

Artículo

Diagnóstico molecular de *Neisseria gonorrhoeae* en Mendoza*Molecular diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in Mendoza*

Dinamarca, S.¹; Salafia, C.¹; Pennacchio, G. E.²;
Quintero, C.A.^{1,3}

¹Universidad Juan Agustín Maza, Argentina.

²Laboratorio de Reproducción y Lactancia, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU-CONICET), Centro Científico Tecnológico (CCT), 5500, Mendoza, Argentina; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCuyo, 5500, Mendoza, Argentina.

³corresponding autor

Dr. Cristián Andrés Quintero

Av. Acceso Este, Lateral Sur 2245,
Guaymallén, Mendoza, Argentina.

Contacto: cquintero@umaza.edu.ar

Palabras claves: *Neisseria gonorrhoeae*-PCR-diagnóstico-Mendoza-ETS

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*-PCR-diagnosis-Mendoza-STD

Resumen

Neisseria gonorrhoeae es una bacteria de transmisión sexual que afecta exclusivamente a humanos. Esta bacteria coloniza las mucosas de la uretra, endocervix, tubo de Falopio, recto, conjuntiva y faríngea. Las infecciones causadas en el aparato genital varían desde infecciones agudas de resolución favorable, hasta enfermedad inflamatoria pélvica que cronifica provocando secuelas irreversibles como obstrucción tubárica y esterilidad. Incrementa además hasta 5 veces la transmisión del virus HIV. Entre otras implicancias críticas en la salud reproductiva, también pueden causar embarazos ectópicos, abortos en el primer trimestre del embarazo y como se mencionó antes, esterilidad. El mayor riesgo para el recién nacido son las infecciones oculares que pueden derivar en ceguera.

La gonorrea es la segunda enfermedad de transmisión sexual de origen bacteriano más frecuente en el mundo. En los últimos años se han incrementado el número de individuos infectados y la aparición de cepas resistentes a los antibióticos utilizados. La situación en Mendoza sigue las tendencias mundiales. Para su detección en la provincia se utilizan técnicas de cultivo. La detección temprana y rápida, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es una herramienta necesaria para su diagnóstico.

Abstract

Neisseria gonorrhoeae is a sexually transmitted bacterium that affects only humans. This bacterium colonizes the mucous membranes of the urethra, endocervix, fallopian tube, rectum, pharyngeal conjunctiva. Infections caused in the genital tract vary from acute infections of favorable resolution to pelvic inflammatory disease that causes chronic irreversible sequelae such as tubal obstruction and sterility. It also increases up to 5 times the transmission of the HIV virus. Among other critical implications in reproductive health, they can also cause ectopic pregnancies, abortions in the first trimester of pregnancy and, as mentioned before, sterility. Eye infections that can lead to blindness are the greatest risk for the newborn.

Gonorrhea is the second most common sexually transmitted disease of bacterial origin in the world. In recent years, the number of infected individuals and the appearance of strains resistant to the antibiotics used have increased. The situation in Mendoza follows the world trends. For its detection in the province, culture techniques are used. Early and rapid detection, using the Polymerase Chain Reaction, is a necessary tool for its diagnosis.

Introducción

Neisseria gonorrhoeae es un patógeno de transmisión sexual que primariamente infecta el tracto urogenital, causante de la enfermedad conocida como gonorrea. La infección induce una respuesta inflamatoria en el tracto urogenital, seguida de una alteración de la mucosa, asociada a un incremento en la susceptibilidad al HIV tipo I. Además, la susceptibilidad a infecciones crónicas es un problema predominante en mujeres, debido a la naturaleza asintomática comúnmente asociada con cervicitis gonocócica y su subsiguiente propagación en el tracto genital superior. Esta infección ascendente ocurre en el 45% de las mujeres infectadas, y puede resultar en enfermedades inflamatorias pélvicas y bloqueos en las trompas de Falopio, generando infertilidad y/o embarazos ectópicos^{1,2}.

Una característica propia de *N. gonorrhoeae* es su capacidad de modular su superficie antigénica a gran velocidad. Esta es la base de su éxito como patógeno específico en humanos, debido a que su constante modulación de la superficie antigénica³ y sus mutaciones puntuales⁴ mejoran la capacidad de la bacteria para evitar los mecanismos de defensa inmune en humanos. Es esta misma capacidad de modulación lo que acarrea un problema mayor en el desarrollo de vacunas efectivas contra diferentes cepas de *N. gonorrhoea*. En los últimos años se ha reportado la aparición de nuevas cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a un amplio espectro de antibióticos, incluyendo los más comúnmente utilizados como cefalosporinas y fluoroquinolonas, dando origen a la denominación de «superbacterias» o «superbugs»^{5,6}. En Argentina se han encontrado cepas resistentes, en distintos relevamientos realizados por el laboratorio de la Dra. Galarza⁷⁻¹⁰. Estos datos indican la necesidad de contar con tratamientos efectivos contra la *N. gonorrhoeae*.

La situación actual en Argentina y en Mendoza muestra una reaparición de gonorrea. Según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud SNS-SIVILA, en el país, durante el período comprendido entre 2007 y 2014, se reportaron en promedio 2500 casos al año, bajando a 500-800 casos en el período del 2015 al 2018. En Mendoza, el promedio para el primer período era de 29 casos por año, y pasó a 59, 1, 3 y 48 desde el 2015 al 2018 respectivamente. En cuanto a la discriminación por sexo, en el año 2018 se detectaron 11 casos en mujeres y 37 en hombres.

La detección de la infección bacteriana es clave para su tratamiento, evitando la cronificación de la infección. Actualmente se utilizan en Mendoza técnicas de reconocimiento mediante cultivos bacterianos de los exudados y la orina del paciente. El medio selectivo de uso general es el agar Thayer-Martin, el cual contiene una base de agar nutritivo GC, adicionado de

hemoglobina, un suplemento nutritivo que contiene numerosos factores de crecimiento y un suplemento antimicrobiano. No obstante, cepas de *Neisseria lactamica* y *Kingella denitrificans* pueden crecer con cierta frecuencia en agar Thayer Martin, mientras que otras especies comensales de *Neisseria* como *N. subflava* y *N. cinerea* crecen en forma ocasional¹¹.

El método tradicional de identificación bioquímica se basa en demostrar su patrón de utilización de azúcares. *Neisseria gonorrhoeae* oxida la glucosa, pero ningún otro azúcar de un panel que incluye lactosa, maltosa, sacarosa y fructosa. La demostración de utilización de azúcares en agar CTA no es recomendada ya que requiere un inóculo denso, larga incubación y puede dar resultados negativos por falta de crecimiento en el medio o por producción insuficiente de ácido de los carbohidratos¹¹.

Desde hace varios años se utiliza la PCR como herramienta de diagnóstico para las infecciones causadas por la bacteria¹²⁻¹⁶, pero la misma no ha sido utilizada aún en Mendoza. En el presente trabajo, hemos puesto a punto la técnica de detección mediante PCR, evidenciando las ventajas que posee en cuanto al menor consumo de tiempo y la independencia de la viabilidad de la bacteria.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Las cepas de *N. gonorrhoeae* utilizadas (n=8) comprenden el panel de referencia 2008 de la WHO¹⁷ creado para asegurar la calidad y control de los test de gonorrea a nivel global. Las cepas son designadas con letras: WHO F (origen: Canadá, 1991), WHO G (Tailandia, 1997), WHO K (Japón, 2003), WHO L (Asia, 1996), WHO M (Filipinas, 1992), WHO N (Australia, 2001), WHO O (Canadá, 1991) y WHO P (Estados Unidos). En el presente trabajo se utilizaron principalmente las cepas WHO M y WHO L.

Cultivo de *Neisseria gonorrhoeae*

Las cepas fueron cultivadas en medio Tayer-Martin modificado, se incubó a 37°C de temperatura y atmósfera controlada con 5% de CO₂ hasta 48hs. Los ensayos de PCR se realizaron con cepas frescas, cultivadas 24hs previo al mismo, excepto en los casos aclarados.

Conservación de la cepa

Cultivos de 24hs se utilizaron para producir los stocks bacterianos. A partir de una placa de 3,5 cm de diámetro con medio Tayer-Martin modificado, se colectaron las bacterias y se resuspendieron en medio GCP (peptona proteasa, almidón soluble, KH₂PO₄/K₂HPO₄) suplementado con glicerol, esterilizado por filtración (filtro Sartorius de 22µm). Se conservaron a -80°C. Los stocks se renovaron cada 4 meses para mantener la viabilidad de las bacterias.

PCR

Se realizaron colony-PCR de las cepas indicadas en cada caso. Se ensayaron cuatro tratamientos previos, 100°C durante 5 minutos, sonicación 3x1 minuto, 100°C durante 5 minutos + sonicación 3x1 minuto, o sin tratamiento previo.

Los cebadores (primers) utilizados fueron: MRL3, 5'-TAAAGCAAGCCAAGGTCGCG y MRL4, 5'-TTTTCA-CATCTACGGCGG. correspondientes al gen que codifica para la proteína de membrana III, universalmente conservada en todas las cepas de *Neisseria gonorrhoeae*¹⁸. Cada reacción de PCR contiene: 1 µL de los cebadores en una concentración de 25 pmol cada uno, 15,75 µL de agua libre de DNAasa, 6 µL de 25 mM, 1 µL de mix de dNTPs 25µM, 1 µL de Taq polimerasa (INBIO Highway) y 1 uL del DNA de la muestra. Las condiciones en las cuales se evaluaron las PCR fueron de 30 ciclos con una desnaturalización previa de 94°C 3 min; cada ciclo contó en desnaturalización 94°C por 1 min, annealing 55°C por 45 seg, extensión 72°C por 45 seg; extensión final 72°C por 10 min. La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, y se revelaron con SyberSafe.

Cuantificación de las colonias de *Neisseria gonorrhoeae*

Se realizó la cuantificación de bacterias mediante el método de turbidez de McFarland¹⁹. Brevemente, se preparan dos soluciones stock: 0,048 mol/L de BaCl₂ y 0,18 mol/L de H₂SO₄. Con agitación constante se agregan 0,5 mL de la solución de BaCl₂ a 99,5 mL de la solución de H₂SO₄. Las bacterias se resuspenden en 1 mL de la solución para verificar la turbidez utilizando un espectrofotómetro y midiendo la absorbancia a 625nm. Valores de absorbancia entre 0,08 y 0,013 equivalen a 0,5 McFarland. Este resultado indica que la suspensión contiene aproximadamente entre 1 y 2 x10⁸ unidades formadoras de colonias (CFU)/mL

Resultados y discusión

Optimización del tratamiento previo de las cepas

El primer paso para realizar una PCR para este tipo de muestras radica en la preparación de las mismas. Las condiciones óptimas para realizarlo sería la purificación previa del ADN bacteriano antes de realizar el ensayo. Una segunda opción es realizar colony-PCR, donde se utiliza la bacteria completa, sin purificación previa, y se rompe la membrana por distintos métodos para liberar el ADN. Como el objetivo es realizar el diagnóstico de manera correcta y en la menor cantidad de tiempo, se utilizó la técnica de colony-PCR.

Para seleccionar el método de pre tratamiento, se utilizaron los dos métodos más habituales, temperatura y sonicación, individualmente o de manera sucesiva. Se seleccionó una colonia, se resuspendió

en 100 µL agua destilada estéril libre de RNAsas y DNAsas, y se realizaron 5 alícuotas iguales de 25 µL. Como control negativo del pre tratamiento se utilizó la cepa sin tratar (resuspensión en agua), y las diferentes estrategias fueron tratar a la cepa con 5 minutos a 100°C, la cepa sonicada 3 veces por 1 minuto cada una, o la cepa tratada con sonicación y calentamiento. Se utilizó 1µL de cada condición para la reacción. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se reveló con luz UV y coloración por SyberSafe. En función de la cantidad de producto obtenido, podemos observar que los dos últimos tratamientos dieron mejores resultados (Fig 1). En adelante, las condiciones de tratamiento previo de las muestras se realizó utilizando sonicación y calentamiento.

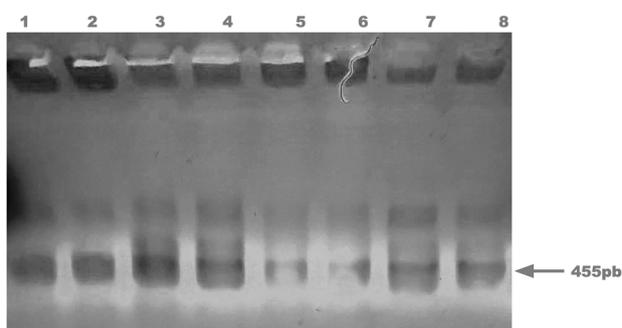


Figura 1. Diferentes tipos de tratamiento previo de la bacteria. PCR de diferentes muestras de *N. gonorrhoeae*. Se realizó una PCR en cepas de referencia de la OMS (WHO). Los diferentes carriles corresponden a: 1-4 *N. gonorrhoeae* cepa WHO L; 5-8 *N. gonorrhoeae* cepa WHO M. 1 y 5, cepas sin tratamiento previo, 2 y 6, cepas precalentadas a 100°C, 3 y 7 cepas sonicadas, 4 y 8 cepas sonicadas y precalentadas a 100°C

La colony-PCR no requiere la viabilidad de la bacteria

El principal problema en el diagnóstico por métodos tradicionales como el cultivo celular es la escasa viabilidad de la bacteria fuera de sus condiciones óptimas (37°C y 5% de CO₂). Para el transporte de las muestras desde el hospital hasta los centros de referencia suele haber prolongadas demoras, lo cual puede resultar en falsos negativos de las muestras, ya que la bacteria llega muerta al laboratorio de referencia su cultivo será negativo, aún en presencia de la misma.

Con el objetivo de demostrar que éste no es un impedimento para la detección por PCR, se realizaron ensayos con las bacterias viables, cultivadas 24hs antes de la reacción, y con bacterias muertas conservadas a 4°C durante dos semanas y a temperatura ambiente durante el mismo período. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se reveló con luz UV y coloración por SyberSafe, como se muestra en la figura 2. El resultado, para

los tres casos fue positivo. Esto indica que la PCR es un método de detección que no requiere la viabilidad de la bacteria.

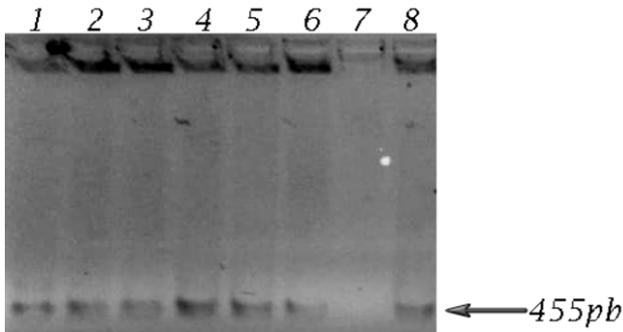


Figura 2. La detección por PCR no requiere la viabilidad de las bacterias. PCR de diferentes muestras de *N. gonorrhoeae*. Se realizó una PCR en cepas de referencia de la OMS (WHO). Los diferentes carriles corresponden a: 1-3 *N. gonorrhoeae* cepa WHO L; 4-6 *N. gonorrhoeae* cepa WHO M, 7 blanco (reacción sin DNA). 8 control positivo. 1 y 4: cepas viables. 2 y 5 cepas muertas (7 días); 3 y 6 cepas muertas (15 días).

La detección por PCR es específica para *N. gonorrhoeae*

Uno de los problemas habituales del diagnóstico es la probable reacción cruzada con otros patógenos. En particular, en el caso de las infecciones de transmisión sexual, es muy común que los pacientes positivos para una infección sean además positivos para diferentes patógenos²⁰⁻²³.

Para validar el método de detección, se realizaron ensayos de PCR con una cepa de *N. gonorrhoeae* como control positivo, y se utilizó una cepa de *Chlamydia trachomatis* (una bacteria de transmisión sexual), una cepa de *Escherichia coli* (una bacteria no relacionada) como controles negativos. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se reveló con luz UV y coloración por SyberSafe, como se muestra en la figura 3. Únicamente se obtiene un producto de PCR cuando la fuente de ADN es *N. gonorrhoeae*, siendo negativos para los otros dos casos.

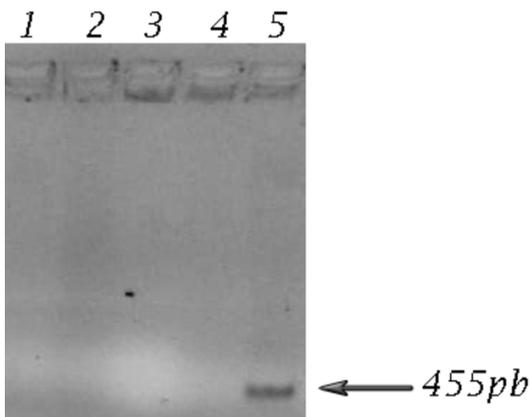


Figura 3. La detección por PCR es específica para *N. gonorrhoeae*. PCR realizada sobre diferentes bacterias en las mismas condiciones. Se utilizó como control negativo *Chlamydia trachomatis* (carril 2) y *Escherichia coli* (carril 3); control positivo *N. gonorrhoeae* cepa WHO M (carril 4). Blanco de reacción carril 1.

La detección por colony PCR es una técnica sensible

Un punto clave en la detección de infecciones bacterianas es la sensibilidad de la técnica. La misma debe poder detectar bajas cargas bacterianas en las muestras recibidas.

Para determinar la sensibilidad de la colony PCR, se realizaron diluciones seriadas de una concentración conocida de bacterias. La cuantificación inicial de colonias se realizó por la técnica de McFarland, se realizó dilución de cada muestra, 1:20, 1:400, 1:8000, 1:160000 y se realizó la PCR con las mismas condiciones utilizadas previamente. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se reveló con luz UV y coloración por SyberSafe, como se muestra en la figura 4. Se utilizaron las cepas M y L, obteniéndose resultados similares, donde vemos que se detecta la bacteria hasta $3,7 \times 10^4$ CFU.

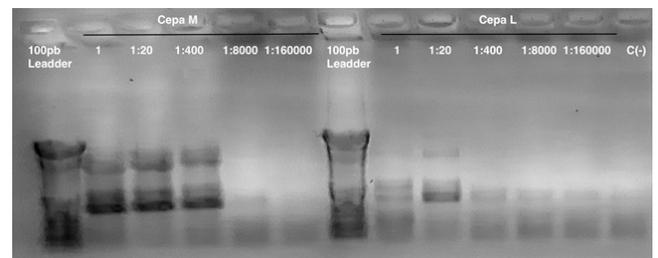


Figura 4. La detección por PCR sensible para *N. gonorrhoeae*. La figura muestra una PCR realizada sobre diferentes cantidad de bacterias en las mismas condiciones. La PCR se realizó a partir de n colonias, y se realizaron diluciones seriadas en base 20. El primer panel muestra corresponde a las diluciones seriadas de la cepa M, el segundo panel a la cepa L. Carga inicial cepa M 3×10^8 CFU, cepa L 2×10^8 CFU.

Conclusiones

Uno de los principales problemas del diagnóstico de gonorrea en Mendoza es el escaso empleo de métodos moleculares para su detección. Actualmente se realizan determinaciones y caracterizaciones por cultivos bacterianos. Este tipo de diagnóstico consume tiempo, ya que tarda más de 24hs, espacio, por la cantidad de placas utilizadas, y requiere la viabilidad de la bacteria.

En nuestra provincia, de acuerdo al Boletín Integrado de Vigilancia | N° 407- SE 17 2018, se han incrementado los casos de gonorrea en los últimos años. En el mundo, se han reportado apariciones de cepas de

Neisseria gonorrhoeae resistentes a los antibióticos utilizados²⁴⁻²⁷. Si bien en Mendoza no hay reportes aún de cepas resistentes, es imperioso mejorar el diagnóstico de la misma. El aumento de casos registrado en los últimos años, sumado a los posibles falsos negativos, debido a la escasa viabilidad de la bacteria, y al uso de antibióticos de amplio espectro para tratar diferentes infecciones bacterianas de transmisión sexual, podría incrementar el número de casos reales en la provincia.

La PCR es una herramienta de diagnóstico útil, versátil, rápida, específica, y que no requiere la viabilidad de la bacteria para poder realizarla. Esto representa una gran ventaja con respecto a los cultivos tradicionales. Adicionalmente, se pueden realizar ensayos de varias infecciones bacterianas en paralelo (PCR múltiplex) con el mismo equipamiento, y diferentes cebadores. Estamos en condiciones de validar estos hallazgos en muestras derivadas de pacientes, y poder ofrecer el servicio de diagnóstico molecular en el corriente año.

Cabe destacar que la resistencia a los antibióticos por parte de las cepas no es posible realizarla aún por este tipo de métodos y debe continuarse el uso de técnicas de cultivo. La PCR no reemplazaría a estas técnicas, sino que la complementaría, y sería una herramienta útil para la detección rápida de diferentes enfermedades de transmisión sexual en paralelo, y en tiempos considerablemente menores.

Agradecimientos

El trabajo se realizó con fondos del subsidio de investigación UMaza convocatoria 2015. Los autores agradecen a la Dra Patricia Galarza por la donación de las cepas de referencia de la WHO de *Neisseria gonorrhoeae*, a la Bioq. Stella Galfré y todo el equipo del laboratorio central por sus servicios y al Dr. Juan Pablo Mackern-Oberti por su asesoramiento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Masi AT, Eisenstein BI. Disseminated gonococcal infection (DGI) and gonococcal arthritis (GCA): II. Clinical manifestations, diagnosis, complications, treatment, and prevention. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 1981;10(3):173-97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6785887>
2. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2008;140(1):3-11. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030121150800136X>
3. Segal E, Hagblom P, Seifert HS, So M. Antigenic variation of gonococcal pilus involves assembly of separated silent gene segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1986;83(7):2177-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2870495>
4. McGuinness BT, Clarke IN, Lambden PR, Barlow AK, Poolman JT, Jones DM, et al. Point mutation in meningococcal por A gene associated with increased endemic disease. *Lancet* [Internet]. 1991;337(8740):514-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705642>
5. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Futur Microbiol* [Internet]. 2012;7(12):1401-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231489>
6. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2014 Jul [cited 2014 Aug 25];27(3):587-613. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982323>
7. Gianecini R, Oviedo C, Guantay C, Piccoli L, Stafforini G, Galarza P. Prevalence of bla TEM-220 gene in Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying Toronto / Rio plasmid in Argentina, 2002 - 2011. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015;1-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1294-0>
8. Stafforini G, Galarza P. Resistant to Ceftriaxone and. 2016;22(6):1139-41.
9. Gianecini R, De M, Romero M, Oviedo C, Vacchino M, Galarza P. Emergence and Spread of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates With Decreased Susceptibility to Extended-Spectrum. 2017;44(6):351-5.
10. Sawatzky P, Martin I, Galarza P, Elena M, Carvallo T, Rodriguez PA, et al. Quality assurance for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* in Latin American and Caribbean countries, 2013 - 2015. 2018;1-4.
11. Knapp JS. Historical Perspectives and Identification of *Neisseria* and Related Species. 1988;1(4):415-31.
12. Tabrizi SN, Chen S, Tapsall J, Garland SM. Evaluation of opa-based real-time PCR for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis*. 2005;32(3):199-202.
13. Callaghan IO, Corcoran D, Lucey B. Design of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. 2010;431-4.
14. Hopkins MJ, Ashton LJ, Alloba F, Alawattegama A, Hart IJ. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine. *Sex Transm Infect*. 2010;86(3):207-11.
15. Mahony JB, Luinstra KE, Tyndall M, Sellors JW, Krepel J, Chernesky MAX. Multiplex PCR for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genitourinary Specimens. 1995;33(11):3049-53.
16. Mayta H, Calderon M, Taverna J, Montenegro S, Balqui J, Campos K, et al. Use of a reliable PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Peruvian patients. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2006 Aug [cited 2018 Mar 30];12(8):809-12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842581>
17. Unemo M, Fasth O, Fredlund H, Limnios A, Tapsall J. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2018 Mar 30];63(6):1142-51. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkp098>
18. Liebling MR, Arkfeld DG, Michelini GA, Nishio MJ, Eng BJ, Jin T, et al. Identification of *Neisseria gonorrhoeae* in synovial fluid using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1994;37(5):702-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8185697>
19. M02Ed13 | Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 13th Edition [Internet]. [cited 2019 Oct 28]. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/>
20. Forward KR. Risk of coinfection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Nova Scotia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* [Internet]. 2010 Jan;21(2):e84-6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2912101&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Haley N, Roy E, Leclerc P, Lambert G, Boivin JF, Cédras L, et al. Risk behaviours and prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* genital infections among Montreal street youth. *Int J STD AIDS* [Internet]. 2002;13(4):238-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11886608>
22. Wada K, Uehara S, Mitsuhashi R, Kariyama R, Nose H, Ishii A, et al. Prevalence of pharyngeal *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among heterosexual men in Japan. *J Infect Chemother* [Internet]. 2012;18(5):729-33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X12702519>

23. Hengel B, Jamil MS, Mein JK, Maher L, Kaldor JM, Guy RJ. Outreach for chlamydia and gonorrhoea screening: a systematic review of strategies and outcomes. *BMC Public Health* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Aug 25];13(1):1040. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3819260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Unemo M, Jensen JS. Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and *Mycoplasma genitalium*. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2016.268>
25. Wi T, Lahra MM, Ndowa F, Bala M, Dillon JR, Ramon-pardo P, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. 2017;1-16.
26. Unemo M, Shafer WM. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2011 Aug [cited 2013 Sep 20];1230:E19-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239555>
27. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Futur Microbiol* [Internet]. 2012;7(12):1401-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231489>