

Thais Mattos dos Santos

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Neisseria gonorrhoeae*
AOS ANTIMICROBIANOS EM UMA SÉRIE HISTÓRICA DE
ISOLADOS DA CIDADE DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Luiza Bazzo

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Thais Mattos dos
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Neisseria*
gonorrhoeae AOS ANTIMICROBIANOS EM UMA SÉRIE
HISTÓRICA DE ISOLADOS DA CIDADE DE SÃO PAULO / Thais
Mattos dos Santos ; orientadora, Maria Luiza Bazzo,
2018.
102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. *Neisseria*
gonorrhoeae. 4. Resistência. 5. Antimicrobiano. I.
Bazzo, Maria Luiza. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

“AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE Neisseria gonorrhoeae AOS ANTIMICROBIANOS EM UMA SÉRIE HISTÓRICA DE ISOLADOS DA CIDADE DE SÃO PAULO”

POR

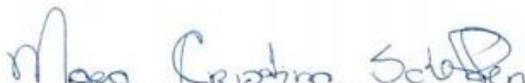
Thais Mattos dos Santos

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Mara Cristina Scheffer (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Orientador(a))



Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Maria Luiza Bazzo, por me receber no laboratório, pela confiança e por ter ajudado a consolidar meus conhecimentos, tanto acadêmicos quanto profissionais. Por me orientar e apoiar quando novas oportunidades surgiram em minha vida.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar esta dissertação.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e todo seu corpo docente, agradeço pelo apoio e conhecimentos compartilhados.

Ao CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Roberto José Carvalho da Silva por fornecer as amostras utilizadas para a realização desse trabalho.

A todos os colegas de Laboratório, especialmente Alisson, Felipe, Hanalydia, Jéssica, Letícia, Manoela, Marcos e Taiane, muito obrigada pela ajuda, troca de conhecimentos e experiências e pela amizade que construímos.

À Lisléia Golfetto, agradeço por ter me guiado durante essa jornada, me ajudado sempre que precisei e também para os momentos de desabafo. Você foi fundamental para este trabalho.

Às minhas grandes amigas e também mestrandas, Marjorie Marin e Juliana Rosa, que estiveram ao meu lado em toda essa caminhada, compartilhando das mesmas dificuldades, alegrias, tristezas e descobertas. Além dos momentos de diversão e conforto que passamos juntas. Vocês são essenciais. Também a todos os meus amigos, Maria Eduarda Cerny, Bruna Philippi, Mayara Koerich e Eliéser Ângelo, que estiveram me apoiando e compartilhando momentos de diversão.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório Médico Santa Luzia, que estiveram na etapa final diariamente ao meu lado.

Ao meu namorado e amigo Bruno Matheus de Campos Facchin, que esteve ao meu lado me apoiando e incentivando nas horas mais difíceis. Obrigada pelo amor, paciência e por compreender os momentos de ausência e por acreditar em mim.

Às minhas tias, Luzia Maria dos Santos e Maria Lea dos Santos, e minha irmã Íris Mattos Santos Pirath, que em todos os momentos de dificuldade me deram força para seguir em frente e não desistir dos meus sonhos.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho e por terem acreditado em mim desde o início. Espero poder retribuir tudo o que aprendi.

OBRIGADA!

RESUMO

Neisseria gonorrhoeae é o agente etiológico causador da gonorreia, umas das Infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais comuns. *Neisseria gonorrhoeae* era originalmente altamente suscetível aos antimicrobianos utilizados no tratamento da infecção. A pressão seletiva aliada à habilidade da bactéria de desenvolver e preservar fatores de resistência vem indicando a possibilidade de *N. gonorrhoeae* evoluir para formas intratáveis. Portanto, atualizações contínuas de diretrizes de tratamento e monitoramento constante da resistência antimicrobiana são essenciais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a evolução da resistência antimicrobiana do gonococo em uma série histórica de isolados da cidade de São Paulo/Brasil. Um total de 186 isolados de *N. gonorrhoeae* obtidos entre 2003 e 2016 do Centro de Referência e Treinamento de DST/São Paulo foram analisados. A identificação das espécies bacterianas foi confirmada por MALDI-TOF e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por ágar diluição para penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, azitromicina, ceftriaxona e cefixima. Foram utilizados testes moleculares a fim de detectar o gene *bla* nas cepas PPNG e correlacionar com os tipos de plasmídeos circulantes além de detectar o gene *tetM* nos gonococos. Ainda, sequenciamento do DNA foi realizado para identificar mutações nos genes *gyrA* e *parC* dos isolados QRNG. Os isolados foram divididos em dois períodos, de 2003 a 2010 e 2011 a 2016 para análise da mudança no perfil dos isolados. O perfil de suscetibilidade para penicilina não apresentou diferença entre os dois períodos. O perfil de suscetibilidade para tetraciclina mostrou comportamento diferente com mais intermediários no segundo período (61,1%) quando comparado ao primeiro período (29,8%). Para azitromicina, houve aumento no número de isolados resistentes ao longo dos anos: 2,3% no primeiro período (2003 - 2010) e 13,0% no segundo período (2011-2016). O ciprofloxacino foi o fármaco que apresentou a principal diferença entre os dois períodos, sendo 86,3% dos isolados suscetíveis e 12,2% resistentes no primeiro período, enquanto no segundo período, o número de isolados resistentes aumentou até 50%. Os padrões mais comuns de mutação foram Ser-91-Phe e Asp-95-Gly associados a uma substituição Ser-87-Arg no gene *parC*. Por fim, os isolados foram 100% sensíveis tanto à cefixima quanto à ceftriaxona. Entanto, uma análise molecular de um isolado que apresentou resistência à penicilina, tetraciclina,

ciprofloxacina, azitromicina e suscetibilidade diminuída à ceftriaxona (CIM = 0,125 µg/ml) foi realizado e o isolado foi classificado no ST1407, o qual está descrito em estirpes que apresentaram resistência às cefalosporinas. O estudo mostrou um aumento alarmante da resistência em isolados tratados com azitromicina e especialmente ciprofloxacino. Em vista dos achados deste estudo, o grave alerta a circulação do clone ST1407 e aumento de CIM para ceftriaxona e cefixima em isolados recentes, é ideal que a análise molecular seja estendida para todos os estudos de vigilância da resistência de *N. gonorrhoeae*.

Palavras-chave: Gonorreia, Neisseria, Resistência, Antimicrobiano.

ABSTRACT

Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* resistance to antimicrobials in a historical series of isolates from city of São Paulo/Brazil

Neisseria gonorrhoeae is the etiological agent of gonorrhea, one of the most common sexually transmitted infections (STIs). *Neisseria gonorrhoeae* was originally highly susceptible to antimicrobials. The ongoing selective pressure allied to the bacterium's ability to develop and preserve resistance factors has been indicating the possibility of *N. gonorrhoeae* to evolve into untreatable forms. Therefore, continuous updates of treatment guidelines and constant monitoring of antimicrobial resistance is essential. Thus, the aim of this study was to evaluate the evolution of *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in a historical series of isolates from São Paulo/Brazil. A total of 186 *Neisseria gonorrhoeae* isolates obtained between 2003 and 2016 from the STD/AIDS Reference and Training Center of São Paulo were analyzed. The bacterial species identification was confirmed by MALDI-TOF and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by agar dilution for benzylpenicillin, tetracycline, ciprofloxacin, performed azithromycin, ceftriaxone and cefixime. The DNA plasmids of PPNG strains were analyzed by PCR, molecular tests were used to detect and type the *tetM* gene in gonococci and direct DNA sequencing were to identify mutations in the *gyrA* and *parC* genes of the QRNG isolates. The isolates were divided in two periods, from 2003 to 2010 and 2011 to 2016. The susceptibility profile to benzylpenicillin did not presented difference between the two periods. The susceptibility profile to tetracycline showed a different behavior with more intermediates in the second period (61.1%) when compared to the first period (29.8%). For azithromycin, there was an increase in the number of resistant isolates over the years: 2.3% in the first period (2003 - 2010), and 13.0% in the second period (2011 - 2016). Ciprofloxacin was the drug that presented the major difference between the periods with 86.3% of isolates being sensitive and 12.2% resistant in the first period while in the second period, the number of resistant isolates increased up to 50%. The most common patterns of mutation were Ser-91-to-Phe and Asp-95-to-Gly associated with a Ser-87-to-Arg substitution in the *parC* gene. Lastly, the isolates were 100% sensitive to both cefixime and ceftriaxone, but a molecular analysis of the isolate that presented

resistant to benzylpenicillin, tetracycline, ciprofloxacin, azithromycin and with a decreased susceptibility to ceftriaxone (MIC = 0.125µg / ml) showed a circulating bacteria from ST 1407, which is described in strains that present resistance to cephalosporines. The study showed an alarming increase in resistance in isolates treated with azithromycin, and especially, ciprofloxacin. The study showed an alarming increase in resistance in isolates treated with azithromycin and especially ciprofloxacin. The circulation of clone ST1407 and increase of ceftriaxone and cefixime MIC in isolates is alarming. It is ideal that molecular analysis be extended to all surveillance studies of *N.gonorrhoeae* resistance. Molecular approaches including genotyping and antimicrobial resistance determinant analysis can be valuable to supplement and enhance the conventional surveillance of gonococcal.

Keywords: Gonorrhoea, Neisseria, Resistance, Antimicrobial.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Terapias antimicrobianas recomendadas para infecção gonocócica.....	27
Quadro 2: Concentração da solução estoque dos antibióticos utilizados para o teste de suscetibilidade antimicrobiana.	41
Quadro 3: Intervalo de concentração dos antibióticos para os testes de suscetibilidade em isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	42
Quadro 4: Diluição a partir de uma solução estoque (Ex: Penicilina)..	44
Quadro 5: Critérios de interpretação de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	46
Quadro 6: Fenótipos de resistência de <i>N. gonorrhoeae</i> à penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina, cefixima e ceftriaxona.	46
Quadro 7: Iniciadores utilizados para a reação de PCR para detecção de mutações em <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	48
Quadro 8: Protocolo da PCR <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	50
Quadro 9: Iniciadores utilizados no MAMA-PCR para detecção de blaTEM-135 e TEM-PCR para detecção de blaTEM-1 e blaTEM-135.	52
Quadro 10: Protocolo TEM-PCR.....	52
Quadro 11: Condições TEM-PCR.....	52
Quadro 12: Protocolo MAMA-PCR.....	53
Quadro 13: Condições PCR-MAMA	53

Quadro 14: Iniciadores para PCR multiplex para caracterização dos plasmídeos.	54
Quadro 15: Protocolo PCR plasmídeo	54
Quadro 16: Condições PCR plasmídeo.....	54
Quadro 17: Combinação de iniciadores da PCR multiplex para detecção do plasmídeo.	55
Quadro 18: Iniciadores utilizados na PCR multiplex.....	55
Quadro 19: Protocolo PCR tetM e variantes do plasmídeo	56
Quadro 20: Condições PCR tetM e variantes do plasmídeo	56
Quadro 21: Combinação de iniciadores utilizados para detecção do plasmídeo Americano e Holandês.....	56
Quadro 22: Iniciadores utilizados para PCR de detecção dos plasmídeos Americano e Holandês.....	57
Quadro 23: Iniciadores utilizados para PCR NG-MAST.....	57
Quadro 24: Protocolo PCR NG-MAST	58
Quadro 25: Condição PCR NG-MAST para <i>porB</i> e <i>tbpB</i>	58
Quadro 26: Porcentagem de isolados com perfil suscetível, intermediário e resistente aos antimicrobianos.	59
Quadro 27: Produção da β -lactamase, concentração inibitória mínima, tipo de alelo <i>bla</i> TEM e tipo do plasmídeo em isolados PPNG de 2003 a 2016.	73
Quadro 28: Fenótipos de suscetibilidade aos antimicrobianos observados no período de 2003 a 2016 em 186 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> da Cidade de São Paulo.	75

Quadro 29: Caracterização molecular de isolados CIPR da cidade de São Paulo, Brasil, de 2003 a 2016 em relação aos padrões de mutação de *gyrA* e *parC*, a presença de plasmídeos *tetM* e β -lactamase e o perfil de resistência à penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, ceftriaxona e cefixima..... 77

Quadro 30: Perfil de suscetibilidade, produção de β -lactamase e sequence type das cepas H042, F89 e SP 36..... 81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Desenho esquemático da diluição dos antimicrobianos a partir de suas soluções estoque (Ex: Penicilina). 43
- Figura 2: Perfil de suscetibilidade global dos 186 isolados entre 2003 e 2016 aos antimicrobianos azitromicina, ciprofloxacino, penicilina, tetraciclina, cefixima e ceftriaxona determinado por meio de ágar diluição..... 60
- Figura 3: Comparação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino e azitromicina nos períodos de 2003 a 2010 vs 2011 a 2016..... 61
- Figura 4: Variação da concentração inibitória mínima da penicilina. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* a penicilina, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016..... 62
- Figura 5: Variação da concentração inibitória mínima da tetraciclina. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* a tetraciclina, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016..... 64
- Figura 6: Porcentagem de *N. gonorrhoeae* resistente à azitromicina, ciprofloxacino, tetraciclina e penicilina do período de 2003 a 2016..... 65
- Figura 7: Variação da concentração inibitória mínima do ciprofloxacino. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* ao ciprofloxacino, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016. 67
- Figura 8: Variação da concentração inibitória mínima. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas de 3^o geração: ceftriaxona e cefixima, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AZMR** - *Neisseria gonorrhoeae* resistente à azitromicina
- CLSI** - Clinical & Laboratory Standards Institute
- CDC** - Centre for Disease Prevention and Control
- CIPR** - *Neisseria gonorrhoeae* resistente ao ciprofloxacino
- CFM^{red}** - *Neisseria gonorrhoeae* com suscetibilidade diminuída a cefixima
- CMPR** - Resistência à Penicilina mediada por Cromossomo
- CMTR** - Resistência à Tetraciclina Mediada por Cromossomo
- CMRNG** - *N. gonorrhoeae* Cromossomalmente Resistente à Penicilina e Tetraciclina
- CRO^{red}** - *Neisseria gonorrhoeae* com suscetibilidade diminuída a ceftriaxona
- CRT – DST/AIDS** - Centro de Referência e Treinamento DST/Aids
- DIP** - Doença inflamatória pélvica
- DHPS** - Enzimas Dihidropteroate Sintase
- DST** - Doenças Sexualmente Transmissíveis
- ECDC** - European Centre for Disease Prevention and Control
- ESBL** - β -lactamase de espectro estendido, do inglês *Extended Spectrum β -lactamases*
- ESC** - Cefalosporinas de espectro estendido, do inglês *Extended-spectrum Cephalosporins*
- EUA** - Estados Unidos da América
- EUCAST** - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- EURO-GASP** - European gonococcal antimicrobial surveillance programme
- FUAM** - Fundação Alfredo da Matta de Manaus
- IST** - Infecção Sexualmente Transmissível
- IT** - Intramuscular
- GASP** - Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Programme
- GASP-LAC** - Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Programme – Latin America and Caribbean
- GISP** - Gonococcal Isolate Surveillance Program
- LOS** - Lipooligossacarídeo

MALDI-TOF MS - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*
CIM - Concentração inibitória mínima
MLST - *Multilocus sequence typing*, do inglês
NAATs - Testes de amplificação de ácido nucleico
NG-MAST - *Neisseria gonorrhoeae Multi-antigen Sequence Typing*, do inglês
OMS - Organização Mundial de Saúde
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PBP - Proteína Ligadora de Penicilina, do inglês *Benzylpenicillin Binding Proteins*
PPNG - *Neisseria gonorrhoeae* produtora de Penicilinase
SNP - Specific single nucleotide polymorphism, do inglês
ST - Tipo da sequência, do inglês *Sequence Type*
TRNG - *N. gonorrhoeae* resistente à tetraciclina
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VO - Via oral
WHO - World Health Organization

Sumário	
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA	20
2.3 PATOGÊNESE	22
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	23
2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
2.6 TRATAMENTO	25
2.7 HISTÓRICO DOS ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA	28
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. METODOLOGIA.....	39
4.1 AMOSTRAGEM	39
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO.....	39
4.3 MALDI-TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization.....	40
4.4 TESTE DE β -LACTAMASE.....	40
4.5 TESTE DE DISCO DIFUSÃO	41
4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR ÁGAR DILUIÇÃO	41
4.7 DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO PERFIL DOS ISOLADOS	47
4.7.1 Extração de DNA Bacteriano	47
4.7.2 Caracterização de Genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> dos Isolados Resistentes à Quinolona.....	48
4.7.3 Caracterização de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Produtora de Penicilinase	50

4.7.3.1	Identificação do gene <i>bla</i> _{TEM}	50
4.7.3.2	Pesquisa do Tipo de Plasmídeo Carreador do gene <i>bla</i> 53	
4.7.4	Pesquisa do gene <i>tetM</i> - Resistência Plasmidial.....	55
4.7.5	NG-MAST.....	57
4.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO	83
7	PERSPECTIVAS	85
8	REFERÊNCIAS.....	87
	APÊNDICE A	101

1 INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) estão entre as principais causas globais de doenças agudas, infertilidade, deficiências e morte. Acarretam graves consequências médicas e psicológicas em milhões de homens, mulheres e bebês, além de ser um grande problema de saúde pública em todo o mundo (WHO, 2016). Segundo WHO, (2016), mais de um milhão de ISTs são adquiridas todos os dias em todo o mundo. A cada ano, estima-se que 357 milhões de novas infecções IST: clamídia (131 milhões), gonorreia (78 milhões), sífilis (5,6 milhões) e tricomoníase (143 milhões). Mais de 500 milhões de pessoas vivem com infecção genital por HSV (herpes). Ainda, mais de 290 milhões de mulheres têm uma infecção por HPV (BRASIL, 2015; WHO, 2016).

Em 2016, um total de 1.598.354 casos de infecção por *Chlamydia trachomatis* foram relatados pelo CDC, (2016b), tornando-se a IST mais comum nos Estados Unidos. A gonorreia é considerada a segunda IST bacteriana mais comumente relatada, no entanto, as taxas relatadas desta infecção, além de outras ISTs, são comumente inferiores à verdadeira prevalência da infecção, uma vez que quase sempre, cerca de metade das infecções gonocócicas nas mulheres são assintomáticas (PISZCZEK; ST. JEAN; KHALIQ, 2015).

Nos últimos anos, vem crescendo a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos utilizados para tratamento das ISTs, em particular gonorreia, reduzindo as opções terapêuticas. A diminuição da suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* à última opção de tratamento, juntamente com a resistência já demonstrada às penicilinas, sulfamidas, tetraciclina, quinolonas e macrolídeos faz do gonococo um organismo resistente a múltiplos antimicrobianos. A resistência antimicrobiana para outras ISTs, embora menos comum, também existe, tornando crucial a prevenção, o tratamento imediato e o controle de cura das infecções (WHO, 2016).

No Brasil, em 2016, o Projeto Sengono realizado em parceria com a UFSC abriu portas para que fossem realizados estudos retrospectivos utilizando bancos de isolados disponíveis. Desses, encontravam-se disponíveis os bancos de cepas da Cidade de São Paulo que compreende os anos de 2003 a 2016 e de Florianópolis dos anos 2008 a 2016. Esses estudos retrospectivos foram desenvolvidos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), concomitantemente ao

Projeto Sengono, a fim de caracterizar fenotipicamente e molecular os isolados circulantes de *N. gonorrhoeae*. O banco de isolados da cidade de São Paulo é tema desta dissertação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Neisseria gonorrhoeae pertence à família *Neisseriaceae* e ao gênero *Neisseria*. Apresentam-se como diplococos Gram-negativos que medem entre 0,6 e 1,5 μ m, são imóveis e não esporulados. *Neisseria gonorrhoeae* é o agente etiológico causador da gonorreia, umas das ISTs mais comuns. São espécies oxidase positiva por apresentarem a enzima citocromo C oxidase e produzem a enzima catalase, a qual degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

N. gonorrhoeae é uma bactéria aeróbia e fastidiosa com crescimento em temperatura ótima entre 35°C e 37°C, em atmosfera úmida e presença de 5% de CO₂. As colônias são normalmente pequenas, brilhantes, viscosas e extremamente aderidas ao meio e seu crescimento é observado entre 18 a 24 horas, porém sua viabilidade no meio perde-se rapidamente por autólise (BRASIL, 2001; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000). Por ser uma bactéria fastidiosa, para o cultivo são necessários meios enriquecidos como o ágar chocolate. O isolamento do gonococo, para amostras biológicas de sítios não estéreis, deve ser realizado em meio seletivo Thayer-Martin, que consiste em ágar chocolate acrescido de vancomicina, colistina e trimetoprim, antibióticos para os quais a bactéria apresenta resistência natural, além do antifúngico nistatina. Materiais obtidos de sítios que não apresentam biota endógena (sangue, fluido sinovial e líquido) devem ser cultivados em meios livres de antibióticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A gonorreia é a segunda IST bacteriana mais prevalente no mundo, considerada um problema de saúde pública devido à sua alta incidência acompanhada por uma diminuição nas opções terapêuticas

(COSTA-LOURENÇO et al., 2017; WHO, 2012). Em 2012 foram estimados 78 milhões de casos da doença (WHO, 2016), onde os maiores números foram observados na Região Oeste do Pacífico (35,2 milhões), Região do Sudeste Asiático (11,4 milhões) e na África (11,4 milhões) (UNEMO; SHAFER, 2014). Em 2013, o *Centre for Disease Prevention and Control* (CDC) relatou 333.004 novos casos de gonorreia nos Estados Unidos, com uma incidência de 106,1 casos por 100.000 habitantes. O CDC estima 820 mil novos casos de gonorreia por ano em todo o país (CDC, 2016b; HILL; MASTERS; WACHTER, 2016). Em 2016, 468514 casos da infecção pelo gonococo foram relatados nos EUA, com um aumento de 18,5% comparado a 2001, uma taxa de 145,8 casos por 100.000 habitantes (CDC, 2016a). A Organização Mundial de Saúde (OMS) já estabeleceu programas globais de vigilância de suscetibilidade antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* (GASP- *Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Programme*) para estabelecer quais antimicrobianos permanecem efetivos como tratamento para gonorreia (BIGNELL; UNEMO, 2009).

Em países da América Latina e do Caribe, a infecção por gonorreia também é considerada um problema de saúde pública e os dados epidemiológicos são escassos. Foi estabelecido durante a década de 90 o GASP-LAC, Programa de Vigilância da Suscetibilidade Antimicrobiana Gonocócica – América Latina e Caribe (GASP-LAC; *Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Programme – Latin America and Caribbean*) compreendendo 41 países incluindo o Brasil a fim de promover a vigilância aos antimicrobianos utilizados para o tratamento da gonorreia e atualizar as diretrizes de tratamento (DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013).

No Brasil, existem limitações quanto à disponibilidade de informações devido os estudos serem pontuais e esporádicos além da gonorreia não ser caracterizada como uma doença de notificação compulsória, o que impossibilita uma análise epidemiológica ampla, mas alguns trabalhos vêm contribuindo para o melhor entendimento das frequências dessa doença no país (FERREIRA et al., 2007; SERRA, 2000). Em 2003, a incidência de infecções gonocócicas no Brasil foi estimada em 1,54 milhões de casos, sendo 657.139 casos na região Sudeste e mais de 130.000 casos no Rio de Janeiro (BRASIL, 2008). Em 2004, a Fundação Alfredo da Matta de Manaus (FUAM) notificou 750 casos de uretrites e cervicites gonocócicas (FERREIRA et al., 2004). Já em 2015, o Ministério da Saúde estimou a ocorrência de

9.285.000 casos por ano entre a faixa etária de 15 a 49 anos (BRASIL, 2015). Outros estudos realizados entre homens que frequentam clínicas de IST e entre mulheres grávidas em seis cidades brasileiras, revelaram prevalências de infecção por *N. gonorrhoeae* de 18,4 e 1,5%, respectivamente (BARBOSA et al., 2010; BRASIL, 2008).

2.3 PATOGÊNESE

N. gonorrhoeae possui diversos fatores relacionados à sua virulência, que incluem a formação de pili, expressão da proteína Opa, expressão do lipooligossacarídeo (LOS), expressão de proteína Por e produção de protease IgA1, que facilita a adaptação da bactéria dentro do hospedeiro (HILL; MASTERS; WACHTER, 2016).

A infecção gonocócica ocorre quando o organismo se liga à superfície da mucosa, invadindo o epitélio e se estabelecendo na lâmina própria ou no espaço subepitelial. Essa adesão inicial é mediada por meio do Pili IV, que é composto principalmente da proteína PilE, além de apresentar em sua extremidade a proteína PilC, responsável pela ligação ao receptor celular, uma glicoproteína de membrana denominada CD46, membro das proteínas reguladoras da ativação do complemento. O Pili IV além de promover a ligação às células hospedeiras, também está envolvido na motilidade bacteriana, formação de biofilme e transformação de DNA (GROSS; TYRING, 2011; HILL; MASTERS; WACHTER, 2016; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Posteriormente à adesão, ocorre uma ligação mais intensa do gonococo ao epitélio, a qual é mediada pela proteína *Opa*, que reconhece duas classes de receptores celulares, as proteoglicanas de heparana sulfato e o antígeno carcinoembrionário (CD66). Uma vez estabelecida essa ligação, o próximo estágio consiste na endocitose e transcitose do gonococo através da célula epitelial. Esse processo é iniciado pelas proteínas *Opa*, mas também tem sido associada ao LOS, o qual é um alvo imune primário juntamente com a principal proteína da membrana externa *Por*, que irá desencadear uma série de sinais para iniciar a endocitose (GROSS; TYRING, 2011; HILL; MASTERS; WACHTER, 2016; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

N. gonorrhoeae é um organismo altamente adaptado, pode adquirir nutrientes de seu hospedeiro, como também desenvolver mecanismos para evadir a resposta imune. Uma vez estabelecida infecção, os antígenos gonocócicos provocam uma resposta

inflamatória, que resulta na infiltração de polimorfonucleares, manifestando os sintomas da gonorreia (GROSS; TYRING, 2011).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A gonorreia é uma IST e seus sinais e sintomas são determinados conforme o local primário da infecção pelo gonococo. *N. gonorrhoeae* acomete primeiramente a membrana mucosa da uretra nos homens e endocérvice nas mulheres, mas pode infectar o reto, faringe e conjuntiva (BRASIL, 2015). Apesar de ser uma IST, neonatos podem adquirir infecção gonocócica na conjuntiva no momento do parto, o que é denominado oftalmia neonatal (GROSS; TYRING, 2011).

Nos homens, a maioria dos casos de uretrite gonocócica aguda apresenta-se na forma sintomática, apresentando secreção uretral purulenta abundante (80%) e disúria (50%), normalmente iniciando de dois a oito dias após a exposição, podendo permanecer latente por até 30 dias. A infecção uretral assintomática é encontrada em uma baixa porcentagem de homens (10%), sendo um importante reservatório para a transmissão. A infecção retal apresenta sintomas, como prurido, dor, tenesmo, constipação e corrimento anal em apenas um terço dos homens infectados, enquanto a infecção faríngea raramente manifesta sintomas em ambos os sexos. Na conjuntivite gonocócica, em sua maioria, é observado edema na pálpebra e exsudato purulento (BIGNELL; UNEMO, 2009; GROSS; TYRING, 2011).

Nas mulheres, os sintomas incluem o aumento ou alteração da secreção vaginal (50%), dor abdominal (25%), disúria (10 – 15%) e raramente sangramento intermenstrual ou menorragia. A infecção endocervical é normalmente assintomática (50%) e só é possível obter o diagnóstico por meio de comunicação do parceiro infectado (BIGNELL; UNEMO, 2009; GROSS; TYRING, 2011). A infecção retal na mulher é menos frequente e usualmente assintomática, assim como infecções de orofaringe. Em ambos os sexos, além dos indivíduos praticantes de relação anal, o envolvimento retal pode ser resultado de autocontaminação, assim como a uretrite nas mulheres que pode ser recorrente da cervicite já existente, embora isso ocorra raramente (SKERLEV; ČULAV-KOŠČAK, 2014).

Infecções por *N. gonorrhoeae* não tratadas ou tratadas incorretamente podem evoluir para o trato genital superior levando a uma infecção gonocócica complicada, como epididimite em homens e

endometrite, anexite e doença inflamatória pélvica (DIP) em mulheres, com o risco de desenvolvimento infertilidade e gravidez ectópica. Essas complicações ocorrem usualmente mais em mulheres do que em homens, devido à maior taxa de infecção assintomática em mulheres (GROSS; TYRING, 2011; SKERLEV; ČULAV-KOŠČAK, 2014). Já a infecção gonocócica disseminada acontece em casos raros (menos que 1% das infecções) e geralmente manifesta-se por meio do aparecimento de lesões cutâneas, febre, atralgia, artrite aguda e tenossinovite e, raramente, pode causar endocardite aguda, pericardite, meningite e peri-hepatite (Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis) (BIGNELL; UNEMO, 2009; GERBASE, 2014).

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da gonorreia é feito da detecção da bactéria por meio de microscopia, cultura ou de seu material genético, utilizando testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs) em amostras genitais ou extragenitais (UNEMO; SHAFER, 2014).

Na rotina, os diplococos intracelulares presentes nos polimorfonucleares podem ser identificados por meio de microscopia de esfregaços corados com azul de metileno ou Gram. Essa metodologia tem baixo custo, fornece resultados rápidos e possui alta sensibilidade ($\geq 95\%$) e especificidade (97%) para o diagnóstico da gonorreia em homens sintomáticos (BIGNELL; UNEMO, 2009). No entanto, a microscopia não é recomendada como o único método diagnóstico para gonorreia cervical ($\leq 55\%$), faríngea ou retal ($\leq 40\%$), ou para pacientes assintomáticos ($\leq 55\%$), pois os resultados negativos não excluem a infecção, devido à baixa sensibilidade do método. Em mulheres, o esfregaço de secreção cervical detecta apenas 40% a 60% de espécimes com cultura positiva, o que pode explicar o baixo número de infecções diagnosticadas em mulheres (BIGNELL; UNEMO, 2009; WHO, 2015).

A cultura, considerada padrão ouro, é um teste de diagnóstico específico e de baixo custo, com uma sensibilidade de 85% a 95% em infecções uretrais e endocervicais (WHO, 2016). É a única metodologia que permite realizar teste de suscetibilidade antimicrobiana, a fim de detectar e monitorar a evolução da resistência (BIGNELL; UNEMO, 2009). É um método lento e para obter altos níveis de sensibilidade e especificidade é necessário otimizar as condições de coleta, transporte,

armazenamento, e mesmo em condições ótimas, a sensibilidade da cultura é baixa para amostras faríngeas e retais (~50%) (GOIRE et al., 2014).

Além disso, o isolamento de *N. gonorrhoeae* de sítios que contêm micro-organismos saprófitas (faringe, reto e cérvix) pode ser difícil. Isso pode ser contornado utilizando meios de cultura contendo agentes antimicrobianos que inibam o crescimento das espécies não patogênicas (PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000). Recomenda-se que os meios de cultura seletivos nutritivos, como o de Thayer-Martin seja utilizado para o diagnóstico de rotina de gonorreia, já para amostras urogenitais é ideal que também se utilize um meio de cultura não seletivo (WHO, 2015).

Protocolos internacionais recomendam NAATs para o diagnóstico da gonorreia (BIGNELL; UNEMO, 2009; CDC, 2015). Esses testes são mais rápidos e sensíveis (>90%), conseguem detectar o gonococo não viável, oferecem uma maior tolerância a inadequações nos processos de coleta, transporte e armazenamento, possuem maior sensibilidade para amostras de faringe e reto, permitem a automatização e a detecção simultânea de vários patógenos (UNEMO; SHAFER, 2014).

2.6 TRATAMENTO

As diretrizes estabelecem políticas para o tratamento sindrômico da gonorreia, definida como uretrite sintomática em homens e cervicite mucopurulenta em mulheres, mesmo que não seja possível um diagnóstico microbiológico (BRASIL, 2015; CDC, 2015). *N. gonorrhoeae* desenvolveu resistência aos antimicrobianos utilizados inicialmente para o seu tratamento (penicilina, tetraciclina e ciprofloxacino), deixando apenas as cefalosporinas de amplo espectro, ceftriaxona e cefixima, como os únicos antimicrobianos recomendados para infecções gonocócicas. A determinação das diretrizes terapêuticas é estabelecida por meio da análise de dados de vigilância, com isso, a OMS reformulou o GASP. Essa reformulação teve a finalidade de realizar o monitoramento local, regional e global da suscetibilidade antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* e estabelecer novos protocolos para o tratamento da gonorreia (ISON; DEAL; UNEMO, 2013; WHO, 2015). Atualmente, as diretrizes da OMS para o tratamento de *N. gonorrhoeae* com base em dados de países de alta, média e baixa renda, publicada em 2016, recomenda o uso da ceftriaxona ou cefixima associada à

azitromicina principalmente para o tratamento de infecções gonocócicas genitais e anorretais (WHO, 2016).

Em 1986, foi criado o “*Gonococcal Isolate Surveillance Program*” (GISP) com o intuito de monitorar as tendências de suscetibilidade de isolados gonocócicos nos Estados Unidos. Com base nos dados obtidos do programa, o CDC pôde estabelecer protocolos terapêuticos com antimicrobianos adequados e com maior eficácia. Atualmente, o regime recomendado pelo CDC para o tratamento da infecção gonocócica não complicada (uretra, cérvix e reto) consiste na administração de 250mg de ceftriaxona intramuscular (IM) dose única associada à 1g de azitromicina por via oral (VO) e como terapia alternativa, o uso de 400mg de cefixima e 1g de azitromicina ambos por VO. Apesar de as infecções de faringe pelo gonococo se mostrarem mais persistentes que as urogenitais e anorretais em relação ao tratamento, sugere-se o uso do mesmo regime terapêutico. Já infecções gonocócicas da conjuntiva requerem 1g de ceftriaxona IM associado a 1g de azitromicina VO (CDC, 2016b).

O *European gonococcal antimicrobial surveillance programme* (Euro-GASP) foi criado em 2004 a fim de monitorar a emergência de gonococos resistentes na União Europeia e Área Econômica Europeia, disponibilizando dados para elaborar protocolos terapêuticos de acordo com a epidemiologia local (COLE et al., 2011). Segundo o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), a diretriz estabelecida tanto para infecções anogenitais por *N. gonorrhoeae* não complicadas quanto para infecções faríngeas recomenda como tratamento de primeira escolha o uso de ceftriaxona 500mg IM em associação com 2g de azitromicina VO. Atualmente, casos de resistência às cefalosporinas já foram descritos, necessitando de terapias alternativas, com administração de concentrações maiores de ceftriaxona (1g) ou ainda o uso de antimicrobianos como a gentamicina e espectinomicina (BIGNELL; UNEMO, 2009; WIND et al., 2017).

No Brasil, até 2016, o regime terapêutico preconizado era o uso do ciprofloxacino 500mg associado à azitromicina 1g VO como tratamento de primeira escolha para infecções anogenitais não complicadas. Entretanto, uso desta fluorquinolona já era contraindicado nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, uma vez que taxas maiores que 5% de resistência ao antimicrobiano foram previamente descritas (COSTA et al., 2013; UEHARA et al., 2011). No ano de 2016, o Ministério da Saúde, em parceria com a Universidade

Federal de Santa Catarina, realizou estudo de vigilância da resistência in vitro do gonococo. Esse estudo de vigilância mostrou resistência emergente e em expansão ao ciprofloxacino, com taxas superiores a 50% em todas as regiões do país (Quadro 1). O esquema terapêutico preconizado para a infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto) de primeira escolha foi alterado, em todo o país, e passou a ser constituído pela terapia dupla de ceftriaxona 500mg IM associada à azitromicina 1g VO em dose única (BRASIL, 2017).

Para infecções gonocócicas de faringe, o Ministério da Saúde sugere o uso de ceftriaxona 500mg IM com 1g de azitromicina VO. A terapia medicamentosa para conjuntivite gonocócica deve ser feita com o uso de 1g de ceftriaxona IM em dose única e o mesmo protocolo deve ser seguido para infecções gonocócicas disseminadas (WHO, 2015). Além da ceftriaxona, outra cefalosporinas de terceira geração, a cefixima, vem sendo utilizada globalmente. Entretanto, essa cefalosporinas não faz parte das recomendações terapêuticas no Brasil, uma vez que a cefixima oral não está disponível no mercado nacional e não possui registro válido na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2015; COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Quadro 1: Terapias antimicrobianas recomendadas para infecção gonocócica.

País/Região	Tratamento	Situações especiais	Ano de publicação
Europa	CRO 500 mg IM + AZM 2 g VO	Se CRO não disponível, ou o paciente se recusa a tomar a medicação: CFM 400 mg VO + AZM 2 g VO	2013
Estados Unidos	CRO 250 mg IM + AZM 1 g VO	Se CRO não disponível: CFM 400 mg PO + AZM 1 g VO	2015
Brasil	CRO 500 mg IM + AZM 500 mg VO	Alergia a CRO: AZM 2 g VO	2017

CRO = ceftiaxona; CFM = cefixima; AZM = azitromicina

2.7 HISTÓRICO DOS ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA

No início do uso de antimicrobianos, *N. gonorrhoeae* apresentava-se suscetível à maioria deles, entretanto possui uma extraordinária capacidade de alterar seu DNA e, quando o microorganismo é exposto à pressão seletiva, modifica seu genoma. Dessa maneira, o gonococo evoluiu e adquiriu ou desenvolveu mecanismos de resistência a praticamente todos os antimicrobianos utilizados para tratamento (UNEMO; SHAFER, 2014).

As sulfonamidas foram introduzidas como terapia para gonorreia durante a década de 1930, entretanto a resistência a esse antimicrobiano emergiu rapidamente. Essa classe de antimicrobiano se liga às enzimas dihidropteroate sintase (DHPS) bacteriana, inibindo a síntese de ácido fólico. A resistência à sulfonamida pode ser mediada pela síntese excessiva do ácido p-aminobenzóico, que dilui o agente antimicrobiano, ou por alterações no gene *folP*. As alterações da DHPS resultam numa afinidade significativamente reduzida para as sulfonamidas e uma atividade bacteriostática (UNEMO; SHAFER, 2014). Já em 1944, uma taxa de 75% de falha no tratamento com sulfatiazol ou sulfapiridina foi relatada entre os soldados da Segunda Guerra Mundial (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Nos anos de 1940 a penicilina tornou-se o tratamento de primeira escolha uma vez que o gonococo era altamente suscetível ao antimicrobiano, com concentração inibitória mínima (CIM) menor ou igual a 0,05 µg/ml. (GROSS; TYRING, 2011; UNEMO; SHAFER, 2011, 2014). Os β-lactâmicos, como a penicilina, inibem a síntese da parede celular bacteriana por se ligarem nas enzimas transpeptidases chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBP – *Benzylpenicillin Binding Proteins*), o que resulta em atividade bactericida (UNEMO; SHAFER, 2014). A prevalência de *N. gonorrhoeae* com resistência mediada por cromossomo aumentou progressivamente com o uso da penicilina e cepas produtoras de penicilinase com alto nível de resistência à penicilina surgiram em 1976 (DEGUCCI et al., 2010; PHILLIPS, 1976).

Durante os primeiros anos de uso, os mecanismos de resistência à penicilina do gonococo estavam relacionados à diminuição da suscetibilidade por mutações cromossômicas cumulativas em diferentes genes *penA* e *ponAI*, *penB*, *penC* e *mtrR* (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Os mecanismos de resistência à penicilina mediada por

cromossomo são complicados e não são completamente compreendidos. Alguns mecanismos já elucidados compreendem as mutações da região promotora do gene *mtrR* resultando em superexpressão da bomba de efluxo por ativação do MtrC-MtrD-MtrE, redução da permeabilidade da proteína da membrana externa PorB1b, codificada pelo gene *porB1b*, prováveis mutações no *pilQ*, gene que codifica proteínas secretoras e, mutações no *penA*, que promovem modificações na Proteínas Ligadoras de Penicilina 2 (PBP2), diminuindo a taxa de acilação da penicilina, além de criar o mosaico PBP2, o qual reduz a suscetibilidade e ou contribui para falha no tratamento com cefixima e ceftriaxona e o determinante *porA*, que codifica mutações na PBP1, ação semelhante ao determinante *penA* (MAIER; ZUBRZYCKI; COYLE, 1975; OLESKY et al., 2006).

Na década de 1970, surgiram isolados de *N. gonorrhoeae* que apresentavam CIM de até 128 µg/ml para penicilina (PHILLIPS, 1976), a resistência de alto nível a penicilina era mediada por plasmídeos possuem plasmídeos que carregavam o gene *blaTEM-1*, que codifica uma β-lactamase do tipo TEM-1. Essa enzima hidrolisa o anel β-lactâmico tornando a penicilina inativa e os isolados ficaram conhecidos como *N. gonorrhoeae* produtores de penicilinase (*PPNG - Benzylpenicillinase producing N. gonorrhoeae*) (PHILLIPS, 1976; UNEMO; SHAFER, 2014). Um alarmante dado sugere que o gene *blaTEM-1*, que codifica a β-lactamase TEM-1, necessita de apenas alguns polimorfismos específicos de nucleotídeos (*SNPs – Specific single nucleotide polymorphisms*) para evoluir para um gene que codifica uma β-lactamase de espectro estendido (ESBL), que poderia degradar todas as cefalosporinas de espectro estendido (ESCs) incluindo ceftriaxona (MUHAMMAD et al., 2014; STEFANELLI et al., 2018). A enzima TEM-135, que difere de TEM-1 por uma substituição de aminoácidos (M182T)¹, foi identificada pela primeira vez em *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Typhimurium* na Itália, mas foi recentemente descrita em cepas de *N. gonorrhoeae* (GIANECINI et al., 2015a; MUHAMMAD et al., 2014; OHNISHI et al., 2011; PASQUALI et al., 2005). A TEM-135 também não possui atividade ESBL, no entanto, a substituição do M182T aumenta a estabilidade da

¹ Substituição de um aminoácido (aa) metionina (M) por um aa treonina (T) na posição 182 do genoma.

enzima e apenas uma mudança adicional em qualquer uma das várias posições-chave de aminoácidos seria necessária para conferir capacidade para hidrolisar as ESCs (COLE et al., 2015). O gene *blaTEM* e os plasmídeos são geneticamente relacionados, mas apresentam diferentes tamanhos e locais de inserção/exclusão, e são nomeados de acordo com sua origem epidemiológica. Os tipos mais descritos globalmente são o Asiático (7426 pares de base [pb]), Africano (5588 pb) e Toronto/Rio (5154 pb). No entanto, outros tipos, como Nimes (6798 pb), Nova Zelândia (9309 pb), Joanesburgo (4865 pb) e Australiano (3269 pb) foram descritos (PAGOTTO et al., 2000; TREMBIZKI et al., 2014).

No final da década de 1940, outros antimicrobianos foram introduzidos para o tratamento da gonorreia em pacientes com contra-indicação para penicilina. Estes antimicrobianos alternativos incluíam alguns aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina (UNEMO; SHAFER, 2011). A tetraciclina foi introduzida como opção de tratamento para a gonorreia na década de 1950. Seu mecanismo de ação consiste em ligar-se, de maneira reversível, à porção 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica, resultando em um efeito bacteriostático (CHOPRA; ROBERTS, 2001). A resistência do gonococo à tetraciclina mediada por cromossomo é decorrente de uma combinação de três mutações genéticas: (i) a mutação *mtrR*, que resulta na superexpressão de uma bomba de efluxo (MtrC-MtrD-MtrE); (ii) o determinante de *penB*, que resulta em uma mutação na porina que diminui o influxo de tetraciclina para a célula, e (iii) o alelo *rpsJ*, que codifica uma forma alterada de proteína ribossômica (JOHNSON; MORSE, 1988; SPARLING; SARUBBI; BLACKMAN, 1975). Destes, apenas o determinante de *rpsJI* é específico para a resistência à tetraciclina, tornando-o o primeiro gene de resistência específico identificado para este antimicrobiano em cepas gonocócicas resistentes a tetraciclinas mediadas cromossomicamente (HU et al., 2005).

Os primeiros isolados de gonococos que apresentaram resistência a altos níveis de tetraciclina (CIM 24-32 µg/ml) foram detectados nos Estados Unidos da América (EUA) em 1985 (MORSE et al., 1986). Em meados dos anos 1980, o surgimento de gonococos com plasmídeos conjugados contendo o gene *tetM*, que leva à altos níveis resistência à tetraciclina (CIM ≥16 µg/ml), resultou na exclusão do antimicrobiano nas diretrizes de tratamento nos EUA e em diversos países. Hoje, estas

estirpes de *N. gonorrhoeae* com resistência à tetraciclina mediada por plasmídeos já estão amplamente difundidas pelo mundo (UNEMO; SHAFER, 2014). Em cepas de *N. gonorrhoeae*, o gene *tetM* é carregado por dois plasmídeos conjugativos o plasmídeo tipo Holandês e o Americano, de tamanho similar, mas provavelmente não relacionados de forma evolutiva (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Com o aumento da resistência, a tetraciclina já não era recomendada para o tratamento da gonorreia e em meados da década de 1980 iniciou-se a era da quinolona (CDC, 1989).

O ciprofloxacino, uma fluoroquinolona de segunda geração, tornou-se o tratamento recomendado para infecções gonocócicas em 1993, uma vez que foi determinado como seguro, econômico e eficaz em dose única dose de 250mg. (CDC, 2007). No entanto, devido a casos relatados de suscetibilidade diminuída, fizeram com que o CDC alterasse a concentração para 500mg em uma única dose (GRANSDEN et al., 1990). Entretanto, foram observadas falhas de tratamento, já no início da década de 1990 em diversos países, tanto com os regimes de 250 mg como também com doses de 500 mg, sendo que a perda da suscetibilidade foi decorrente de mutações nos genes *gyrA* e *parC* (LEWIS, 2014).

As quinolonas atuam na inibição da DNA gyrase e da topoisomerase IV, duas topoisomerasas essenciais para a replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA, resultando em atividade bactericida (UNEMO; SHAFER, 2014). A resistência ao ciprofloxacino é determinada principalmente por alterações nos genes *gyrA* e *parC*² envolvidos na replicação e recombinação do DNA, respectivamente (JACOBY, 2005). O nível de resistência parece estar relacionado com a localização e com o número de mutações nesses 2 genes. As mutações que conduzem a uma única alteração de aminoácidos nas posições GyrA 91 ou 95 levam a um nível de resistência intermediária (CIM 0,1 - 0,5 µg/ml); no entanto, três ou mais alterações de aminoácidos nas proteínas GyrA (nas posições 91, 95 e 102) e ParC (87 e 91) e/ou ParE podem levar à CIM \geq 32 µg/ml (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). As mutações nos codons 91 e 95 de *gyrA* e 86 a 88 e 91 de *parC* são os mais frequentemente associadas à resistência a quinolonas em *N. gonorrhoeae* (VERNEL-PAUILLAC et al., 2009). Além disso, a

² *parC* e *parE* são subunidades da enzima topoisomerase IV

mutação no códon Ser91³ do gene *gyrA* está presente em 99% dos isolados resistentes investigados até o momento, sendo esta mutação um alvo atraente para a predição da suscetibilidade ao ciprofloxacino (HEMARAJATA et al., 2016).

Uma década depois de ser recomendado como primeira escolha para o tratamento de gonorreia nos EUA, o tratamento com ciprofloxacino foi abandonado, devido a altas taxas de resistência (CDC, 2007). Depois disso, o gonococo resistente ao ciprofloxacino também surgiu em diversas regiões da Europa (COLE et al., 2011; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL., 2015; SOOD et al., 2017). Estudos confirmaram a correlação genética entre os isolados, destacando um padrão clonal (MAVROIDI et al., 2000; SU; LIND, 2001). No Brasil, a diminuição da suscetibilidade ao ciprofloxacino já havia sido descrita em estudos prévios com isolados de *N. gonorrhoeae* de diferentes regiões brasileiras, com taxas variando de 5,5% para 9,7% (BARRETO et al., 2004; FERREIRA et al., 2007, 2011). Em 2007, a resistência ao ciprofloxacino foi descrita entre os isolados de duas grandes cidades brasileiras: 7,7% entre os isolados do Rio de Janeiro (UEHARA et al., 2011) e 3,1% entre os isolados de São Paulo (BELDA et al., 2007). Depois de observada taxas de resistência maiores que 5% em algumas regiões do Brasil, o Ministério da Saúde preconizou que para a maioria dos territórios, o ciprofloxacino em associação com azitromicina continuava a ser o tratamento de primeira escolha para a gonorreia, com exceção dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, onde o ciprofloxacino deveria ser substituído pela ceftriaxona 500mg dose única (BRASIL, 2015).

Então 2016 o Projeto Sengono, da já mencionada parceria entre o Ministério da Saúde e a UFSC determinou, por ágar diluição, a CIM de isolados clínicos provenientes de sete sítios no país: Porto Alegre, Florianópolis, São Paulo, Belo Horizonte, Brasília, Salvador e Manaus. Esse estudo de vigilância mostrou que além das resistências já bem estabelecidas às sulfas, tetraciclinas e penicilinas, constatou-se resistência emergente e em expansão ao ciprofloxacino e azitromicina, com taxas superiores a 50% em todas as regiões do país. O esquema terapêutico preconizado para a infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto) de primeira escolha foi

³ Serina

alterado, em todo o país, e passou a ser constituído pela terapia dupla de ceftriaxona 500mg intramuscular (IM) associada à azitromicina 1g (VO) em dose única (BRASIL, 2017).

A azitromicina foi incluída como uma possível terapia para a gonorreia no início dos anos 1980. Esse macrolídeo inibe a síntese proteica dependente de RNA, através da ligação em receptores localizados na porção 50S do ribossoma, particularmente na molécula 23S do RNA, impedindo as reações de transpeptidação e translocação, resultando em efeito bacteriostático (UNEMO; SHAFER, 2014). A resistência de *N. gonorrhoeae* aos macrolídeos pode resultar de vários mecanismos como a modificação do RNAr 23S através da ação de metilases RNAr, mutações específicas em RNAr 23S e superexpressão de bombas de efluxo. O aumento da atividade da bomba de efluxo *mtrCDE*, dirigida pelos mesmos mecanismos moleculares relatados para diminuir a suscetibilidade do gonococo à penicilina, é o mecanismo mais comum e chega a aumentar a CIM da azitromicina para 0,5 µg/ml (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Até os anos 90, a resistência à azitromicina havia sido relatada apenas na América Latina. Atualmente, já foram detectadas estirpes raras com uma elevada resistência à azitromicina (CIM ≥ 256 µg/ml) em diversos países da Europa e Américas (UNEMO; SHAFER, 2014). Por apresentar estudos prévios demonstrando isolados com uma elevada resistência à azitromicina e relatos do desenvolvimento da resistência à azitromicina durante a terapia, esse antimicrobiano não é recomendado para monoterapia empírica de gonorreia, no entanto, é recomendada a administração em conjunto com a ceftriaxona (LEWIS, 2014). A azitromicina é recomendada no tratamento devido a abordagem sindrômica, pois a associação é efetiva para o tratamento de *Chlamydia trachomatis* (BRASIL, 2015). Alguns estudos que caracterizaram isolados com elevados CIMs para azitromicina demonstraram que essa resistência ocorre principalmente em virtude de mutações genéticas, não estando relacionada com os clones circulantes (JACOBSSON et al., 2016).

Em 2007, todas as fluoroquinolonas foram excluídas dos regimes de tratamento recomendados pelo CDC para a gonorreia, e em adição a descontinuação da penicilina e tetraciclina para seu tratamento. *N. gonorrhoeae* passou a ser classificada como uma superbactéria (UNEMO; SHAFER, 2014). Após o desuso das fluoroquinolonas, a maioria dos países alterou suas diretrizes terapêuticas, incluindo o uso

de cefalosporinas de terceira geração como terapia de primeira linha para o tratamento da gonorreia (LEWIS, 2014). Essa classe de antimicrobianos, que inclui a ceftriaxona e cefixima, ainda possui alta eficácia em baixas concentrações (UNEMO; SHAFER, 2011). No entanto, *N. gonorrhoeae* já tem demonstrado capacidade de desenvolver resistência às ESCs, atualmente classificada como última opção para o tratamento de primeira linha da gonorreia. A resistência às ESCs pode ser desenvolvida por alterações no gene *penB*, *mtrR* e *penC*, embora as mutações no gene *penA*, que codifica a PBP2, parecem ser o principal determinante da resistência à ceftriaxona. O gene *penA* alterado pode resultar de mutações pontuais, ou de recombinação genética com *Neisseria* spp. colonizadora (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

A resistência à ceftriaxona é caracterizada pelo tanto pelo CDC (CLSI, 2014) por um CIM 0,25µg/ml tanto como pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUCAST, 2015). A detecção de isolados resistentes ainda é pouco frequente, porém já foram isoladas cepas no Japão, França e Espanha (CÂMARA et al., 2012; OHNISHI et al., 2011; UNEMO et al., 2012). A resistência às ESCs tem sido relacionada à presença de diferentes padrões de PBP2. No entanto, estudos têm associado suscetibilidade reduzida à disseminação clonal de linhagens específicas. Os isolados detectados na França e na Espanha foram incluídos no mesmo *sequence type* (ST) 1407, um clone bem sucedido que circula na Europa tem sido associada à diminuição da suscetibilidade às ESCs. Os isolados clonais exibiram CIM 4,0 µg/ml e 1,5 µg/ml para cefixima e 2 µg/ml e 1,5 µg/ml para ceftriaxona na França e Espanha, respectivamente (MANZANO et al., 2014; OHNISHI et al., 2011; UNEMO et al., 2012).

De acordo com agências que realizam programas de vigilância, a estratégia de terapia combinada pode desacelerar o aumento das taxas de resistência a esses antimicrobianos (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). *N. gonorrhoeae* está evoluindo rapidamente para uma superbactéria, e futuras infecções podem tornar-se intratáveis. É uma grande preocupação que clones ST7363 e ST1901, além do ST1407 disseminados globalmente, tenham demonstrado capacidade de desenvolver resistência de alto nível à cefixima e a ceftriaxona (UNEMO et al., 2012). O monitoramento molecular utilizando técnicas de tipagem, como *Neisseria gonorrhoeae Multi-antigen Sequence Typing* (NG-MAST) e *Multilocus sequence typing* (MLST), estão sendo implementados nos programas de vigilância ao redor do mundo, a fim

de caracterizar clones circulantes, para atualizar diretrizes de tratamentos.

No Brasil, em 2016, o Projeto Sengono realizado em parceria com a UFSC abriu portas para realização de estudos retrospectivos com bancos de isolados disponíveis. Entre esses, os bancos de *N. gonorrhoeae* da Cidade de São Paulo (2003 a 2016) e de Florianópolis (2008 a 2016). Esses estudos retrospectivos foram desenvolvidos na UFSC, concomitantemente ao Projeto Sengono, a fim de caracterizar fenotipicamente e molecular os isolados circulantes de *N. gonorrhoeae*. O banco de isolados da cidade de São Paulo é tema desta dissertação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar o perfil de resistência dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae* da cidade de São Paulo correspondentes ao período de 2003 a 2016.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae*;
- Determinar a CIM, por ágar diluição, para os antimicrobianos penicilina, tetraciclina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino e azitromicina;
- Caracterizar o genótipo de resistência plasmidial e cromossômica de penicilina e tetraciclina dos isolados de *N. gonorrhoeae*;
- Caracterizar a resistência dos isolados ao ciprofloxacino por meio da detecção de mutações nos genes da subunidade A da DNA girase (*gyrA*) e subunidade *parC* da enzima topoisomerase IV.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

O estudo foi composto por isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* provenientes de pacientes atendidos no Centro de Referência e Treinamento DST/Aids - CRT DST/Aids da cidade de São Paulo/SP. Os isolados faziam parte de um banco de culturas de bactérias formado entre 2003 e 2016. Após realização de exame bacteriológico, 373 isolados foram incluídos no banco, dos quais 186 (Apêndice A) foram recuperados e compuseram o estudo. Os demais isolados (187) foram excluídos do estudo devido à presença de contaminação ou ausência de crescimento. Dos isolados recuperados, 177 (95,2%) eram provenientes de amostras de secreção uretral e os demais (4,8%), de amostras de diferentes sítios, como secreção endocervical (2,7%), urina (1,6%) e secreção anal (0,5%).

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

A recuperação dos isolados foi realizada por meio de semeadura por esgotamento em ágar Thayer-Martin e/ou Ágar chocolate (BioMérieux, Brasil) a partir da cultura congelada. Os meios semeados foram incubados a 35°C em atmosfera com 5% de CO₂, por até 48 horas. Colônias características de *N. gonorrhoeae* apresentaram-se pequenas, brilhantes e viscosas.

A partir do crescimento bacteriano foi realizada a coloração de Gram, para confirmar a presença de diplococos gram-negativos aos pares, com faces côncavas adjacentes. As reações de catalase e oxidase foram realizadas para identificação do gênero *Neisseria*. Para a reação da catalase, uma colônia característica de *N. gonorrhoeae* foi colocada sobre uma lâmina de vidro e adicionou-se 2 a 3 gotas de peróxido de hidrogênio 30% (Vetec, Brasil). O gênero *Neisseria* apresenta reação de catalase positiva, a qual é caracterizada pelo aparecimento de bolhas. Para a reação de oxidase, realizou-se a fricção de uma colônia característica de *N. gonorrhoeae* em fita impregnada com o reativo de indofenol-oxidase (NewProv, Paraná, Brasil). Bactérias que possuem atividade de citocromo-oxidase provocam a oxidação rápida do reativo, que quando oxidado desenvolve cor púrpura. A reação foi considerada positiva quando observado o aparecimento da respectiva coloração.

As bactérias que se apresentaram como diplococos Gram negativos e com as provas de oxidase e catalase positivas foram encaminhadas para a confirmação da espécie pela metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF VITEK MS (BioMérieux, Lyon, França). Após confirmação da espécie, as bactérias foram armazenadas em Caldo Casoy (Difco™, BD) com 20% de glicerol (Sigma-Aldrich) a -80°C.

4.3 MALDI-TOF MS - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

Para confirmação da espécie, foram utilizadas colônias cultivadas em ágar chocolate a 35°C em atmosfera com 5% de CO₂ por até 24h. Uma alçada (1µL) de colônia foi aplicada em *um spot* (poço) da lâmina VITEK MS-DS. Sobre a colônia foram adicionados 10µL de matriz, a qual é capaz de fornecer prótons para o processo de ionização dos componentes da amostra.

Após a cristalização da matriz juntamente com a amostra, a lâmina foi introduzida no equipamento (BioMerrieux/França) para a determinação do espectro de massa. Breves pulsos de laser UV de comprimento de onda 337nm foram emitidos, gerando espectros que foram analisados por comparação com o banco de dados *Myla* (BioMerrieux/França). Para a validação de cada corrida, foi utilizada uma cepa padrão de *E. coli* ATCC 8379. A metodologia de MALDI-TOF MS foi realizada no Laboratório Médico Santa Luzia.

4.4 TESTE DE β-LACTAMASE

O teste da nitrocefina, uma cefalosporina cromogênica, foi realizado com a finalidade de detectar isolados de *N. gonorrhoeae* produtores da enzima β-lactamase, a qual hidrolisa o anel beta-lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas. Colônias recém-cultivadas (24h) foram raspadas do meio de cultura e friccionadas em um disco de nitrocefina umedecido com água destilada. Nas reações positivas, a enzima β-lactamase hidrolisa o anel β-lactâmico produzindo ácido cefalosporânico, fazendo com que o disco de cor amarela mude para cor rosa.

4.5 TESTE DE DISCO DIFUSÃO

O teste de disco difusão foi realizado com a finalidade de caracterizar o fenótipo de resistência à penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino e ceftriaxona. Foram preparadas placas com ágar GC (Difco™, BD) suplementado com 1% de Vitox (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). Os inóculos foram preparados como suspensão em caldo Mueller Hinton (Difco™, Sparks, United States) a partir de colônias de 24h. As suspensões foram ajustadas na escala 0,5 McFarland. Com um *swab rayon* estéril (Inlab, São Paulo, Brasil), o inóculo foi semeado em três direções diferentes e os discos dos antimicrobianos, penicilina (10U), tetraciclina (30µg), ciprofloxacino (5µg) e ceftriaxona (30µg) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) foram aplicados na placa. As bactérias foram incubadas a 35°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24h. A interpretação dos diâmetros dos halos foi realizada de acordo com os critérios do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015).

4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR ÁGAR DILUIÇÃO

As CIMs para penicilina, tetraciclina, azitromicina, ceftriaxona, cefixima e ciprofloxacino foram determinada pela metodologia de ágar diluição, de acordo com o preconizado pelo CLSI (2015).

Foram preparadas diluições seriadas, a partir de soluções estoque dos antimicrobianos, com concentração 10 vezes maior que a concentração mais alta das respectivas soluções de trabalho. A concentração final na placa foi adquirida por meio de uma diluição 1:10 em ágar da solução de trabalho (Quadro 2). Os intervalos de concentração dos antibióticos estão descritos nos Quadro 3 e Quadro 4.

Quadro 2: Concentração da solução estoque dos antibióticos utilizados para o teste de suscetibilidade antimicrobiana.

Antimicrobiano	Concentração o da Solução Estoque (mg/l)	Concentração da Solução de Trabalho (mg/l)	Concentração Final 1:10 nas placas (mg/l)
Cefixima	1000	10	1

Ceftriaxona	1000	10	1
Ciprofloxacino	1000	320	32
Azitromicina	1000	40	4
Penicilina	10000	1280	128
Tetraciclina	1000	320	32

Fonte: GALARZA; GIANECINI, 2015

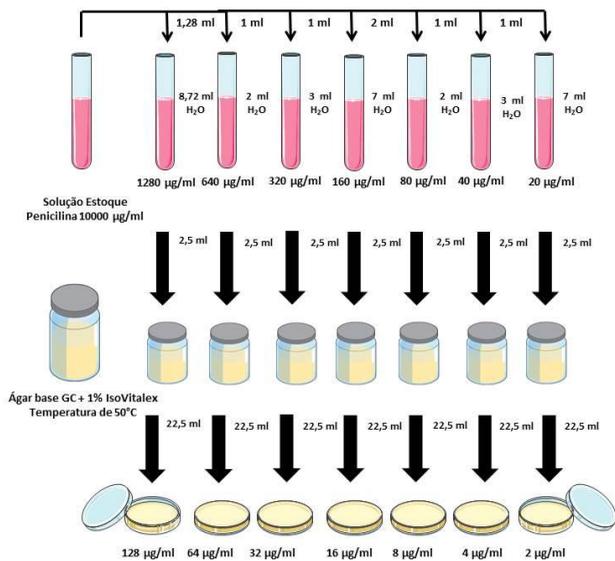
Quadro 3: Intervalo de concentração dos antibióticos para os testes de suscetibilidade em isolados de *N. gonorrhoeae*.

Antimicrobiano	Concentração (µg/L)
Penicilina	0,016-128
Tetraciclina	0,06-32,0
Cefixima	0,0005-1,0
Ceftriaxona	0,0005-1,0
Ciprofoxacino	0,001-32,0
Azitromicina	0,03-4,0

Fonte: GALARZA; GIANECINI, 2015

O meio contendo antibiótico foi preparado adicionando um volume de solução de trabalho a 9 volumes de ágar base. Os meios de cultura foram preparados com ágar base GC (Difco™, Sparks, United States) esterilizados por autoclave e suplementados com 1% de Vitox (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). Também foram preparadas placas contendo somente ágar suplementado, que foram utilizadas como controle. As placas contendo meio de cultura com antibiótico foram armazenadas a 4°C e utilizadas dentro de um período de sete dias.

Figura 1: Desenho esquemático da diluição dos antimicrobianos a partir de suas soluções estoque (Ex: Penicilina).



Fonte: Elaborado pela Autora

Quadro 4: Diluição a partir de uma solução estoque (Ex: Penicilina).

Etapa	Concentração (µg/ml)	Fonte	Volume (ml)	Água (ml)	Concentração Intermediária (µg/ml)	Concentração final, diluição em ágar (1:10) (µg/ml)
1	10000	Estoque	1,28	8,72	1280	128
2	1280	Etapa 1	2	2	640	64
3	1280	Etapa 1	1	3	320	32
4	1280	Etapa 1	1	7	160	16
5	160	Etapa 4	2	2	80	8
6	160	Etapa 4	1	3	40	4
7	160	Etapa 4	1	7	20	2
8	20	Etapa 7	2	2	10	1
9	20	Etapa 7	1	3	5	0,5
10	20	Etapa 7	1	7	2,5	0,25
11	2,5	Etapa 10	2	2	1,25	0,125
12	2,5	Etapa 10	1	3	0,6	0,06
13	2,5	Etapa 10	1	7	0,3	0,03
14	0,3	Etapa 13	2	2	0,16	0,016

Solução estoque de Penicilina 10000 µg/ml.

Fonte: GALARZA; GIANECINI, 2015

Foi preparado um inóculo inicial em caldo Muller Hinton (Difco™, Sparks, United States), ajustado na escala 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) utilizando o DensiCHEK™ (Biomérieux, USA), a partir de colônias jovens, com crescimento de 18-24h em ágar chocolate a 35°C em CO₂ a 5%. O inóculo foi diluído 1:10 ajustando assim para a concentração apropriada de trabalho (Figura 1).

Como o LBMMS não possuía um Replicador de Steers, um multiinoculador, foi desenvolvido um aparelho que desempenhasse a mesma função. Então, o inóculo de cada amostra foi adicionado a um poço da placa de metal (policubeta) do Replicador de Steers adaptado. Os inóculos foram aplicados nas placas de meio de cultura contendo as diluições dos antibióticos por meio dos pinos móveis do Replicador de Steers. A inoculação pelo replicador foi realizada na ordem da menor concentração dos antibióticos para a maior, a fim de evitar que o antibiótico fosse carregado de uma placa para outra. Foram adicionadas placas de controle de esterilidade dos pinos, controle negativo (estufa sem CO₂), controle inicial e controle final de cada antibiótico. A cada rodada de experimentos foram incluídas quatro cepas controles: cepa ATCC 49226 de *N. gonorrhoeae* e três cepas WHO (World Health Organization) F, G, K, L, M, N, O e P, de forma alternada.

As placas inoculadas foram incubadas a 35°C C em atmosfera com 5% de CO₂ por 18h-24h. A leitura das placas foi realizada e a interpretação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi baseada nos valores da CIM de acordo com o preconizado pelo CLSI (2015) (Quadro 5), exceto para a azitromicina, que foram utilizados os critérios estabelecidos pelo protocolo do EUCAST, 2015.

A classificação dos fenótipos de resistência de *Neisseria gonorrhoeae* foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI, 2014 (

Quadro 6). Os fenótipos determinados neste estudo incluíram: *N. gonorrhoeae* produtora de penicilinase (PPNG, β-lactamase positiva); *N. gonorrhoeae* resistente à tetraciclina (TRNG; CIM de tetraciclina $\geq 16\mu\text{g/ml}$ e β-lactamase negativa); PPNG/TRNG (β-lactamase positiva e tetraciclina CIM $\geq 16\mu\text{g/ml}$); resistência à penicilina mediada por cromossomo (CMPR, não PPNG, tetraciclina CIM $< 2,0\mu\text{g/ml}$ e penicilina CIM $\geq 2,0\mu\text{g/ml}$); resistência à tetraciclina mediada por cromossomo (CMTR, não-PPNG, não-TRNG, CIM de penicilina, $2,0\mu\text{g/ml}$ e tetraciclina CIM $\geq 2,0-8,0\mu\text{g/ml}$); *N. gonorrhoeae* cromossomicamente resistente (CMRNG, não-PPNG, não-TRNG,

penicilina CIM $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$ e tetraciclina CIM 2,0-8, 0 $\mu\text{g/ml}$); resistente ao ciprofloxacino (CIPR, CIM $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$) e resistente a azitromicina (AZMR; CIM $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$). Isolados com CIM de cefixima $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$ e ceftriaxona CIMs $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ foram classificados como tendo uma suscetibilidade diminuída a esses antibióticos (CFM^{red} e CRO^{red}, respectivamente).

Quadro 5: Critérios de interpretação de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de *N. gonorrhoeae*.

Antimicrobiano	Padrões de interpretação de CIM ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	I	R
Penicilina	$\leq 0,06$	0,12-1,0	$\geq 2,0$
Tetraciclina	$\leq 0,25$	0,5-10	$\geq 2,0$
Cefixima	$\leq 0,25$	-	-
Ceftriaxona	$\leq 0,25$	-	-
Ciprofloxacino	$\leq 0,06$	0,12-0,5	$\geq 1,0$
Azitromicina	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1,0$

^a Resistência à cefixima e ceftriaxona não são definidos pelo CLSI. Para esses casos, o CLSI recomenda classificar os isolados que possuem CIM $> 0,25$ como “Não suscetível” (CLSI, 2015b).

^b Os valores de CIM de azitromicina foram interpretados de acordo com EUCAST (2015).

Quadro 6: Fenótipos de resistência de *N. gonorrhoeae* à penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina, cefixima e ceftriaxona.

Fenótipo	Critério
PPNG ^a	β -lactamase (+)
TRNG ^b	β -lactamase (-) TET CIM $\geq 16,0 \mu\text{g/ml}$
PPNG/TRNG	β -lactamase (+) TET CIM $\geq 16,0 \mu\text{g/ml}$
CMPR	não-PPNG TET CIM $< 2,0 \mu\text{g/ml}$ PEN CIM $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$
CMTR	não-PPNG, não-TRNG PEN CIM $< 2,0 \mu\text{g/ml}$ TET CIM $\geq 2,0-8,0 \mu\text{g/ml}$
CMRNG	Não-PPNG, não-TRNG PEN CIM $\geq 2,0 \mu\text{g/ml}$

	TET CIM 2.0–8.0 µg/ml
CIPR	CIP CIM ≥ 1.0 µg/ml
AZMR^c	AZM CIM ≥ 2.0 µg/ml
CFM^{red}	≥ 0.25 µg/ml
CRO^{red}	≥ 0.125 µg/ml

^aPPNG é definida somente como produtora de β-lactamase e não através dos valores de CIM. Alguns isolados PPNG apresentam CIMs reduzidos (0.25 µg/ml) para penicilina, mas ainda assim são β-lactamase positivos.

^bA identificação presuntiva do fenótipo é baseada nos valores de CIM para penicilina e tetraciclina. A confirmação do fenótipo TRNG deve ser feita por PCR (TetM).

^c Os valores de CIM de azitromicina foram interpretados de acordo com EUCAST (2015).

4.7 DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO PERFIL DOS ISOLADOS

4.7.1 Extração de DNA Bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada pela metodologia de fervura. Os isolados armazenados em caldo Casoy crescido de 20% de glicerol e congelados a -80°C foram reativadas por semeadura em ágar chocolate e incubados 24 horas a 35°C em atmosfera com 5% de CO₂. Depois de reativadas, as colônias foram repicadas em ágar chocolate e incubadas *overnigh* a 35°C em atmosfera com 5% de CO₂. Uma suspensão bacteriana ajustada a 2,0 na escala McFarland foi feita em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) - pH 7,3. Essa suspensão foi centrifugada a uma velocidade de 2000 xg durante cinco minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido. Adicionou-se 1,0 ml de PBS ao *pellet* que foi submetido à agitação em *vórtex*. Essa solução foi incubada em termobloco a temperatura de 100°C por 10 minutos, a fim de promover a lise das bactérias. O lisado bacteriano foi centrifugado em velocidade máxima de 10.000 xg durante um minuto e, após a centrifugação, 200µl do sobrenadante, contendo o DNA bacteriano, foram transferidos para um novo tubo e armazenados a temperatura de -20°C.

4.7.2 Caracterização de Genes *gyrA* e *parC* dos Isolados Resistentes à Quinolona

A detecção de mutações nos genes *gyrA* e *parC* foi realizada para isolados que apresentaram fenótipo resistente ao ciprofloxacino. Os isolados foram submetidos à extração de DNA, amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético. Para a caracterização dos genes foram utilizados Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos (Quadro 7) e o procedimento foi realizado de acordo com o descrito por TANAKA et al., 2000.

Quadro 7: Iniciadores utilizados para a reação de PCR para detecção de mutações em *gyrA* e *parC*.

Gene		Sequência	PB
<i>gyrA</i>	Sense 5'-3'	AATGTCTGCCAGCATTTCATGTGAGA	279
	Antisense 5'-3'	AATGTCTGCCAGCATTTCATGTGAGA	
<i>ParC</i>	Sense 5'-3'	ATGCGCGATATGGGTTTGAC	255
	Antisense 5'-3'	GGACAACAGCAATTCGCAA	

PB: Pares de base

Fonte: TANAKA et al., 2000

O DNA bacteriano foi obtido por meio de extração por fervura, como o descrito no item 3.7.1. A PCR foi realizada de acordo com o protocolo, os iniciadores e os demais reagentes utilizados na reação estão descritos no quadroQuadro 8. Foram realizadas 35 ciclos para cada reação. Cada ciclo consistiu em 30 segundos a 93°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C. Posteriormente, os produtos obtidos da PCR foram separados por eletroforese a 1%, e o tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com marcador de tamanho molecular de 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Para o gene *gyrA*, observou-se produtos de 279 pb, enquanto para o *parC* 255 pb. Os produtos de PCR foram purificados conforme as instruções do fabricante do kit de purificação Purelink, Quick PCR Purification (Invitrogen, Lithuania). O sequenciamento, pela metodologia de Sanger, dos nucleotídeos foi realizado no equipamento AB3500 Genetic Analyzer.

A análise das sequências de nucleotídeos para a identificação de substituições de resíduos de aminoácidos foi realizada no programa BioEdit versão 7.1.3.0 por meio do alinhamento das sequências das amostras resistentes ao ciprofloxacino com as sequências selvagens dos

genes *gyrA* e *parC* obtidas no Genbank sob nº U08817 para *gyrA* e U08907 para *parC*.

Quadro 8: Protocolo da PCR *gyrA* e *parC*

	1X	Concentração
H₂O	14,7ul	-
Tampão 5X	5,0 ul	1X
MgCl₂ (25mM)	1,5ul	1,5mM
dNTP (25mM)	0,2ul	0,2mM
Iniciador Sense (10uM)	0,7ul	0,25uM
Iniciador Antisense (10uM)	0,7ul	0,25uM
Taq Pol (5U/ul)	0,2ul	1U
DNA	2ul	-
VOLUME TOTAL	25ul	-

Fonte: TANAKA et al., 2000

A cada placa de reação para sequenciamento foi adicionada uma das cepas de referência (WHO K e L) resistentes ao ciprofloxacino que contém mutações nos genes *gyrA* e *parC*. A análise da qualidade do sequenciamento dos nucleotídeos foi realizada pela score de Phred no programa FastQC High Throughput Sequence Quality Control Report versão 11.5.

4.7.3 Caracterização de *Neisseria gonorrhoeae* Produtora de Penicilinase

4.7.3.1 Identificação do gene *bla_{TEM}*

Os isolados que apresentaram CIM $\geq 2\mu\text{g/ml}$ para penicilina e aqueles que apresentaram-se positivos quando submetidos ao teste do disco de nitrocefina foram submetidos à pesquisa do gene *bla_{TEM}* (

Quadro 9 e Quadro 10). O conjunto de iniciadores da TEM-PCR pode amplificar um produto de 231 pb de *bla*TEM₁ e *bla*TEM₁₃₅ e o conjunto de iniciadores da MAMA-PCR, é específico para *bla*TEM₁₃₅. Para a pesquisa desse gene foram utilizados iniciadores e os protocolos descritos por NAKAYAMA e colaboradores, (2012) e GIANECINI et al., 2015a (Quadro 11, Quadro 12 e Quadro 13).

Quadro 9: Iniciadores utilizados no MAMA-PCR para detecção de blaTEM-135 e TEM-PCR para detecção de blaTEM-1 e blaTEM-135.

Gene		Sequência	PB
<i>bla</i> _{TEM-PCR}	Sense 5'-3'	GTCGCCCTTATCCCTTTTTTG	231
	Antisense 5'-3'	TAGTGTATGCGGCGACCGAG	
<i>bla</i> _{MAMA-PCR}	Sense 5'-3'	GCATCTTACGGATGGCATGAC	
	Antisense 5'-3'	TGTTGCCATTGCTGCAGGGG	

Fonte: GIANECINI et al., 2015b; NAKAYAMA et al., 2012 PB: Pares de base

Quadro 10: Protocolo TEM-PCR.

	1X
H ₂ O	11,54 µl
Tampão 5X	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,2 µl
dNTP (25mM)	0,16 µl
Iniciador Sense (10uM)	0,5 µl
Iniciador Antisense (10uM)	0,5 µl
Taq Pol (5U/ul)	0,1 µl
DNA	2 µl
VOLUME TOTAL	20 µl

Fonte: GIANECINI et al., 2015b; NAKAYAMA et al., 2012

Quadro 11: Condições TEM-PCR

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1X	96	2min
	96	10s
25X	56	10s
	72	0s
1X	72	2min

Fonte: GIANECINI et al., 2015b; NAKAYAMA et al., 2012

Quadro 12: Protocolo MAMA-PCR.

	1X
H₂O	15,15µl
Tampão 5X	5,0 µl
MgCl₂ (25mM)	1,0 µl
dNTP (25mM)	0,2 µl
Iniciador Sense (10uM)	1,25 µl
Iniciador Antisense (10uM)	1,25 µl
Taq Pol (5U/ul)	0,15 µl
DNA	1 µl
VOLUME TOTAL	20 µl

Fonte: GIANECINI et al., 2015b; NAKAYAMA et al., 2012

Quadro 13: Condições PCR-MAMA

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1X	96	2min
	96	10s
25X	62	15s
	72	30s
1X	72	2min

Fonte: GIANECINI et al., 2015b; NAKAYAMA et al., 2012

4.7.3.2 Pesquisa do Tipo de Plasmídeo Carreador do gene *bla*

Posterior à detecção da presença do gene *bla_{TEM}* nos isolados bacterianos, foi realizada uma PCR Multiplex para caracterizar o tipo de plasmídeo carregador do gene. O protocolo e os *primers* utilizados (Quadro 14 e Quadro 15) estão de acordo com o descrito por Palmer, Leeming e Turner (2000). Posteriormente, os produtos obtidos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, com marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Invitrogen) utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos. Os fragmentos com 1191 pb correspondem ao plasmídeo Africano, aqueles com 958 pb correspondem ao plasmídeo Asiático e os fragmentos com 650 pares de base ao plasmídeo Toronto/Rio (Quadro 16, Quadro 17 e Quadro 18).

Quadro 14: Iniciadores para PCR multiplex para caracterização dos plasmídeos.

Plasmídeo		pb
Africano	Sense 5'-3'	TACTCAATCGGTAATTGGCT
	Antisense 5'-3'	CCATAGTGTTGAGTATTGCG AA
Toronto/Rio	Sense 5'-3'	CACCTATAAAATCTCGCAAGC
	Antisense 5'-3'	TCATTCGTGCGTTCTAGGA
Asiático	Sense 5'-3'	CACCTATAAAATCTCGCAAGC
	Antisense 5'-3'	CCATAGTGTTGAGTATTGCG AA

Fonte: PALMER; LEEMING; TURNER, 2000 . pb: Pares de base

Quadro 15: Protocolo PCR plasmídeo

	1X	Concentração
H₂O	21,35ul	-
Tampão 5X	10ul	1X
MgCl₂ (25mM)	3,0ul	1,5uM
dNTP (25mM)	0,4ul	0,2mM
Iniciador BL1 (10uM)	2,5ul	0,5uM
Iniciador BL2 (10uM)	2,5ul	0,5uM
Iniciador BL3 (10uM)	2,5ul	0,5uM
Iniciador BL4 (10uM)	2,5ul	0,5uM
Taq Pol (5U/ul)	0,25ul	1,25U
DNA	5ul	-
VOLUME TOTAL	50ul	-

Fonte: PALMER; LEEMING; TURNER, 2000

Quadro 16: Condições PCR plasmídeo

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1X	94	3 min
	94	15s
35X	64	15s
	72	1min
1X	72	10 min

Fonte: PALMER; LEEMING; TURNER, 2000

Quadro 17: Combinação de iniciadores da PCR multiplex para detecção do plasmídeo.

Plasmídeo	Iniciadores	pb
Africano	BL1 + BL3	1191
Toronto/Rio	BL2 + BL4	650
Asiático	BL2 + BL3	958

Fonte: PALMER; LEEMING; TURNER, 2000. pb: Pares de base

Quadro 18: Iniciadores utilizados na PCR multiplex.

Iniciador	Sequência	
BL1	Sense 5'-3'	TACTCAATCGGTAATTGGCT
BL2	Sense 5'-3'	CACCTATAAATCTCGCAAGC
BL3	Antisense 5'-3'	CCATAGTGTTGAGTATTGCGAA
BL4	Antisense 5'-3'	TCATTTCGTGCGTTCTAGGA

Fonte: (PALMER; LEEMING; TURNER, 2000)

4.7.4 Pesquisa do gene *tetM* - Resistência Plasmidial

Isolados de *Neisseria gonorrhoeae* que apresentaram alto nível de resistência à tetraciclina (CIM $\geq 16\mu\text{L/ml}$) foram submetidos a uma PCR, a fim de distinguir entre as variantes americanas e holandesas do gene *tetM* (Quadro 19 e Quadro 20). A PCR foi realizada como descrito por Turner, Gough e Leeming (1999), utilizando os a combinação de iniciadores descritos no Quadro 21. Um iniciador direto universal (5'-CTCGAACAAGAGGAAAGC- 3') que hibridiza com ambas as variantes foi combinado com iniciadores reversos específicos para cada variante Americana (5'- GCATTCCAATTCCCAAC- 3') e Holandesa (5'- TGCAGCAGAGGGAGG- 3'). Os produtos obtidos na PCR foram fracionados por eletroforese para que fosse possível verificar o tamanho dos fragmentos. Os produtos com fragmentos de 778 pb correspondem ao plasmídeo Americano e fragmentos com 443 pb correspondem ao plasmídeo Holandês (TURNER; GOUGH; LEEMING, 1999).

Quadro 19: Protocolo PCR tetM e variantes do plasmídeo

	1X	Concentração
H₂O	33,36ul	-
Tampão 5X	10ul	1X
MgCl₂ (25mM)	3,0ul	1,5mM
dNTP (25mM)	0,04ul	0,02mM
Iniciador Sense (10uM)	0,5ul	0,1uM
Iniciador Antisense (10uM)	0,5ul	0,1uM
Primer R2 (10uM)	0,5ul	0,1uM
Taq Pol (5U/ul)	0,1ul	0,5U
DNA	2ul	-
VOLUME TOTAL	50ul	-

Fonte: TURNER; GOUGH; LEEMING, 1999

Quadro 20: Condições PCR tetM e variantes do plasmídeo

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1X	94	3min
30X	94	20s
	55	1min
	72	30s
1X	72	10min

Fonte: TURNER; GOUGH; LEEMING, 1999

Quadro 21: Combinação de iniciadores utilizados para detecção do plasmídeo Americano e Holandês

Tipo de plasmídeo	Iniciadores	pb
Americano	UF + R1	778
Holandês	UF + R2	443

Fonte: TURNER; GOUGH; LEEMING, 1999. pb: Pares de base

Quadro 22: Iniciadores utilizados para PCR de detecção dos plasmídeos Americano e Holandês.

Iniciador		Sequência
UF	Sense 5'-3'	CTCGAACAAGAGGAAAGC
R1	Antisense 5'-3'	GCATTCCACTTCCCAAC
R2	Antisense 5'-3'	TGCAGCAGAGGGAGG

Fonte: TURNER; GOUGH; LEEMING, 1999

4.7.5 NG-MAST

A tipagem molecular de isolados de *N. gonorrhoeae* foi realizada pelo método de NG-MAST, um sistema baseado na amplificação e análise de sequências internas altamente variáveis dos genes *porB* e *tbpB*, que codificam as duas maiores proteínas externas de membrana do gonococo. O gene *porB* codifica a porina, responsável pela entrada de vários antimicrobianos na célula bacteriana enquanto o *tbpB* codifica a subunidade beta da proteína de ligação à transferrina. Este sistema fornece um alto poder discriminatório entre os isolados.

A reação de PCR para amplificação dos genes *porB* e *tbpB* foi realizada de acordo com o estabelecido por MARTIN et al. (2004) assim como os iniciadores utilizados para a PCR (Quadro 23, Quadro 24 e Quadro 25). Para ambos *porB* e *tbpB* o tamanho dos fragmentos amplificados pode variar entre os isolados devido a possibilidade de inserção ou deleção nas regiões codificadas.

Quadro 23: Iniciadores utilizados para PCR NG-MAST.

Região	Sequência	
<i>porB</i>	Sense 5'-3'	CAAGAAGACCTCGCAA
	Antisense 5'-3'	CCGACAACCACTTGGT
<i>TbpB</i>	Sense 5'-3'	CGTTGTCGG CAG CGCGAAAAC
	Antisense 5'-3'	TTCATCGGTCGCTCGCCTTG

Fonte: MARTIN et al., 2004

Quadro 24: Protocolo PCR NG-MAST

	1X	Concentração
H₂O	23,1µl	-
Tampão 5X	10µl	1X
MgCl₂ (25mM)	4µl	2,0 mM
dNTP (25mM)	0,4µl	0,2 mM
Iniciador Sense (10uM)	5µl	1,0 uM
Iniciador Antisense (10uM)	5µl	1,0 uM
Taq Pol (5U/ul)	0,5µl	2,5U
DNA	2µl	-
VOLUME TOTAL	50µl	-

Fonte: MARTIN et al., 2004

Quadro 25: Condição PCR NG-MAST para *porB* e *tbpB*

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1X	95	4 min
	95	30s
25X	58	30s
	72	1 min
1X	72	1 min

Fonte: MARTIN et al., 2004

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram analisados com *GraphPad Prism 6* e utilizando o teste exato de Fisher bicaudal. As proporções dos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016 foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado. A significância estatística para todos os valores de p foi estabelecida em 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de identificação fenotípica e de espectrometria de massa possibilitaram determinar a identificação de gênero e espécie dos 186 isolados clínicos incluídos no presente estudo. Todos se apresentaram como diplococos gram-negativos na coloração de Gram, foram positivos para ambos os testes de catalase e oxidase e identificados como *N. gonorrhoeae* com alta acurácia (99,9%) por meio da metodologia de MALDI-TOF MS. Na reativação dos isolados do banco de bactérias, chamou atenção o fato de que as bactérias congeladas entre 2003 e 2006 tiveram maior recuperação do que os congelamentos mais recentes. O Brasil passou a recomendar o tratamento por abordagem sindrômica partir de 1993 e esta recomendação se manteve até 2015 para homens com corrimento uretral (BRASIL, 2015).

A análise da suscetibilidade à penicilina revelou 77,4% (144/186) dos isolados com perfil intermediário e 20,4% (38/186) resistente e poucos isolados suscetíveis (4/186; 2,2%). A tetraciclina apresentou 50,5% (94/186) de isolados resistentes, 39,2% (73/186) com resistência intermediária e apenas 10,3% (19/186) suscetíveis. Grande parte dos isolados de *N. gonorrhoeae* apresentou-se suscetível para azitromicina (170/186; 91,4%), com somente 5,4% (10/186) de resistência e 3,2% (6/186) de resistência intermediária. O ciprofloxacino apresentou uma distribuição bimodal com 71,5% (140/186) dos isolados suscetíveis, 23,7% (44/186) resistentes e apenas 1,1% (2/186) com perfil intermediário (Quadro 26) (Figura 2). O perfil tanto para ceftriaxona quanto para cefixima foi suscetível em todos os isolados analisados. Apenas 1,6% (3/186) dos isolados estudados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Quadro 26: Porcentagem de isolados com perfil suscetível, intermediário e resistente aos antimicrobianos.

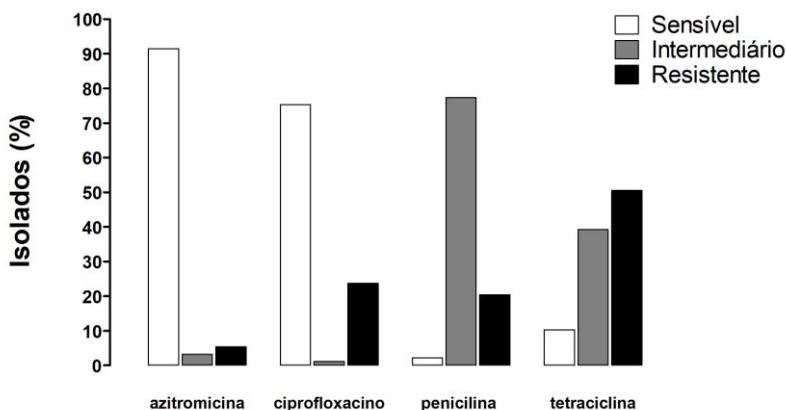
Antimicrobiano	% (n*) Isolados		
	S	I	R
Azitromicina	91,4 (170)	3,2 (6)	5,4 (10)
Cefixima	100 (186)	0	0
Ceftriaxona	100 (186)	0	0
Ciprofloxacino	75,3 (140)	1,1 (2)	23,7 (44)

Penicilina G	2,2 (4)	77,4 (144)	20,4(38)
Tetraciclina	10,3 (19)	39,2 (73)	50,5 (94)

*n total de 186 amostras estudadas de 2003 a 2016.

S=Sensível, I=Intermediário, R=Resistente.

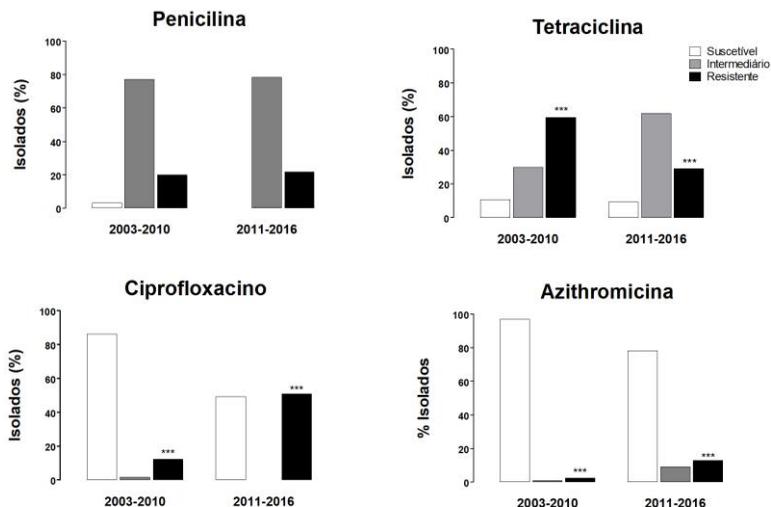
Figura 2: Perfil de suscetibilidade global dos 186 isolados entre 2003 e 2016 aos antimicrobianos azitromicina, ciprofloxacino, penicilina, tetraciclina, cefixima e ceftriaxona determinado por meio de ágar diluição.



Todos os isolados apresentaram-se suscetíveis para cefixima e ceftriaxona.

Os isolados estudados foram separados em dois períodos e o perfil de suscetibilidade de cada período foi comparado a fim de verificar mudanças no perfil de resistência dos gonococos circulantes para os antimicrobianos penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina, ceftriaxona e cefixima (Figura 3). O primeiro período compreendeu os anos de 2003 a 2010 e contou com 131 isolados e o segundo de 2011 a 2016 com 55 isolados. Uma limitação do estudo foi a dificuldade de recuperação de isolados do segundo período. Foram encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) um total de 344 isolados, destes apenas 186 foram recuperados, em sua maioria, pertencentes ao primeiro período.

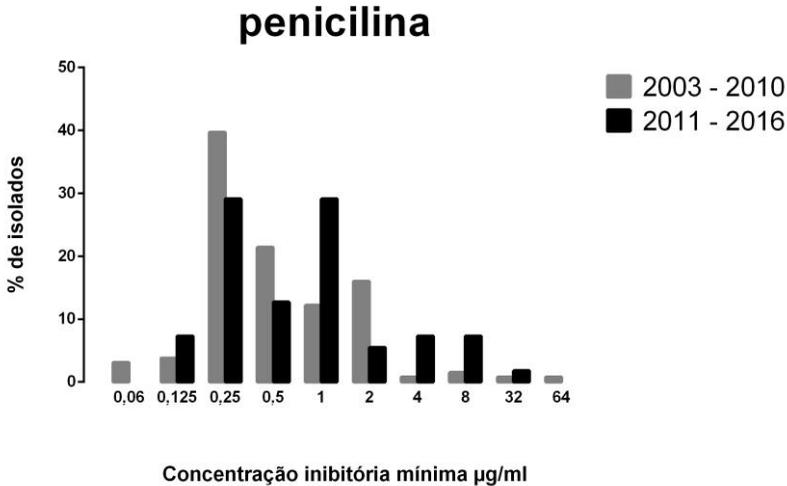
Figura 3: Comparação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino e azitromicina nos períodos de 2003 a 2010 vs 2011 a 2016.



Valores de p definidos por teste de Qui-quadrado. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05^*$, $p < 0,005^{**}$ e $p < 0,001^{***}$. A análise estatística foi realizada somente para avaliar o aumento/redução do perfil de resistência.

O perfil de suscetibilidade à penicilina se apresentou similar nos dois períodos estudados. Poucos isolados suscetíveis no primeiro período (4/131; 3,1%) e nenhum no segundo período. Ambos os períodos apresentaram taxas intermediárias semelhantes (101/131; 77,1% e 43/55; 78,2%, respectivamente) e sem diferença ($p=0,378$) no perfil de resistência, 19,8% (26/131) no primeiro período e 21,8% (12/55) no segundo (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Esses dados corroboram com aqueles encontrados na Alemanha, onde um estudo comparou o perfil de suscetibilidade dos períodos de 2004 a 2009 com 2010 a 2015, e não foi encontrada mudança no perfil de suscetibilidade à penicilina (REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016). Já um estudo realizado na América Latina encontrou uma redução da resistência a penicilina de 46% no ano 2000 para 17% em 2009 (STARNINO et al., 2012).

Figura 4: Variação da concentração inibitória mínima da penicilina. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* a penicilina, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016.



O presente estudo revelou altas proporções de isolados intermediários (77,4%) e resistentes (20,4%) para penicilina durante todo o período. A resistência do gonococo à penicilina obteve maiores taxas em 2016 com 37,9% (10/28) dos isolados testados e em 2006 uma porcentagem de 34,4% (11/32) (Figura 4). Apesar de em 2009, ter sido encontrado uma porcentagem de resistência de 50% esse dado não foi levado em consideração para análise uma vez que foram recuperados apenas dois isolados.

Tabela 1: Resistência de isolados de *N. gonorrhoeae*, Cidade de São Paulo, 2003-2010 vs 2011-2016 (n = 186).

Antimicrobiano	2003-2010 (n=131)		2011-2016 (n=55)		p*
	N	%	N	%	
Penicilina	26	9,8%	2	1,8%	0,378
Tetraciclina	8	59,5%	6	9,1%	0,000
Ciprofloxacino	6	12,2%	8	50,9%	0,000
Azitromicina	3	2,3%	7	12,7%	0,000

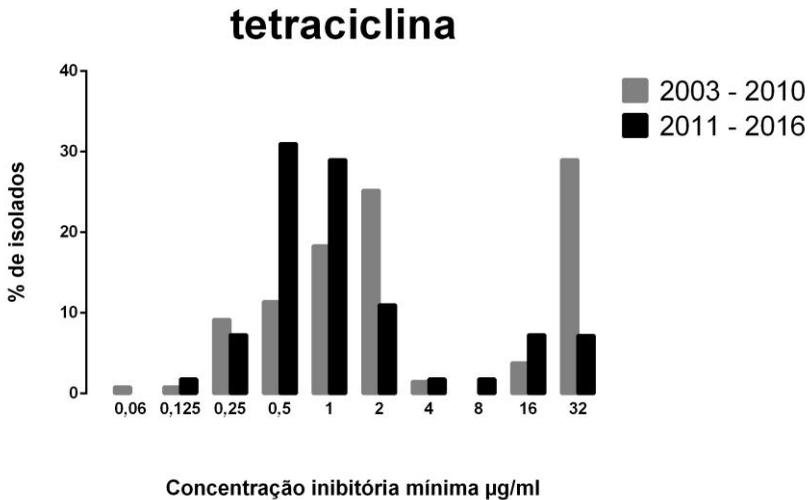
Percentagem de isolados resistentes definidos pelos pontos de corte do CLSI, 2015.

*Valores de p definidos pelo Teste do Qui-quadrado.

Em relação à tetraciclina, quando comparados os dois períodos estudados, o período de 2011 a 2016 obteve uma redução significativa nas taxas de resistência (16/55; 29,1%) em relação ao período de 2003 a 2010, as taxas eram de 59,5% (78/131). Entretanto, não houve diferença na taxa de suscetibilidade observando apenas uma redução da CIM. Foi observada uma modificação do perfil predominantemente resistente para um perfil de isolados com resistência intermediária; no primeiro período foram encontrados 29,8% (39/131) de resistência intermediária já no segundo período 61,8% (34/55). Em ambos os períodos, poucos isolados suscetíveis foram observados (14/131; 10,7% e 5/55; 9,1%, respectivamente) (

Figura 5). Assim como no presente estudo, Starnino et al. (2012) observaram em seu estudo composto por 11.400 amostras oriundas de 11 países da América Latina, considerável redução nas taxas de resistência à tetraciclina em países como Argentina (32% em 2000 para 20% em 2009), Bolívia (83% em 2000 para 54% em 2009), Chile (80% em 2000 para 33% em 2009), Colômbia (71% em 2000 para 52% em 2009) e Uruguai (52% em 2000 para 32% em 2009). Ainda, o presente estudo mostrou uma redução significativa ($p = 0,033$) de isolados resistentes à tetraciclina de 2016 (10/29; 34,5%) em relação a 2003 (29/45; 64,4%) em São Paulo, levando a crer que o Brasil provavelmente está seguindo a tendência dos países da América Latina.

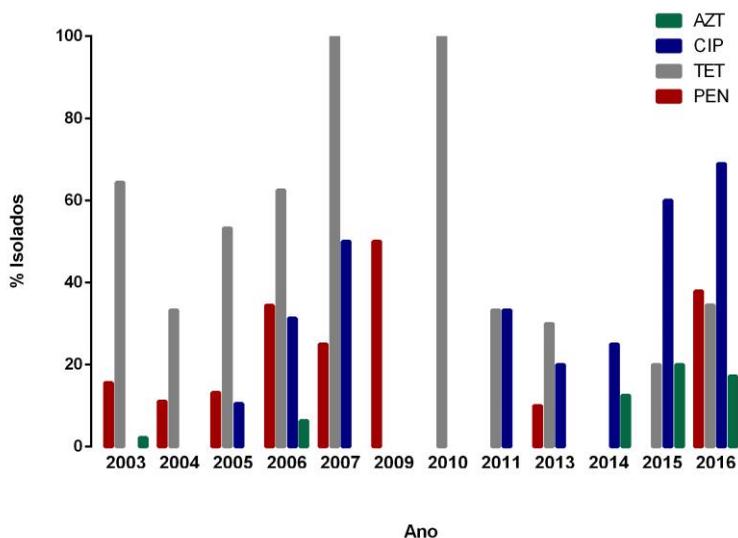
Figura 5: Variação da concentração inibitória mínima da tetraciclina. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* a tetraciclina, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016.



Analisando todos os anos, as porcentagens de isolados resistentes à tetraciclina permaneceram superiores a 50%. Como podemos observar na Figura 6, o perfil de resistência à tetraciclina manteve-se alto durante todos os anos, com taxas variando entre 20% (2015) a 100% (2007 e 2010). Os anos 2008, 2009, 2012 e 2014 apresentaram pequena porcentagem de resistência que pode ser explicado devido ao baixo de número de isolados recuperados, uma limitação do estudo. Starnino et al., (2012), reportaram em seu estudo uma taxa de 56% de resistência à tetraciclina no Brasil que se mostrou constante nos anos 2000. Entretanto, no presente estudo, a porcentagem de resistência permaneceu elevada e, altos níveis de resistência mediada por plasmídeo ($\geq 16\mu\text{l/ml}$) foram observados em 27,4% (51/186) dos isolados. Esses altos níveis de resistência conferidos ao gonococo podem ser explicados pelo fato de que bactérias da microbiota genital, como os lactobacilos,

contêm o gene *tetM*, por isso uma recuperação completa da suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* a esses antimicrobianos não ocorre mesmo sem a pressão de seleção do antimicrobiano (KUBANOV et al., 2017; LI et al., 2017) (Figura 6). Na China (48,7% em 2000 para 55,9% em 2012), Alemanha (36,9% em 2004 para 55,6% em 2015), Canadá (17,8% em 2004 para 34,6% em 2010) e Estados Unidos (16,7 em 2009 para 22,5% em 2012) foram observados aumento da resistência ao longo dos anos que pode ser atribuída ao uso de tetraciclina ou doxiciclina para tratar infecções por clamídia (KIRKCALDY et al., 2013; PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA; SURVEILLANCE AND EPIDEMIOLOGY DIVISION, 2014; REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016; ZHU et al., 2014).

Figura 6: Porcentagem de *N. gonorrhoeae* resistente à azitromicina, ciprofloxacino, tetraciclina e penicilina do período de 2003 a 2016.



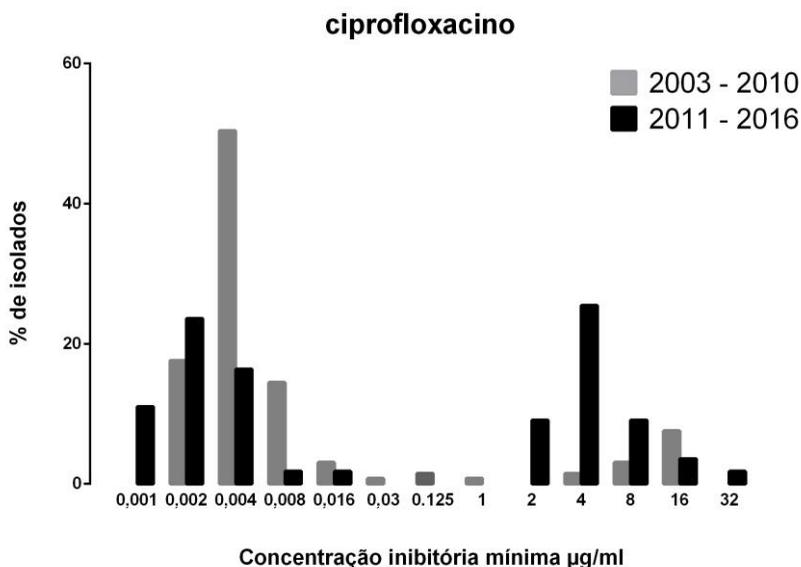
Número de isolados por ano 2003 (45), 2004 (9). 2005 (38), 2006 (32), 2007 (4), 2008 (0), 2009 (2), 2010 (1) 2011 (3), 2012 (0), 2013 (10), 2014 (8), 2015 (5). 2016 (29). Número total de isolados por anos encontra-se em APÊNDICE A - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos anos de 2003 a 2016.

Até 2016, o ciprofloxacino era o antimicrobiano recomendado como terapia de primeira escolha para o tratamento da gonorreia no Brasil. Em 2017, por meio da Rede de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana do Gonococo, além das resistências já bem estabelecidas às tetraciclina e penicilinas, constatou-se a resistência emergente e em expansão ao ciprofloxacino, com taxas superiores a 50% em todas as regiões do país. Desde então, o ciprofloxacino foi substituído por ceftriaxona como terapia de primeira escolha em todo o Brasil (BRASIL, 2017). No presente estudo, dos 186 isolados, 44 (23,7%) apresentaram resistência ao ciprofloxacino no período total de 2003 a 2016. A resistência a este antimicrobiano apareceu pela primeira vez em 2005, com 10,5%; (4/38; $p=0,04$) e atingiu taxas máximas de 69,0% (20/29; $p<0,000$) em 2016.

O ciprofloxacino foi o antimicrobiano que apresentou maior mudança no perfil de suscetibilidade quando analisados os períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016. No primeiro período, 86,3% (113/131) dos isolados apresentaram-se suscetíveis enquanto 12,2% (16/131) resistentes. Já no segundo período, foi observada uma redução de isolados suscetíveis (27/55; 49,1%) com aumento concomitante no número de isolados resistentes (28/55; 50,1%). Houve uma tendência ($p= 0,001$) em relação ao aumento da resistência ao ciprofloxacino. Apenas no primeiro período foram observados dois isolados (1,5%) com resistência intermediária, enquanto no segundo período nenhum isolado apresentou esse perfil, mostrando um padrão único do ciprofloxacino que revelou dois grupos de isolados, ou seja, expressando CIMs muito baixas e o outro CIMs $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. Todos os isolados de *N. gonorrhoeae* testados apresentaram-se suscetíveis ao ciprofloxacino em 2003 e, em relação a 2016, a resistência aumentou para 69,0% ($p<0,000$), isso pode ser explicado pelo uso elevado de fluoroquinolona para o tratamento empírico da gonorreia e outras infecções principalmente de trato urinário. Ainda não está bem esclarecido se o aumento ou redução da resistência ao ciprofloxacino se correlaciona com a frequência do uso deste antimicrobiano. Um estudo composto de 2526 amostras conduzido por Espinosa et al., (2015) nos EUA, cujo objetivo era examinar fatores que atribuíram as tendências de isolados resistentes ao ciprofloxacino em São Francisco verificou que após a interrupção do uso do antimicrobiano a resistência ao ciprofloxacino diminuiu (REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016). No presente estudo a resistência ao ciprofloxacino não foi observada em 2003, 2004

e 2009, entretanto atribui-se a falta de isolados resistentes no ano de 2009, mais uma vez, ao fato da baixa recuperação de isolados naquele ano (2/14). A porcentagem de isolados com resistência ao ciprofloxacino aumentou em 2006 (31,3%) e 2007 (50%), manteve a tendência de alta nos anos posteriores e teve aumento expressivo nos anos de 2015 (60%) e 2016 (69%).

Figura 7: Variação da concentração inibitória mínima do ciprofloxacino. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* ao ciprofloxacino, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016.



Uma análise retrospectiva da literatura mostra que a resistência ao ciprofloxacino surgiu no Brasil em meados dos anos 2000 em isolado de *N. gonorrhoeae*, assim como na maioria dos países da América do Sul e aumentou consideravelmente no final de 2013, mostrando que os resultados do presente estudo estão de acordo com descrito (STARNINO et al., 2012; UEHARA et al., 2011). Em uma visão global, a alta porcentagem de resistência a esta fluorquinolona vem sendo

descrita em diversos países como Alemanha (70,3% em 2015), Canadá (35,9% em 2010), Argentina (33,3% em 2016), Estados Unidos (19,2% em 2016) e a alarmante taxa de 99,8% encontrada na China. Esta última atribuída à automedicação para tratamento da gonorreia, muito comum na China e/ou uso extensivo de fluoroquinolonas para outras infecções, hábito que costumava ser muito comum também no Brasil (CHEN et al., 2016; HEMARAJATA et al., 2016; REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016; THAKUR et al., 2017a). Apenas dois isolados (1,5%) tiveram suscetibilidade intermediária (CIM 0,125 µg/ml - 0,5 µg/ml) ao ciprofloxacino, exibindo um comportamento que difere dos outros antimicrobianos testados. Essa distribuição bimodal foi previamente observada no Japão e na Alemanha (HAMASUNA et al., 2015; REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016) (Figura 7).

A maioria dos isolados apresentou-se suscetível à azitromicina nos dois períodos estudados, com 96,9% (127/131) de 2003 a 2010 e 78,2% (43/55) de 2011 a 2016, com taxa global de 5,4%. Entretanto, houve aumento significativo ($p < 0,0001$) de 2,3% (3/131) isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes no primeiro período para 12,7% (7/55) no segundo. Esses dados estão de acordo com o encontrado em um estudo alemão, que relatou tendência ($p = 0,084$) de aumento da resistência à azitromicina, os autores relataram que no período de 2004 a 2009 haviam 3,0% de isolados resistentes e nos isolados de 2010 a 2015 o número aumentou para 7,1% (REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016). Dados da América Latina mostraram resistência de 13% à azitromicina, variando de 6% em 2000 a 23% em 2009 (STARNINO et al., 2012). A porcentagem de isolados resistentes à azitromicina nos EUA foi de 2,5% em 2014, 3,3% em 2014 no Canadá, e na Europa apresentou variação de 5,4% (2013) a 7,9% (2014) (JACOBSSON et al., 2016; KIRKCALDY et al., 2016). Em 2016 foi observado um percentual de 17,2% de resistência a este antimicrobiano na Cidade de São Paulo, taxas que só foram relatadas em países como Irlanda (LYNAGH et al., 2015), Suécia e Portugal (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL., 2015). Segundo Starnino et al. (2012), o Brasil reportou resistência à azitromicina em 2004 (22%), 2007 (6%) e 2009 (um isolado). No presente estudo, o primeiro isolado a apresentar resistência à azitromicina foi do ano de 2003 (1/45; 2,2%), os demais foram encontrados em 2006 (2/32; 6,3%), 2014 (1/8; 12,4%), 2015 (1/5; 20%) e 2016 (5/29; 17,2%), mostrando o aumento da frequência de isolados resistentes com o passar dos anos.

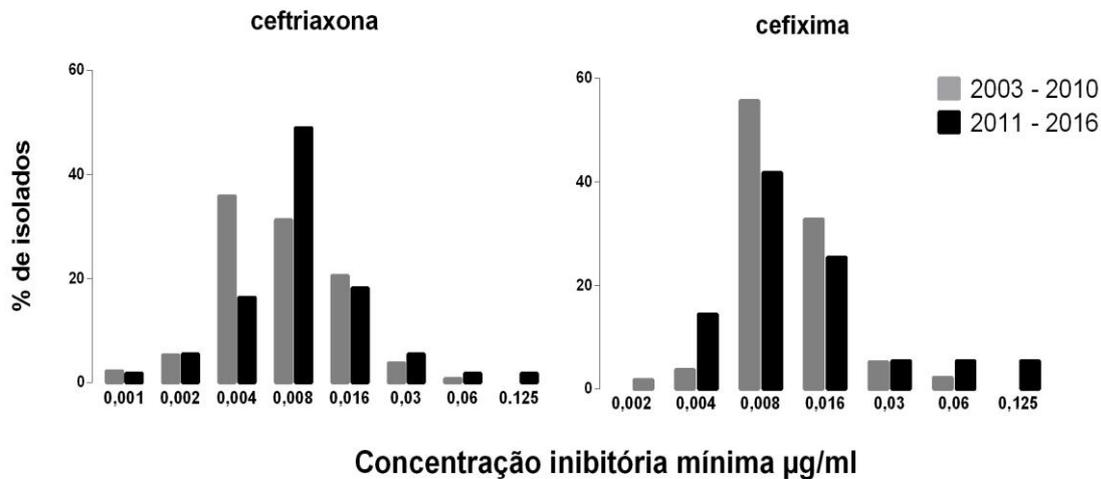
Não foi pesquisada resistência de alto nível ($> 256\mu\text{g/ml}$) à azitromicina. Em países como Canadá e Paquistão, a azitromicina isolada (2g) é utilizada para tratar infecções gonocócicas, quando fatores como alergia grave, resistência a β -lactâmicos ou/e indisponibilidade de ceftriaxona e espectinomicina estão envolvidos (JABEEN et al., 2016), mas falhas no tratamento foram relatadas (GOSE et al., 2015; MORITA-ISHIHARA et al., 2014). A OMS recomenda a azitromicina para o tratamento de infecções por *C. trachomatis* (1g), um regime que pode expor *N.gonorrhoeae* (incluindo as comensais) a concentrações sub ótimas que podem favorecer a seleção/desenvolvimento de isolados resistentes (TRECKER et al., 2015; WHO, 2016).

Quando analisados nossos resultados dos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016 é possível observar que o segundo período possui maior porcentagem de isolados com CIMs no intervalo de 0,03 a 0,06 $\mu\text{g/ml}$ e um isolado 0,125 $\mu\text{g/ml}$ para ceftriaxona e de 0,03 a 0,125 $\mu\text{g/ml}$ para cefixima, do que o primeiro período (Tabela 1). Considerando o ponto de corte $> 0,25\mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2014) e $> 0,125 \mu\text{g/ml}$ (EUCAST, 2015) para ceftriaxona e $>0,25\mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2014) e $> 0,125 \mu\text{g/ml}$ (EUCAST, 2015) para cefixima, os dados evidenciam necessidade de estabelecer vigilância. O CLSI não possui ponto de corte estabelecido para resistência às cefalosporinas para *N. gonorrhoeae*, já o EUCAST estabelece que isolados com CIM $> 0,125 \mu\text{g/ml}$ são considerados resistentes. A análise de perfil de suscetibilidade foi realizada de acordo com o preconizado no CLSI para todos os antimicrobianos, com exceção da azitromicina, e os dados de CIMs das cefalosporinas foram analisados de acordo com os padrões do CLSI como também do EUCAST. Na análise de ambos os padrões, não foi encontrado nenhum isolado resistente para as cefalosporinas, entretanto foram encontrados três isolados com CIM elevado para cefixima (CIM 0,125 $\mu\text{g/ml}$) sendo que um deles também continha CIM elevado para ceftriaxona (CIM 0,125 $\mu\text{g/ml}$).

Embora as cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes às ESCs ainda serem relativamente raras, o aumento crescente das CIMs em isolados suscetíveis têm sido motivo de grande preocupação (Figura 8). Os isolados com CIMs elevadas para ESC são considerados potenciais precursoras de estirpes resistentes (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2016). Segundo DILLON; TRECKER; THAKUR (2013) foram identificados isolados com CIMs para ceftriaxona $\geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ em quatro países da América Latina (Argentina, Cuba, Colômbia e Uruguai)

entre 2010 e 2011. Isolados de *N. gonorrhoeae* com suscetibilidade reduzida (CIMs $\geq 0,125$ - $0,25$ $\mu\text{g/ml}$) para ceftriaxona não foram relatados na América Latina antes de 2007, quando sete isolados com CIM $\geq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ foram identificados em Manaus (STARNINO et al., 2012). Em 2014, um isolado resistente à ceftriaxona e cefixima (CIM $0,5$ $\mu\text{g/ml}$) foi relatado na Argentina, indicando o surgimento de resistência gonocócica às ESCs (GIANECINI et al., 2016). A baixa prevalência de isolados com suscetibilidade reduzida às ESCs durante este período pode refletir o baixo nível de utilização da ceftriaxona como opção terapêutica ou a ausência de um clone circulante (THAKUR et al., 2017b).

Figura 8: Variação da concentração inibitória mínima. Perfil de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas de 3^o geração: ceftriaxona e cefixima, nos períodos de 2003 a 2010 e 2011 a 2016.



A análise molecular mostrou que dos 186 isolados que compuseram o estudo, 7,5% (14/186) foram agrupados como PPNG, de acordo com a reação do disco nitrocefina, e foram observados nos anos de 2003, 2005, 2009, 2013, 2014 e 2016. A porcentagem de PPNG relatada neste estudo, ainda que baixa, corrobora com a porcentagem encontrada em Manaus em 2000 (8,6%) (DILLON et al., 2001a), e em 2013 em Minas Gerais (14,5%) (COSTA et al., 2013) e com a encontrada em países da Europa (8% a 14,1%) (DILLON et al., 2001a; STEFANELLI et al., 2018). Na Europa, a prevalência de PPNG encontra-se com taxas entre 0% (Chipre, Estônia, Islândia e Letônia) e 32% (Áustria), com um nível de resistência global de 14,8% de PPNG. A prevalência de PPNG é a mais alta já observada no Euro-GASP, e tem havido uma tendência cada vez maior desde 2010 (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL., 2015).

Os dados de prevalência e os perfis de plasmídeos de isolados PPNG da América do Sul são limitados, no período de 2000 a 2009 644 isolados brasileiros foram testados como produtores de β -lactamase e 21,9% considerados positivos (STARNINO et al., 2012). Entre os tipos de plasmídeos que carregam o gene *bla*TEM, os plasmídeos tipo Asiático, Africano e Toronto/Rio são os mais frequentemente descritos globalmente (BARRETO et al., 2004; GIANECINI et al., 2015b; MUHAMMAD et al., 2014). Conforme mostrado no Quadro 27, neste estudo o plasmídeo o Africano foi o tipo predominante, 64,3% (9/14) das PPNG, seguido do Toronto/Rio, 14,3% (2/14) e Asiático, 14,3% (2/14). Um isolado foi negativo para a pesquisa dos três tipos de plasmídeos. Dados publicados por Barreto (2004) mostraram que o plasmídeo Africano foi o mais prevalente no Rio de Janeiro, o mesmo tipo de plasmídeo foi observado como mais prevalente na cidade de São Paulo no presente estudo. O isolado PPNG negativo para os três plasmídeos, pode abrigar um outro tipo de plasmídeo, visto que existem outros tipos já descritos circulantes no mundo. (GIANECINI et al., 2015a; MUHAMMAD et al., 2014). Este estudo não utilizou métodos capazes de rastrear e identificar plasmídeos.

Estudos descreveram a prevalência e a caracterização molecular de PPNG e as variantes do gene *bla*TEM (COLE et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2014). Os isolados PPNG foram submetidos à análise molecular para detectar o gene *bla*TEM, com o intuito de

relacionar as variantes do gene com o tipo de plasmídeo encontrado. Os resultados da TEM-PCR mostraram que os 14 isolados PPNG continham o gene *bla*TEM. Após a realização da MAMA-PCR, quatro isolados foram identificados com o alelo *bla*TEM-135 e carregavam o plasmídeo Toronto/Rio (50%) e o Africano (50%). Os outros 10 isolados MAMA-PCR negativos que amplificaram na TEM-PCR, sugeriram a presença do alelo *bla*TEM-1. Um estudo realizado na Argentina, que contou com 151 PPNG, mostrou que 95,2% dos isolados que possuíam o alelo *bla*TEM-135 carregavam o plasmídeo Toronto/Rio e apenas 4,8% carregavam o plasmídeo Africano (GIANECINI et al., 2015a). MUHAMMAD, 2014, observou que o plasmídeo Toronto/Rio estava relacionado ao alelo *bla*TEM-135 e que possivelmente esse plasmídeo teve origem do alelo *bla*TEM-135.

Quadro 27: Produção da β -lactamase, concentração inibitória mínima, tipo de alelo *bla*TEM e tipo do plasmídeo em isolados PPNG de 2003 a 2016.

β -lactamase	CIM CRO μ g/ml	CIM PEN μ g/ml	PCR TEM	PCR MAMA	<i>bla</i> TEM ^a	Plasmídeo
+	0,004	64	+	+	TEM-135	Toronto/Rio
+	0,008	8	+	-	TEM-1	Africano
+	0,016	32	+	+	TEM-135	Africano
+	0,016	8	+	-	TEM-1	Africano
+	0,008	2	+	-	TEM-1	Africano
+	0,004	4	+	+	TEM-135	Africano
+	0,03	0,5	+	-	TEM-1	Africano
+	0,008	8	+	-	TEM-1	Asiático
+	0,008	4	+	-	TEM-1	Asiático
+	0,06	8	+	-	TEM-1	Africano
+	0,008	4	+	-	TEM-1	Africano
+	0,008	8	+	-	TEM-1	Africano

+	0,008	32	+	+	TEM-135	Toronto/Rio
+	0,008	8	+	-	TEM-1	- ^b

^a: Isolados MAMA-PCR negativos que foram TEM-PCR positivos, sugeriram a presença do alelo *bla*TEM-1.

^b: PCR negativa para os tipos de plasmídeos pesquisados.

Dados retrospectivos de um estudo realizado na Itália, mostraram a redução de plasmídeos Toronto/Rio carreando o alelo *bla*TEM-135 e aumento de plasmídeos Africanos carreando o alelo *bla*TEM-1 paralelamente, sugerindo uma alteração no perfil molecular de PPNG circulantes naquele país (STEFANELLI et al., 2018). Poucas mutações em *bla*TEM-1 e uma única mutação em *bla*TEM-135 foram descritas estando associadas à β -lactamase de espectro estendido (ESBL) em *N. gonorrhoeae* (GIANECINI et al., 2015a; NAKAYAMA et al., 2012). O perfil molecular das cepas circulantes está mudando e, curiosamente, apenas um SNP específico adicionado ao alelo *bla*TEM-135 produziria uma ESBL, que seria capaz de degradar todas as cefalosporinas de espectro estendido (GIANECINI et al., 2015a; MUHAMMAD et al., 2014).

Foram observados os isolados fenotípicos TRNG em todos os anos do presente estudo. Em geral, 17 (9,1%) isolados apresentaram fenótipo somente CMTR e 43 (23,1%) somente TRNG (Quadro 28). Em relação ao tipo de plasmídeo que confere a resistência a tetraciclina (*tetM*) carregado pelos isolados do presente estudo, o plasmídeo tipo Holandês foi encontrado em 86% dos isolados TRNG e o plasmídeo tipo Americano em somente 10% dos isolados. Esses resultados corroboram com os dados apresentados por Dillon et al., 2001a que mostram que a maioria dos isolados TRNG de países da América Latina e do Caribe carregam o plasmídeo tipo Holandês (DILLON et al., 2001a). Estudos sobre a prevalência mundial de plasmídeos conjugativos do tipo Holandês e Americano mostraram que o tipo Holandês foi relatado como mais prevalente em países asiáticos, como Indonésia (100%), Filipinas (100%) e Tailândia (100%) em 1988-1995, na China em 1999-2006 (99,2%) e em 2011-2012 (96,2%) e em Bangladesh (98,7%). Também é o tipo mais prevalente no Brasil (76,5%), na Guiana (61,1%), em Trinidad (95,5%) e em São Vicente (93,3%). Já o plasmídeo tipo Americano foi relatado como mais prevalente na Europa em 1988-1995 (80,5%), no Reino Unido em 1988-1995 (81,8%), na Itália em 2003-

2005 (77,8%), em diversos países africanos em 1988-1995 (98,3%) e na Jamaica em 1988-1995 (63%), com uma prevalência total no Caribe de 64,3% (BEATA et al., 2016; DILLON et al., 2001a, 2001b; TURNER; GOUGH; LEEMING, 1999).

Quadro 28: Fenótipos de suscetibilidade aos antimicrobianos observados no período de 2003 a 2016 em 186 isolados de *N. gonorrhoeae* da Cidade de São Paulo.

Fenótipo	Número de isolados (%)
Suscetível	59 (31.7%)
Somente PPNG	6 (3.2%)
Somente CMPR	2 (1.1%)
Somente CMTR	17 (9.1%)
Somente TRNG	43 (23.1%)
Somente CIP^R	15 (8.0%)
Somente AZM^R	4 (2.2%)
Somente CMRNG	10 (5.4%)
CMPR/CIP^R	2 (1.1%)
PPNG/CIP^R	3 (1.6%)
PPNG/TRNG	1 (0.5%)
PPNG/TRNG/CIP^R	4 (2.2%)
CMTR/CIP^R	6 (3.2%)
CMTR/CIP^R/AZM^R	1 (0.5%)
CIP^R/AZM^R	2 (1.1%)
CMRNG/CIP^R	8 (4.3%)
TRNG/CIP^R	2 (1.1%)
TRNG/CIP^R/AZM^R/CRO^{red}	1 (0.5%)
Total	186

Diversas mutações vêm sendo associadas à resistência ao ciprofloxacino (Asp95 em *gyrA*, Ser88 ou Glu91 no *parC*), entretanto estudos anteriores mostraram que uma única mutação no códon Ser91 do gene *gyrA* do gonococo consegue conferir resistência a esta fluorquinolona (HEMARAJATA et al., 2016; SIEDNER et al., 2007). Para determinar os mecanismos associados à resistência ao ciprofloxacino, neste estudo, foram analisados os padrões de mutação nos genes *gyrA* e *parC* nos 42 isolados CIPR (Quadro 29). Foi observado que a maioria dos isolados resistentes apresentaram uma

mutação dupla no gene *gyrA*, com exceção de três isolados que não apresentou nenhuma mutação. Dos isolados que apresentaram mutações, em todos, a substituição S91F (Ser-91-Phe) no gene *gyrA* estava presente. Além da substituição S91F, outras mutações no códon 95 do gene *gyrA* foram observadas, D95G (Asp-95-Gly) em 71,4% (30/42) e D95A (Asp-95-Ala) em 19,0% (8/42) dos isolados.

Isolados com alto nível de resistência às fluoroquinolonas podem carrear mutações em *gyrA* nas posições 91 e 95 e em *parC* nas posições 87 e 91 (VERNEL-PAUILLAC et al., 2009). No presente estudo a análise do gene *parC* demonstrou mutações nos códons 86, 87 e 91. Uma única mutação foi observada em 72,2% isolados CIPR (32/42) e mutação dupla em apenas em 11,9% (5/42). A mutação única mais comum foi S87R (66,7%; 28/42), seguida de D86N (4,8%; 2/42) e E91G (Glu-91-Gly) em um único isolado (2,4%; 1/42). S87N (Ser-87-Asn) foi associada com a mutação E91Q (Glu-91-Gln) em quatro isolados (9,5%) e em somente um isolado S87I (Ser-87-Ile) foi visto juntamente com E91G (Glu-91-Gly) (2,4%). Os padrões mais comuns de mutações encontradas foram as substituições S91F (Ser-91-Phe) e D95G (Asp-95-Gly) no gene *gyrA*, associadas a um S87R (Ser-87-Arg) no gene *parC* (CIM \geq 4 μ g/ml). Esses dados corroboram com dados previamente encontrados no Rio de Janeiro em 2011 (UEHARA et al., 2011). Os três isolados que não apresentaram mutação no gene *gyrA* também não apresentaram mutação no gene *parC*, além disso, é interessante observar que quando presente mutações nos isolados, essas se deram de maneira concomitante, ou seja, tanto em *gyrA* quanto em *parC*. Entretanto a resistência presente nesses isolados com ausência de mutações pode ser explicada com a possível presença das proteínas Qnr, capazes de proteger DNA gyrase das quinolonas (ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006).

Quadro 29: Caracterização molecular de isolados CIPR da cidade de São Paulo, Brasil, de 2003 a 2016 em relação aos padrões de mutação de *gyrA* e *parC*, a presença de plasmídeos *tetM* e β -lactamase e o perfil de resistência à penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, ceftriaxona e cefixima.

Ano	CIP CIM ($\mu\text{g/ml}$)	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	Plasmídeo <i>tetM</i>/β- lactamase	Fenótipo de resistência
2005	8	Sem mutação	Sem mutação	-	CIPR
2005	8	S91F/D95G	D86N	-	CMTR/CIPR
2005	4	S91F/D95A	S87N/E91Q	-/Americano	TRNG/CIPR
2005	16	S91F/D95G	S87R	-	CMRNG/CIPR
2006	8	Sem mutação	Sem mutação	-/Holandês	TRNG/CIPR
2006	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2006	16	S91F/D95G	S87R	-	CMRNG/CIPR
2006	16	S91F/D95G	S87R	-	CMRNG/CIPR
2006	16	S91F/D95G	S87R	-	CMRNG/CIPR
2006	16	S91F/D95G	S87R	-	CMRNG/CIPR
2006	16	S91F/D95G	S87R	-	CMTR/CIPR
2006	16	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2006	16	S91F/D9G	S87R	-	CMTR/CIPR
2006	8	S91F/D95G	S87R	-	CMRNG/CIPR
2007	16	S91F/D95G	S87R	-	CMTR/CIPR

2011	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2013	16	S91F/D95G	S87R	-	CMTR/CIPR
2013	1	S91F/D95A	S87N	-	CIPR
2014	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2014	2	S91F/D95G	S87R	Africano/-	PPNG/CIPR
2015	2	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2015	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR/AZMR
2015	2	Sem mutação	Sem mutação	-	CIPR
2016	4	S91F/D95A	S87N/E91Q	Asiático/Americano	PPNG/TRNG/CIPR
2016	4	S91F/D95A	S87R	Asiático/Americano	PPNG/TRNG/CIPR
2016	4	S91F/D95G	S87R	-	CMPR/CIPR
2016	4	S91F/D95G	S87R	-	CMPR/CIPR
2016	2	S91F/D9A	S87R	Africano/Americano	PPNG/TRNG/CIPR
2016	16	S91F/D95G	S87R	-	TRNG/CIPR/AZMR/CROred
2016	2	S91F/D95A	S87N/E91Q	-	CIPR
2016	8	S91F/D95G	S87R	-	CMTR/CIPR/AZMR
2016	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2016	32	S91F/D95G	S87I/E91G	-	CMTR/CIPR
2016	8	Sem mutação	Sem mutação	Africano/Americano	PPNG/TRNG/CIPR
2016	4	S91F/D95A	D86N	Toronto/Rio/-	PPNG/CIPR
2016	8	S91F/D95G	S87R	-	CIPR

2016	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR/AZMR
2016	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2016	8	S91F/D95G	S87R	-	CMRNG/CIPR
2016	4	S91F/D95G	S87R	-	CIPR
2016	8	S91F/D95G	E91G	-	CIPR
2016	4	S91F/D95A	S87N/E91Q	-	PPNG/CIPR

No presente estudo, foi realizada uma análise molecular mais profunda do isolado (SP361) do ano de 2016 que apresentou a mutação S87R do gene *parC*, uma vez que foi caracterizado como um isolado multirresistente, sendo resistente a penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina e com suscetibilidade diminuída para ceftriaxona (CIM=0,125µg/ml). Esse isolado foi submetido à tipagem molecular pelo método de *multi-antigen sequence typing* (NG-MAST). Essa ferramenta tem sido de grande importância no rastreamento de estirpes resistentes, como o clone de *sequence type* (ST) 1407, associado à diminuição da suscetibilidade à cefalosporinas de terceira geração (UNEMO; DILLON, 2011). A tipagem por NG-MAST, revelou que o isolado SP361 pertence ao ST 1407 (*porB*-908 e *thpB*-110) que está associado à resistência à cefalosporinas de espectro estendido e é mais prevalente na Europa (UNEMO et al., 2012).

A primeira cepa (H041), com CIM para ceftriaxona de 2 µg/ml, foi descrita no Japão, e a tipagem molecular por NG-MAST mostrou um novo ST, o ST4220. Este genótipo não foi descrito em outro lugar, sugerindo que foi um evento esporádico (OHNISHI et al., 2011). A segunda cepa (F89) apresentando CIM de 1,5 - 2,0 µg/ml para ceftriaxona foi descrita mais tarde na França e pertencia ao ST1407 (UNEMO et al., 2012). Posteriormente, dois isolados apresentando o mesmo perfil de suscetibilidade antimicrobiana foram identificados na Espanha (Quadro 30). Ambos mostraram duas substituições de aminoácidos em *gyrA* (S91F e D95G) e uma em *parC* (S87R) (ĆMARA et al., 2012). Com exceção da cepa isolada no Japão, as demais cepas foram isoladas de homens que fazem sexo com homens, sugerindo a presença de clones multirresistentes nessa comunidade (ĆMARA et al., 2012; OHNISHI et al., 2011; UNEMO et al., 2012). UNEMO et al., 2012, mostrou com a cepa F89 que o clone ST1407 pode, por uma única mutação adicional no gene da proteína ligadora de penicilina 2 (*penA*), desenvolver resistência de alto nível tanto à cefixima quanto à ceftriaxona, que são as últimas opções para o tratamento da gonorreia. Atualmente, no Brasil, nenhuma cepa com resistência às cefalosporinas de terceira geração foi relatada. Entretanto, a presença do clone 1407 circulante com suscetibilidade diminuída à ceftriaxona é um fator preocupante relacionado à possível ocorrência de mutações que possam acarretar no surgimento de isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência às ESCs.

Quadro 30: Perfil de suscetibilidade, produção de β -lactamase e sequence type das cepas H042, F89 e SP 36.

Cepa	Sequence type	β -lactamase	CIM PEN	CIM TET	CIM CIP	CIM CFM	CIM CRO	CIM AZM
H041	4220	Neg	4,0 (R)	4,0 (R)	>32 (R)	8,0 (R)	2,0 (R)	1,0 (R)
F89	1407	Neg	1,0 (I)	2,0 (R)	>32 (R)	4,0 (R)	2,0 (R)	1,0 (R)
SP36 1	1407	Neg	4,0 (R)	16,0 (R)	16,0 (R)	0,125 (S)	0,125 (S)	1,0 (R)

O principal determinante para a diminuição da suscetibilidade e resistência às ESCs são as mutações no gene *penA* que codificam a proteína ligadora de penicilina 2 (PBP2) (UNEMO et al., 2012). A aquisição de genes específicos de mosaico de *penA* ou uma alteração do aminoácido A501 em PBP2 resulta em menor afinidade para ESCs e uma consequente diminuição na suscetibilidade. Além disso, mutações específicas no gene repressor *mtrR* promotor ou sequência de codificação causam uma superexpressão do sistema de bomba de efluxo *MtrCDE* que exporta ESCs para fora da célula, o que reduz ainda mais a suscetibilidade ESC (*mtrR*) (UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO et al., 2011). Ainda, as alterações dos aminoácidos G101 e A102 em PorB1b resultam em diminuição da permeabilidade e diminuição da suscetibilidade às ESC (*penB*) (JEVERICA et al., 2014; OHNISHI et al., 2011; UNEMO; NICHOLAS, 2012). Em vista dos achados deste estudo, o grave alerta a circulação do clone ST1407 e aumento de CIM para ceftriaxona e cefixima em isolados recentes, é ideal que a análise molecular seja estendida para todos os estudos de vigilância da resistência de *N. gonorrhoeae*.

5 CONCLUSÃO

No Brasil, não havia sido realizado nenhum estudo retrospectivo de resistência antimicrobiana para *Neisseria gonorrhoeae* que compreendesse tantos anos. O presente estudo identificou isolados de *N. gonorrhoeae* com perfil de resistência semelhante ao encontrado globalmente.

A porcentagem de isolados com resistência à penicilina e tetraciclina é alta, entretanto CIM estas altas taxas de resistência já eram descritas no Brasil. Foi observada uma variação na CIM ao longo dos anos evidenciando uma alteração desses valores, no entanto não havendo uma alteração no perfil de resistência. Um aumento no perfil de resistência para azitromicina foi observado ao longo dos anos, como também valores de CIM mais elevados no segundo período do estudo. Ainda, um expansivo aumento na resistência do gonococo ao ciprofloxacino, dados mais preocupantes devido às diretrizes terapêuticas até o ano de 2016 recomendarem o ciprofloxacino associado à azitromicina. Nenhum isolado apresentou-se não suscetível às ESCs, entretanto um isolado apresentou suscetibilidade reduzida para ceftriaxona. A análise das cefalosporinas estudadas mostrou um aumento das CIMs no segundo período em relação ao primeiro e a presença de isolados com suscetibilidade reduzida (CIM 0,125) antes não encontradas.

A caracterização molecular dos isolados PPNG mostrou o gene *blaTEM-1* carreado pelo plasmídeo Africano como o mais prevalente. Em relação aos isolados TRNG, a caracterização molecular mostrou o plasmídeo Holandês carreado o gene *tetM* como o mais prevalente. As mutações mais comuns encontradas na caracterização molecular dos isolados CIPR mostrou a substituição S91F e D95G no gene *gyrA*, associadas a S87R em *parC* (CIM $\geq 4\mu\text{g/ml}$).

O presente estudo mostrou dados preocupantes para o futuro do tratamento das infecções gonocócicas. A presença de um isolado com ST1407 e o aumento nos valores de CIMs são fatores alarmantes uma vez que a ceftriaxona é a última opção de tratamento da gonorreia. É necessário conhecer o fenótipo e genótipo dos isolados circulantes para poder estabelecer diretrizes de tratamento compatíveis para cada população e evitar que a gonorreia se torne intratável.

6 PERSPECTIVAS

- Finalizar a análise das sequências de NG-MAST que já estão em andamento;
- Estudar possíveis mutações no gene *penA* que codificam a proteína ligadora de penicilina 2 (PBP2) dos isolados com suscetibilidade reduzida às ESCs;
- Estudar possíveis mutações no gene *mtrR*, que levam à superexpressão da bomba de efluxo MtrC- MtrD-MtrE;
- Divulgar os resultados entre os clínicos mostrando a importância do controle etiológico e do controle de cura da gonorreia.

7 REFERÊNCIAS

BARBOSA, M. J. et al. Prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection in men attending STD clinics in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 500–503, out. 2010.

BARRETO, N. A. et al. Caracterização Fenotípica e mMolecular de *Neisseria gonorrhoeae* Isoladas No Rio de Janeiro, 2002–2003. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente transmissíveis**, v. 16, n. 3, p. 32–42, 2004.

BEATA, M. B. et al. Plasmid-mediated resistance to tetracyclines among *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Poland between 2012 and 2013. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 33, n. 6, p. 475–479, 2016.

BELDA, W. et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 293–295, 2007.

BIGNELL, C.; UNEMO, M. 2009 European (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **International journal of STD & AIDS**, v. 20, n. 7, p. 453–457, 2009.

BRASIL. **NOTA INFORMATIVA Nº 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS. Atualização da recomendação nacional do tratamento preferencial da infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto).** DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES VIRAIS. **Anais...** Brasília-DF: Ministério da Saúde: 2017

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente**

Transmissíveis. Ministério da Saúde. Brasília, 2015.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; PROGRAMA NACIONAL DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS E AIDS. Cultura , Isolamento e Identificação da Neisseria Gonorrhoeae. **Ministério da Saúde**, TELELAB. p. 72, 2001.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E I. E. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Ministério da Saúde**, p. 121, 2015.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. **Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras , 2005 .** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

CDC. **1989 Sexually transmitted diseases treatment guidelines.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001459.htm>. Acesso em: 4 fev. 2018.

CDC. Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006: Fluoroquinolones No Longer Recommended for Treatment of Gonococcal Infections. **Annals of Emergency Medicine**, v. 50, n. 3, p. 232–234, 2007.

CDC. **Sexually transmitted diseases treatment guidelines.MMWR Recommendations and Reports.**Atlanta, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6403a1.htm>

CDC. **The State of STDs | STD Surveillance 2016 | CDC.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/std/stats16/infographic.htm>. Acesso em: 15 fev. 2018a.

CDC. Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP) Protocol. **Public Health**, v. 2007, n. December, p. 1–36, 2016b.

CHEN, S. C. et al. First nationwide study regarding ceftriaxone resistance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 92–99, 2016.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CLSI. **M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Information Supplement**. [s.l.: s.n.]. v. 34

CLSI. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial. In: **CLSI document M100-S25**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. p. 236.

ÓMARA, J. et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1858–1860, 2012.

COLE, M. J. et al. The European gonococcal antimicrobial surveillance programme, 2009. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 42, p. 4, 2011.

COLE, M. J. et al. Genetic diversity of blaTEM alleles, antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological characteristics of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from England and Wales. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 12, p. 3238–3243, 2015.

COSTA, L. M. B. et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais,

Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 304–309, jun. 2013.

COSTA-LOURENÇO, A. P. R. DA et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 617–628, 2017.

DEGUCHI, T. et al. Emergence and Spread of Drug Resistant *Neisseria gonorrhoeae*. **The Journal of Urology**, v. 184, n. 3, p. 851–858, set. 2010.

DILLON, J. A. et al. Reduced susceptibility to azithromycin and high percentages of penicillin and tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Manaus, Brazil, 1998. **Sexually transmitted diseases**, v. 28, n. 9, p. 521–6, set. 2001a.

DILLON, J. A. R. et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from three Caribbean countries: Trinidad, Guyana, and St. Vincent. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 28, n. 9, p. 508–514, set. 2001b.

DILLON, J.-A. R.; TRECKER, M. A.; THAKUR, S. D. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. Suppl 4, p. iv36–iv41, 2013.

ESPINOSA, K. et al. Fluoroquinolone resistance in *neisseria gonorrhoeae* after cessation of ciprofloxacin usage in San Francisco: Using molecular typing to investigate strain turnover. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 42, n. 2, p. 57–63, 2015.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. **Guidance on reading EUCAST Breakpoint Tables**

Breakpoints, 2015. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf>

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe. **Stockholm: ECDC**, 2015.

FERREIRA, W. A. et al. Neisseria gonorrhoeae produtoras de Betalactamase resistentes a azitromicina em Manaus, amazonas, Brasil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente transmissíveis**, v. 16, n. 2, p. 28–32, 2004.

FERREIRA, W. A. et al. Resistência da Neisseria gonorrhoeae a antimicrobianos em Manaus: Período 2005-2006. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente transmissíveis**, v. 19, n. 2, p. 65–69, 2007.

FERREIRA, W. A. et al. Genotyping of two Neisseria gonorrhoeae fluoroquinolone-resistant strains in the Brazilian Amazon region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 629–631, 2011.

GALARZA, P. G.; GIANECINI, R. A. Guía Practica Para el Diagnostico y Susceptibilidad de Neisseria gonorrhoeae. **Laboratorio Nacional y Regional de Referencia en Neisseria gonorrhoeae.**, p. 26, 2015.

GERBASE, A. C. Gonorreia: estado atual e comparação das recomendações terapêuticas do Brasil com a literatura e normas internacionais recentes. **Ministério da Saúde**, p. 39, 2014.

GIANECINI, R. et al. Identification of TEM-135 β -lactamase in neisseria gonorrhoeae strains carrying African and Toronto plasmids in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 717–720, 2015a.

GIANECINI, R. et al. Prevalence of bla TEM-220 gene in Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae strains carrying Toronto/Rio plasmid

in Argentina, 2002 - 2011. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 2015b.

GIANECINI, R. et al. **Neisseria gonorrhoeae resistant to ceftriaxone and cefixime, Argentina** **Emerging Infectious Diseases**, 2016.

GOIRE, N. et al. Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 223–229, 10 fev. 2014.

GOSE, S. O. et al. Failure of azithromycin 2.0 g in the treatment of gonococcal urethritis caused by high-level resistance in California. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 42, n. 5, p. 279–280, maio 2015.

GRANSDEN, W. R. et al. **Decreased susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to ciprofloxacin** **The Lancet**, jan. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0140673690901777>>. Acesso em: 4 fev. 2018

GROSS, G. E.; TYRING, S. K. **Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. v. 58

HAMASUNA, R. et al. The second nationwide surveillance of the antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* from male urethritis in Japan, 2012-2013. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 5, p. 340–345, 2015.

HEMARAJATA, P. et al. Performance and Verification of a Real-Time PCR Assay Targeting the *gyrA* Gene for Prediction of Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 805–808, 2016.

HILL, S. A.; MASTERS, T. L.; WACHTER, J. Gonorrhea – an evolving disease of the new millennium. **Microbial Cell**, v. 3, n. 9, p. 371–389, 2016.

HU, M. et al. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rpsJ* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4327–4334, 2005.

ISON, C. A.; DEAL, C.; UNEMO, M. Current and future treatment options for gonorrhoea: Table 1. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. Suppl 4, p. iv52–iv56, dez. 2013.

JABEEN, K. et al. Antimicrobial resistance and *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) genotypes in *N. gonorrhoeae* during 2012–2014 in Karachi, Pakistan. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 353, 2016.

JACOBSSON, S. et al. WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC >2 mg/L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe from 2009 to 2014. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 11, p. 3109–3116, nov. 2016.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41 Suppl 2, n. Supplement_2, p. S120–6, 2005.

JEVERICA, S. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006–12: Rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 6, p. 1517–1525, 2014.

JOHNSON, S. R.; MORSE, S. A. Antibiotic resistance in *neisseria gonorrhoeae*: Genetics and mechanisms of resistance. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 15, n. 4, p. 217–224, out. 1988.

KIRKCALDY, R. D. et al. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the USA: the Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP), January 2006–June 2012. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. Suppl 4, p. iv5–iv10, 15 dez. 2013.

KIRKCALDY, R. D. et al. *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility Surveillance — The Gonococcal Isolate Surveillance Project, 27 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 65, n. 7, p. 1–19, 2016.

KUBANOV, A. A. et al. Drug resistance mutations and susceptibility phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. **Molecular Biology**, v. 51, n. 3, p. 379–388, 22 maio 2017.

LEWIS, D. A. Global resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 62–67, fev. 2014.

LI, M. et al. Presence of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma* spp., but not *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*, in women undergoing an infertility evaluation: high prevalence of tetracycline resistance gene tet(M). **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.

LYNAGH, Y. et al. Detailed characterization of the first high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases in Ireland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 8, p. 2411–2413, 2015.

MAIER, T. W.; ZUBRZYCKI, L.; COYLE, M. B. Genetic Analysis of Drug Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Identification and Linkage Relationships of Loci Controlling Drug Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 7, n. 5, p. 676–681, 1975.

MANZANO, S. et al. Catheterization of the Urethra in Girls. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 2, p. e2, 2014.

MARTIN, I. M. C. et al. Rapid Sequence-Based Identification of Gonococcal Transmission Clusters in a Large Metropolitan Area. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1497–1505, 2004.

MAVROIDI, A. et al. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* Strains with Decreased Susceptibility to Fluoroquinolones Isolated in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3489–3491, 2000.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Susceptibility to ceftriaxone and occurrence of penicillinase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Poland in 2012–2013. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 4, p. 269–273, 23 jul. 2016.

MORITA-ISHIHARA, T. et al. Treatment failure with 2 g of azithromycin (extended-release formulation) in gonorrhoea in Japan caused by the international multidrug-resistant ST1407 strain of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 8, p. 2086–2090, 2014.

MORSE, S. A. et al. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 5, p. 664–670, 1986.

MUHAMMAD, I. et al. Characterisation of blaTEMgenes and types of β -lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* - the prevalent and conserved blaTEM-135has not recently evolved and existed in the Toronto plasmid from the origin. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2014.

NAKAYAMA, S. I. et al. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 916–920, 2012.

OHNISHI, M. et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3538–3545, 1 jul. 2011.

OLESKY, M. et al. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2300–2308, 2006.

PAGOTTO, F. et al. Sequence analysis of the family of penicillinase-producing plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. **Plasmid**, v. 43, n. 1, p. 24–34, 2000.

PALMER, H. M.; LEEMING, J. P.; TURNER, A. A multiplex polymerase chain reaction to differentiate \hat{I}^2 -lactamase plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 777–782, 2000.

PASQUALI, F. et al. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 562–565, 1 abr. 2005.

PENNA, G. O.; HAJJAR, L. A.; BRAZ, T. M. Gonorrhea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 451–464, out. 2000.

PHILLIPS, I. BETA-LACTAMASE-PRODUCING, PENICILLIN-RESISTANT GONOCOCCUS. **The Lancet**, v. 308, n. 7987, p. 656–657, 25 set. 1976.

PISZCZEK, J.; ST. JEAN, R.; KHALIQ, Y. Gonorrhea: Treatment update for an increasingly resistant organism. **Canadian Pharmacists Journal**, v. 148, n. 2, p. 82–89, 2015.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA; SURVEILLANCE AND EPIDEMIOLOGY DIVISION. National Surveillance of Antimicrobial Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* Annual Summary. **Public Health Agency of Canada**, p. 46, 2014.

REGNATH, T.; MERTES, T.; IGNATIUS, R. Antimicrobial resistance of *neisseria gonorrhoeae* isolates in south-west Germany, 2004 to 2015: Increasing minimal inhibitory concentrations of tetracycline but no resistance to third-generation cephalosporins. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 36, p. 1–7, 2016.

ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 629–640, 2006.

SERRA, J. Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória. **Informe Epidemiológico do Sus**, v. 9, n. 1, p. 59–60, 2000.

SIEDNER, M. J. et al. Real-time PCR assay for detection of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1250–1254, 2007.

SKERLEV, M.; ČULAV-KOŠČAK, I. Gonorrhea: New challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 2, p. 275–281, mar. 2014.

SOOD, S. et al. Exploring quinolone resistance-determining region in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from across India. **The Indian journal of medical research**, v. 146, n. Supplement, p. S64–S69, jul. 2017.

SPARLING, P. F.; SARUBBI, F. A.; BLACKMAN, E. INHERITANCE OF LOW-LEVEL RESISTANCE TO PENICILLIN, TETRACYCLINE, AND CHLORAMPHENICOL IN *NEISSERIA-GONORRHOEAE*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 2, p. 740–749, 1975.

STARNINO, S. et al. Retrospective analysis of antimicrobial susceptibility trends (2000–2009) in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from countries in Latin America and the Caribbean shows evolving resistance to ciprofloxacin, azithromycin and decreased susceptibility to ceftriax. **Sexually transmitted diseases**, v. 39, n. 10, p. 813–21, 2012.

STEFANELLI, P. et al. Molecular Characterization of Penicillinase–Producing *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Two Time Periods, 2003–2004 and 2014–2015, in Italy. **Microbial Drug Resistance**, p. mdr.2017.0218, 2 jan. 2018.

SU, X.; LIND, I. Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Denmark from 1995 to

1998. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 117–123, jan. 2001.

TANAKA, M. et al. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 521–525, 2000.

THAKUR, S. D. et al. High levels of susceptibility to new and older antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Saskatchewan (2003–15): time to consider point-of-care or molecular testing for precision treatment? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–8, 2017a.

THAKUR, S. D. et al. Resistance to Ceftriaxone and Azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates From 7 Countries of South America and the Caribbean: 2010–2011. **Sexually transmitted diseases**, v. 44, n. 3, p. 157–160, mar. 2017b.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

TRECKER, M. A. et al. Demographic and behavioural characteristics predict bacterial STI reinfection and coinfection among a cross-sectional sample of laboratory-confirmed gonorrhea cases in a local health region from Saskatchewan, Canada. **Canadian Journal of Public Health**, v. 106, n. 2, p. e17–e21, 3 fev. 2015.

TREMBIZKI, E. et al. Characterization of a novel *Neisseria gonorrhoeae* penicillinase-producing plasmid isolated in Australia in 2012. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4984–4985, 2014.

TURNER, A.; GOUGH, K. R.; LEEMING, J. P. Molecular epidemiology of tetM genes in *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually transmitted infections**, v. 75, n. 1, p. 60–6, 1999.

UEHARA, A. A. et al. Molecular Characterization of Quinolone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolates from Brazil. **Journal of**

Clinical Microbiology, v. 49, n. 12, p. 4208–4212, 1 dez. 2011.

UNEMO, M. et al. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 43, 2011.

UNEMO, M. et al. 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**, v. 56, n. 3, p. 1273–1280, 2012.

UNEMO, M.; DILLON, J.-A. R. Review and International Recommendation of Methods for Typing *Neisseria gonorrhoeae* Isolates and Their Implications for Improved Knowledge of Gonococcal Epidemiology, Treatment, and Biology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 447–458, 1 jul. 2011.

UNEMO, M.; NICHOLAS, R. A. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. **Future Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1401–1422, dez. 2012.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1230, n. 1, p. E19–E28, ago. 2011.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 587–613, 1 jul. 2014.

VERNEL-PAUILLAC, F. et al. Quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Rapid genotyping of quinolone resistance-determining regions in *gyrA* and *parC* genes by melting curve analysis predicts susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1264–1267, 2009.

WHO. Global action plan to control the spread and impact of

antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **World Health Organization**, p. 40, 2012.

WHO. Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana. **Ministério da Saúde**, p. 255, 2015.

WHO. WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. **World Health Organization**, p. 50, 2016.

WIND, C. M. et al. Trends in antimicrobial susceptibility for azithromycin and ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in amsterdam, the Netherlands, between 2012 and 2015. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 1, p. 30431, 5 jan. 2017.

ZHU, B. et al. Surveillance of Antimicrobial Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Nanning, China, 2000 to 2012. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 41, n. 8, p. 501–506, ago. 2014.

APÊNDICE A – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos anos de 2003 a 2016.

Ano (n)	Penicilina % (n)			Tetraciclina % (n)			Ciprofloxacino % (n)			Azitromicina % (n)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
2003 (45)	2,2 (1)	82,2 (37)	15,6 (7)	6,7 (3)	28,9 (13)	64,4 (29)	97,8 (44)	2,2 (1)	0 (0)	7,8 (44)	0 (0)	2,2 (1)
2004 (9)	11,1 (1)	77,8 (7)	11,1 (1)	11,1 (1)	55,6 (5)	33,3 (3)	100,0 (9)	0 (0)	0 (0)	100,0 (9)	0 (0)	0 (0)
2005 (38)	2,6 (1)	84,2 (32)	13,2 (5)	18,4 (7)	26,3 (10)	55,3 (21)	86,8 (33)	2,6 (1)	10,5 (4)	97,4 (37)	2,6 (1)	0 (0)
2006 (32)	3,1 (1)	62,5 (20)	34,4 (11)	9,4 (3)	28,1 (9)	62,5 (20)	68,8 (22)	0 (0)	31,2 (10)	93,8 (30)	0 (0)	6,2 (2)
2007 (4)	0 (0)	75,0 (3)	25,0 (1)	0 (0)	0 (0)	100,0 (4)	50,0 (2)	0 (0)	50,0 (2)	100,0 (4)	0 (0)	0 (0)
2008 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2009 (2)	0 (0)	50,0 (1)	50,0 (1)	0 (0)	100,0 (2)	0 (0)	100,0 (2)	0 (0)	0 (0)	100,0 (2)	0 (0)	0 (0)

2010	0	100,0	0	0	0	100,0	100,0	0	0	100,0	0	0
(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)
2011	0	100,0	0	0	66,7	33,3	66,7	0	33,3	66,7	33,3	0
(3)	(0)	(3)	(0)	(0)	(2)	(1)	(2)	(0)	(1)	(2)	(1)	(0)
2012	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(0)												
2013	0	90,0	10,0	10,0	50,0	40,0	80,0	0	20,0	100,0	0	0
(10)	(0)	(9)	(1)	(1)	(5)	(4)	(8)	(0)	(2)	(10)	(0)	(0)
2014	0	100,0	0	37,5	62,5	0	75,0	0	25,0	87,5	0	12,5
(8)	(0)	(8)	(0)	(3)	(5)	(0)	(6)	(0)	(2)	(7)	(0)	(1)
2015	0	100,0	0	20,0	60,0	20,0	40,0	0	60,0	80,0	0	20,0
(5)	(0)	(5)	(0)	(1)	(3)	(1)	(2)	(0)	(3)	(4)	(0)	(1)
2016	0	62,1	37,9	0	65,5	34,5	31,0	0	69,0	69,0	13,8	17,2
(29)	(0)	(18)	(11)	(0)	(19)	(10)	(9)	(0)	(20)	(20)	(4)	(5)