradas en 13.5% y 7.4% respectivamente. Adicionalmente, mediante secuenciamiento se detectaron mutaciones relacionadas a susceptibilidad disminuida a cefixime en los codones G375T, A376P y E377K en el 40.7% de las muestras; A501T y P551L en 11.1% y G542S en 3.7%.

En este trabajo de investigación se logró detectar mutaciones relacionadas a alta resistencia a azitromicina y susceptibilidad disminuida a cefalosporinas en muestras clínicas de HSH infectados con *N. gonorrhoeae*. Indicando la circulación de cepas resistentes en la población estudiada y resaltando la importancia del uso de métodos moleculares para optimizar la

vigilancia epidemiológica y actualizar protocolos para un tratamiento oportuno de *N. gonorrhoeae*.

Palabras clave: *Neisseria gonorrhoeae*, resistencia, *penA*, 23S ARNr, Perú.

ABSTRACT

Neisseria gonorrhoeae causes sexually transmitted infections worldwide. The emergence of strains resistant to first-line antibiotics – azithromycin and cephalosporins – has become a major concern. Point mutations in the 23S rRNA and *penA* genes confer resistance and can be detected by molecular assays; however, data on prevalence of these mutations in Peru were lacking.

We analyzed 124 rectal samples from men who have sex with men (MSM), collected between 2013 – 2016 and 2019 – 2021, using a MAMA-qPCR assay to detect C2611T and A2059G mutations in 23S rRNA gene (azithromycin resistance) and mosaic alleles in *penA* (decreased susceptibility to ceftriaxone). Additionally, 27 samples were analyzed by Sanger sequencing to identify *penA* codon mutations linked to cefixime resistance.

Two samples (3.8%) carried the A2059G mutation, confirmed by Sanger sequencing in one specimen, while no C2611T mutations were found. In *penA* gene, D345del and G545S were detected in 13.5% and 7.4% samples, respectively. Sequencing also revealed mutations in codons G375T, A376P and E377K in 40.7%, A501T and P551L in 11.1%, and G542S in 3.7%.

This study demonstrates the circulation of high-level azithromycin–and reduced-cephalosporin–susceptible *N. gonorrhoeae* strains among MSM in our study population, underscoring the value of molecular diagnostics for epidemiological surveillance and the urgent need to update treatment protocols.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, resistance, *penA*, 23S rRNA, Peru.

1. INTRODUCCIÓN

La gonorrea es la segunda infección de transmisión sexual (ITS) más reportada a nivel mundial, esta es causada por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* y produce alrededor de 82.4 millones de casos nuevos al año (1). Según reportes del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), la infección se presenta mayormente de forma asintomática y por este motivo puede contagiarse a otros individuos sanos fácilmente (2). En hombres, se ha reportado una mayor tasa de prevalencia que en mujeres; adicionalmente, la implementación del diagnóstico en poblaciones de riesgo elevado, como son los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), ha incrementado la tasa de prevalencia en hombres (3). Cabe resaltar que entre los años 2010 a 2014 la prevalencia en hombres se incrementó en un 27.9% (4).

N. gonorrhoeae produce infecciones genitales y extragenitales (localizadas en la faringe y el recto), las infecciones genitales en hombres producen secreción purulenta y las infecciones extragenitales a nivel de recto y faringe mayormente no producen síntomas (5,6). La gonorrea puede presentar diversas complicaciones tanto en hombres como en mujeres; tales como infertilidad, enfermedad inflamatoria pélvica, abortos espontáneos, proctitis, disfunción testicular, uretritis entre otras (4,7). Adicionalmente a lo ya mencionado, la gonorrea aumenta el riesgo de adquirir otros organismos patógenos como el VIH, clamidia, entre otros (8,9).

La tasa de prevalencia de *N. gonorrhoeae* extragenital en población HSH es mayor que en la población general, debido a sus conductas sexuales. Estudios previos realizados en HSH que estaban infectados con *N. gonorrhoeae* extragenital, revelaron que solamente un 5.1% y 11.9% presentaron síntomas a nivel rectal y faríngeo, respectivamente (4). En Perú también existen reportes previos de prevalencia de esta infección en HSH, el último reporte

es del año 2016, en el cual los autores reportan una prevalencia de 6.5% a nivel faríngeo y 9.6% a nivel rectal (10).

En cuanto al tratamiento, *N. gonorrhoeae* actualmente es considerada una gran preocupación en salud pública debido a su elevada resistencia a antibióticos; ya que, a lo largo de los años, esta bacteria ha ido adquiriendo resistencia a cada uno de los antibióticos usados para su tratamiento, llegando a tener hasta un 90% de resistencia a ciprofloxacino, el cual era el antibiótico usado en gonorrea hasta hace algunos años (11). En tal sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha decidido cambiar las guías de tratamiento para *N. gonorrhoeae* desde el año 2015 discontinuando el uso de ciprofloxacino y actualmente recomienda la monoterapia oral con cefalosporinas de tercera generación, que puede ser ceftriaxona o cefixime, o dual más azitromicina en lugares donde la resistencia a azitromicina aún no haya sido reportada (12). Sin embargo, actualmente ya existen reportes del aumento en los casos con resistencia a cefalosporinas a nivel mundial (13). Además, solo entre los años 2014 - 2017, la resistencia a azitromicina aumentó de 2.5% a 4.4% e incluso ya se han reportado casos de pacientes con concentración mínima inhibitoria (MICs) elevada tanto para azitromicina como para cefalosporinas (12).

Los avances en estudios moleculares en todo el mundo han permitido detectar mutaciones específicas que confieren resistencia a los antibióticos. Existen mutaciones que confieren resistencia a las cepas de *N. gonorrhoeae*, las mutaciones en los genes diana de los antibióticos evitan que estos actúen correctamente sobre la bacteria (14,15). Diversos autores han estudiado las mutaciones encontradas en el gen *penA*, el cual codifica la proteína de unión a penicilinas tipo 2 (PBP-2 por sus siglas en inglés), dichas mutaciones confieren resistencia y susceptibilidad disminuida a cefalosporinas (cefixime y ceftriaxona) (16–18). Por otro lado, está comprobado que la presencia de cualquier mutación ubicada en los codones 375-377, 501, 542 o 551 en la PBP-2 confiere susceptibilidad disminuida a

cefixime, e incluso se han propuesto ensayos moleculares para su detección (18,19). Adicionalmente, las mutaciones en el gen 23S ARNr están relacionadas con resistencia a azitromicina, las mutaciones C2611T y A2059G en este gen confieren moderada y elevada resistencia a azitromicina, respectivamente (20).

En nuestro país existen escasos reportes de mutaciones genéticas asociadas a resistencia en *N. gonorrhoeae*. Reportes de hace 20 años mostraban una susceptibilidad del 100% a los antibióticos en cepas peruanas; sin embargo, los casos de resistencia han ido incrementándose con los años (10). En el año 2017, se reportó en Perú una tasa de resistencia a ciprofloxacino de 82.3%, así como también la aparición de cepas resistentes a azitromicina y ceftriaxona representando el 15.6% y 4.2%, respectivamente (21). Recientemente, Quellon *et al.* hallaron un 84.0% de mutaciones en el codón 91 del gen *gyrA* que codifica el aminoácido serina, asociada a resistencia a quinolonas (22).

Los datos mencionados anteriormente no reflejan el panorama actual de mutaciones genéticas en *N. gonorrhoeae* que están involucradas en la resistencia de azitromicina o cefixime en nuestra población. En tal sentido, el presente estudio tiene como objetivo detectar las mutaciones asociadas a resistencia en los genes 23S ARNr y *penA* de *N. gonorrhoeae*, las cuales confieren resistencia a azitromicina y cefalosporinas respectivamente, esto nos ayudará a recomendar nuevas estrategias en el tratamiento y manejo de la enfermedad en base al estado actual de resistencia.

1.1. Planteamiento del problema

La gonorrea, causada por *N. gonorrhoeae*, es una de las ITS bacterianas más frecuentes en el mundo, con millones de casos nuevos cada año. Las complicaciones asociadas a esta infección incluyen enfermedad inflamatoria pélvica, abortos

espontáneos e infertilidad en mujeres, así como disfunción testicular, proctitis e infertilidad en hombres (7). Cuando la infección se localiza en zonas anatómicas extragenitales (como la faringe y el recto), suele cursar de manera asintomática (6), lo que facilita su transmisión hacia otras parejas sexuales y complica su diagnóstico.

Los hombres que tienen sexo con hombres (HSH) presentan tasas de infección extragenital por *N. gonorrhoeae* significativamente más elevadas que la población general, alcanzando en Perú prevalencias entre el 6% y el 10% (10). Esta población de alto riesgo, al no presentar síntomas, actúa como reservorio y promueve la diseminación de cepas de *N. gonorrhoeae* que podrían presentar resistencia antimicrobiana.

N. gonorrhoeae ha desarrollado resistencia a cada uno de los antimicrobianos utilizados en el pasado para su tratamiento, incluidas las tetraciclinas, las penicilinas y las fluoroquinolonas (11). En el año 2018, la OMS emitió una alerta epidemiológica, recomendando el uso de cefalosporinas (ceftriaxona o cefixime) como última línea de tratamiento, a menudo en combinación con azitromicina (13,23). En Perú, se ha documentado ya una resistencia del 15.6% a azitromicina y del 4.2% a ceftriaxona en cepas clínicas aisladas mediante cultivo (24); sin embargo, aún se desconoce la frecuencia de mutaciones a nivel molecular que podrían ser responsables de dicha resistencia. Además, en los últimos años se han identificado diversas mutaciones asociadas a la resistencia en *N. gonorrhoeae*, tales como las mutaciones en el gen 23S ARNr y la aparición de alelos en mosaico del gen *penA* que confieren resistencia a cefalosporinas (15,16,18,25), sin embargo, esa data aún no está disponible en nuestra población debido a la falta de estudios en este campo.

A pesar de la actualización de las guías de la OMS, en nuestro país el tratamiento empírico sigue apoyándose en el uso de ciprofloxacino y depende de la sintomatología clínica (26). Esto evidencia la carencia de datos actuales sobre los perfiles genéticos de resistencia de *N. gonorrhoeae* en la población HSH y subraya la urgente necesidad de realizar estudios moleculares que permitan ajustar las estrategias de diagnóstico, vigilancia y tratamiento frente al creciente desafío de resistencia antimicrobiana.

2. MARCO TEORICO

2.1. Gonorrea

La gonorrea, producida por la bacteria *N. gonorrhoeae*, es la segunda infección de transmisión sexual más reportada a nivel mundial. El término “gonorrea” fue introducido por Galeno en el año 130 a.C. e incluso existen referencias bíblicas acerca de los síntomas característicos de la infección en el antiguo testamento (27). Esta infección es comúnmente asintomática, entre 20.0% a 60% de hombres infectados carece de síntomas a nivel uretral (6), y en mujeres menos del 50.0% de presentan síntomas genitales (Figura 1). Aunque aproximadamente un 33.0% de los infectados puede combatir la infección eficazmente, se ha reportado que un 10% a 20% de las infecciones no tratadas en mujeres pueden complicarse y causar infección en el tracto genital superior generando diversas complicaciones como infertilidad, enfermedad inflamatoria pélvica, entre otras (4,28). En sistemas inmunes comprometidos, esta bacteria puede actuar mediante un mecanismo de transcitosis, el cual le permite establecer una infección gonocócica diseminada (DGI) que puede incluir artritis,

dermatitis, meningitis, pericarditis y sepsis (29). Adicionalmente, *N. gonorrhoeae* puede causar infecciones a nivel extragenital, ya sea en faringe o recto; estas son a menudo asintomáticas tanto en mujeres como en hombres, aproximadamente un 93.0% de infecciones faríngeas son asintomáticas y que 3 de cada 4 mujeres no presentan síntomas a nivel rectal (5).

En HSH la tasa de prevalencia de infecciones por *N. gonorrhoeae* es mayor que en población general e incluso el CDC ha reportado cifras alarmantes en el incremento de la infección en esta población de riesgo. Adicionalmente, debido a que las infecciones en esta población se presentan en mayor proporción a nivel rectal o faríngeo debido a sus conductas sexuales, la mayoría de estas infecciones cursan de manera asintomática. La tasa de infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* que producen síntomas en HSH, a nivel rectal y faríngeo, son tan bajas como un 5.1% y 11.9% respectivamente (4). En Perú existen reportes de prevalencia de esta infección en HSH, en el año 2016 se encontró una tasa de prevalencia de 6.5% a nivel faríngeo y de 9.6% a nivel rectal (10). Es importante considerar que la ausencia de sintomatología, y por ende la falta de conocimiento del estado infectado en el individuo, produce una mayor diseminación hacia otras parejas sanas; además, podrían presentarse casos de infecciones que no son detectadas en un chequeo habitual en los servicios de salud lo que podría llevar a problemas crónicos relacionados a esta infección. Estudios previos revelaron que de un grupo de hombres que tenían infertilidad, 6.5% tuvieron la infección por *N. gonorrhoeae*; además, esto refuerza la premisa de que las infecciones no tratadas en hombres pueden conllevar a problemas de disfunción testicular y/o infertilidad (7). Otro de los aspectos resaltantes es que la infección causada por *N. gonorrhoeae*, también aumenta el riesgo de

adquirir otras ITS no curables de importancia en salud pública, como lo es el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (8,9).

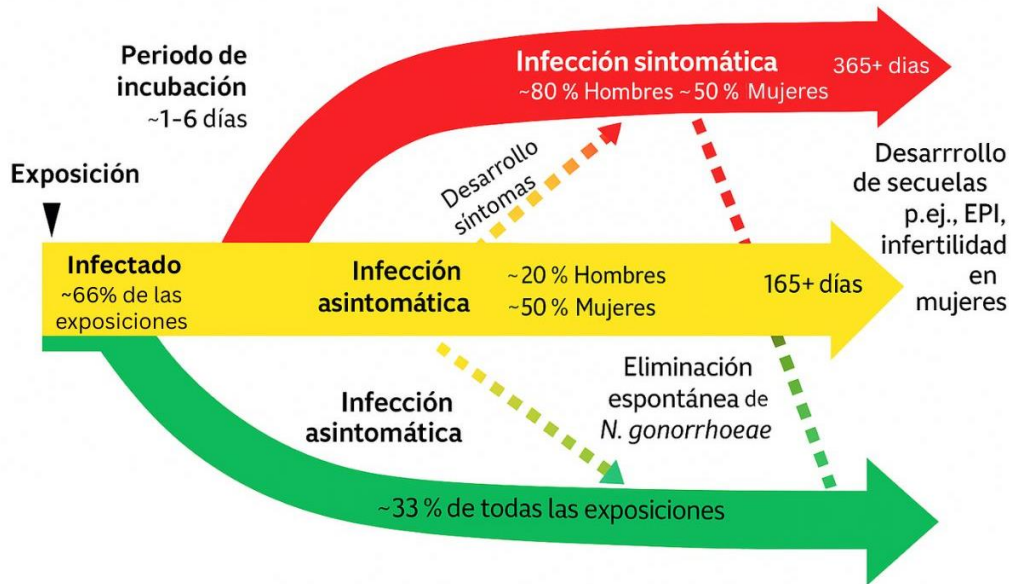


Figura 1. Historia natural de la infección causada por *N. gonorrhoeae*. Adaptado de Lovett A. *et al.* “Human Immune Responses and the Natural History of Neisseria gonorrhoeae Infection”. *Front Immunol*, 2019; 19:9:3187. doi: 10.3389/fimmu.2018.03187. (28)

2.2. El agente etiológico: *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae es un diplococo gram negativo, es inmóvil y no forma esporas, esta bacteria infecta de manera exclusiva a los humanos (30). El género *Neisseria* pertenece a la familia “*Neisseriaceae*” y a la orden “*Neiseriales*” (31), se caracteriza por colonizar las células de las mucosas, como son la mucosa genital, de la faringe, del recto y de la uretra; adicionalmente, ha desarrollado un sistema de adaptación a la transición de distintos ambientes anatómicos en el hospedero (32). Entre sus factores de virulencia destaca la adherencia a las células de la mucosa, la cual es mediada por distintas estructuras, entre pili Tipo

IV, proteínas Opa y PorB. La adhesión y colonización depende principalmente de pili Tipo IV y las proteínas Opa son responsables de la evasión inmunológica (32,33). Las proteínas PorB también cumplen un rol importante en la pérdida de la actividad inmunosupresora del individuo infectado, inhibiendo la proliferación de las células T (34). La infección por *N. gonorrhoeae* produce una reacción inflamatoria en el lugar de la colonización, lo que produciría la descarga uretral en hombres sintomáticos (28). Adicionalmente, esta bacteria tiene diversos mecanismos de evasión que no permiten que el sistema inmune pueda eliminarla exitosamente. Se conoce también que *N. gonorrhoeae* evade y ataca el sistema de complemento, el cual es la principal vía de defensa contra esta infección; esto lo consigue a través de dos mecanismos: puede expresar moléculas parecidas a las del organismo humano en su superficie o puede inactivar el sistema de complemento (32). La inmunidad humoral producida contra la bacteria no es protectora, estudios revelan que la cantidad de anticuerpos anti *N. gonorrhoeae* entre individuos infectados por primera vez y los que habían sido infectados anteriormente no variaba de manera significativa, indicando que la inmunidad desarrollada contra la infección no es totalmente eficaz en combatirla (35).

2.2.1. Requerimientos nutricionales y cultivo de *N. gonorrhoeae*

Con respecto a sus requerimientos nutricionales, *N. gonorrhoeae* es cultivable y crece en condiciones de laboratorio en un tiempo de 18 a 24 horas en presencia de glucosa, glutamina, fosfatos y además requiere una atmósfera con CO₂, puesto que sin este suplemento no puede crecer y pierde la habilidad de formar colonias (36,37), es sensible a la desecación

y temperaturas diferentes a las del ser humano (32). Los medios idóneos para el cultivo pueden ser un medio selectivo como el agar Thayer Martin modificado y un medio no selectivo como agar chocolate. Las muestras utilizadas para su diagnóstico mediante cultivo pueden ser orina, descargas uretrales o vaginales, hisopado anal, faríngeo y de conjuntiva (38). El cultivo fue la prueba de referencia para diagnóstico de gonorrea durante años, sin embargo, a pesar de tener una especificidad alta (>99.4%), la sensibilidad disminuye en sitios extragenitales (43% y 41% en infecciones rectales y faríngeas respectivamente) indicando que la sensibilidad puede variar dependiendo del sitio anatómico de la toma de muestra (39).

2.2.2. Métodos de diagnóstico

Las guías de la OMS recomiendan el diagnóstico de la infección por *N. gonorrhoeae* mediante cultivo o amplificación de ácidos nucleicos (NAATs por sus siglas en inglés) (23). El cultivo ha sido la prueba de referencia durante años, pero ahora se recomienda el tamizaje con pruebas moleculares usando NAATs. En algunas zonas rurales de nuestro país, el diagnóstico microscópico mediante la coloración de gram también es utilizado, para esto se utilizan muestras de secreción uretral en hombres y tiene una sensibilidad de 90.0 a 95.0%, la sensibilidad para muestras vaginales en mujeres es menor, entre 50 a 70% (23,38).

La OMS ha recomendado ampliamente el uso de adicional de NAATs para el diagnóstico en conjunto con el cultivo; y diversos estudios han demostrado que la sensibilidad de los NAATs es mayor a la del cultivo (23). La comparación del uso de cultivo versus NAATs en muestras

extragenitales remarca la utilidad de las pruebas moleculares, ya que se puede llegar a duplicar el porcentaje de positividad (40); además, se sugiere tomar múltiples muestras tanto de lugares genitales como extragenitales, para poder detectar la infección en alguno de estos lugares anatómicos en población de riesgo (41).

Actualmente se encuentran desarrolladas diversas pruebas moleculares para la detección del material genético de *N. gonorrhoeae*; el ensayo Xpert CT/NG (GeneXpert, Cepheid) es un método validado por la OMS, que puede ser usado como una prueba de diagnóstico para el lugar de la atención (POCTs) el cual detecta la presencia o ausencia de la infección mediante la técnica de amplificación en tiempo real (qPCR) sin presentar reacciones cruzadas con otras especies de *Neisseria* (42). Adicionalmente se encuentra el ensayo Aptima Combo 2 (AC2 Hologic, San Diego), que combina la amplificación y la retrotranscripción de ácidos nucleicos para detectar infecciones por *N. gonorrhoeae*, dicho ensayo mide su reacción final en unidades relativas de luz (RLU) mediante las cuales se estima un valor semicuantitativo y un umbral de positividad en las muestras, con valores de RLU entre 100 y 3000 para indicar positividad.

2.2.3. Método de detección molecular Aptima para *Neisseria gonorrhoeae*

El ensayo Aptima Combo 2 (AC2 Hologic, San Diego) es un ensayo cualitativo basado en la detección simultánea de ARN ribosomal de *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, mediante la tecnología llamada Amplificación mediada por transcripción. El tubo de transporte utilizado

para dicho ensayo contiene un buffer de lisis, el cual lisa las células, libera el material genético y lo conserva hasta su procesamiento. En consecuencia, se podría utilizar este líquido para la extracción posterior de ADN de *N. gonorrhoeae* mediante diversos kits de extracción para luego realizar pruebas de amplificación como la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) o secuenciación. Algunas investigaciones han demostrado que este buffer de transporte es incompatible para su uso directo en otras plataformas de diagnóstico como por ejemplo GeneXpert, obteniéndose algunos resultados discordantes y muestras positivas no detectadas; ocurre de la misma manera cuando se ha intentado usar otro buffer de transporte que no es el proporcionado en el kit de AC2 para el análisis de *N. gonorrhoeae* mediante dicho ensayo (Aptima) (43,44). Se ha evaluado utilizar métodos de extracción que tengan una mayor recuperación de ADN bacteriano a partir de estos buffers para posterior procesamiento, Mayes *et al.* obtuvieron una concordancia de 92.9% al comparar los resultados de muestras positivas de *N. gonorrhoeae* procesadas con AC2 y las mismas muestras de ADN extraídas con el kit de Roche Diagnostics con otro método molecular (45). Existe la necesidad de mejorar las técnicas de extracción de ácidos nucleicos a partir del buffer de transporte de AC2 para poder utilizar el material genético de *N. gonorrhoeae* en diversos estudios posteriores una vez que se tenga la prueba de tamizaje AC2 positiva.

2.3. Resistencia antimicrobiana

2.3.1. Historia de la resistencia en *N. gonorrhoeae*

Desde mediados del siglo XX, *N. gonorrhoeae* ha desarrollado resistencia a casi todos los antibióticos utilizados para su tratamiento, incluyendo penicilinas, tetraciclinas y quinolonas (46), esto se debe a la naturaleza altamente competente para transformación de *N. gonorrhoeae*, la cual es capaz de captar material genético perteneciente a otras especies comensales de *Neisseria spp.* presentes en la microbiota del hospedero (47). Las sulfonamidas fueron el método de elección para tratar *N. gonorrhoeae* al inicio y durante varios años, estos antibióticos presentaron una gran eficacia contra estreptococos, y también contra *N. gonorrhoeae*, se introdujo su uso desde el año 1937 (48); las sulfonamidas actúan como un sustrato de la enzima Dihidropeptorato sintasa (DHPS), inhibiendo la síntesis de ácido fólico. Años más tarde se empezaron a detectar fallas al tratamiento contra *N. gonorrhoeae* debido a la mutación de DHPS, descontinuándose su uso (49), por el año 1944 ya se detectaban tasas de resistencia a tetraciclinas mayores al 90% (50). Lo mencionado anteriormente contribuyó al uso de penicilina para tratar las infecciones de gonorrea; este tratamiento fue introducido aproximadamente en el año 1940, las penicilinas inhiben la síntesis de la pared celular ya que se unen a las enzimas transpeptidasas llamadas Proteínas de unión a penicilina (PBP), durante años el tratamiento fue exitoso; sin embargo, la detección de mutaciones sería reportada 20 años después, encontrándose mutaciones genéticas involucrados en la síntesis de la pared celular (*penA* y *ponA*) o en las bombas de flujo de la membrana citoplasmática (*penB*, *penC* y *mtrR*) y

además en los genes que codificaban betalactamasas mediados por plásmidos (49,51). Posteriormente, la OMS recomendó el uso de quinolonas como una alternativa al uso de la penicilina, el ciprofloxacino es un antibiótico del grupo de las quinolonas, el cual afecta la actividad de enzimas involucradas en la replicación de ADN, como la girasa y topoisomerasa IV (52). Este antibiótico se estuvo utilizando por varios años, sin embargo, las fallas al tratamiento actualmente reportadas tienen una tasa del 90%, y se han encontrado mutaciones que confieren resistencia en el codón 91 del gen *gyrA* (22).

Actualmente, las cefalosporinas de tercera generación cefixime y ceftriaxona en monoterapia, o a veces en casos especiales junto con la azitromicina en terapia dual, se consideran el tratamiento estándar recomendado por la OMS (13,23). Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a estos antibióticos amenaza con dejar sin opciones terapéuticas efectivas. La naturaleza altamente competente de la bacteria y la presencia del pili tipo IV, hacen que esta bacteria pueda incluir secuencias de material genético en su ADN pertenecientes a otras *Neisserias* comensales también encontradas en la microbiota del hospedero (53,54).

En el 2016, se detectó un aumento en la resistencia a azitromicina y cefixime en Europa, con tasas de 7.5% y 2.1% respectivamente, con un 0.3% de casos con una elevada resistencia a azitromicina (55). Adicionalmente, en Japón existen reportes de fallas al tratamiento y resistencia en cefalosporinas (17,56,57).

Debido a que las infecciones por *N. gonorrhoeae* son una preocupación creciente en todo el mundo, las investigaciones apuntan a la búsqueda de nuevos antibióticos para su tratamiento; la Zoliflodacina, un antibiótico perteneciente a una clase nueva de medicamentos y que inhibe la biosíntesis bacteriana del ADN, se encuentra en la fase III en ensayos clínicos, demostrando efectividad contra cepas que producen infecciones genitales y rectales, además de demostrar una buena efectividad comparado al tratamiento dual de ceftriaxona más azitromicina (58,59).

Por otro lado, la Gepotidacina, otro antibiótico que se encuentra actualmente en investigación e inhibe la actividad de ADN topoisomerasa II, ha mostrado una eficiencia del 95% en tratamientos de gonorrea urogenital, demostrando su efectividad (58,60). Si bien estos antibióticos son prometedores, aún se encuentran en diversas fases de investigación para poder comprobar su eficacia e inocuidad en el tratamiento.

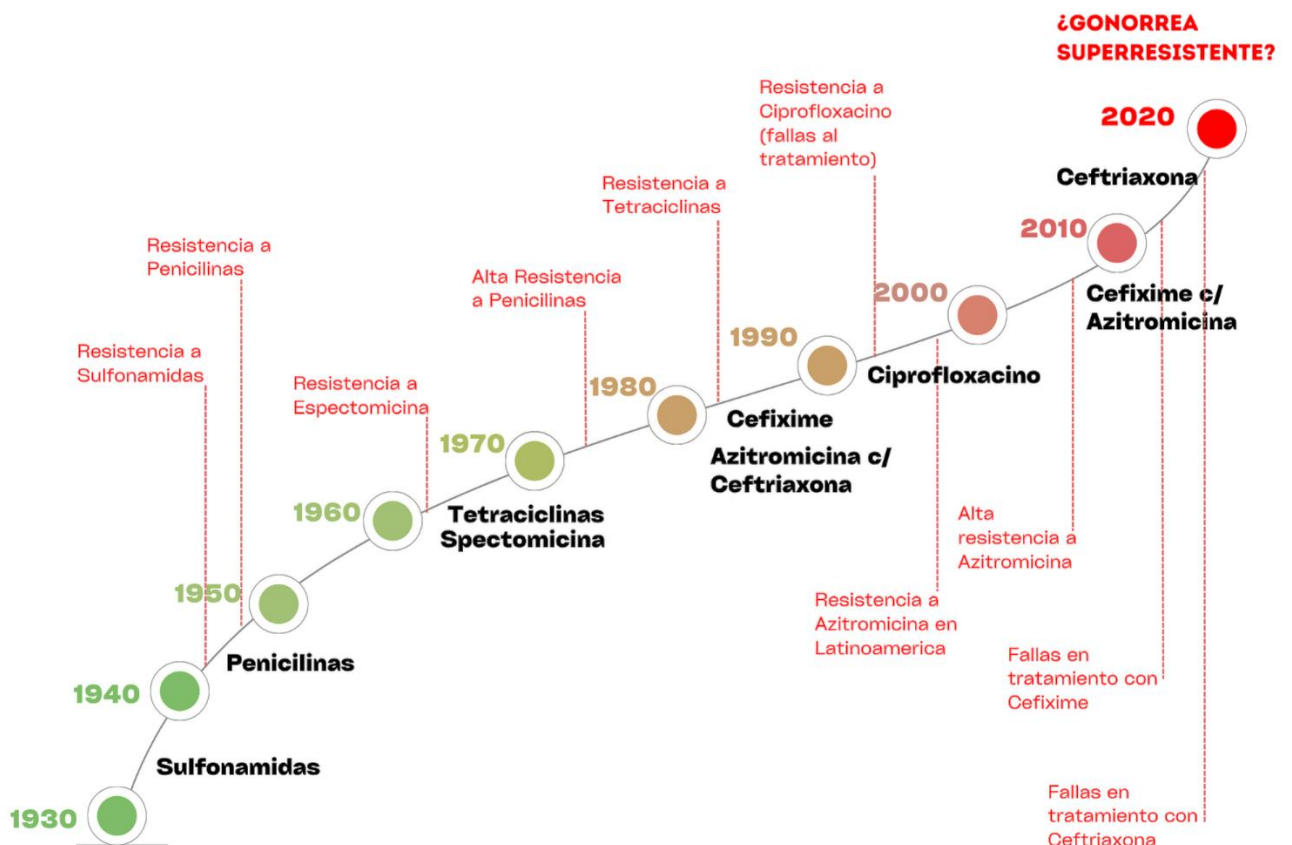


Figura 2. Historia de los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de *N. gonorrhoeae* y la aparición de resistencia desde el año 1930 hasta 2020. Adaptado de Unemo *et al.*, “Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future”, *Clin Microbiol Rev*, 2014; 27(3):587-613. doi: 10.1128/CMR.00010-14. (46)

2.3.2. Resistencia a azitromicina por mutaciones C2611T y A2059G en el gen 23S ARNr

La azitromicina es un antibiótico perteneciente a la familia de los macrólidos, tiene como molécula diana a la subunidad 23S del ARN ribosomal (23S ARNr), el cual forma parte del canal de salida del péptido de la unidad 50S del ribosoma, la azitromicina se une al 23S ARNr inhibiendo de esta manera la síntesis de proteínas (15,20). Existen 2 mutaciones puntuales, las mutaciones C2611T y A2059G ubicadas en el bucle (*loop*) del dominio V peptidiltransferasa del gen 23S ARNr de *N. gonorrhoeae* que han sido asociadas a resistencia a azitromicina (ver figura 3). La mutación C2611T confiere una baja a moderada resistencia a azitromicina (valores de MIC en antibiograma mayores o iguales a 2 µg/ml), mientras que la mutación A2059G confiere una elevada resistencia a azitromicina (valores de MIC mayores o iguales a 256 µg/ml) (25). *N. gonorrhoeae* posee 4 copias del gen 23S ARNr en su cromosoma, si se encuentran las mutaciones antes mencionadas en por lo menos 3 copias del gen se puede asociar a la resistencia a azitromicina; Wang *et al.* reportaron que el valor predictivo positivo de la mutación A2059G en muestras con alta resistencia fue de 96.4%, existiendo una fuerte relación entre la mutación A2059G y la resistencia elevada (61). Además, otro estudio realizado en 23 países de Europa entre los años 2009 - 2014 sugirió que la presencia de estas dos mutaciones en el gen 23S ARNr (C2611T y A2059G) pueden predecir acertadamente la resistencia a azitromicina mediante ensayos moleculares (62).

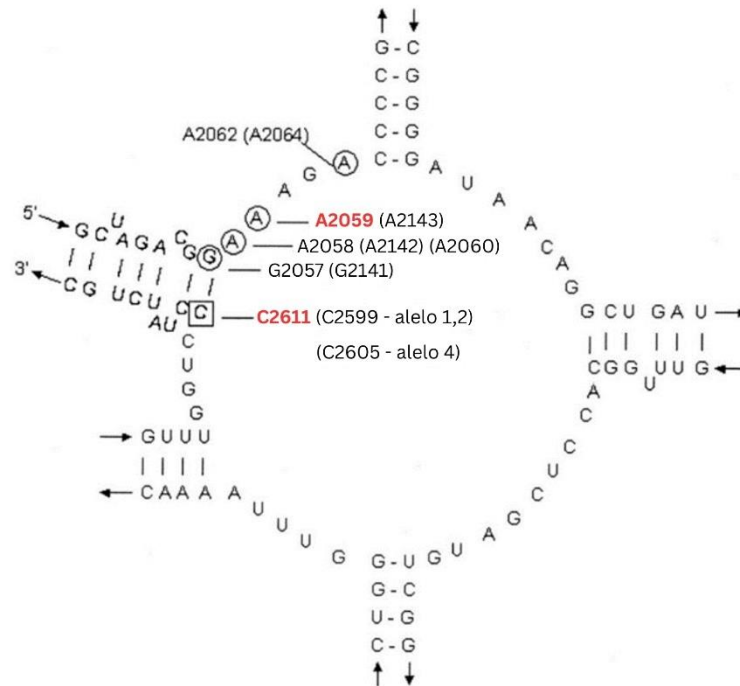


Figura 3. Estructura del dominio V peptidiltransferasa en el gen 23S ARNr. Entre paréntesis se encuentra la numeración de *N. gonorrhoeae*. Adaptado de Lai-King Ng *et al.* "Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*". *Antimicrob Agents Chemother*, 2002; 46(9):3020-5. doi: 10.1128/AAC.46.9.3020 (63)

2.3.3. Susceptibilidad disminuida o resistencia a cefixime por mutaciones en el gen *penA*

Cefixime es un antibiótico perteneciente al grupo de cefalosporinas de tercera generación, este antibiótico es usado actualmente como tratamiento en gonorrea y ejerce su actividad antibiótica uniéndose a las proteínas de unión a penicilina (PBPs). Las PBPs son enzimas generalmente envueltas en la síntesis de peptidoglucano en *N. gonorrhoeae*, a las cuales se unen las penicilinas u otros antibióticos de la clase de los β -lactámicos para inactivarlas (54). Las PBPs se subdividen PBP-1, la cual tiene función en la elongación de la célula y su ausencia está relacionada a lisis celular, la

PBP-2 que estaría relacionada a la forma celular y la BPB-3 involucrada en la formación del septo. (64). El gen *penA* de *N. gonorrhoeae* se encarga de codificar el dominio transpeptidasa de la PBP-2 (65). La disminución de la afinidad de los antibióticos debido a mutaciones en la PBP-2 está correlacionada a resistencia o susceptibilidad disminuida a cefixime con un MIC mayor a 0.5 µg/ml (14).

Adicionalmente, Deng *et al.* realizaron una revisión sistemática de diversas publicaciones relacionadas a resistencia o susceptibilidad disminuida a cefixime y encontraron que cualquier alteración encontrada en cualquiera de las posiciones 375-377, 501, 542 o 551 de los aminoácidos del gen *penA* pueden predecir la susceptibilidad disminuida con un 99.5% de precisión (18,19).

2.3.4. Susceptibilidad disminuida o resistencia a ceftriaxona por mutaciones en el gen *penA* mosaico y no-mosaico

La ceftriaxona es una cefalosporina de tercera generación utilizada como tratamiento de última línea para infecciones causadas por *N. gonorrhoeae*. La resistencia a ceftriaxona reportada en diversos países es una preocupación creciente nivel mundial (66). Existen mutaciones en el gen *penA* asociadas a resistencia a este antibiótico, estas mutaciones surgen debido a eventos de recombinación entre diferentes especies pertenecientes a *Neisseria*, dichas especies pueden ser comensales o patógenas (16). Se han encontrado hasta 70 aminoácidos mutados en cepas en mosaico, pertenecientes a otras especies de *Neisseria* (66). La ausencia de inserción

de un aspartato en el codón 345 (D345~~del~~) del gen *penA* es característico de las cepas en mosaico, esto disminuye significativamente la afinidad al antibiótico ceftriaxona, contribuyendo así a la disminución de la susceptibilidad (67). Por otro lado, las sustituciones en la posición 545, el reemplazo de una Glicina por una Serina (G545S) está asociada a disminución de susceptibilidad en Ceftriaxona y es frecuentemente encontrada en alelos en mosaico del gen *penA* (68). En la figura 4 se puede apreciar el impacto de la mutación G545S en *N. gonorrhoeae* mediante la superposición de la estructura del sitio activo de ceftriaxona en la cepa silvestre (*wt*) y la cepa H041 (mutante), evidenciándose un tipo de unión diferente cuando existe la mutación G545S que altera la interacción del antibiótico en esta posición mutada.

La perspectiva actual en cuanto a la resistencia en gonorrea se centra tanto en la búsqueda de nuevos antibióticos para el tratamiento de cepas resistentes como en la detección temprana de dichos casos. Con este objetivo se están desarrollando ensayos moleculares dirigidos a la detección de mutaciones puntuales altamente asociadas a resistencia, destacando las dos mutaciones en el gen 23S ARNr (A2059G y C2611T) relacionadas a resistencia a azitromicina y las alteraciones en los alelos mosaico y no mosaico del gen *penA*, las cuales están relacionados a resistencia y susceptibilidad disminuida a cefixime y ceftriaxona.

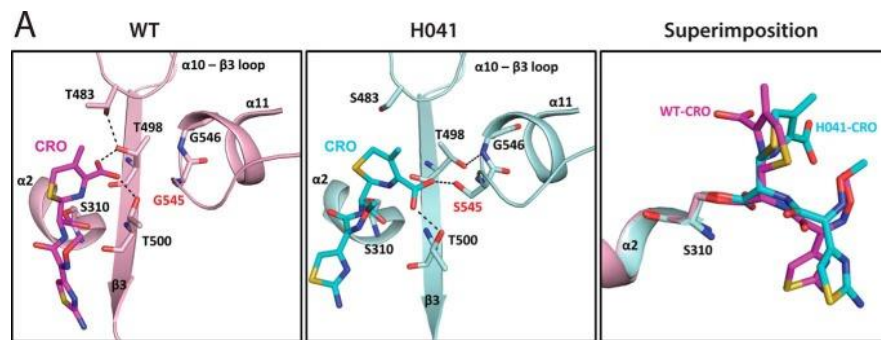


Figura 4. Impacto de la mutación en G545S en el PBP-2 de *N. gonorrhoeae*.

Figura tomada de Singh A. *et al.* “Mutations in penicillin-binding protein 2 from cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* hinder ceftriaxone acylation by restricting protein dynamics”. *J Biol Chem.*, 2020 ; 295(21):7529–43. doi:10.1074/jbc.RA120.012617 (68)

3. HIPOTESIS

Existen mutaciones que confieren resistencia a azitromicina y cefixime en los genes 23S ARNr y *penA* de *Neisseria gonorrhoeae* detectada en muestras rectales de HSH.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la frecuencia de mutaciones que confieren resistencia a azitromicina y cefixime en los genes 23S ARNr y *penA* de *Neisseria gonorrhoeae* detectada mediante amplificación mediada por transcripción (Aptima) en muestras rectales de HSH.

4.2. Objetivos específicos

- Identificar las mutaciones C2611T y A2059G en el gen que codifica el 23S ARNr de *Neisseria gonorrhoeae* que confieren resistencia a azitromicina.
- Identificar las alteraciones en las posiciones de los aminoácidos 375-377, 501, 542 o 551 del gen *penA* de *Neisseria gonorrhoeae* que confieren resistencia a cefixime.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Diseño de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. Para este estudio se consideraron 124 muestras de hisopado rectal positivo para *N. gonorrhoeae* provenientes de participantes HSH pertenecientes 2 estudios realizados en centros de ITS (CERITS) pertenecientes a Lima y Callao::

- Un total de 65 muestras pertenecientes al estudio “Picasso”, las cuales fueron colectadas entre junio del año 2013 y Julio del año 2016. Este estudio consideró participantes HSH infectados con sífilis previa o infección *de novo* como criterio de inclusión. Este grupo de muestras fueron colectadas en 2 CERITS: “Epicentro”, localizado en el distrito de Barranco y “Centro de Salud Alberto Barton” localizado en el Callao.
- Un total de 59 muestras pertenecientes al estudio “Prospero”, realizado entre los años 2019-2021. Este estudio consideró población con factores de riesgo que podían estar infectados con Clamidia/Gonorrea y otras ITS y que acudía a clínicas de ITS como criterio de inclusión. Este grupo de muestras fueron colectadas en 2 CERITS: “Centro Materno Infantil Tahuantinsuyo Bajo”, localizado en el distrito de Independencia y “Centro de Salud Alberto Barton” localizado en el Callao.

Las muestras rectales fueron autocolectadas con hisopo y resuspendidas en el buffer del kit de colección del ensayo Aptima Combo 2 (AC2, Hologic, San Diego CA) para su procesamiento. El buffer del ensayo de AC2 lisa las células de la muestra para liberar el material genético y lo conserva adecuadamente. Las muestras rectales con resultado positivo para *N. gonorrhoeae* mediante el ensayo de Aptima fueron

seleccionadas y almacenadas a -80°C en ultra congeladora hasta su posterior uso (ver figura 5).

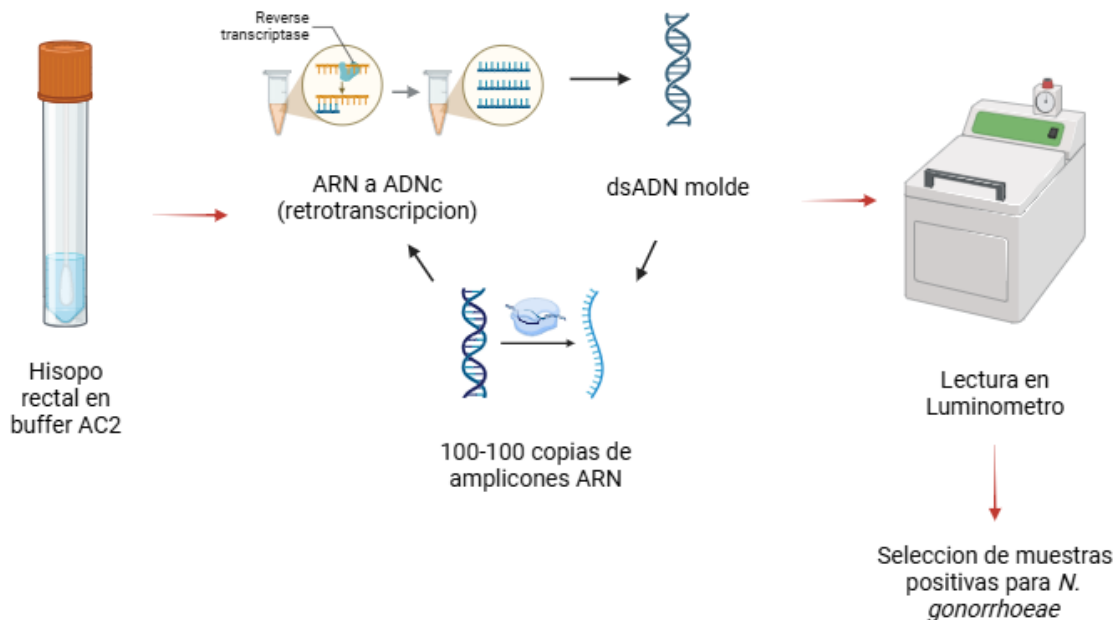


Figura 5. Flujograma de procesamiento de hisopos rectales por el ensayo de Aptima combo 2 (Amplificación mediada por transcripción) y posterior selección de positivos para *N. gonorrhoeae*.

Figura creada con BioRender.com

5.2. Procedimientos y técnicas

5.2.1. Extracción de ADN de *N. gonorrhoeae* a partir de la muestra resuspendida en tubo de colección de AC2

Debido a que la recuperación de ADN a partir de tubos de transporte AC2 es baja y además este buffer de transporte no es compatible con otras plataformas de amplificación comercial, se realizó una estandarización del método de extracción (método por columnas utilizando 03 kits diferentes de extracción de ADN y por fenol cloroformo) en una muestra positiva por

AC2, la cual fue escogida por presentar un valor de RLU de 1250, indicando una elevada positividad para *N. gonorrhoeae* en AC2 (y así poder elegir el mejor método de extracción y para su posterior amplificación y análisis adecuado.

- ***Extracción por columnas (kits de extracción)***

Este método de extracción realizó por columnas siguiendo las instrucciones del fabricante en cada uno. Se utilizaron 3 diferentes kits de extracción:

- QIAamp DNA minikit (Qiagen, Ontario, Canada): Se utilizó el protocolo de extracción de ADN para sangre o fluidos biológicos utilizando el volumen de muestra según fabricante y también con 2 variantes: 1. Volumen de la muestra duplicada (400 µl de muestra y 40 µl de proteinasa K) y 2. Buffer ATL (buffer de lisis para tejidos).
- GeneJET Genomic DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific In, USA.): Se utilizó el protocolo de extracción de ADN para sangre o fluidos biológicos utilizando el volumen de muestra según fabricante y también duplicamos el volumen de la muestra (400 µl de muestra, 40 µl de proteinasa K y 700 µl de solución de lisis).
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Inc, USA): Se utilizó el protocolo de extracción de ADN para sangre o fluidos biológicos utilizando el volumen de muestra siguiendo las instrucciones del fabricante.

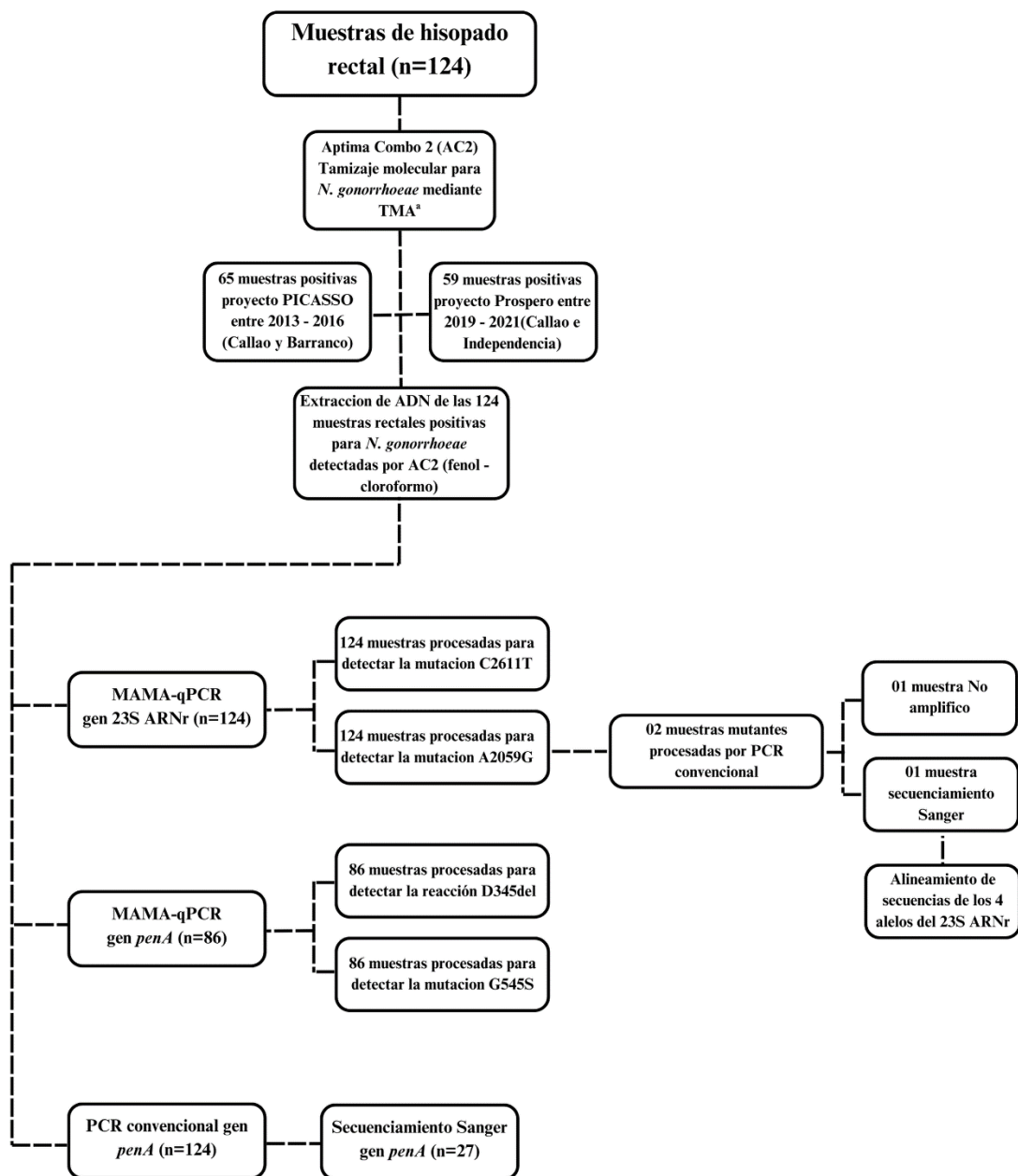


Figura 6. Diagrama de flujo que muestra los pasos seguidos en el análisis de 124 muestras rectales positivas para *N. gonorrhoeae*.

Muestras rectales detectadas mediante tamizaje por AC2. Se realizó la extracción de ADN, detección de mutaciones puntuales asociadas a resistencia mediante el ensayo MAMA-qPCR en los genes 23S ARNr (C2611T y A2059G) y *penA* (D345del y G545S), así como la confirmación de mutaciones seleccionadas mediante secuenciamiento Sanger. Este diagrama resume el flujo de trabajo desde la extracción de muestras hasta el análisis genético.

^a Amplificación Mediada por Transcripción

Tabla 1. Lista de muestras positivas para *N. gonorrhoeae* utilizadas para comparar kits de extracción a partir del buffer de AC2

ID Muestra	Kit de extracción empleado (marca)	Modificaciones
21512 (a)	QIAamp DNA minikit (Qiagen)	<i>Sin modificaciones</i>
21512 (b)	QIAamp DNA minikit (Qiagen)	400 µl de muestra, 40 µl de proteinasa K y buffer ATL
21512 (c)	QIAamp DNA minikit (Qiagen)	400 µl de muestra, 40 µl de proteinasa K
21512 (d)	GeneJET Genomic DNA (Thermo Fisher)	400 µl de muestra, 40 µl de proteinasa K y 700 µl de solución de lisis
21512 (e)	High Pure PCR (Roche)	<i>Sin modificaciones</i>
21512 (f)	GeneJET Genomic DNA (Thermo Fisher)	<i>Sin modificaciones</i>

- ***Extracción por fenol cloroformo modificado***

Se extrajo 400 µl del líquido de transporte del tubo AC2 en un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril, se agregó 400 µl de buffer de extracción de ADN (2 % SDS, 0.01 M EDTA pH 8.0) y 20 µl de Proteínasa K, luego de mezclar usando el vórtex, se incubó por 2 horas a 56 °C; luego se agregó Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) en igual proporción que el buffer de extracción y Proteínasa K (20 mg/ml), se centrifugó a 5000g por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 50 µl de acetato de sodio 3M. Posteriormente fue lavado con etanol 70° y secado a 37°C. Obteniéndose

finalmente DNA resuspendido en 50 μ l de agua libre de nucleasas para su posterior amplificación (ver figura 7).



Figura 7. Esquema de extracción de ADN de muestras positivas a *N. gonorrhoeae*.
Figura creada con BioRender.com

La amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) de las muestras extraídas con diferentes métodos, se realizó utilizando 2 tipos de *primers* (uno para amplificar el gen *gyrA* y el otro para amplificar el gen ARN ribosomal 23S de *N. gonorrhoeae*), los *primers* utilizados se detallan en la tabla 2.

Se realizó una curva de amplificación de magnesio y se probaron diferentes temperaturas de hibridación:

- Curva de amplificación: 1.5 mM MgCl₂, 2.0 mM MgCl₂ y 2.5 mM MgCl₂
- Temperaturas de hibridación: 60°C y 62°C

Tabla 2. *Primers* utilizados para la amplificación de *N. gonorrhoeae* por PCR convencional (63)

<i>Primers</i>	Secuencia primer (5' a 3')	Gen que amplifica
gonrRNA-F	ACGAATGGCGTAACGATGGCCACA	23S ARNr
gonrRNA-R2	TTCGTCCACTCCGGTCCTCTCGTA	
gyrA_F	TGGAATAACTGGAATGCCGCCTA	gyrA*
gyrA_R	CCGATTTCGGTATAGCGCATGG	

* Tamaño del producto 188 pb

Los productos amplificados fueron visualizados mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, a 75V con posterior teñido con Bromuro de Etidio bajo luz UV en transiluminador. Se evaluó y escogió las condiciones óptimas para la PCR, según la intensidad de la banda presente en el gel de agarosa.

5.2.2. Detección de cepas mutantes en los genes 23S ARNr y *penA* mediante el ensayo “Mismatch Amplification Mutation Assay por PCR cuantitativo en tiempo real” (MAMA-qPCR)

El ensayo MAMA-qPCR (69) es un método que permite amplificar cepas mutantes de *N. gonorrhoeae* mediante PCR en tiempo real (qPCR). Este ensayo es altamente específico y permite detectar mutaciones puntuales en *N. gonorrhoeae*, las cuales están asociadas a resistencia antibiótica, especialmente a azitromicina y cefalosporinas.

Los *primers* utilizados para este ensayo se unen y amplifican cepas mutantes y de tipo silvestre (*wt* por sus siglas en inglés) de *N. gonorrhoeae*. En el ensayo MAMA-qPCR, el extremo 3' del primer presenta un desajuste (o *mismatch*) con un nucleótido específico en el ADN *wt* de *N. gonorrhoeae*. Durante la qPCR, solamente el *primer* que coincida con la secuencia del ADN objetivo (mutante) lo amplificará de una manera eficiente en comparación con la amplificación de la cepa *wt*. El desajuste en el extremo 3' del *primer* evita la elongación eficiente si el DNA pertenece a una cepa *wt*, permitiendo la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Para detectar mutaciones que confieran resistencia antimicrobiana en *N. gonorrhoeae*, se utilizaron *primers* previamente diseñados (69) para el ensayo MAMA-qPCR (ver tabla 3), los cuales coinciden en su extremo 3' con las mutaciones de interés en los genes 23S ARNr y *penA*. Para el gen 23S ARNr se utilizaron 2 tipos de *primers* que amplifican la mutación en la posición 2611 (C→T) y en la posición 2059 (A→G) del gen. Para el gen *penA* en mosaico permiten detectar las siguientes mutaciones: delección en el codón 345 que codifica Aspartato (D345del) y la sustitución de Glicina por Serina en el codón 545 (G545S).

El ensayo MAMA-qPCR utiliza SYBR green como colorante fluorescente. Los valores de C_T más bajos sugieren una eficiente amplificación (cepa mutante), mientras que un valor de C_T más elevado está relacionado a una amplificación menos eficiente (cepa *wt*), lo que nos permitió determinar si las muestras tenían ADN de *N. gonorrhoeae* mutante o *wt*.

Tabla 3. *Primers* utilizados para la amplificación de *N. gonorrhoeae* por MAMA-qPCR

<i>Primers</i>	Secuencia primer (5' a 3')	Gen que amplifica
C2611_F	AACGTCGTGAGACAGTTTGGTT <u>T</u>	23S ARNr
C2611_R	GAACTTAGCTACCCGGCTATGCA	mutación C2611T
A2059_F	TACAGTAAAGGTTACGGGGTC <u>AC</u>	23S ARNr
A2059_R	TGGCCACACTGTCTCCTCCC	mutación A2059G
545_F	TGGTTAACGGTCGTTACGTCGATT	<i>penA</i> mutación
545_R	GGCCCTGCCACTACACCG <u>TT</u>	G545S
345_F	GGCAAAGTGGATGCAACCGAT	<i>penA</i> D345del
345_R	GATAAACGTGGGTATCTTGTACGG	

Los nucleótidos que contienen mutaciones (comparados a la secuencia *wt*) se encuentran subrayados.

5.2.3. Secuenciamiento por Sanger del gen 23S ARNr de *N. gonorrhoeae*

La selección previa de cepas mutantes para el gen 23S ARNr en las posiciones C2611T y/o A2059G se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR).

Se amplificaron por PCR convencional los 4 alelos del ARNr 23S utilizando los *primers* enumerados en la tabla 4, los *primers* gonrRNA-F

(forward) se emparejaron con *primers* específicos rRNA_1, rRNA_2, rRNA_3 y rRNA_4 (reverse) para la amplificación de los alelos 1 a 4, respectivamente (63). Las condiciones de la PCR convencional se establecieron en 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1,5 minutos a 66 °C (alelos 2 y 3) o 68 °C (alelos 1 y 4) para la hibridación y 2,5 minutos de elongación a 72 °C durante 30 ciclos. Luego de obtener los amplicones correspondientes a los cuatro alelos en la primera amplificación, se utilizaron los *primers* gonrRNA-F y gonrRNA-R2 para una segunda amplificación y posterior secuenciamiento. Las condiciones para esta segunda PCR fueron 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto a 59°C para hibridación y 1 minuto de elongación a 72°C durante 35 ciclos.

Las muestras amplificadas con éxito fueron enviadas para secuenciación mediante el método Sanger. Los electroferogramas se analizaron comparándolos con la secuencia *wt* de *N. gonorrhoeae* de referencia M32091 mediante alineamiento múltiple utilizando la herramienta de análisis de secuencia EMBL-EBI Job Dispatcher (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher>) y se identificó la presencia de las mutaciones C2611T y/o A2059G en cada uno de los cuatro alelos del gen 23S ARNr.

Tabla 4. *Primers* utilizados para la amplificación de los 4 alelos del gen ribosomal de *N. gonorrhoeae* por PCR convencional

<i>Primers</i>	Secuencia primer (5' a 3')	Tamaño del producto (pb)
gonrRNA-F	ACGAATGGCGTAACGATGGCCACA	712
gonrRNA-R2	TTCGTCCACTCCGGTCCTCTCGTA	
rRNA_1	TCAGAATGCCACAGCTTACAAACT	2,054
rRNA_2	GCGACCATAACAAACACCCACAGG	2,240
rRNA_3	GATCCCGTTGCAGTGAAGAAAGTC	2,217
rRNA_4	AACAGACTTACTATCCCATTCAGC	1,847

5.2.4. Secuenciamiento por Sanger del gen *penA* de *N. gonorrhoeae* y alineamiento múltiple

Para detectar mutaciones adicionales en el gen *penA* se amplificó mediante PCR la tercera porción del gen y posteriormente el producto de amplificación se secuenció por el método de Sanger. Las condiciones del PCR empleadas fueron las siguientes: 1 minuto para denaturación a 94°C, 1.5 min a temperatura de hibridación a 60°C y 2.5 minutos a 72°C para elongación por 35 ciclos.

Tabla 5. *Primers* utilizados para la amplificación del gen *penA* de *N. gonorrhoeae* por PCR convencional

<i>Primers</i>	Secuencia primer (5' a 3')	Posición de nucleótidos
PenA-A3	GCCGTAACCGATATGATCGA	1003-1022
PenA-B3	CGTTGATACTCGGATTAAGACG	1844-1865

Una vez obtenidas las secuencias de *penA* de las cepas, se realizó un alineamiento múltiple de los aminoácidos del PBP-2, utilizando el programa EMBL-EBI Job Dispatcher (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher>) para detectar mutaciones.

Posteriormente se analizó la variabilidad en las regiones que contienen mutaciones de nucleótidos, pero codifican para el mismo aminoácido, para lo cual se generó un logo de secuencia a partir de los resultados de la secuenciación.

5.2.5. Cepas control utilizadas

Se realizó la reactivación de seis cepas control de *N. gonorrhoeae*, las cuales fueron enviadas desde el laboratorio del Dr. Klausner ubicado en la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA, EEUU), dichas cepas fueron enviadas en medio criopreservante manteniendo la cadena de frío y almacenadas posteriormente a -80°C. Las cepas control seleccionadas incluyeron dos cepas con resistencia conocida a azitromicina (una con baja resistencia y otra con elevada resistencia), dos cepas con resistencia confirmada a ceftriaxona y cefixime y dos cepas control sensibles a los

antibióticos mencionados. En la tabla 6 se encuentran las características y estado de resistencia y susceptibilidad de las seis cepas control utilizadas.

Las cepas fueron reactivadas mediante inoculación directa en agar chocolate incubación durante 24 a 48 horas en atmosfera enriquecida con CO₂, y una temperatura de 37°C. La prueba de susceptibilidad fue evaluada mediante E-test (BioMérieux Inc., Francia) y se interpretaron los MICs para confirmar resistencia de acuerdo con los valores establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI).

El ADN de las cepas fue extraído con el kit comercial QIAamp DNA minikit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La caracterización de cepas control se llevó a cabo mediante el ensayo MAMA-qPCR para identificar las mutaciones de interés relacionadas a resistencia a azitromicina y ceftriaxona en los genes 23S ARNr y *penA* respectivamente. Finalmente se amplificaron las muestras seleccionadas por PCR convencional. Los productos de amplificación fueron enviadas para secuenciamiento mediante el método de Sanger para corroborar la presencia de las mutaciones previamente detectadas.

Tabla 6. Cepas control de *N. gonorrhoeae* utilizadas para los ensayos moleculares de resistencia

Cepa	Fenotipo de resistencia	MIC	Mutación
0202	Resistencia moderada a azitromicina	16 µg/ml	C2611T
0181	Resistencia elevada a azitromicina	256 µg/ml	A2059G
FQ009	Susceptible a azitromicina	0.5 µg/ml	<i>wt</i>
FQ069	Susceptibilidad reducida cefixime	0.250 µg/ml	D345del
FQ096	Susceptibilidad reducida ceftriaxona	0.250 µg/ml	D345del / G545S
FQ093	Susceptible a ceftriaxona	<0.125 µg/ml	<i>wt</i>

5.3. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATA versión 18.0 (Stata Corporation, College Station, Texas, EE. UU). Se realizó el análisis descriptivo de la variable año de colección, utilizando frecuencias absolutas y relativas. Se calculó la proporción de cepas de *N. gonorrhoeae* que contenían mutaciones en los genes 23S ARNr y *penA* mediante MAMA-qPCR. Además, se realizó un subanálisis para comparar el acuerdo entre los resultados de MAMA-qPCR disponibles con las muestras de *penA* secuenciadas, para detectar las mutaciones D345del y G545S. Se utilizó el método binomial exacto para determinar los valores Kappa. Para evaluar la asociación entre el periodo de colección (2013 – 2016 o 2019 – 2021) y el resultado de las mutaciones para MAMA-qPCR del gen *penA* (D345del o G545S) se construyó una tabla de contingencia excluyendo resultados de muestras no amplificadas, se calculó porcentajes y prueba de chi2 para detectar asociación global y prueba exacta de Fisher el cual es un método no paramétrico.

6. RESULTADOS

6.1. Selección del método de extracción de ADN por columnas mediante amplificación del gen *gyrA*

Se utilizó una muestra (ID 21512) colectada en buffer AC2, esta muestra fue extraída por diferentes kits de extracción (QIAamp DNA minikit, GeneJET Genomic DNA Purification kit y High Pure PCR Template Preparation Kit), utilizando diferentes modificaciones añadidas al procedimiento del fabricante en algunos casos (detalladas en la tabla 1). La figura 8 muestra los resultados de visualización del gel de agarosa de los productos amplificados en transiluminador UV.

Debido a que la misma muestra fue extraída por diferentes kits comerciales, la eficiencia en la extracción se logró identificar mediante las características de las bandas de ADN en el gel de agarosa además de seleccionar las mejores condiciones para el PCR convencional. Los resultados obtenidos indicaron que las mejores condiciones para amplificar las muestras de *N. gonorrhoeae* fueron: 1.5 mM MgCl₂ y una temperatura de 60°C (figura 8, gel A). Por otro lado, el kit de extracción que ofreció mejores resultados a dichas condiciones fue el kit QIAamp DNA minikit (Qiagen). Los resultados indican que duplicar el volumen de muestra y de proteinasa K (400 µl de muestra y 40 µl de proteinasa K) con este kit arroja mejores resultados que con los otros kits de extracción.

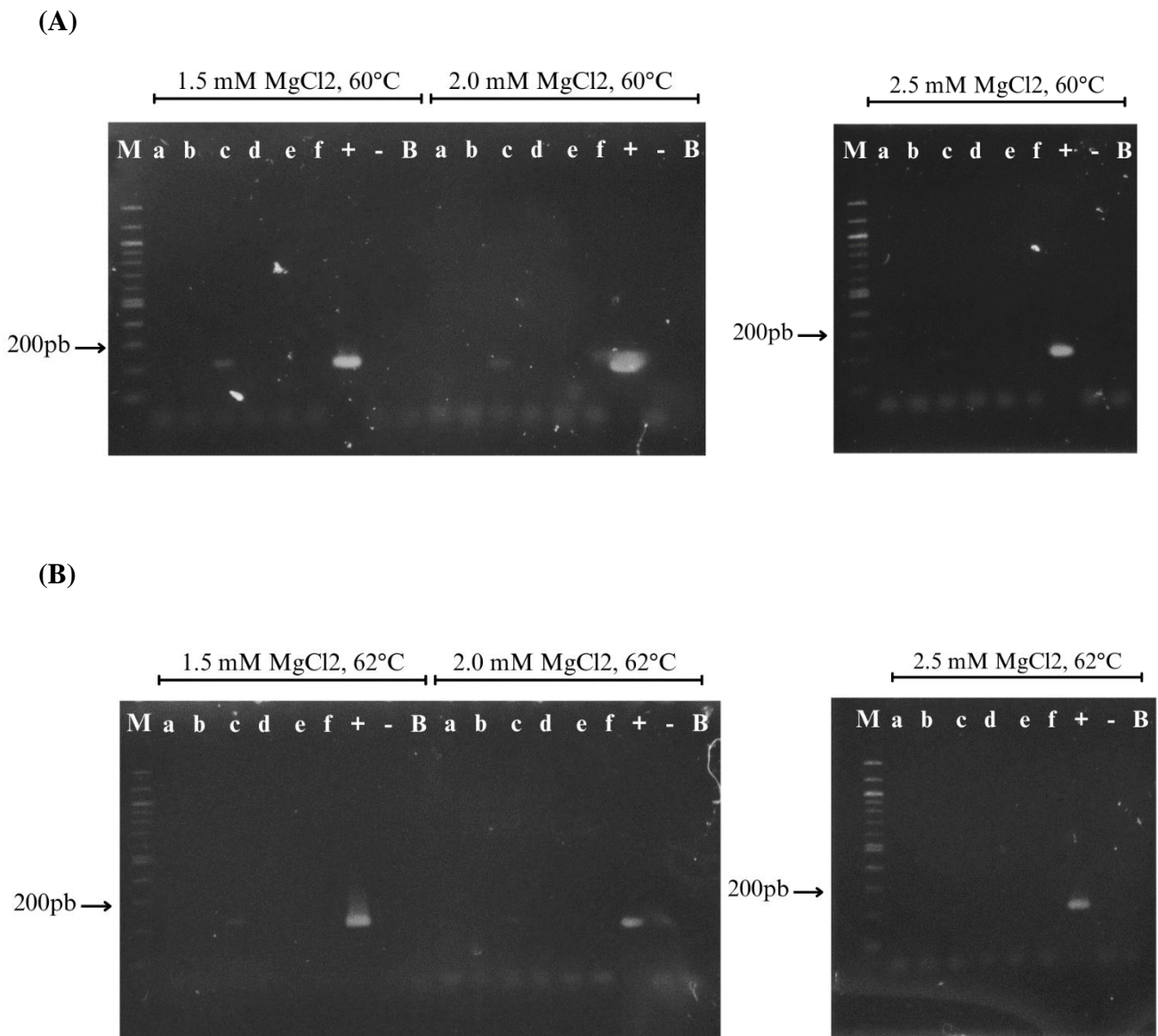


Figura 8. Productos de la amplificación por PCR de la muestra código 21512 por diferentes métodos de extracción.

Se utilizaron *primers* para amplificar el gen *gyrA* de *N. gonorrhoeae*. Las letras “a – f” representan las condiciones de extracción para la muestra ID 21512 indicados en la tabla 1, las figuras (A) y (B) muestran los productos amplificados a diferentes concentraciones de MgCl₂ a temperaturas de 60°C y 62°C respectivamente.

M: Marcador 100pb; “a”: muestra 21512 extraída con kit QIAamp DNA minikit; “b”: muestra 21512 extraída con kit QIAamp DNA minikit modificado con doble volumen de muestra proteinasa y buffer ATL; “c”: muestra 21512 extraída con kit QIAamp DNA minikit modificado con doble volumen de muestra proteinasa; “d”: muestra 21512 extraída con kit GeneJET Genomic DNA modificado con doble volumen de muestra proteinasa y solución de lisis; “e”: muestra 21512 extraída con kit High Pure PCR; “f”: muestra 21512 extraída con kit GeneJET Genomic DNA; “+”: control positivo *N. gonorrhoeae*; “-”: control negativo (ADN humano); B: blanco.

6.2. Amplificación del gen 23S ARNr en muestras positivas para *N. gonorrhoeae* extraídas por el método de fenol – cloroformo

Se utilizaron 6 diferentes muestras positivas para *N. gonorrhoeae* que fueron extraídas por el método de fenol cloroformo (ver Anexo 1), dichas muestras fueron utilizadas para amplificación por PCR convencional del gen 23S ARNr utilizando los *primers* gonrRNA-F y gonrRNA-R2 detallados en la tabla 2. Se decidió amplificar un segundo gen para evaluar la eficacia de este método ya que el producto era de un tamaño de 700pb. Como resultado se obtuvo amplificación en 5/6 muestras (figura 9). 1

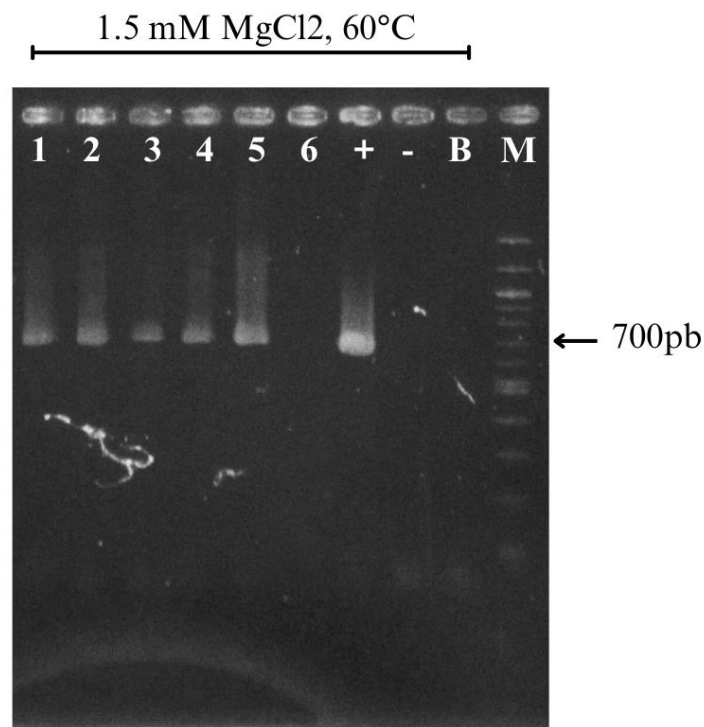


Figura 9. Productos de la amplificación por PCR con *primers* que amplificaron el gen ribosomal mediante el método de Fenol – cloroformo.

Las muestras utilizadas fueron enumeradas del 1 al 6. “M”: Marcador 100pb, “+”: control positivo *N. gonorrhoeae*, “-”: control negativo (ADN humano), “B”: blanco.

Se consideró que el método de Fenol – Cloroformo tenía mejores resultados en cuanto a concentración de ADN y una banda más nítida que los métodos de extracción con kit, por lo que se eligió como el método de extracción para el resto de las muestras a las condiciones previamente estandarizadas de 1.5 mM MgCl₂ y una temperatura de 60°C. La figura 9 muestra los resultados de amplificación por método de Fenol – Cloroformo de las 6 muestras.

6.3. Detección de mutaciones en el gen 23S ARNr por el ensayo MAMA-qPCR

Se procesaron un total de 124 muestras de ADN extraídas del buffer de transporte de AC2 por método de fenol cloroformo. La amplificación se consideró exitosa cuando el punto de corte era menor de 40 ($C_T < 40$ ciclos). Se utilizaron *primers* para amplificar las posiciones 2611 y 2059 del gen ribosomal. Para la posición 2059, el 41.94% (n=52) amplificó exitosamente y de estas, el 3.8% (n=2) presentó la mutación A2059G asociada a elevada resistencia a azitromicina. Entre las muestras que amplificaron, no se encontraron mutaciones que contenían la mutación en la posición C2611T que se correlaciona a resistencia baja a moderada a azitromicina. En la tabla 7 se muestran los porcentajes de muestras mutantes detectadas en el gen 23S ARNr, los valores fueron calculados en base a las muestras que amplificaron.

Tabla 7. Proporción de muestras mutantes detectadas mediante el ensayo de MAMA-qPCR

Posición en el gen 23S ARNr	Muestras que no amplificaron n (%)	Muestras que amplificaron n (%)	Mutantes detectadas n (%)	Mutación
2611	95 (76.6%)	29 (23.4%)	0 (0.00%)	C → T
2059	72 (58.1%)	52 (41.9%)	2 (3.8%)	A → G

6.4. Detección de mutaciones en los codones D345~~del~~ y G545S en el gen *penA* por el ensayo MAMA-qPCR

Se procesaron un total de 86 muestras de ADN extraídas del buffer de transporte de AC2 por método de fenol cloroformo. En la tabla 8 se muestran los resultados de la amplificación y detección de mutaciones en dos posiciones del gen *penA* de *N. gonorrhoeae* (codones 345 y 545). La amplificación se consideró exitosa con un punto de corte de $C_T < 40$ ciclos. Para el codón 345, el 43.02% (n=37) amplificó exitosamente y de estas, el 13.5% (n=5) presentó la mutación D345~~del~~, asociada a alelos en mosaico del gen *penA* y por ende a la disminución de susceptibilidad en cefalosporinas. Para el codón 545, el 62.79% (n=54) amplificaron exitosamente y de este grupo, el 7.41% (n=4) tuvo como resultado la sustitución G545S, también relacionada con susceptibilidad disminuida a cefalosporinas. Los porcentajes de muestras mutantes detectadas fueron calculados en base a las muestras que amplificaron.

Tabla 8. Detección de mutaciones en el gen *penA* mediante el ensayo MAMA-qPCR.

(N=86)

Posición en el gen <i>penA</i> (codón)	Muestras que no amplificaron n (%)	Muestras que amplificaron n (%)	Mutantes detectadas n (%)	Mutación
345	49 (57.0%)	37 (43.0%)	5 (13.5%)	<u>D</u> 345del
545	32 (37.2%)	54 (62.8%)	4 (7.4%)	G545S

6.5. Análisis del secuenciamiento de muestras mutantes en la posición A2059G para el gen 23S ARNr de *N. gonorrhoeae*

De las 124 muestras previamente analizadas para detectar mutaciones en el gen 23S ARNr de *N. gonorrhoeae*, se encontró que 02 muestras presentaron la mutación A2059G, solo una de ellas se logró amplificar (ID 12702) utilizando los *primers* de la tabla 2 mediante PCR convencional para amplificar cada uno de los 4 alelos del gen (la segunda muestra no produjo productos de amplificación por PCR, por lo que no pudo ser secuenciada). Luego del análisis de los electroferogramas del secuenciamiento, se encontró que los 4 alelos del gen 23S ARNr pertenecientes a dicha muestra contenían la mutación A2059G validando así los resultados obtenidos por PCR en tiempo real. En la tabla 9 se muestran las secuencias de nucleótidos de los 4 alelos del gen 23S ARNr secuenciados, resaltando en color rojo el nucleótido “G” representando la mutación respectiva en la posición 2059 correlacionada a resistencia elevada a azitromicina.

Tabla 9. Mutaciones encontradas en las secuencias de la muestra ID 12702R para los 4 alelos del gen 23S ARNr

ID	Gen 23S ARNr	Secuencia (5'-3')	Mutación
12702	Alelo 1	ACGGAGAGACCCCGT	A → G
	Alelo 2	ACGGAGAGACCCCGT	A → G
	Alelo 3	ACGGAGAGACCCCGT	A → G
	Alelo 4	ACGGAGAGACCCCGT	A → G

6.6. Análisis del secuenciamiento de muestras con mutaciones en el gen *penA* de *N. gonorrhoeae* que confieren resistencia a ceftriaxona y a cefixime

Se realizó un PCR convencional en las 124 muestras de ADN rectales positivas para *N. gonorrhoeae*, sin embargo, solo 27 de ellas produjeron productos de amplificación para posterior secuenciamiento por Sanger de la tercera porción del gen *penA*. La figura 10 incluye todas las mutaciones de aminoácidos encontradas en las muestras secuenciadas (tercera porción del gen *penA*), desde la posición del codón 341 hasta el codón 555. Se ha considerado agregar en +1 las posiciones a partir del codón 345 debido a la inserción del Aspartato (D345ins) en el codón 346 de los alelos No-mosaicos del gen *penA*. Del total, se detectó la inserción D345ins en 16 (59.3%) muestras y de estas mutantes un total de 12/16 (75.0%) fueron colectadas entre los años 2019 – 2021.

Respecto a los alelos en mosaico relacionados a sensibilidad disminuida a ceftriaxona, 10 (37.0%) muestras contenían la delección D345~~del~~ relacionada a cepas con *penA* en mosaico; adicionalmente, 8 (29.6%) muestras presentaron la sustitución G545S. Respecto a las sustituciones relacionadas a susceptibilidad disminuida a cefixime, se detectaron mutaciones a nivel de los codones G375T, A376P y E377K en 11 (40.74%) muestras; las mutaciones A501T y P551L se detectaron en 3 (11.11%) muestras y la mutación en G542S se detectó solamente en 1 (3.70%) muestra perteneciente al año 2020. Todas las 27 muestras secuenciadas presentaron la sustitución F504L y A510V; adicionalmente, 8 (29.6%) muestras tenían la sustitución de N512Y.

6.7. Comparación de resultados entre el ensayo MAMA-qPCR y el secuenciamiento por Sanger para mutaciones en mosaico del gen *penA*

Los resultados obtenidos de la amplificación por MAMA-qPCR de los codones 345 y 545 con los resultados del secuenciamiento por Sanger de las muestras que amplificaron, fueron comparados para hallar el porcentaje de concordancia, se realizó la comparación de un total 13 muestras para el codón 345 y 12 muestras para el codón 545, de las cuales se tenía información tanto para MAMA-qPCR y para secuenciamiento (ver tabla 10). Para la mutación D345*del* encontrada en el codón 345, el porcentaje de concordancia total y el coeficiente Kappa fueron del 84,6 % (intervalo de confianza [IC] del 95 %: 54,6 % – 98,1 %) y 0,69 (IC 95%: 0,33 – 1,00) respectivamente. Con respecto a la mutación G545S en el codón 545, se obtuvieron resultados similares, con una mejora en el porcentaje de concordancia general del 91,7 % (IC del 95 %: 61,5 % – 99,8 %) y un valor Kappa de 0.82.

Tabla 10. Desempeño del ensayo MAMA-qPCR en la detección de mutaciones en el gen *penA* comparado al secuenciamiento por Sanger

(1)	Secuenciamiento del codon 345		Total	Porcentaje de concordancia total (95% CI)	Coeficiente Kappa (95% CI)
	Resultado <i>wt</i>	Resultado mutante			
MAMA-qPCR 345 (resultado <i>wt</i>)	6	2	8	84.6% (54.6% - 98.1%)	0.69 (0.33 - 1.00)
MAMA-qPCR 345 (resultado mutante)	0	5	5		
Total	6	7	13		
(2)	Secuenciamiento del codon 545		Total	Porcentaje de concordancia total (95% CI)	Coeficiente Kappa (95% CI)
	Resultado <i>wt</i>	Resultado mutante			
MAMA-qPCR 545 (resultado <i>wt</i>)	7	1	8	91.7% (61.5% - 99.8%)	0.82 (0.49 - 1.00)
MAMA-qPCR 545 (resultado mutante)	0	4	4		
Total	7	5	12		

6.8. Variabilidad de nucleótidos en el codón 542 y 551 del gen *penA*

Para evaluar la variabilidad en las regiones que codifican los codones 542 (posición 1624 – 1626) y 551 (posición 1651 – 1653) del gen *penA*, se generó un logo de secuencia a partir de los resultados del secuenciamiento. En la figura 11 se observa la variabilidad en 2 alineamientos de aproximadamente 40 nucleótidos (eje X), la altura de cada letra graficada en el eje Y (bits) representa la conservación de cada nucleótido en las posiciones. Las posiciones altamente conservadas (sin variabilidad de nucleótidos) aparecen con una letra única alta (aproximadamente 1.8 – 2 bits) indicando que prácticamente todas las muestras llevan el mismo nucleótido en esas columnas.

En la figura 11 (A) se realizó el análisis de variabilidad del alineamiento de las 26/27 muestras secuenciadas que codificaron para el aminoácido “glicina”, a partir de la posición 1609 en el gen (posición 1 en eje X). En la posición 18 (tercer nucleótido del codón 542), las letras C/T relejan un polimorfismo GGC→GGT para glicina, el nucleótido C está en aproximadamente 60% de las cepas, mientras que T en el 40% restante. La predominancia de GGC frente a GGT en esta posición se visualiza con claridad resaltando la coexistencia de ambas variantes en las cepas analizadas, aunque codificando para el mismo aminoácido glicina.

Por otro lado, en la figura 11 (B) se puede observar el análisis de variabilidad del alineamiento de las 24/27 muestras secuenciadas que codificaron para el aminoácido “prolina”, contadas a partir del nucleótido 1617 en el gen (posición 1 en eje X). En la posición 37 (tercer nucleótido del codón 551), las letras G/C relejan un polimorfismo CCG→CCC para prolina, el nucleótido G está en aproximadamente 85% de las cepas, mientras que C en el 15% restante. Existe

una predominancia de CCG frente a CCC en esta posición, ambos codones codifican el mismo aminoácido prolina.

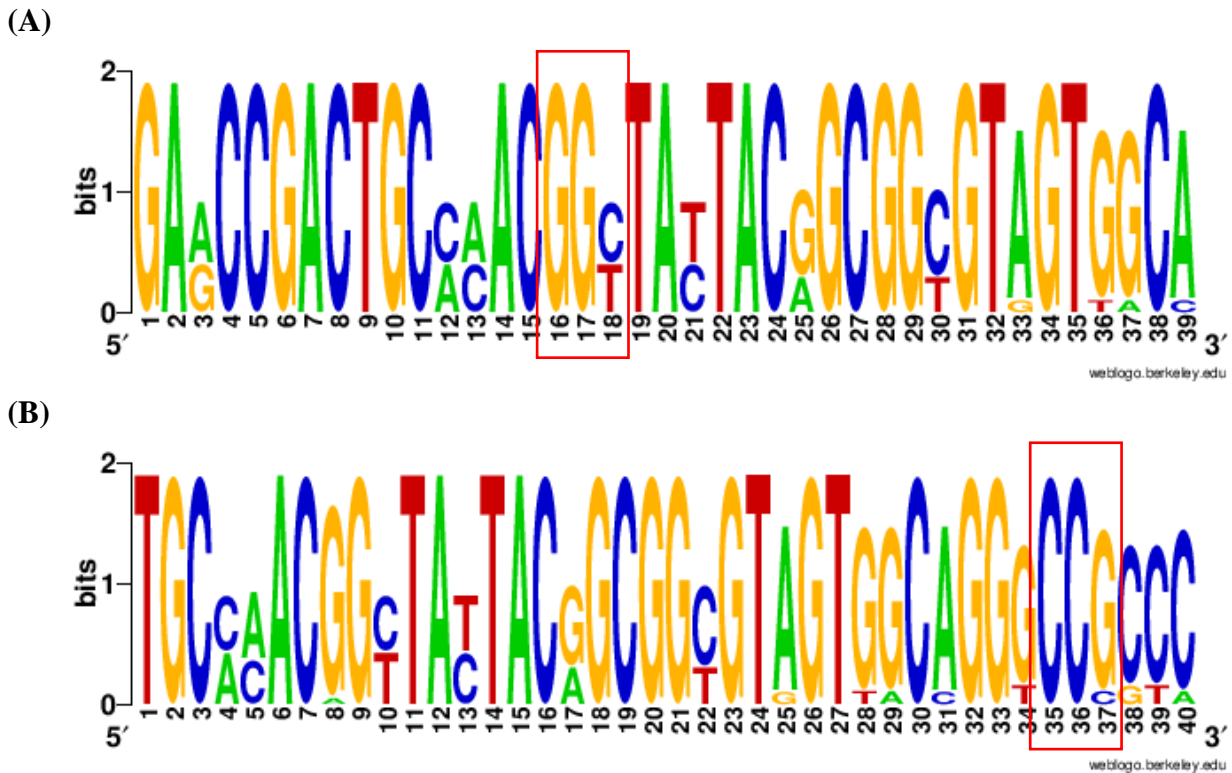


Figura 11. Variabilidad de nucleótidos en los codones 542 y 551 del gen *penA* de *N. gonorrhoeae*. Se utilizó el programa WebLogo para la creación de las figuras (70).

6.9. Proporción de mutaciones en los genes *penA* y 23S ARNr entre periodo de años 2013 – 2016 vs 2019 – 2021

En la figura 12 se muestra la frecuencia de mutaciones de los alelos *wt* y mutante de *penA* en dos posiciones clave, las cuales fueron detectadas mediante MAMA-qPCR (D345del y G545S) entre los periodos 2013 – 2016 y 2019 – 2021. Entre los años 2013 – 2016 se encontró que el 100% de las cepas amplificadas presentaron alelos *wt* en los codones 345 y 545, mientras que entre los años

2019 – 2021 se observó un 85.3% de cepas *wt* y un 14.7% de cepas mutantes con la delección D345del; y un 88.6% de cepas *wt* y un 11.4% de cepas mutantes en el codón G545S. Aunque se observa un aumento de mutantes en el segundo periodo (2019 – 2021) para ambos codones, las diferencias no alcanzaron significancia estadística para D345del ($p=0.573$) ni para G545S ($p=0.125$), por lo que no puede confirmarse un verdadero incremento de las variantes mosaico de *penA* entre estos periodos temporales.

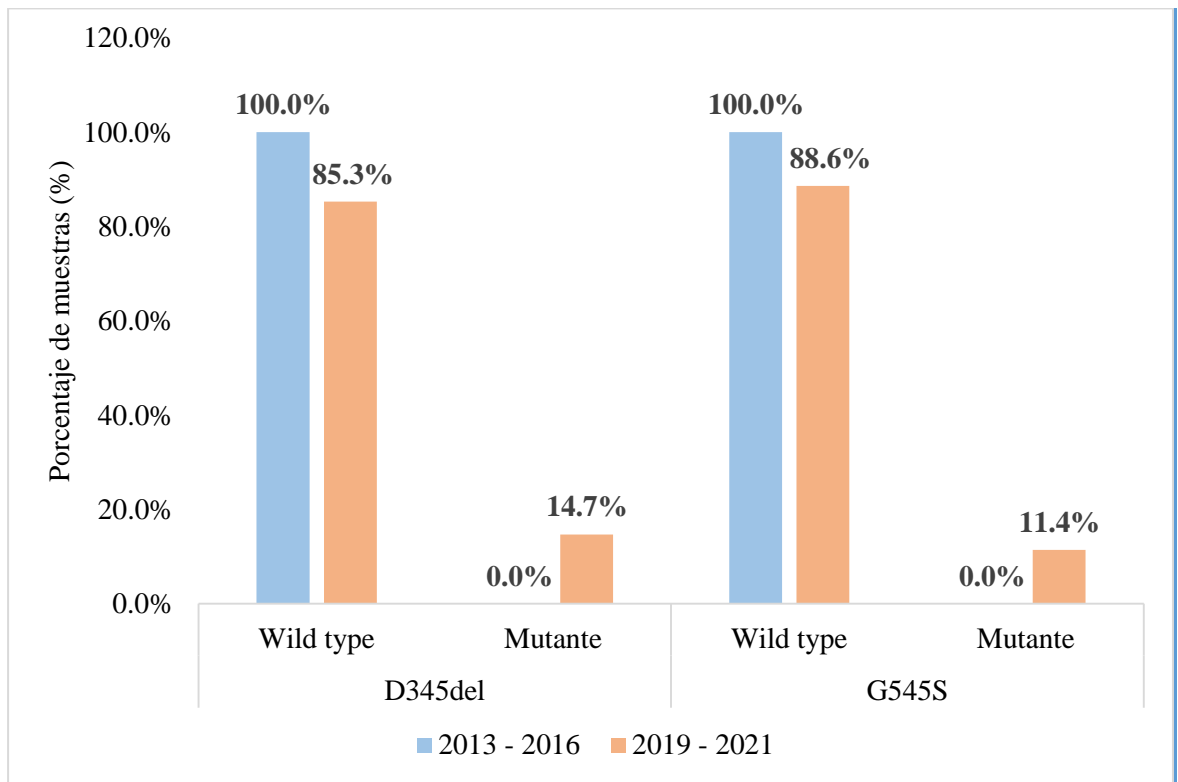


Figura 12. Proporción de mutaciones D345del y G545S en el gen *penA* de *N. gonorrhoeae*. Periodo de años 2013 – 2016 vs 2019 – 2021.

7. DISCUSION

En el presente trabajo de investigación, se han detectado mutaciones en los genes 23S ARNr y *penA* de *N. gonorrhoeae*, usando muestras rectales de pacientes HSH, dichas mutaciones están relacionadas con susceptibilidad disminuida a cefalosporinas (cefixime y ceftriaxona) y con resistencia a azitromicina.

Del total de 124 muestras analizadas por MAMA-qPCR para mutaciones en el gen 23S ARNr, 52 muestras amplificaron con los *primers* dirigidos a la mutación A2059G; de estas, la mutación A2059G se detectó en 2 (3.8%) muestras rectales, esto constituye una señal de alerta en nuestra población de estudio, ya que esta mutación está asociada a elevada resistencia a azitromicina con un MIC > 256 µg/ml (15). Siendo el presente trabajo el primer reporte del hallazgo de esta mutación en cepas pertenecientes a muestras de pacientes HSH provenientes de los distritos de Lima (Barranco e Independencia) y Callao, resaltando la importancia de implementar un programa de vigilancia molecular en este patógeno y evidenciar las diversas mutaciones que podrían existir en el resto de la población. La presencia de la mutación A2059G en los 4 alelos del gen 23S ARNr fue confirmada por secuenciamiento, esto refuerza el vínculo que existe entre el número de alelos y el grado de resistencia previamente reportados en diversos estudios, los cuales indican que la existencia de la mutación en al menos 3 alelos predice de manera confiable la elevada resistencia a azitromicina (15,25); por otro lado, Wang *et al.* realizaron un estudio sistemático, confirmando que esta mutación es el único factor que resulta directamente en elevada resistencia a azitromicina en *N. gonorrhoeae* (61). Si bien los métodos clásicos de cultivo y antibiograma (dilución en agar, E-test) son ampliamente usados a nivel clínico y en investigación, su baja sensibilidad en muestras extragenitales (faríngeo o rectal) y el tiempo de respuesta limitan su utilidad para la toma de decisiones a nivel clínico, pudiendo enmascarar la verdadera prevalencia de resistencia en poblaciones clave (71,72). En este

contexto, la incorporación de ensayos moleculares que detecten mutaciones de importancia clínica, permitirá optimizar el tratamiento, reducir el uso inadecuado de antibióticos y prevenir la diseminación de cepas resistentes. En la presente investigación se ha comprobado que el ensayo MAMA-qPCR permite detectar mutaciones directamente en muestras clínicas rectales, sin necesidad de utilizar el cultivo, lo que la convierte en una alternativa más rápida y eficaz para la detección de resistencia (69,73).

De las 86 muestras procesadas por MAMA-qPCR para el gen *penA*, amplificaron 37 muestras con los *primers* de la reacción D345del y se detectó que el 13.5% contenía la delección D345del y de las 54 muestras que amplificaron con los *primers* de la mutación G545S, se detectó dicha mutación en el 7.41%. Ambas mutaciones son marcadores característicos de alelos en mosaico de *penA*, los cuales han sido implicados en la disminución de susceptibilidad en cefalosporinas de tercera generación (56,74). En consistencia con los resultados de esta investigación, Grad *et al.* han evidenciado que la expansión de los alelos en mosaico del gen *penA* han impulsado un incremento global en el MIC de aislados de ceftriaxona y cefixime (75). Mientras que Ohnishi *et al.* describieron una cepa aislada en Japón de *N. gonorrhoeae* con alta resistencia a ceftriaxona y cefixime que contenía D345del y G545S en un alelo en mosaico (76). Estructuralmente la mutación G545S introduce cambios conformacionales en el dominio transpeptidasa de la PBP-2, reduciendo así su afinidad por los antibióticos. Singh *et al.* demostraron que los ajustes en el sitio activo son críticos para el fenotipo resistente (66,68).

La comparación entre el ensayo MAMA-qPCR para la detección de la delección D345del y G545S en *penA* y el secuenciamiento (tomando como referencia el secuenciamiento por Sanger) muestra coeficientes Kappa que indican un acuerdo sustancial para la delección D345del (0.69) y un acuerdo casi perfecto para la mutación G545S (0.82). Sin embargo solo se pudo hacer esta comparación en 13 muestras para la delección D345del y en 12

muestras para la mutación G545S, dando como resultado intervalos de confianza amplios, esto debido a que la cantidad de muestras que amplificaron para posterior secuenciamiento fue baja, esto resaltaría la necesidad de optimizar la extracción de ADN y condiciones de PCR en muestras rectales, donde la cantidad de ADN bacteriano recuperado de *N. gonorrhoeae* es típicamente bajo (77). No obstante, estos resultados indicarían que es posible utilizar el ensayo MAMA-qPCR como herramienta de detección de mutaciones directamente de muestras clínicas. En tal sentido, se hacen necesarios ensayos adicionales que puedan validar la consistencia en esta aseveración con una mayor cantidad de muestras extragenitales, ya que se han reportado algunas reacciones cruzadas con otras especies de *Neisseria* en muestras faríngeas mediante el uso de MAMA-qPCR sobre todo al detectar la delección D345del (69). La búsqueda e implementación de ensayos moleculares que detecten mutaciones directamente de muestras clínicas se ha convertido en uno de los principales objetivos en la resistencia en *N. gonorrhoeae*, Peterson *et al.* validaron un ensayo multiplex de qPCR para predecir la susceptibilidad a cefalosporinas en muestras clínicas positivas para *N. gonorrhoeae*, indicando que, para evitar la detección de falsos positivos debido a las cepas comensales, es recomendable utilizar este qPCR multiplex en muestras que hayan sido previamente caracterizadas como positivas para *N. gonorrhoeae* mediante NAATs (78), tal como lo hemos utilizado en este estudio.

La baja tasa de amplificación observada tanto en el ensayo MAMA-qPCR como en la PCR convencional previa al secuenciamiento de las 124 muestras analizadas también podría explicarse por algún desajuste entre los *primers* utilizados y el ADN molde en regiones del target altamente variables. Se ha demostrado que incluso las variaciones de un solo par de bases en la región 3' podría reducir drásticamente la eficiencia de la PCR y llevar a falsos negativos, Stadhouders *et al.* encontraron que estos desajustes en la región 3' podrían reducir hasta 90% la eficiencia de la PCR (79). En *N. gonorrhoeae* esto se agrava en cepas

con alelos mosaicos de *penA*, ya que estas incorporan fragmentos de otras *Neisseria* y pueden acumular diversas sustituciones en la región de unión a los *primers* (80,81), lo que explicaría la baja tasa de amplificación en este estudio. Una posible solución podría ser ensayar paneles multiclonales que incluyan cepas *wild type*, mosaico y mutantes emergentes para medir eficiencia de cada primer, sin embargo, para esto se necesitarían ensayos adicionales.

Por otro lado, la presencia de fenol residual, dado que las muestras fueron extraídas por método de fenol cloroformo, puede inhibir drásticamente la PCR, ya que este compuesto actúa sobre la ADN polimerasa, reduciendo su actividad e incluso provocando fallos en la amplificación (82). Asimismo, Wilson *et al.* realizaron una revisión de los diferentes inhibidores de PCR presentes en extractos biológicos, incluyendo fenol y recomendando su completa eliminación mediante lavados o el uso de columnas para evitar falsos negativos debido a esta inhibición (83). Lo antes mencionado podría explicar la tasa de amplificación obtenida en los ensayos moleculares de este estudio, que podría evitarse en futuros estudios optimizando el paso de limpieza previo a la amplificación.

Los alelos en mosaico se distinguen por la acumulación de sustituciones de aminoácidos en la PBP-2, producto de eventos de recombinación inter-especies con otras *Neisseria*, Takahata *et al.* describieron por primera vez este tipo de recombinaciones en aislados clínicos de *N. gonorrhoeae* con susceptibilidad disminuida a cefixime y estructura en mosaico, reconociendo segmentos idénticos a *N. preflava*, *N. cinerea*, *N. flavescens* y *N. meningitidis*, confirmando la transferencia horizontal de ADN entre especies comensales y patógenas (84,85). En este estudio se han detectado 11 (40.7%) muestras con sustituciones que reflejan un patrón en mosaico, llegando a alcanzar hasta 32 sustituciones solo en la tercera porción del gen *penA* secuenciado (contando desde el codón 341 hasta el codón 555). De manera similar, Tomberg *et al.* realizaron un análisis molecular y estructural de

variantes mosaico de PBP-2, demostrando que estos alelos podrían contener hasta 63 sustituciones de aminoácidos, algunas de las cuales podrían estar localizadas en regiones críticas del sitio activo de las cefalosporinas, explicando la disminución de afinidad por el antibiótico (80). Además, estudios *in vivo* han demostrado que algunas variantes mosaico no solo confieren resistencia a ceftriaxona, sino que podrían incorporar mutaciones compensatorias que restauran el *fitness* bacteriano, ilustrando la dinámica evolutiva de *N. gonorrhoeae* bajo presión antimicrobiana; sin embargo, serán necesarias más investigaciones al respecto para poder identificar si las mutaciones compensatorias en cepas resistentes están presentes en todos los aislados de resistencia a cefalosporinas (86).

Esta investigación permitió identificar tres muestras con la mutación P551L, la cual está significativamente asociada con resistencia a ceftriaxona (87), en coexistencia con las mutaciones A501T y F504L. Estudios previos indican que la sustitución A501T, especialmente combinada en alelos no-mosaicos pueden contribuir significativamente a la disminución de susceptibilidad a cefalosporinas de espectro extendido (88,89). Asimismo, mutaciones específicas en el codón 551 han sido significativamente asociadas con la reducción de susceptibilidad a ceftriaxona, sugiriendo que las mutaciones a este nivel desempeñan un papel crítico en el sitio activo de la PBP-2 (76). De manera particular, la combinación de mutaciones F504L y P551S ha sido previamente relacionada con resistencia a penicilinas ya que producen la acilación del sitio activo de la PBP-2 (90). Sin embargo, en este estudio se ha identificado la combinación de mutaciones F504L y P551L, la cual no ha sido ampliamente documentada en la literatura. Esto resalta la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales que nos permitan comprender el impacto de estas dos mutaciones combinadas en la conformación estructural de la PBP-2 y el efecto que producen en la susceptibilidad antibiótica. Respecto a los codones que predicen la reducción de susceptibilidad a cefixime, se logró identificar mutaciones en los codones

críticos 375-377, A501T, G542S y P551L de la PBP-2, las cuales están estrechamente relacionadas con la disminución de susceptibilidad. Estudios previos han confirmado que la presencia de cualquier mutación en los codones mencionados, puede predecir la susceptibilidad a cefixime con una precisión de 98.5% (18,19). Específicamente la mutación A501T fue detectada en el 11.1% de las muestras secuenciadas, dicha mutación genera una mayor rigidez en el sitio activo de la PBP-2 reduciendo afinidad por las cefalosporinas y contribuyendo directamente al fenotipo de resistencia observado en estas cepas (81).

Los resultados obtenidos en los codones 542 (glicina) y 551 (prolina) del gen *penA* que no tuvieron ninguna variación a nivel de aminoácido, pero sí a nivel de nucleótido, podrían reflejar diferentes presiones selectivas o preferencias en el uso de codones (codon usage) específicas para *N. gonorrhoeae* (ver Anexo 5). En el análisis realizado en el codón 542, se evidencia la coexistencia de los codones GGC y GGT que codifican el aminoácido glicina, los cuales son observados en las muestras procesadas en un 60% y 40% respectivamente. Según los datos del Codon Usage Database (Kazusa DNA Research Institute) para *N. gonorrhoeae* FA1090, el codón GGC es más frecuente que GGT (46.7 por mil vs 15.2 por mil) en cepas silvestres, lo que podría indicar una preferencia selectiva hacia el uso de GGC en condiciones normales (91). De manera similar, en el codón 551 se observa una predominancia del codón CCG sobre CCC (19.4 por mil vs 15.0 por mil). La coexistencia de estos codones alternativos en las cepas secuenciadas, pese a que codifican para el mismo aminoácido, podría estar asociada a cambios adaptativos en respuesta a presión antibiótica o podrían presentar una adaptación local que contribuya a variaciones fenotípicas de resistencia a cefalosporinas (92). La importancia de estudiar estas variaciones en el *codon usage* radica en la influencia que podría presentar en la evolución molecular de *N. gonorrhoeae*. De esta manera la evaluación del uso de codones correlacionado a los

hallazgos de mutaciones en los nucleótidos anteriormente mencionados no solo aporta información adicional para comprender la evolución de cepas circulantes, sino también podría guiar futuras investigaciones dirigidas a la optimización de herramientas moleculares y bioinformáticas que nos ayuden a comprender y detectar a tiempo la resistencia antibiótica.

8. CONCLUSIONES

- Se logró detectar la mutación A2059G en el gen 23S ARNr de *N. gonorrhoeae* asociada a resistencia elevada a azitromicina, en 2 muestras mediante el ensayo MAMA-qPCR, representando el 3.8%. El secuenciamiento adicional de una de estas 2 las muestras, corroboró la presencia de la mutación en los 4 alelos del gen 23S ARNr.
- No se identificaron mutaciones C2611T relacionadas a resistencia baja a moderada a azitromicina en ninguna de las muestras analizadas por MAMA-qPCR.
- Se detectaron mutaciones en los codones D345del (13.5%) y G545S (7.4%) del gen *penA* de *N. gonorrhoeae* mediante el ensayo MAMA-qPCR, indicando la presencia de *penA* en mosaico que confiere susceptibilidad reducida a cefalosporinas en las muestras estudiadas.
- Se detectaron mutaciones en el gen *penA* de *N. gonorrhoeae* de las 27 muestras secuenciadas, en los codones G375T, A376P y E377K (40.7%), A501T y P551L (11.1%) y G542S (3.7%) relacionadas a susceptibilidad disminuida a cefixime.
- Se comprobó la eficacia del ensayo MAMA-qPCR en la detección directa de mutaciones en los genes 23S ARNr y *penA* a partir de muestras clínicas rectales,

evidenciando una sólida concordancia con los resultados obtenidos mediante secuenciamiento por Sanger.

9. LIMITACIONES

Este estudio presentó las siguientes limitaciones:

1. Solo se utilizó una muestra para la estandarización y extracción de ADN con kits comerciales y su posterior evaluación comparativa, esta limitación impide generalizar los resultados obtenidos respecto al rendimiento de este método de extracción, ya que no se consideraron diferentes muestras ni se evaluó la reproducibilidad del procedimiento en otros casos. Por tanto, los resultados mostrados con los kits de extracción deben tomarse con cautela, podrían no reflejar el comportamiento del resto de muestras con estos kits.
2. Al menos la mitad de las muestras analizadas no amplificó adecuadamente debido a la baja cantidad de ADN recuperado del buffer de transporte empleado (AC2), lo que no permitió realizar el análisis de qPCR y secuenciamiento de todas las cepas pertenecientes al estudio, limitando la cantidad de data obtenida. La incompatibilidad del buffer AC2 con otras plataformas de amplificación sumado a la baja carga bacteriana de *N. gonorrhoeae* en muestras rectales, las cuales comúnmente son asintomáticas, podría haber resultado en un impacto negativo en la cantidad final de muestras rectales amplificadas (22,93).
3. No se ha realizado una prueba para control de extracción de ADN de las muestras (como por ejemplo amplificación del gen de Globina humana), lo que podría haber verificado la eficiencia del proceso de extracción en cada muestra y así poder detectar posibles inhibidores en la muestra dando resultado de falsos negativos. Adicionalmente, no se

incluyó un control interno de amplificación en el PCR de cada reacción, por lo tanto, no se ha podido confirmar que la reacción de PCR se llevó a cabo de manera correcta y así poder diferenciar entre la ausencia del target y de posibles fallos técnicos en las muestras no amplificadas.

4. La ausencia de resultados fenotípicos en las muestras analizadas, debido a que estas muestras clínicas fueron colectadas directamente en buffer de transporte AC2 y no en un medio de cultivo microbiológico, pudiendo recuperar solo el material genético de estas a partir de este buffer para ensayos moleculares. Por lo tanto, no se pudo hacer una correlación entre las mutaciones detectadas y el fenotipo resistente.

10. RECOMENDACIONES

1. Se recomiendan más ensayos de secuenciamiento adicionales que permitan corroborar la relación entre otras mutaciones de importancia y fenotipos de resistencia para *N. gonorrhoeae* en nuestro país.
2. Se sugiere la adición de controles internos de extracción como Globina humana y de PCR en futuros ensayos para discernir si las muestras no amplificaron debido a algún fallo durante la técnica de extracción o en el PCR.
3. Se recomienda ampliar la cantidad de muestras en futuras investigaciones, se debería incluir a futuro muestras de tipo faríngeo y genital adicionales a las muestras rectales empleadas en este trabajo para detectar cepas mutantes circulantes, esto ayudaría a tener un panorama más completo de los datos moleculares asociados a resistencia en *N. gonorrhoeae* actuales en población de riesgo.

11. ASPECTOS ETICOS

Este estudio se llevó a cabo después de la revisión y aprobación por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). El presente trabajo, registrado con el código SIDISI 208626, cuenta con la aprobación del el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la UPCH (CONSTANCIA 301 - 25 - 22 recibida el día 01/07/2022).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections [Internet]. 2021 [citado el 1 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>
2. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021 [Internet]. United States; 2021. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/STI-Guidelines-2021.pdf>
3. Kirkcaldy RD, Weston E, Segurado AC, Hughes G. Epidemiology of Gonorrhoea: A Global Perspective. *Sex Health*. septiembre de 2019;16(5):401–11.
4. Chan PA, Robinette A, Montgomery M, Almonte A, Cu-Uvin S, Lonks JR, et al. Extragenital Infections Caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: A Review of the Literature. *Infect Dis Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 [citado el 30 de marzo de 2020];2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4913006/>
5. Peters RPH, Nijsten N, Mutsaers J, Jansen CL, Morr  SA, van Leeuwen AP. Screening of oropharynx and anorectum increases prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection in female STD clinic visitors. *Sex Transm Dis*. septiembre de 2011;38(9):783–7.
6. Detels R, Green AM, Klausner JD, Katzenstein D, Gaydos C, Handsfield HH, et al. The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries. *Sex Transm Dis*. junio de 2011;38(6):503–9.

7. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJV, Maria-Engler SS, Bonini MG, et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nature Reviews Urology*. diciembre de 2014;11(12):672–87.
8. Newman DR, Rahman MM, Brantley A, Peterman TA. Rates of New Human Immunodeficiency Virus (HIV) Diagnoses After Reported Sexually Transmitted Infection in Women in Louisiana, 2000-2015: Implications for HIV Prevention. *Clin Infect Dis*. el 3 de marzo de 2020;70(6):1115–20.
9. Diaz A, Junquera ML, Esteban V, Martínez B, Pueyo I, Suarez J, et al. HIV/STI co-infection among men who have sex with men in Spain. *Euro Surveill*. el 3 de diciembre de 2009;14(48):19426.
10. Leon SR, Segura ER, Konda KA, Flores JA, Silva-Santisteban A, Galea JT, et al. High prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in anal and pharyngeal sites among a community-based sample of men who have sex with men and transgender women in Lima, Peru. *BMJ Open*. el 6 de enero de 2016;6(1):e008245.
11. Wi T, Lahra MM, Ndowa F, Bala M, Dillon JAR, Ramon-Pardo P, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. *PLoS Med* [Internet]. el 7 de julio de 2017 [citado el 9 de octubre de 2019];14(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5501266/>
12. Centers for disease control and prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017 [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/stats17/gonorrhea.htm>
13. Pan American Health Organization WHO. Epidemiological Alert, Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* [Internet]. 2018 feb. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50516>

14. Dougherty T, Koller A, Tomasz A. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;18(5):730–7.
15. Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2010;54(9):3812–6.
16. Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, et al. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 Gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother.* diciembre de 2002;46(12):3744–9.
17. Liao Y, Xie Q, Yin X, Li X, Xie J, Wu X, et al. *penA* profile of *Neisseria gonorrhoeae* in Guangdong, China: Novel *penA* alleles are related to decreased susceptibility to ceftriaxone or cefixime. *Int J Antimicrob Agents.* abril de 2024;63(4):107101.
18. Deng X, Klausner JD. Six *penA* Codons Accurately and Reliably Predict Cefixime-Reduced Susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis.* el 18 de febrero de 2020;221(5):851–2.
19. Deng X, Allan-Blitz LT, Klausner JD. Using the genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to cefixime to develop a molecular assay to predict cefixime susceptibility. *Sex Health.* septiembre de 2019;16(5):488–99.
20. Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J. Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. octubre de 2016 [citado el 31 de marzo de 2020];6(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5046686/>

21. Portilla C J. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* procesadas en el instituto nacional de salud, Lima, Perú. 1998-1999. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2003;20(4):216–9.
22. Quellon J, Vargas SK, Eguiluz M, Vasquez F, Durand D, Allan-Blitz LT, et al. Extra-genital *Neisseria gonorrhoeae* infections with genetic mutations conferring ciprofloxacin resistance among men who have sex with men and transgender women in Lima, Peru. *Int J STD AIDS*. marzo de 2023;34(4):245–50.
23. World Health Organization. WHO guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2016.
24. Jorge-Berrocal A, Mayta-Barrios M, Fiestas-Solórzano V. Resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(1):155–6.
25. Zhang J, van der Veen S. *Neisseria gonorrhoeae* 23S rRNA A2059G mutation is the only determinant necessary for high-level azithromycin resistance and improves in vivo biological fitness. *J Antimicrob Chemother*. el 1 de febrero de 2019;74(2):407–15.
26. Ministerio de Salud del Peru (MINSA). Directiva Sanitaria N° 030-MINSA/DGSP-V.01, Directiva Sanitaria para la atención médica periódica a las/os trabajadoras/es sexuales y HSH, [Internet]. 2009 [citado el 3 de enero de 2025]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/246221-650-2009-minsa>
27. Hook EW, Kirkcaldy RD. A Brief History of Evolving Diagnostics and Therapy for Gonorrhea: Lessons Learned. *Clin Infect Dis*. el 28 de septiembre de 2018;67(8):1294–9.
28. Lovett A, Duncan JA. Human Immune Responses and the Natural History of *Neisseria gonorrhoeae* Infection. *Front Immunol* [Internet]. el 19 de febrero de 2019 [citado el 12 de

febrero de 2020];9. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6389650/>

29. Masi AT, Eisenstein BI. Disseminated gonococcal infection (DGI) and gonococcal arthritis (GCA): II. Clinical manifestations, diagnosis, complications, treatment, and prevention. *Semin Arthritis Rheum.* febrero de 1981;10(3):173–97.
30. R García-Mendiola G, Aguilera-Arreola M, Contreras-Rodríguez A. *Neisseria gonorrhoeae*. *Revista chilena de infectología.* 2017;34(3):263–4.
31. Koneman E, Allen A. Koneman. *Diagnostico Microbiologico.* 6ta edicion. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2008. 1691 p.
32. Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* abril de 2018;16(4):226–40.
33. Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment: microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection - PubMed [Internet]. [citado el 9 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17682045/>
34. Zhu W, Tomberg J, Knilans KJ, Anderson JE, McKinnon KP, Sempowski GD, et al. Properly folded and functional PorB from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits dendritic cell stimulation of CD4+ T cell proliferation. *J Biol Chem.* el 13 de julio de 2018;293(28):11218–29.
35. Hedges SR, Mayo MS, Mestecky J, Hook EW, Russell MW. Limited local and systemic antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* during uncomplicated genital infections. *Infect Immun.* agosto de 1999;67(8):3937–46.

36. Platt DJ. Carbon dioxide requirement of *Neisseria gonorrhoeae* growing on a solid medium. *Journal of Clinical Microbiology*. el 1 de agosto de 1976;4(2):129–32.
37. Kellogg DS, Peacock WL, Deacon WE, Brown L, Pirkle CI. NEISSERIA GONORRHOEAE I.: Virulence Genetically Linked to Clonal Variation. *Journal of Bacteriology*. el 1 de junio de 1963;85(6):1274–9.
38. Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(1):15–25.
39. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*--2014. *MMWR Recomm Rep*. el 14 de marzo de 2014;63(RR-02):1–19.
40. Cornelisse VJ, Chow EPF, Huffam S, Fairley CK, Bissessor M, De Petra V, et al. Increased Detection of Pharyngeal and Rectal Gonorrhea in Men Who Have Sex With Men After Transition From Culture To Nucleic Acid Amplification Testing. *Sex Transm Dis*. 2017;44(2):114–7.
41. Barlow D. Culture of the gonococcus: a reliable gold standard? *Sex Transm Infect*. 2017;93(3):178.
42. Jacobsson S, Boiko I, Golparian D, Blondeel K, Kiarie J, Toskin I, et al. WHO laboratory validation of Xpert® CT/NG and Xpert® TV on the GeneXpert system verifies high performances. *APMIS*. diciembre de 2018;126(12):907–12.
43. Goldenberg SD, Finn J, Sedudzi E, White JA, Tong CYW. Performance of the GeneXpert CT/NG Assay Compared to That of the Aptima AC2 Assay for Detection of Rectal

- Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Use of Residual Aptima Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. el 1 de diciembre de 2012;50(12):3867–9.
44. Alexander S, Coelho da Silva F, Manuel R, Varma R, Ison C. Evaluation of strategies for confirming *Neisseria gonorrhoeae* nucleic acid amplification tests. *J Med Microbiol*. julio de 2011;60(Pt 7):909–12.
 45. Mayes J, Liyanarachchy N, Balm MND. Nucleic Acid Extraction from Residual Aptima Clinical Samples: Evaluation of Automated Platform To Enhance Workflow. *Journal of Clinical Microbiology*. el 1 de junio de 2017;55(6):1968–9.
 46. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. *Clin Microbiol Rev*. julio de 2014;27(3):587–613.
 47. Tanaka M, Nakayama H, Huruya K, Konomi I, Irie S, Kanayama A, et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. *Int J Antimicrob Agents*. enero de 2006;27(1):20–6.
 48. Kampmeier RH. Introduction of sulfonamide therapy for gonorrhea. *Sex Transm Dis*. junio de 1983;10(2):81–4.
 49. Costa-Lourenço APR da, Barros Dos Santos KT, Moreira BM, Fracalanza SEL, Bonelli RR. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. *Braz J Microbiol*. diciembre de 2017;48(4):617–28.
 50. Dunlop EMC. Gonorrhoea and the sulphonamides. *Br J Vener Dis*. junio de 1949;25(2):81–3.

51. Lewis DA. Global resistance of *Neisseria gonorrhoeae*: when theory becomes reality. *Curr Opin Infect Dis.* febrero de 2014;27(1):62–7.
52. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry.* el 18 de marzo de 2014;53(10):1565–74.
53. Fussenegger M, Rudel T, Barten R, Ryll R, Meyer TF. Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae* – a review¹. *Gene.* el 11 de junio de 1997;192(1):125–34.
54. Spratt B, Cromie K. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):699–711.
55. Day MJ, Spiteri G, Jacobsson S, Woodford N, Amato-Gauci AJ, Cole MJ, et al. Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC Infect Dis.* el 3 de diciembre de 2018;18(1):609.
56. Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, Yasuda M, Yokoi S, Ito SI, et al. Emergence and Spread of *Neisseria gonorrhoeae* Clinical Isolates Harboring Mosaic-Like Structure of Penicillin-Binding Protein 2 in Central Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2005;49(1):137–43.
57. Zhao Y, Le W, Genco CA, Rice PA, Su X. Increase in Multidrug Resistant *Neisseria gonorrhoeae* FC428-Like Isolates Harboring the Mosaic penA 60.001 Gene, in Nanjing, China (2017-2020). *Infect Drug Resist.* 2023;16:4053–64.

58. Raccagni AR, Ranzenigo M, Bruzzesi E, Maci C, Castagna A, Nozza S. *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Resistance: The Future of Antibiotic Therapy. *J Clin Med.* el 18 de diciembre de 2023;12(24):7767.
59. Jacobsson S, Golparian D, Oxelbark J, Kong FYS, Da Costa RMA, Franceschi F, et al. Pharmacodynamics of zoliflodacin plus doxycycline combination therapy against *Neisseria gonorrhoeae* in a gonococcal hollow-fiber infection model. *Front Pharmacol.* el 7 de diciembre de 2023;14:1291885.
60. Scangarella-Oman NE, Hossain M, Perry CR, Tiffany C, Powell M, Swift B, et al. Dose selection for a phase III study evaluating gepotidacin (GSK2140944) in the treatment of uncomplicated urogenital gonorrhoea. *Sex Transm Infect.* febrero de 2023;99(1):64–9.
61. Wang F, Liu J, Liu H, Huang J, Chen S, Chen X, et al. Evaluation of the accuracy of molecular assays targeting the mutation A2059G for detecting high-level azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: a systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Resist.* el 28 de diciembre de 2018;12:95–104.
62. Jacobsson S, Golparian D, Cole M, Spiteri G, Martin I, Bergheim T, et al. WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC >2 mg/L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe from 2009 to 2014. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(11):3109–16.
63. Ng LK, Martin I, Liu G, Bryden L. Mutation in 23S rRNA Associated with Macrolide Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* el 1 de septiembre de 2002;46(9):3020–5.
64. Nakagawa J, Tamaki S, Tomioka S, Matsushashi M. Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs

- of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *J Biol Chem.* 1984;259(22):13937–46.
65. Młynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. *Med Microbiol Immunol.* abril de 2020;209(2):95–108.
66. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. *Future Microbiol.* diciembre de 2012;7(12):1401–22.
67. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-Level Cefixime- and Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: Novel penA Mosaic Allele in a Successful International Clone Causes Treatment Failure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* el 14 de febrero de 2012;56(3):1273–80.
68. Singh A, Turner JM, Tomberg J, Fedarovich A, Unemo M, Nicholas RA, et al. Mutations in penicillin-binding protein 2 from cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* hinder ceftriaxone acylation by restricting protein dynamics. *J Biol Chem.* el 22 de mayo de 2020;295(21):7529–43.
69. Donà V, Smid JH, Kasraian S, Egli-Gany D, Dost F, Imeri F, et al. Mismatch Amplification Mutation Assay-Based Real-Time PCR for Rapid Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and Antimicrobial Resistance Determinants in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* el 27 de agosto de 2018;56(9):e00365-18.
70. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* junio de 2004;14(6):1188–90.

71. Potter RF, Ransom EM, Burnham CAD. The Next-Generation of *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Resistance Testing. *Clin Chem.* el 31 de marzo de 2021;67(4):573–5.
72. Meyer T, Buder S. The Laboratory Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current Testing and Future Demands. *Pathogens.* el 31 de enero de 2020;9(2):91.
73. Serra-Pladevall J, Caballero E, Roig G, Juvé R, Barbera MJ, Andreu A. Comparison between conventional culture and NAATs for the microbiological diagnosis in gonococcal infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* el 1 de diciembre de 2015;83(4):341–3.
74. Whiley DM, Limnios EA, Ray S, Sloots TP, Tapsall JW. Further Questions Regarding the Role of Mosaic *penA* Sequences in Conferring Reduced Susceptibility to Ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 2007;51(2):802–3.
75. Grad YH, Kirkcaldy RD, Trees D, Dordel J, Harris SR, Goldstein E, et al. Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime in the USA: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis.* marzo de 2014;14(3):220–6.
76. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone ▽. *Antimicrob Agents Chemother.* julio de 2011;55(7):3538–45.
77. Street TL, Sanderson ND, Barker L, Kavanagh J, Cole K, The GonFast Investigators Group null, et al. Target enrichment improves culture-independent detection of *Neisseria gonorrhoeae* and antimicrobial resistance determinants direct from clinical samples with Nanopore sequencing. *Microb Genom.* marzo de 2024;10(3):001208.

78. Peterson SW, Martin I, Demczuk W, Barairo N, Naidu P, Lefebvre B, et al. Multiplex real-time PCR assays for the prediction of cephalosporin, ciprofloxacin and azithromycin antimicrobial susceptibility of positive *Neisseria gonorrhoeae* nucleic acid amplification test samples. *J Antimicrob Chemother.* el 1 de diciembre de 2020;75(12):3485–90.
79. Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Voermans J, Mes THM, Schutten M. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn.* enero de 2010;12(1):109–17.
80. Tomberg J, Unemo M, Davies C, Nicholas RA. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. *Biochemistry.* el 21 de septiembre de 2010;49(37):8062–70.
81. Tomberg J, Fedarovich A, Vincent LR, Jerse AE, Unemo M, Davies C, et al. Alanine 501 Mutations in Penicillin-Binding Protein 2 from *Neisseria gonorrhoeae*: Structure, Mechanism, and Effects on Cephalosporin Resistance and Biological Fitness. *Biochemistry.* el 28 de febrero de 2017;56(8):1140–50.
82. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* noviembre de 2012;113(5):1014–26.
83. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* octubre de 1997;63(10):3741–51.
84. Takahata S, Senju N, Osaki Y, Yoshida T, Ida T. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 2006;50(11):3638–45.

85. Bowler LD, Zhang QY, Riou JY, Spratt BG. Interspecies recombination between the penA genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. *J Bacteriol.* enero de 1994;176(2):333–7.
86. Vincent LR, Kerr SR, Tan Y, Tomberg J, Raterman EL, Dunning Hotopp JC, et al. In Vivo-Selected Compensatory Mutations Restore the Fitness Cost of Mosaic penA Alleles That Confer Ceftriaxone Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *mBio.* el 3 de abril de 2018;9(2):e01905-17.
87. Whiley DM, Goire N, Lambert SB, Ray S, Limnios EA, Nissen MD, et al. Reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* is associated with mutations G542S, P551S and P551L in the gonococcal penicillin-binding protein 2. *J Antimicrob Chemother.* agosto de 2010;65(8):1615–8.
88. de Laat MM, Wind CM, Bruisten SM, Dierdorp M, de Vries HJC, Schim van der Loeff MF, et al. Ceftriaxone Reduced Susceptible *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands, 2009 to 2017: From PenA Mosaicism to A501T/V Nonmosaicism. *Sex Transm Dis.* septiembre de 2019;46(9):594–601.
89. Bharat A, Demczuk W, Martin I, Mulvey MR. Effect of Variants of Penicillin-Binding Protein 2 on Cephalosporin and Carbapenem Susceptibilities in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 2015;59(8):5003–6.
90. Powell AJ, Tomberg J, Deacon AM, Nicholas RA, Davies C. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J Biol Chem.* el 9 de enero de 2009;284(2):1202–12.

91. Parvathy ST, Udayasuriyan V, Bhadana V. Codon usage bias. *Mol Biol Rep.* enero de 2022;49(1):539–65.
92. Plotkin JB, Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet.* enero de 2011;12(1):32–42.
93. Priest D, Ong JJ, Chow EPF, Tabrizi S, Phillips S, Bissessor M, et al. *Neisseria gonorrhoeae* DNA bacterial load in men with symptomatic and asymptomatic gonococcal urethritis. *Sex Transm Infect.* noviembre de 2017;93(7):478–81.
94. Madeira F, Madhusoodanan N, Lee J, Eusebi A, Niewielska A, Tivey ARN, et al. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res.* el 1 de julio de 2024;52(W1):W521–5.

13. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN genómico de bacterias, hongos y levaduras por método de Fenol – cloroformo

1. Agregar 400ul de buffer AC2, 75ul de SDS al 10%, luego agregar 20ul de proteinasa K (20mg/ml Promega), vortexear y dejar incubar por 1 a 3 horas a 65°C. Vortexear cada media hora observando que la muestra se encuentre completamente homogénea.

NOTA: el tiempo de incubación se realizará teniendo en cuenta las características de la muestra tales como: Coloración Gram (Gram + o Gram -), cantidad de muestra.
- 4 Añadir 100ul de NaCl 5M, luego agregar 100ul de CTAB/NaCl (previamente calentado a 65°C), vortexear suavemente e incubar 10 minutos a 65°C.
- 5 Adicionar 750ul de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), vortexear y centrifugar a 10000rpm por 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.
- 6 Adicionar 750ul de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), vortexear y centrifugar a 10000rpm por 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.
- 7 Añadir 1ml de etanol absoluto frío y colocar a -70°C por al menos 20 minutos.
- 8 Centrifugar a 10000rpm por 8 minutos. Descartar el sobrenadante.
- 9 Agregar 1ml de etanol al 70% previamente enfriado y centrifugar a 10000rpm por 3 minutos. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet colocando el tubo boca abajo con la tapa abierta sobre un papel toalla.
- 10 Eluir el ADN en 30-50ul de buffer Tris EDTA o de Agua libre de nucleasas y conservar a -20°C hasta su uso.

Anexo 2

Valores de concentración de ADN por cada muestra a partir del método de fenol cloroformo y los parámetros de calidad y pureza de ADN (A2860/A280 y A260/A230)

Nro.	Código	concentración ng/ul	A260/A280	A260/A230
1	213241	34.3	1.08	0.65
2	111641	12.3	3.19	0.08
3	111503	9.2	1.1	0.08
4	112033	12.8	0.97	0.06
5	112317	11.3	1.7	0.06
6	112146	1.4	1.45	0.1
7	214568	4.4	1.95	0.16
8	214569	5.1	3.27	0.07
9	31102R	5.5	1.65	0.19
10	213011	6.9	0.91	0.41
11	214591	8.6	2.75	0.11
12	213412	2.5	2.1	0.08
13	213616	8.4	1.91	0.16
14	213318	9.3	1.65	0.1
15	111426	4.4	1.38	0.09
16	214109	3.8	1.26	0.11
17	214659	6.7	2.13	0.14
18	30702R	10.5	2.94	0.21
19	213371	2.3	1.92	0.73
20	214651	1.7	2.7	0.11
21	213594	2.7	1.72	0.12
22	213586	2	1.97	0.16
23	111016	3.7	1.89	0.1
24	111026	5.8	1.83	0.29
25	214699	2.8	1.86	0.12
26	30182R	11	1.39	0.22
27	10172R	9.9	1.69	0.33
28	110461	12.5	1.05	0.74
29	214691	4.7	1.47	0.12
30	213704	1.6	1.15	0.09
31	111425	2.6	1.39	0.16
32	213847	0.7	1.26	0.12
33	213589	2.3	1.52	0.14
34	213119	5.4	1.28	0.17
35	31272R	12.6	1.65	1.29

36	30562R	15.7	1.69	0.17
37	110231	2.3	0.82	0.49
38	110043	1.7	1.56	0.12
39	213254	0.4	1.19	0.09
40	110605	1.2	0.74	0.02
41	111996	0.5	0.84	0.07
42	213239	2	2.64	0.09
43	213419	3	1.57	0.15
44	31452R	10.2	1.8	0.63
45	30392R	18.2	1.52	0.43
46	110664	10.2	1.65	0.36
47	110301	5.6	1.2	0.14
48	112314	6.3	1.16	0.11
49	110035	6.5	1.3	0.13
50	213868	4.9	1.25	0.07
51	213219	6.2	0.97	0.06
52	110459	12.2	1.77	0.15
53	30832R	16.2	1.85	0.4
54	10332R	14.7	2.03	0.32
55	214161	8.8	1.45	0.11
56	110661	2.3	2.1	0.09
57	213245	1	2.05	0.09
58	110438	1.4	2.27	0.08
59	214127	2.2	1.38	0.09
60	110069	4.03	2.1	0.12
61	110669	1.9	1.92	0.11
62	10202R	7.7	2.35	0.3
63	31002R	11.5	1.95	0.41
64	111311	2.8	1.77	0.13
65	214542	2.9	1.96	0.11
66	214285	2.2	1.82	0.15
67	213218	1	1.52	0.1
68	214497	0.9	3.18	0.05
69	111249	1.6	1.54	0.19
70	213509	2.7	4.1	0.05
71	10342R	9.1	1.81	0.31
72	12042R	6.2	1.84	0.27
73	111611	1.5	-1.26	0.03
74	111323	1.8	1.71	0.11
75	213426	0.9	14.52	0.06
76	214436	1.1	1.51	0.23
77	214657	1.9	-0.61	0.01
78	110759	4.5	3.71	0.1
79	214059	2.3	-1.55	0.02
80	31322R	3.3	3.67	0.15

81	10752R	7.9	2.15	0.22
82	10652R	6.2	2.32	0.31
83	11482R	12.3	1.89	0.49
84	31532R	4.4	-4.68	0.16
85	32462R	5.1	1.99	0.4
86	33132R	4.8	2.02	0.18
87	11322R	14.1	2.18	0.28
88	12172R	14.4	2.48	0.24
89	31702R	4.3	5.89	0.17
90	31902R	3.9	2.06	0.53
91	33382R	0.1	7.38	0.06
92	11042R	7.1	2.02	0.27
93	11082R	6.6	1.87	0.39
94	32022R	13.5	1.71	0.88
95	32652R	9.8	1.77	0.82
96	33462R	1.6	3.23	0.07
97	11712R	12.7	2.57	0.33
98	11562R	20.1	1.93	1.22
99	32052R	1.9	-0.54	0.03
100	32662R	5.7	3.31	0.86
101	33572R	2.3	17.72	0.11
102	11142R	9.44	3.31	0.2
103	10302R	0.2	1.35	-0.74
104	32712R	13.5	1.86	1.7
105	33802R	2.8	2.51	0.2
106	11332R	11.9	2.17	0.73
107	32142R	0.9	1.13	0.27
108	32772R	0.6	1.56	0.26
109	33852R	1.1	2.63	0.08
110	11532R	3.9	1.91	0.31
111	12272R	1.1	1.14	0.2
112	32172R	2	1.47	0.48
113	32782R	0.8	1.43	0.49
114	33932R	5.6	2.02	0.34
115	10922R	2.2	4.07	0.17
116	31482R	2	1.8	0.68
117	32382R	0.9	1.44	0.36
118	32962R	0.2	1.87	-0.12
119	12532R	1.6	2.33	0.12
120	12212R	3.3	2.01	0.25
121	31502R	7.1	1.27	0.38
122	32422R	0.2	0.4	0
123	33032R	1.3	2.85	0.49
124	12702R	22.7	1.92	0.99

Anexo 3

La siguiente figura ilustra el cálculo de la diferencia de C_T utilizado en la detección de mutantes en el gen 23S ARNr mediante el ensayo MAMA-qPCR, figura tomada del artículo “Mismatch Amplification Mutation Assay-Based Real-Time PCR for Rapid Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and Antimicrobial Resistance Determinants in Clinical Specimens” (69)

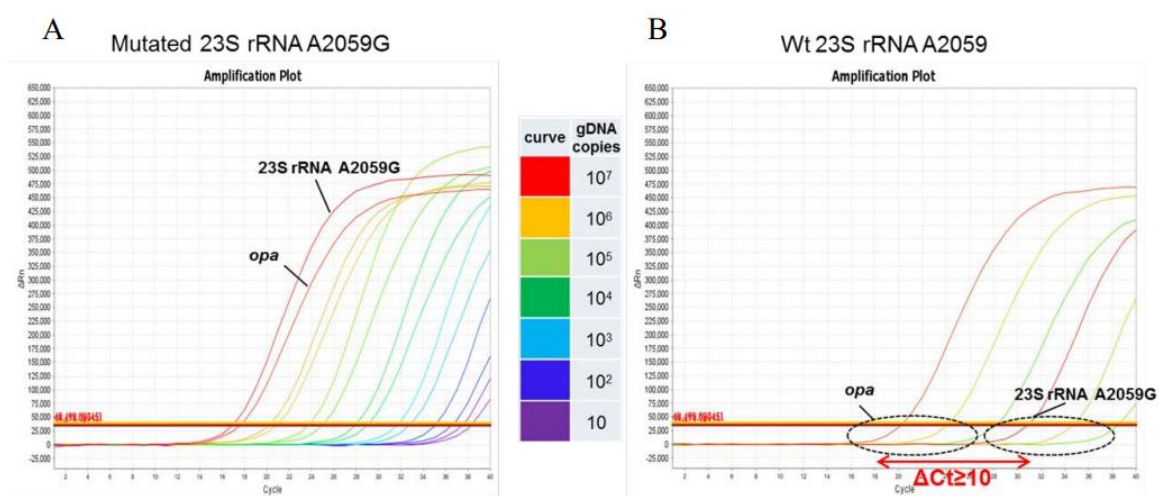
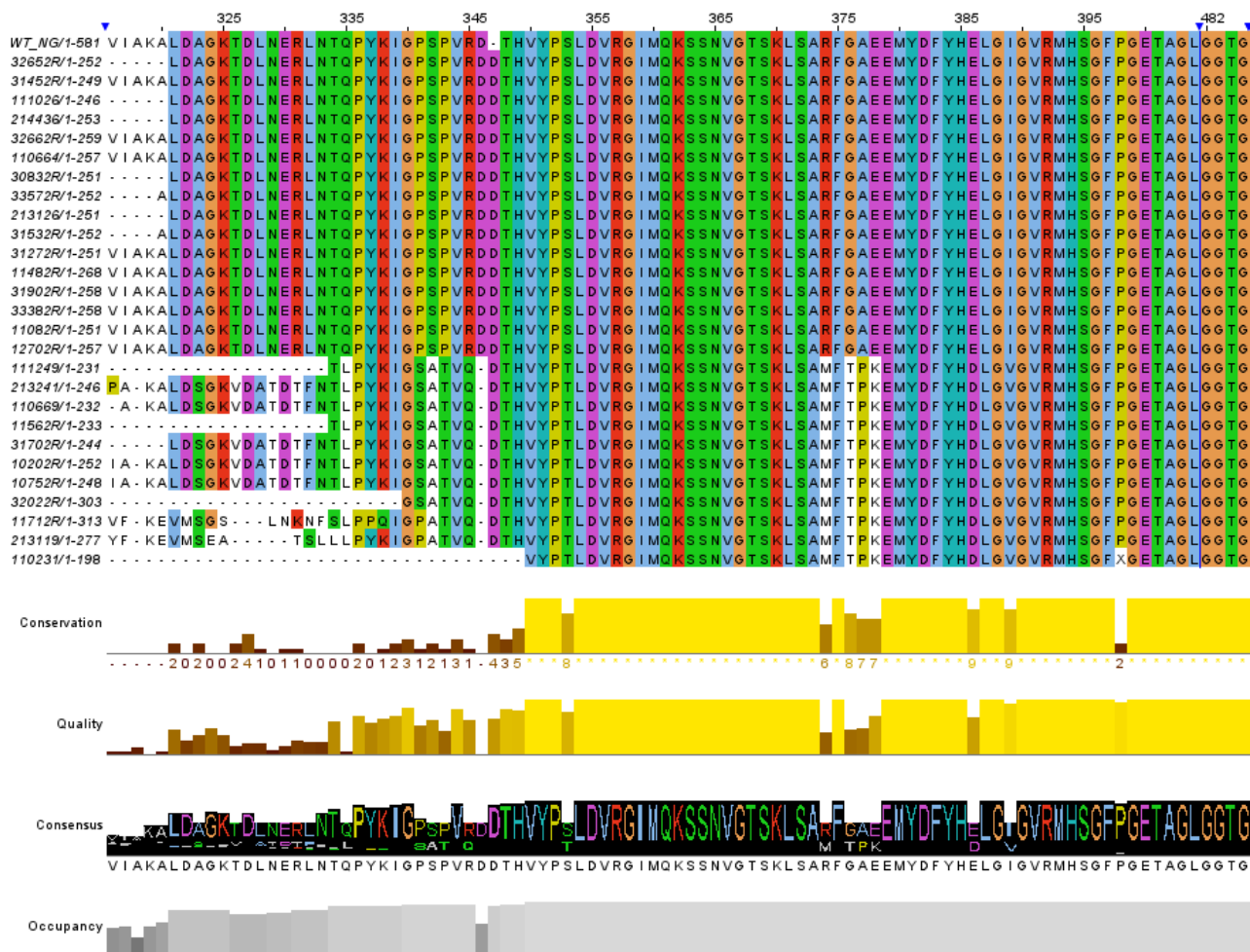


Figure S1. Example of delayed amplification due to the MAMA-strategy. When plating same amounts of gDNA copies/reaction, the C_t of the *opa* reaction will be comparable to the the C_t of the AMR reaction if the mutated allele is present (A), whereas there will be a strong delay in the amplification if the wild type allele is present (B). The different colors indicate different amounts of plated gDNA.

Anexo 4

Alineamiento de aminoácidos del PBP-2 (*penA*). Los aminoácidos se muestran en colores comparados con la cepa *WT_NG* (primera secuencia) desde el codón 321 hasta el 573. La diferencia entre aminoácidos (entre la secuencia *wt* y las secuencias de las cepas estudiadas) se ven en colores. El programa utilizado para este alineamiento fue Clustal Omega (94) y el archivo FASTA fue analizado posteriormente en Jalview 2.11.4.1



WT_NG/1-581 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYADNKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 32652R/1-252 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPDQA--
 31452R/1-249 TAGAVDGF DVGAKTGTTRKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGLFFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 111026/1-246 TAGAVDGF DVGAKTGTTRKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGLFFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 214436/1-253 TAGAVDGF DVGAKTGTTRKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGLFFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 32662R/1-259 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHSYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGVSPTKPLT
 110664/1-257 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 30832R/1-251 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 33572R/1-252 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 213126/1-251 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 31532R/1-252 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 31272R/1-251 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 11482R/1-268 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 31902R/1-258 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 33382R/1-258 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 11082R/1-251 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 12702R/1-257 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 111249/1-231 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVTPGVFKQVMGGSNLILGISPTKPLT
 213241/1-246 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 110669/1-232 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVTPGVFKQVMGGSNLILGISPTKPLT
 11562R/1-233 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 31702R/1-244 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 10202R/1-252 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 10752R/1-248 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 32022R/1-303 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDYKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYSGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 11712R/1-313 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 213119/1-277 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 110231/1-198 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVGTFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTANGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT



Consensus TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT
 TAGAVDGF DVGAKTGTARKLVNGRYVDNKHVATFI GFAPAKNPRVIVAVTIDEPTAHGYYGGVVAGPPFKKIMGGSNLILGISPTKPLT



Anexo 5

Frecuencia del uso de codones (codon usage) para la cepa de referencia *Neisseria gonorrhoeae*

FA1090, cepa *wt* ampliamente estudiada (<https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=242231>)

Neisseria gonorrhoeae FA 1090 [gbbct]: 2002 CDS's (564135 codons)

fields: [triplet] [frequency: **per thousand**] ([number])

UUU 20.2(11370)	UCU 5.4(3045)	UAU 13.4(7586)	UGU 2.9(1626)
UUC 21.7(12233)	UCC 14.3(8076)	UAC 15.8(8939)	UGC 8.3(4659)
UUA 6.3(3542)	UCA 4.1(2287)	UAA 1.8(1010)	UGA 1.4(774)
UUG 30.5(17180)	UCG 10.0(5667)	UAG 0.4(218)	UGG 11.5(6481)
CUU 9.9(5564)	CCU 6.9(3910)	CAU 8.4(4716)	CGU 10.9(6143)
CUC 13.7(7756)	CCC 15.0(8487)	CAC 13.3(7496)	CGC 29.8(16799)
CUA 1.6(930)	CCA 2.0(1150)	CAA 21.6(12171)	CGA 2.7(1503)
CUG 35.2(19865)	CCG 19.4(10952)	CAG 16.8(9482)	CGG 8.0(4523)
AUU 20.6(11647)	ACU 4.9(2784)	AAU 13.6(7695)	AGU 3.8(2167)
AUC 31.2(17584)	ACC 25.7(14484)	AAC 25.9(14593)	AGC 16.2(9134)
AUA 5.4(3025)	ACA 5.8(3300)	AAA 45.2(25527)	AGA 2.3(1306)
AUG 24.7(13946)	ACG 13.7(7740)	AAG 10.9(6133)	AGG 3.9(2224)
GUU 16.1(9106)	GCU 7.9(4458)	GAU 21.4(12098)	GGU 15.2(8591)
GUC 24.1(13590)	GCC 43.7(24648)	GAC 30.7(17344)	GGC 46.7(26329)
GUA 9.7(5463)	GCA 19.1(10765)	GAA 49.5(27905)	GGA 8.6(4827)
GUG 17.9(10085)	GCG 31.6(17842)	GAG 12.2(6884)	GGG 8.5(4771)

Coding GC 53.99% 1st letter GC 57.81% 2nd letter GC 41.03% 3rd letter GC 63.13%