



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MARCOS ANDRÉ SCHÖRNER

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES APÓS INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À  
CEFEXIMA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Neisseria gonorrhoeae* E  
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Neisseria elongata* ISOLADA DE  
ENDOCARDITE**

FLORIANÓPOLIS

2021

Marcos André Schörner

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES APÓS INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À CEFIXIMA  
EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Neisseria gonorrhoeae* E CARACTERIZAÇÃO  
GENÔMICA DE *Neisseria elongata* ISOLADA DE ENDOCARDITE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, na área de concentração em Análises Clínicas, para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo.

Florianópolis

2021

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

Schörner, Marcos André  
AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES APÓS INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À  
CEFIXIMA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Neisseria gonorrhoeae* E  
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Neisseria elongata* ISOLADA DE  
ENDOCARDITE / Marcos André Schörner ; orientadora, Maria  
Luiza Bazzo, 2021.  
145 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Neisseria* spp.. 3. Indução de  
resistência. 4. Sequenciamento de genoma total. 5.  
Endocardite infecciosa. I. Bazzo, Maria Luiza. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmácia. III. Título.

Marcos André Schörner

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES APÓS INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À CEFIXIMA  
EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Neisseria gonorrhoeae* E CARACTERIZAÇÃO  
GENÔMICA DE *Neisseria elongata* ISOLADA DE ENDOCARDITE**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Glauber Wagner.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Prof. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenadora do Programa

Prof. Dra. Maria Luiza Bazzo  
Orientadora

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2021

Este trabalho é dedicado em memória de meu querido pai.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à professora Maria Luiza Bazzo, pela orientação e oportunidade para o desenvolvimento da tese e pelo exemplo de profissionalismo. Muito obrigado pela participação na minha formação como profissional e por acreditar em mim há mais de 10 anos!

À Jussara Kasuko Palmeiro, que desde 2014 é minha parceira de bioinformática, por ter me auxiliado na conclusão deste trabalho e ter aberto portas para novas parcerias. Com certeza manteremos contato e parceria em novos trabalhos.

Ao Setor de Microbiologia do HU/UFSC/EBSERH, especialmente à Mara Cristina Scheffer, bioquímica deste setor, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação ao seu trabalho. Sua busca incessante por conhecimento e rápido diagnóstico microbiológico impacta positivamente na vida de muitas pessoas.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS). Em mais de 10 anos de LBMMS convivi com muitas pessoas com as quais troquei um vasto conhecimento. Aos que convivi, aos que ainda convivo e por todos os “cafezão?” meu muito obrigado! Em especial ao Fernando Hartmann Barazzetti, que nos últimos anos foi meu parceiro de experimentos no laboratório. Um amigo para toda a vida, um exemplo de perseverança e dedicação ao trabalho.

Aos novos colegas de bioinformática Hemanuel Passarelli e Dany Mesa por terem dado o apoio fundamental nessa área. Aprendi muito com vocês.

Ao Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC), pela disponibilização de acesso ao servidor de bioinformática para realização de parte das análises computacionais.

À minha família. Minha querida mãe, Dirce, meus irmãos Everaldo e Silvana que sempre me fizeram acreditar nos meus sonhos. Sem o apoio de vocês, não seria possível. Pai, mesmo não mais presente, você foi fundamental pela minha chegada até aqui. Agradeço imensamente a todos vocês.

À Márick Rodrigues Starick pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões. Obrigado por toda a força, principalmente nessa reta final, mesmo de muito longe. Você foi fundamental.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por ser a casa de toda minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade e pelo apoio financeiro na pós graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina e todo seu corpo docente pelo apoio e conhecimento partilhados.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional ou para realização deste trabalho.

## RESUMO

Este estudo avaliou a presença de mutações no genoma de isolados de *Neisseria gonorrhoeae* após indução de resistência com cefixima e caracterizou o genoma de *Neisseria elongata* isolada de paciente com endocardite infecciosa (EI). Para o estudo de indução de resistência, foram selecionados seis isolados clínicos com diferentes genótipos da região da grande Florianópolis e duas cepas de referência (WHO F e WHO Y). Os isolados foram subcultivados com concentrações crescentes do antimicrobiano cefixima. Após a indução, foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC) para seis antimicrobianos pelo método de ágar diluição. Os isolados clínicos foram sequenciados antes e após a indução e as cepas de referência somente após a indução utilizando a plataforma MiSeq Illumina. Os genomas dos isolados clínicos antes da indução de resistência foram montados utilizando SPAdes e anotados com Prokka. Para as cepas de referência, foram utilizados os genomas disponíveis no NCBI. Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), inserções e deleções foram analisados por meio do mapeamento das leituras após a indução nos genomas montados, utilizando bwa. Samtools foi utilizado para manipulação do mapeamento. As variantes foram obtidas com o programa BCFtools e anotadas com o programa SnpEff. A indução foi finalizada após 138 subcultivos, com crescimento de todos os isolados em concentração do antimicrobiano acima do ponto de corte de resistência à cefixima de acordo com o BrCAST. Os isolados M111 e M128 (ST1407) apresentaram diversas mutações na proteína ligadora de penicilina (PBP2) e exibiram os maiores valores de MIC para cefixima dentre os isolados clínicos. M107 e M110 (ST338) não apresentaram mutações nos principais determinantes de resistência às cefalosporinas de espectro estendido (ESC), mas aumentaram em 127 vezes a MIC para cefixima. WHO Y, inicialmente resistente à cefixima, apresentou mutações no gene *penB* (porina) e nos genes *mtrC* e *mtrD* da bomba de efluxo MtrCDE. Para o estudo com *N. elongata*, foram avaliados os dados clínicos de um paciente com EI (M001) que foi a óbito durante a internação e realizado o sequenciamento do genoma completo do isolado. As leituras do sequenciamento foram utilizadas para recuperar 16 sequências desta espécie disponíveis no NCBI. Os genomas foram montados com SPAdes e Gfinisher e anotados utilizando Prokka. A análise de diversidade entre os isolados foi avaliada utilizando o programa PYANI. O *core* genoma foi obtido com o programa Roary e os SNPs foram extraídos com SNP-site. A filogenia do *core* genoma e de proteínas ortólogas foi realizada com o programa RAxML. A presença de genes de resistência e de virulência foi realizada com as bases de dados CARD e VFDB. Os isolados apresentaram uma grande diversidade genética. Dezesete diferentes genes de resistência foram encontrados em todos os isolados de *N. elongata*, com maior predominância de genes relacionados a sistemas de efluxo. Genes duplicados de *pili* foram encontrados somente no isolado M001, o que pode predizer uma maior capacidade de virulência. Os resultados obtidos no estudo apontam para aquisição de resistência às ESC por diferentes mecanismos e reforçam a importância do programa de vigilância antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* no Brasil, devido a recente mudança de tratamento e prevalência de STs que podem adquirir resistência a esses antimicrobianos. O estudo genômico de *N. elongata* associado ao relato de caso, alerta a necessidade de rápida identificação microbiológica e intervenção médica para evitar desfechos desfavoráveis e fornece evidências que podem contribuir para outras investigações biológicas em espécies de *Neisseria* comensais.

**Palavras-chave:** *Neisseria* spp. Indução de resistência. Sequenciamento de genoma total. Endocardite infecciosa. Pangenoma.



## ABSTRACT

### **Title: Evaluation of mutations after resistance induction to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* and genomic characterization of *Neisseria elongata* isolate from endocarditis**

This study evaluated the presence of mutations in the genome of *Neisseria gonorrhoeae* isolates after resistance induction to cefixime and characterized the genome of *Neisseria elongata* isolated from patient with infective endocarditis (EI). For the resistance induction study, six clinical isolates with different genotypes were selected from Florianopolis region and two reference strains (WHO F and WHO Y). The isolates were subcultured with increasing concentrations of the antimicrobial cefixime. After induction, the minimum inhibitory concentration (MIC) for six antimicrobials was determined by agar dilution method. Clinical isolates were sequenced before and after induction and reference strains only after induction using the Illumina MiSeq platform. The genomes of the clinical isolates before resistance induction were assembled using SPAdes and annotated with Prokka. For the reference strains, the genomes available at NCBI were used. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions, and deletions were analyzed by mapping reads after induction onto the assembled genomes using bwa. Samtools was used for mapping manipulation. Variants were obtained with the program BCFtools and annotated with the program SnpEff. Induction was completed after 138 subcultures, with the growth of all isolates at an antimicrobial concentration above the cutoff point for cefixime resistance according to BrCAST. Isolates M111 and M128 (ST1407) had several mutations in the penicillin-binding protein (PBP2) and exhibited the highest MIC values for cefixime among the clinical isolates. M107 and M110 (ST338) showed no mutations in key determinants of resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESC) but increased the MIC for cefixime by 127-fold. WHO Y, initially resistant to cefixime, showed mutations in the *penB* (porin) gene and in the *mtrC* and *mtrD* genes of the MtrCDE efflux pump. For the study with *N. elongata*, the clinical data of one patient with EI (M001) who died during hospitalization were evaluated and the whole genome sequencing of the isolate was performed. The sequencing reads were used to retrieve 16 sequences of this species available at NCBI. Genomes were assembled with SPAdes and Gfinisher and annotated using Prokka. Diversity analysis among isolates was evaluated using the PYANI program. The core genome was obtained with the program Roary and SNPs were extracted with SNP-site. Phylogeny of the core genome and orthologous proteins was performed with the RAxML program. The presence of resistance and virulence genes was evaluated with the CARD and VFDB databases. The isolates showed a high genetic diversity. Seventeen different resistance genes were found in all *N. elongata* isolates, with a higher predominance of genes related to efflux systems. Duplicated *pili* genes were found only in isolate M001, which may predict a higher virulence capacity. The results achieved by the *N. gonorrhoeae* induced resistance study point to the acquisition of resistance to ESC by different mechanisms and reinforce the importance of *N. gonorrhoea* antimicrobial surveillance program in Brazil, due to the recent change of treatment and prevalence of STs that can acquire resistance to these antimicrobials. The genomic study of *N. elongata* associated with this case report highlights the need for rapid microbiological identification and medical intervention in order to avoid unfavorable outcomes and provides evidence that may contribute to further biological investigations of commensal *Neisseria* species.

**Keywords:** *Neisseria* spp. Resistance induction. Whole genome sequencing. Infective endocarditis. Pangenome.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação filogenética entre espécies de <i>Neisseria</i> que colonizam/infectam humanos. ....	20
Figura 2. Exemplo de inserção e deleção de repetições de nucleotídeos em uma sequência codificadora. ....	23
Figura 3. Processo infeccioso por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . ....	27
Figura 4. Fluxograma do processo de avaliação de mutações nos isolados após a indução de resistência com cefixima. ....	56
Figura 5. Curva de crescimento dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> durante a indução de resistência com cefixima. ....	65
Figura 6. Número total de mutações em cada isolado, diferenciadas entre sinônimas e não sinônimas. ....	70
Figura 7. Mutações não sinônimas em sequências codificadoras e proteínas hipotéticas. ....	71
Figura 8. Quantidade de inserções/deleções em sequências codificadoras conhecidas. ....	72
Figura 9. Quantidade de inserções/deleções em proteínas hipotéticas. ....	72
Figura 10. Sequência de aminoácidos da proteína ligadora de penicilina do tipo 2 (PBP2) dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> deste estudo e de isolados com resistência às cefalosporinas de espectro estendido, alinhados com a sequência referência M32091. ....	74
Figura 11. Presença de mutações em sequências codificadoras conhecidas nos isolados após a indução de resistência com cefixima. ....	77
Figura 12. Exames de imagem de ecocardiografia do paciente durante a internação. ....	83
Figura 13. Identidade média de nucleotídeos (ANI) entre os isolados de <i>Neisseria elongata</i> . ....	92
Figura 14. Filogenia dos isolados de <i>Neisseria elongata</i> . ....	93
Figura 15. <i>Heatmap</i> dos genes de resistência detectados nos isolados de <i>Neisseria elongata</i> . ....	95
Figura 16. <i>Heatmap</i> dos genes de virulência detectados nos isolados de <i>Neisseria elongata</i> e o respectivo número de cópias. ....	96
Figura 17. Qualidade Phred das leituras do isolado M009. ....	126
Figura 18. Qualidade Phred das leituras do isolado M043. ....	126
Figura 19. Qualidade Phred das leituras do isolado M107. ....	127
Figura 20. Qualidade Phred das leituras do isolado M110. ....	127
Figura 21. Qualidade Phred das leituras do isolado M111. ....	128
Figura 22. Qualidade Phred das leituras do isolado M128. ....	128

Figura 23. Qualidade Phred das leituras dos isolados WHO F e WHO Y.....	129
Figura 24. Qualidade Phred das leituras do isolado de <i>Neisseria elongata</i> .....	129

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo das recomendações para tratamento das infecções gonocócicas segundo a Organização Mundial da Saúde.....	34
Quadro 2. Resumo das recomendações para tratamento das infecções gonocócicas segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> incluídos no estudo.....	50
Tabela 2. Pontos de corte utilizados para interpretação da concentração inibitória mínima (MIC) dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	53
Tabela 3. Características genótípicas dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> incluídos no estudo. ....	61
Tabela 4. Concentração inibitória mínima dos isolados antes e após a indução de resistência à cefixima.....	67
Tabela 5. Características dos isolados inclusos na comparação de PBP2 com os isolados deste estudo. ....	75
Tabela 6. Resumo dos relatos de caso de endocardite infecciosa causada por <i>Neisseria elongata</i> . .....	84
Tabela 7. Tabela de aminoácidos e suas respectivas siglas.....	125
Tabela 8. Lista de amostras de <i>Neisseria elongata</i> incluídas neste estudo, e dados adicionais obtidos do NCBI.....	131
Tabela 9. Métricas da qualidade da montagem do genoma dos isolados antes da indução de resistência com cefixima. ....	133
Tabela 10. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M009.....	134
Tabela 11. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M043.....	135
Tabela 12. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M107.....	136
Tabela 13. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M110.....	138
Tabela 14. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M111.....	140
Tabela 15. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M128.....	142
Tabela 16. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima da cepa de referência WHO F.....	144

Tabela 17. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima da cepa de referência WHO Y.....	145
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>bpm</b>	Batimentos por minuto
<b>BrCAST</b>	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>CARD</b>	<i>The Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CDS</b>	<i>Coding Sequence</i>
<b>cgMLST</b>	<i>Core genome Multilocus Sequence Typing</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CR</b>	<i>Correia element</i>
<b>CREE</b>	<i>Correia Repeat Enclosed Elements</i>
<b>DIP</b>	Doença inflamatória pélvica
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DUS</b>	Sequência de captação de DNA
<b>EBSERH</b>	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
<b>ESC</b>	<i>Extended-spectrum Cephalosporin</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EV</b>	Endovenosa
<b>FR</b>	Frequência cardíaca
<b>g</b>	grama
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HU</b>	Hospital Universitário
<b>kb</b>	Quilo bases (referente a mil bases)
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IST</b>	Infecção Sexualmente Transmissível
<b>IV</b>	Intravenosa

<b>LBMMS</b>	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
<b>LOS</b>	Lipooligossacarídeo
<b>Mb</b>	Um milhão de bases
<b>MALDI-TOF MS</b>	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry</i>
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MIC</b>	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetros cúbicos
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>NAAT</b>	<i>Nucleic Acid Amplification Test</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NG-MAST</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae - Multi Antigen Sequence Typing</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>Opa</b>	Proteína de opacidade
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBP</b>	<i>Penicillin-binding Protein</i>
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
<b>PNM</b>	Leucócitos polimorfonucleares
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ST</b>	<i>Sequence type</i>
<b>Tfp</b>	Tipo IV de <i>pili</i>
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>µg</b>	Micrograma
<b>VFDB</b>	<i>Virulence Factor Database</i>
<b>VO</b>	Via oral
<b>XDR</b>	<i>Extensively Drug-resistant</i>



**WHO**

*World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1	SOBRE O GÊNERO <i>Neisseria</i> .....	18
<b>2.1.1</b>	<b>Organização genômica .....</b>	<b>20</b>
2.1.1.1	Elementos repetitivos .....	21
2.1.1.2	Mecanismos de variação antigênica.....	22
2.1.1.2.1	<i>Variação de fase</i> .....	23
<b>2.1.2</b>	<b>Fatores de virulência .....</b>	<b>24</b>
2.2	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	25
<b>2.2.1</b>	<b>Patogênese e resposta inflamatória por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Dados epidemiológicos de <i>N. gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Manifestações clínicas da infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Diagnóstico de infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>30</b>
2.2.4.1	Microscopia .....	31
2.2.4.2	Cultura .....	31
2.2.4.3	Testes de identificação confirmatória.....	32
2.2.4.4	Testes de amplificação de ácidos nucleicos.....	32
2.2.4.5	Deteção de resistência antimicrobiana em <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	33
<b>2.2.5</b>	<b>Tratamento de infecções por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Resistência aos antimicrobianos em <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>37</b>
2.2.6.1	Resistência à tetraciclina .....	38
2.2.6.2	Resistência a macrolídeos.....	39
2.2.6.3	Resistência a fluoroquinolonas .....	39
2.2.6.4	Resistência aos $\beta$ -lactâmicos .....	40
<b>2.2.7</b>	<b>Tipagem de isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....</b>	<b>45</b>
2.3	<i>Neisseria elongata</i> .....	46

<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	49
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
5.1	LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO .....	49
5.2	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	49
5.2.1	Seleção dos isolados .....	49
5.2.2	Indução <i>in vitro</i> de resistência à cefixima .....	50
5.2.3	Sequenciamento do genoma total dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> antes da indução de resistência .....	51
5.2.4	Sequenciamento do genoma total dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> após indução de resistência .....	52
5.2.5	Teste de estabilidade dos isolados após indução de resistência.....	52
5.2.6	Determinação da concentração inibitória mínima após indução de resistência	52
5.2.7	Montagem dos genomas e anotação.....	53
5.2.8	Tipagem dos isolados e caracterização de determinantes de resistência .....	54
5.2.9	Avaliação de mutações nos isolados após indução de resistência .....	54
5.3	<i>Neisseria elongata</i> .....	57
5.3.1	Aprovação ética .....	57
5.3.2	Isolamento, identificação e sequenciamento.....	57
5.3.3	Busca por isolados para genômica comparativa, montagem dos genomas e anotação.....	57
5.3.4	Pangenoma e análise filogenética.....	58
5.3.5	Análise de virulência e resistência aos antimicrobianos .....	59
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
6.1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	60
6.1.1	Caracterização genômica dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	60

6.1.2	Indução de resistência à cefixima e determinação da concentração inibitória mínima	64
6.1.3	Mutações no genoma dos isolados após indução de resistência com cefixima ...	69
6.2	<i>Neisseria elongata</i> .....	81
6.2.1	Relato do caso e revisão dos casos publicados.....	81
6.2.2	Características genômicas de <i>Neisseria elongata</i> subsp. <i>nitroreducens</i> M001 ....	91
6.2.3	Análise genômica comparativa .....	91
6.2.4	Perfis de resistência e virulência.....	94
7	CONCLUSÕES .....	98
8	PERSPECTIVAS .....	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	ANEXO A – Tabela de aminoácidos .....	125
	APÊNDICE A – Qualidade Phred das leituras do sequenciamento dos isolados.....	126
	APÊNDICE B – Lista de amostras de <i>Neisseria elongata</i> incluídas no estudo .....	131
	APÊNDICE C - Montagem dos isolados antes da indução de resistência .....	133
	APÊNDICE D – Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima	134

## 1 INTRODUÇÃO

Após a primeira descrição das espécies de *Neisseria gonorrhoeae* (1879) e *Neisseria meningitidis* (1887), consideradas patogênicas ao homem (HOFFMAN; WEBER, 2009), vem sendo observado que o gênero *Neisseria* apresenta uma grande variedade de espécies comensais, sendo que pelo menos oito delas fazem parte de uma porção substancial da microbiota nasal e da orofaringe em humanos (MARRI et al., 2010; QUILLIN; SEIFERT, 2018). Enquanto algumas espécies, como por exemplo *N. gonorrhoeae*, possuem a forma de diplococos, outras espécies, como *N. elongata* apresentam-se como bacilos gram-negativos, fazendo desse um dos poucos gêneros bacterianos a apresentarem microrganismos com diferentes morfologias (LIU; TANG; EXLEY, 2015).

As espécies de *Neisseria* são naturalmente competentes para transferência horizontal de genes. Tanto as espécies patogênicas quanto as comensais possuem em seu genoma uma variedade de elementos capazes de realizar troca de material genético, por meio de conjugação, e captura de DNA exógeno, incorporando-o ao seu genoma (GOODMAN; SCOCCAT, 1988). A grande diversidade de espécies comensais de *Neisseria* que habitam a mucosa humana, principalmente a região da orofaringe, aumenta a possibilidade dessa troca genética (KNAPP, 1988). A aquisição de novos traços genéticos é o principal condutor da evolução e diversificação de muitas espécies e pode levar à disseminação de genes não essenciais, mas que auxiliam na aptidão do organismo e sua chance de sobrevivência em diferentes condições e ambientes (CEHOVIN; LEWIS, 2017; HIGASHI et al., 2011; RANKIN; ROCHA; BROWN, 2011).

*N. gonorrhoeae* é o agente etiológico da gonorreia, uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST) com estimativa de incidência mundial de 86,9 milhões de casos em 2016 (ROWLEY et al., 2019). Este microrganismo pode causar infecção em diferentes sítios anatômicos, como orofaringe, membrana mucosa ocular, líquido sinovial, mucosa anal e genital (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Quando as infecções urogenitais permanecem não tratadas ou se forem tratadas de forma não adequada, *N. gonorrhoeae* pode ascender o trato genital e resultar em muitas complicações, como endometrite, doença inflamatória pélvica na mulher, edema no pênis e epididimite no homem. Essas complicações tornam-se um grave problema pois podem resultar em infertilidade e gravidez ectópica (MURRAY et al., 2007; UNEMO; SHAFER, 2014).

Nas últimas décadas este microrganismo tem ganhado grande destaque mundial em consequência do aumento da resistência aos antimicrobianos utilizados como primeira linha de tratamento para essa infecção. *N. gonorrhoeae* tem desenvolvido ou adquirido e, além disso, mantido resistência a todos os antimicrobianos utilizados no tratamento da gonorreia: desde as sulfonamidas até as cefalosporinas de espectro estendido (ESC, do inglês *Extended-Spectrum Cephalosporin*), últimos antimicrobianos introduzidos no tratamento. Este microrganismo tem basicamente todos os mecanismos fisiológicos de resistência aos antimicrobianos: 1) hidrólise ou modificação do antimicrobiano por enzimas, 2) modificação ou proteção do alvo do antimicrobiano, 3) redução do influxo e 4) aumento do efluxo do antimicrobiano (UNEMO; SHAFER, 2014).

A maior preocupação hoje é o surgimento de resistência às ESC (cefixima e ceftriaxona), as quais são as últimas alternativas como primeira linha de monoterapia empírica para gonorreia (EYRE et al., 2019; SÁNCHEZ-BUSÓ et al., 2019; UNEMO; SHAFER, 2014). Como consequência, o protocolo de tratamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) e protocolos de tratamento na Europa, Austrália, Estados Unidos e Canadá atualmente recomendam terapia dupla, principalmente com a utilização de ceftriaxona e azitromicina, enquanto alguns países recomendam apenas alta dosagem de ceftriaxona como monoterapia (UNEMO, SHAFER, 2014). No Brasil, até 2017, a recomendação como primeira linha para o tratamento da gonorreia era a utilização de ciprofloxacino e azitromicina. Esse tratamento foi alterado, desde então, para ceftriaxona e azitromicina devido a altas taxas de resistência ao ciprofloxacino com base em resultados de um estudo nacional de vigilância de resistência em *N. gonorrhoeae* (BAZZO et al., 2018).

Após o primeiro relato de *N. gonorrhoeae* resistente às ESC (AMEYAMA et al., 2002), novos casos foram relatados em 2011 na França (UNEMO, Magnus et al., 2011) e 2012 na Espanha (CÁMARA et al., 2012) sendo que ambos os isolados são pertencentes ao ST1407, um clone de isolados de *N. gonorrhoeae* resistente a diversos antimicrobianos e responsável por grande proporção dos casos de diminuição da sensibilidade às ESC em diversos países (UNEMO; NICHOLAS, 2012). Casos esporádicos de isolados com resistência à ceftriaxona têm sido descritos em muitos países e a primeira falha no tratamento com a utilização de ceftriaxona mais azitromicina foi relatada no Reino Unido (CHISHOLM et al., 2016). Além disso, uma transmissão internacional de um grupo de isolados com resistência à ceftriaxona foi verificada entre 2015 e 2019 (EYRE et al., 2018; 2019; LAHRA et al., 2018; LEE et al., 2019),

o que reforça a necessidade urgente de melhorar a compreensão da emergência, evolução e disseminação de resistência aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*.

Por causa de sua importância na saúde pública mundial, pesquisadores têm dedicado seus esforços em pesquisas nas espécies patogênicas, o que levou a identificação de muitos fatores de virulência que são importantes para a infecção em humanos. Apesar disso, muitos desses fatores de virulência também estão presentes nas espécies comensais, o que faz com que sejam relatados casos de infecção por essas espécies. Diferentemente do gonococo, *N. elongata* é considerada uma espécie comensal e é tida como incomum entre as espécies do gênero por ser um bacilo gram-negativo (GRANT et al., 1990). Sua identificação e classificação como nova espécie foi proposta em 1970 por Bovre e Holten (BOVRE, K. AND HOLTEN, 1970). Desde então, alguns casos de endocardite infecciosa (EI) têm sido descritos, causados por três subespécies: *N. elongata* subesp. *elongata*, *N. elongata* subesp. *glycolytica* e *N. elongata* subesp. *nitroreducens* (GRANT et al., 1990).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 SOBRE O GÊNERO *Neisseria*

O gênero *Neisseria* é composto por organismos Gram-negativos, geralmente cocoides, não móveis e não formadores de esporos, pertencentes à família *Neisseriaceae*, a qual inclui outros gêneros de importância médica, como *Kingella*, *Moraxella* e *Eikenella*. A primeira descrição de um membro desse gênero (*N. gonorrhoeae*) ocorreu em 1879, quando Albert Neisser observou pequenos diplococos dentro de leucócitos polimorfonucleares de exsudato uretral de 26 homens e mulheres com gonorreia. A segunda descrição ocorreu em 1887, quando *Neisseria meningitidis* foi isolada por Weichselbaum de líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite (LIU; TANG; EXLEY, 2015). Juntas, *N. gonorrhoeae* (gonococo) e *N. meningitidis* (meningococo) são as duas espécies do gênero patogênicas ao homem (HOFFMAN; WEBER, 2009).

A maioria das espécies de *Neisseria* são catalase e oxidase positivas e, por produzirem ácidos a partir da oxidação de vários carboidratos, podem ser diferenciadas e identificadas (MURRAY et al., 2007). O crescimento ótimo desse gênero ocorre a uma temperatura de 35 a 37 °C. As espécies patogênicas são mais exigentes e crescem em meios enriquecidos, como o ágar chocolate e o ágar Thayer-Martin. A incubação em atmosfera úmida e com 5 a 10% de

CO<sub>2</sub> auxilia no cultivo das espécies de *Neisseria* (MURRAY et al., 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; WHO, 2013).

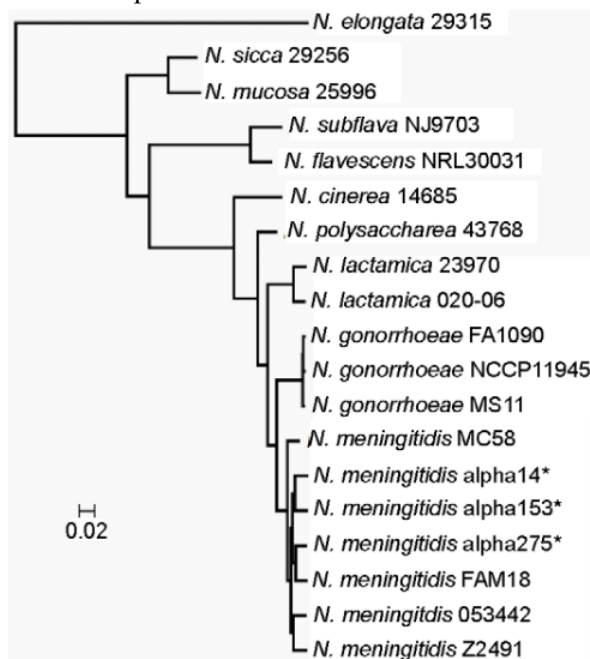
Além das duas espécies patogênicas, o gênero *Neisseria* inclui uma grande variedade de espécies comensais, sendo que pelo menos oito delas constituem uma porção substancial da microbiota nasal e da orofaringe em humanos (MARRI et al., 2010; QUILLIN; SEIFERT, 2018). Dentre as espécies comensais pode-se citar: *N. sicca*, *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. subflava*, *N. mucosa*, *N. polysaccharea* e *N. elongata*. Conforme ocorreu a descoberta de novas espécies, tornou-se evidente que o gênero *Neisseria* é muito mais abundante, difundido e diversificado do que se pensava. Enquanto algumas espécies, como por exemplo *N. gonorrhoeae*, possuem a forma de diplococos, outras espécies, como *N. bacilliformis* e *N. elongata* apresentam-se como bacilos gram-negativos, sendo um dos poucos gêneros bacterianos a apresentarem microrganismos com diferentes morfologias (LIU; TANG; EXLEY, 2015).

Diferentemente do gonococo, *N. elongata* é incomum entre as espécies do gênero por, além de ser um bacilo gram-negativo, geralmente apresentar prova de catalase negativa (GRANT et al., 1990). Sua identificação e classificação como nova espécie foi primeiramente proposta em 1970 por Bovre e Holten (BOVRE; HOLTEN, 1970). Essa espécie é imóvel, aeróbica, assacarolítica, oxidase positiva, ureia negativa e com crescimento ótimo à 35 °C. Até o momento foram descritas três subespécies: *N. elongata* subesp. *elongata*, *N. elongata* subesp. *glycolytica* e *N. elongata* subesp. *nitroreducens* (GRANT et al., 1990). A subespécie *nitroreducens* difere das outras subespécies por ser apta a reduzir nitrato (GRANT et al., 1990). *N. elongata* subesp. *glycolytica* difere das outras subespécies por ser catalase positiva (GRANT et al., 1990). Já a subespécie *elongata* difere das outras devido a incapacidade de produzir ácido a partir da D-glicose (HENRIKSEN; HOLTEN, 1976).

Dentre as espécies do gênero *Neisseria* que são descritas como comensais em humanos, *N. lactamica* é a espécie mais próxima das espécies patogênicas e *N. elongata* a mais distante filogeneticamente (Figura 1).



Figura 1. Relação filogenética entre espécies de *Neisseria* que colonizam/infectam humanos.



Método de Máxima Verossimilhança, utilizando a sequência de 896 genes encontrados em todas as espécies. Fonte: (MARRI et al., 2010).

### 2.1.1 Organização genômica

O gênero *Neisseria* tipicamente contém um cromossomo circular de aproximadamente 2,2 Mb. Entretanto, tanto *N. meningitidis* quanto *N. gonorrhoeae* são poliploides, contendo de dois a cinco equivalentes de genoma por célula cocoide, com duas cópias cromossômicas estimadas por unidade de célula cocoide (TOBIASON; SEIFERT, 2006). Apesar disso, esses organismos são considerados haploides e não podem ser portadores de dois alelos diferentes no mesmo *locus* genômico (TOBIASON; SEIFERT, 2010). Interessantemente, *N. lactamica* é monoploide (TOBIASON; SEIFERT, 2010), levando a possibilidade de que a poliploidia seja um traço de virulência, uma vez que a cópia extra de DNA poderia facilitar o processo de variação antigênica e outras trocas gênicas mediadas por recombinação (ROTMAN; SEIFERT, 2014).

*N. gonorrhoeae* também pode conter diferentes plasmídeos em seu genoma, sendo quatro deles mais frequentemente descritos: 1) plasmídeo críptico (~4,2 kb) encontrado na grande maioria dos isolados (KORCH et al., 1985); 2) um plasmídeo com nenhum marcador de resistência detectado (MAYER; HOLMES; FALKOW, 1974); 3) plasmídeo carreador do gene

produtor de  $\beta$ -lactamase (*bla*<sub>TEM</sub>) (ASHFORD; GOLASH; HEMMING, 1976); e 4) plasmídeo carreador do gene *tetM*, o qual confere resistência à tetraciclina (MORSE et al., 1986). Raros são os isolados que não possuem plasmídeos, como o caso da cepa de *N. gonorrhoeae* WHO F, cepa de referência da (OMS) (UNEMO et al., 2016).

#### 2.1.1.1 Elementos repetitivos

Uma das principais características do gênero *Neisseria* é a quantidade e variedade de sequências repetitivas de DNA presentes no seu genoma (MARRI et al., 2010). Centenas de cópias de elementos e sequências repetidas estão presentes no gênero desempenhando diferentes funções, como captura de DNA e sítios de integração de bacteriófagos (ROTMAN; SEIFERT, 2014).

O elemento repetitivo de maior abundância no genoma de *Neisseria* é uma sequência não palindrômica<sup>1</sup> de 10 pb (GCCGTCTGAA) denominada sequência de captação de DNA (DUS, do inglês *DNA uptake sequence*), a qual é essencial para transformação genética em *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* (GOODMAN; SCOCCAT, 1988). Existem aproximadamente 2000 dessas sequências nas espécies de *Neisseria*, o que corresponde a aproximadamente uma a cada 1000 pb, embora não necessariamente estejam espaçadas dessa maneira (MARRI et al., 2010). Em *N. gonorrhoeae*, 76% das DUS contêm dois nucleotídeos adicionais, que proporcionam um aumento na eficiência da transformação (AMBUR; FRYE; TØNJUM, 2007). Embora DUS não seja o alvo de um sistema de restrição conhecido, o gênero *Neisseria* mostra uma determinada seletividade na incorporação de DNA contendo essas sequências, uma vez que se observa um significativo aumento da transformação quando o DNA a ser transformado possui uma DUS (DUFFIN; SEIFERT, 2010; STEIN; GREGOIRE; PIEKAROWICZ, 1988). Dentre as espécies comensais, apenas *N. sicca* e *N. mucosa* possuem uma baixa quantidade da forma canônica de DUS. Apesar disso, elas possuem mais de 3400 cópias de uma variante (DUS1) com uma base de diferença (GTCGTCTGAA). Nas espécies patogênicas, essa pequena mudança diminui a taxa com que o DNA é transformado (GOODMAN; SCOCCAT, 1988; MARRI et al., 2010; QVARNSTROM; SWEDBERG, 2006; ROTMAN; SEIFERT, 2014). Apesar da captura de DNA exógeno na maioria das vezes trazer uma vantagem para a bactéria,

---

<sup>1</sup> Sequência que tem a propriedade de ser igual quando lida em ambas as direções (5'→3' ou 3'→5').

espécies comensais de *Neisseria* podem levar *N. gonorrhoeae* à morte quando o DNA contém um padrão de metilação que o gonococo não é capaz de reconhecer (KIM et al., 2019).

Uma sequência de 20 pb denominada sequência repetida duplicada (dRS3) é a segunda repetição mais encontrada, principalmente em *N. meningitidis* (~700 cópias) e *N. gonorrhoeae* (~200 cópias). Em *N. elongata*, essa sequência aparece aproximadamente 30 vezes no genoma. dRS3 parece atuar como sítio de integração a bacteriófagos (BENTLEY et al., 2007; MARRI et al., 2010; SNYDER; COLE; PALLEEN, 2009), regulação de genes (VÉLEZ ACEVEDO et al., 2014) e de sequências de variação em espécies de *Neisseria* patogênicas (BENTLEY et al., 2007; MARRI et al., 2010; SNYDER; COLE; PALLEEN, 2009). Espécies comensais possuem quantidades menores dessas sequências e, além disso, tais sequências não estão agrupadas em grandes conjuntos nas regiões intergênicas. Isso sugere que a expansão de dRS3 ocorreu mais recentemente nas espécies patogênicas (MARRI et al., 2010; ROTMAN; SEIFERT, 2014).

O elemento de Correia (CR, do inglês *Correia Repeat*), por sua vez, é uma sequência de 25 a 27 pb encontrada centenas de vezes no genoma de *Neisseria* (aproximadamente 250 e 100 cópias em *N. gonorrhoeae* e *N. elongata*, respectivamente) (MARRI et al., 2010). CRs geralmente flanqueiam uma região de 100 a 150 pb, funcionando como repetições invertidas terminais, sendo esse conjunto denominado de elemento Correia repetido fechado (CREE do inglês, *Correia repeat enclosed element*) (BUISINE; TANG; CHALMERS, 2002; CORREIA; INOUE; INOUE, 1988; LIN, Y. H.; RYAN; DAVIES, 2011). Assim como dRS3, CREE pode afetar a expressão gênica (atuando como promotor de alguns genes) ou até mesmo de forma pós transcricional, alterando o nível de tradução gênica (GREGORIO, DE et al., 2002; LIN, Y. H.; RYAN; DAVIES, 2011; MAZZONE et al., 2001; ROTMAN; SEIFERT, 2014).

#### 2.1.1.2 Mecanismos de variação antigênica

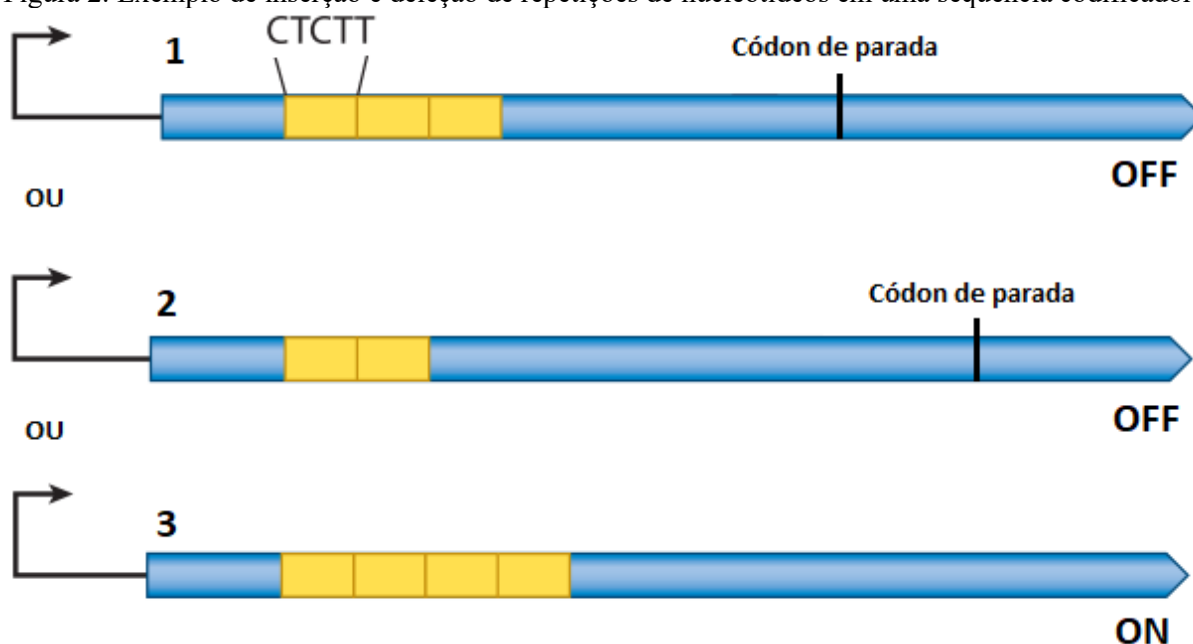
Variação antigênica é uma das estratégias mais efetivas utilizadas por patógenos para evadir o sistema imune do hospedeiro. A variabilidade de estruturas expostas na membrana permite o organismo ter uma subpopulação com tipos de divergência antigênica. Por alterar componentes da membrana externa, as espécies de *Neisseria* podem evitar seu reconhecimento pelo sistema imune, prolongando uma infecção e possibilitando uma reinfecção. Um dos principais tipos de variação antigênica observada nesse gênero é a variação de fase reversível de genes. A variabilidade do tipo IV de *pili* (Tfp), o antígeno lipooligossacarídeo (LOS) e

proteína de membrana externa (Opa) são as principais vantagens de *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, facilitando seu sucesso na patogênese (ROTMAN; SEIFERT, 2014).

#### 2.1.1.2.1 Variação de fase

A variação de fase, observada em alguns genes de espécies de *Neisseria*, é a mudança reversível entre os estados de expressão, geralmente uma mudança entre um estado expresso (ON) e não expresso (OFF) (MOXON; BAYLISS; HOOD, 2006). Em espécies de *Neisseria*, a maior parte da variação de fase é mediada por incorporação ou retirada de polinucleotídeos repetidos durante a replicação da bactéria (LEVINSON; GUTMAN, 1987). Se a repetição é incorporada na região da sequência codificadora (CDS, do inglês *Coding Sequence*), causa uma mudança na fase de leitura do gene, levando a mudança entre os estados ON e OFF (Figura 2) (ROTMAN; SEIFERT, 2014).

Figura 2. Exemplo de inserção e deleção de repetições de nucleotídeos em uma sequência codificadora.



A inserção ou deleção de sequência de nucleotídeos leva a mudança da fita de leitura do gene se o número de nucleotídeos não for múltiplo de três. Neste exemplo, a deleção de uma sequência de cinco nucleotídeos da sequência 1 leva à uma mudança de leitura (sequência 2), mas ainda contendo um códon de parada. Enquanto a inserção de uma sequência restaura a fita de leitura correta (sequência 3). A barra azul representa a região codificadora do gene. A flecha preta representa a região promotora. Retângulos amarelos representam a estrutura de repetição (cada retângulo representa uma sequência CTCTT). Barra preta representa um códon de parada (TAA, TAG ou TGA). Legenda: ON, expresso; OFF, não expresso. Fonte: adaptado de (ROTMAN; SEIFERT, 2014).

Muitos genes de proteínas de membrana externa das espécies patogênicas de *Neisseria* sofrem com alta frequência a variação de fase que resulta em uma recombinação de sequências repetidas na sequência codificadora. Mais do que 70% dos genes conhecidos ou com hipótese de sofrerem variação de fase nas espécies patogênicas estão presentes nas comensais. Entretanto, metade deles não possui repetições, indicando que a variação de fase, por meio de recombinação, ocorre com menor frequência entre as espécies comensais (MARRI et al., 2010).

### 2.1.2 Fatores de virulência

Por causa de sua importância na saúde pública, a pesquisa de isolados do gênero *Neisseria* tem seu foco voltado para as espécies patogênicas: *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, levando à identificação de muitos fatores de virulência que são importantes para a infecção em humanos. Até 2010, o conteúdo total de genes de virulência em espécies de *Neisseria* era desconhecido, pois um número limitado de genes ou apenas um genoma das espécies comensais foram estudados (*N. lactamica*) (MARRI et al., 2010; SNYDER; COLE; PALLEN, 2009; STABLER et al., 2005).

A grande diversidade de espécies comensais que habitam a mucosa humana, principalmente a região da orofaringe, aumenta a possibilidade de troca genética (KNAPP, 1988). A aquisição de novos traços genéticos pode auxiliar na aptidão do organismo e sua chance de sobrevivência na mudança de ambientes (HIGASHI et al., 2011). Essa transferência de material genético, por transdução e conjugação, é mediada por Tfp, que são estruturas de membrana externa formadas por um conjunto de proteínas que são cruciais para realizar, além de transferência de material genético, a aderência celular inicial e sinalização da célula hospedeira (MERZ; SO, 2000; QUILLIN; SEIFERT, 2018). Aproximadamente 20 genes que já foram descritos estão envolvidos na biogênese de Tfp, mas a presença de quatro é fundamental para a completa montagem dessa estrutura: *pilE*, o qual codifica pilina; *pilD*, que codifica prepilina peptidase; *pilF*, que codifica uma ATPase que faz uma montagem das pilinas em fibras de Tfp; e *pilQ*, que codifica subunidades que formam poros na membrana externa da bactéria, por meio dos quais ocorre o crescimento e extensão de Tfp (WOLFGANG et al., 2000). O sistema Tfp das espécies comensais difere das espécies patogênicas em alguns quesitos, como a presença de mais cópias de *pilS* (responsável por recombinação com *pilE* e consequente variação antigênica) e presença de *pilC1* e *pilC2* (que realizam uma adesão mais

forte na célula) nas espécies patogênicas (SCHEUERPFUG et al., 1999; WINTHER-LARSEN et al., 2001).

A aquisição de ferro do hospedeiro é outro importante fator de virulência atribuído às espécies patogênicas (PAYNE, 1993). As espécies comensais de *Neisseria* possuem um diverso arsenal de genes de aquisição de ferro. Algumas espécies possuem genes que fazem captação de ferro de transferrina e lactoferrina humanas (*tbpA/tbpB* e *lbpA/lbpB*, respectivamente). Em *N. gonorrhoeae* a expressão de TbpA é essencial para captação de ferro e, embora a expressão de TbpB não seja essencial, sua presença faz com que esse processo de captação seja mais eficiente (ANDERSON; SPARLING; CORNELISSEN, 1994; CORNELISSEN et al., 1992; VÉLEZ ACEVEDO et al., 2014). Algumas espécies comensais também possuem os genes *hmbR* e *hpuAB*, os quais são necessários para captação de ferro da hemoglobina, sendo que em *N. meningitidis*, *hmbR* auxilia na sua replicação na corrente sanguínea (MARRI et al., 2010; PERKINS-BALDING; RATLIFF-GRIFFIN; STOJILJKOVIC, 2004).

A formação de cápsula também está associada com virulência em diversos patógenos humanos, incluindo *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* e *Klebsiella pneumoniae* (BENNETT et al., 2014; BENTLEY et al., 2007; CLEMENCE; MAIDEN; HARRISON, 2018). Vacinas bem-sucedidas já foram desenvolvidas para atuar em antígenos capsulares de alguns sorogrupos de *N. meningitidis* (MARRI et al., 2010). Cápsulas podem auxiliar na evasão do sistema imune, incluindo sistema complemento e fagocitose por macrófagos, facilitando a persistência do patógeno na circulação sanguínea (BENNETT et al., 2014). Genes para biossíntese de cápsula parecem ser únicos de *N. meningitidis*. Apesar de algumas bactérias comensais possuírem os *loci ctrABCDE* e *lipAB*, os quais codificam transportadores de polissacarídeos, a presença do *locus siaABC* é necessária para geração de cápsula (MARRI et al., 2010).

## 2.2 *Neisseria gonorrhoeae*

### 2.2.1 Patogênese e resposta inflamatória por *Neisseria gonorrhoeae*

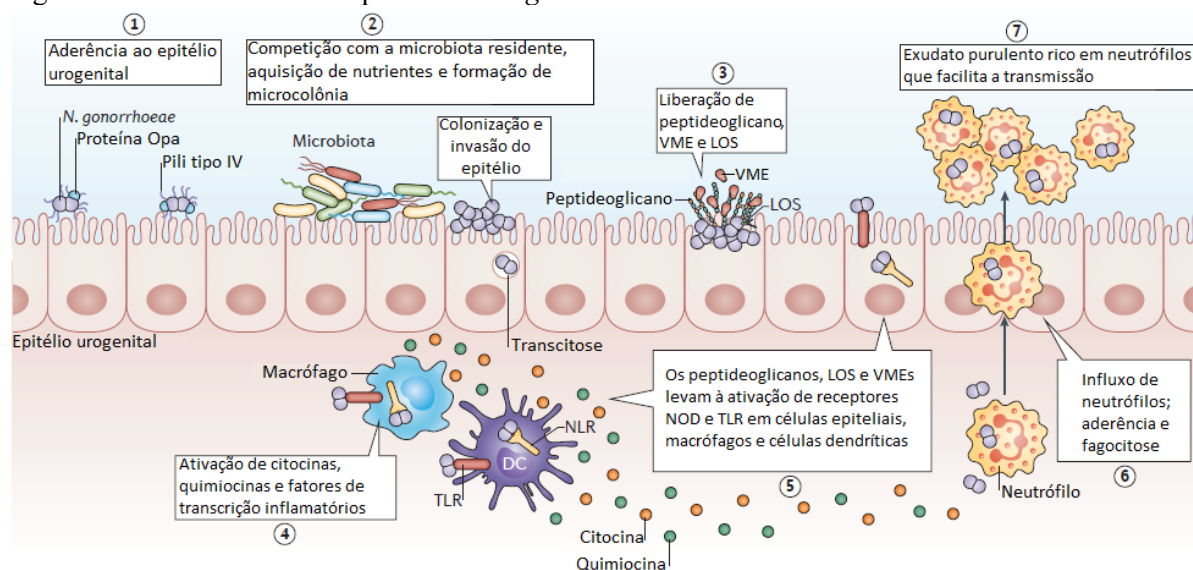
*N. gonorrhoeae* é primariamente um microrganismo colonizador de mucosas, fazendo adesão a diversas superfícies epiteliais. O evento inicial para estabelecimento da infecção e a primeira etapa da patogênese é a sua aderência ao epitélio da mucosa, a qual é mediada por diferentes estruturas da superfície do gonococo, sendo as principais Tfp, Opa, LOS e a proteína

de membrana externa (porina) PorB. Durante o primeiro estágio da infecção, a adesão do gonococo e sua subsequente colonização depende basicamente de Tfp (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Esse tipo de fímbria pertence a uma família de adesinas encontradas em diversas espécies bacterianas. No gonococo, Tfp é composta principalmente pela proteína PilE e, em sua extremidade, apresenta a proteína PilC, a qual é responsável pela ligação ao receptor celular (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; VIRJI, 2009). O canal por meio do qual *pilus* é estendida ou retraída através da membrana externa é a proteína PilQ (WOLFGANG et al., 2000). A aderência à superfície epitelial e subsequente retração de Tfp faz com que o gonococo fique próximo ao epitélio (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Após essa adesão inicial, ocorre uma aderência mais forte da bactéria ao epitélio mediada pelas proteínas Opa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; VIRJI, 2009).

A interação entre Opa e os receptores da molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário são importantes para a aderência do gonococo no epitélio. Opa são proteínas de membrana externa abundantes que medeiam a aderência após o contato inicial de Tfp ao epitélio. Tfp e proteínas Opa são expressos durante a infecção em homens e mulheres e são considerados essenciais para a colonização da mucosa epitelial do trato genital e outros sítios de infecção (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

O segundo estágio consiste na penetração da bactéria na célula epitelial por meio de um mecanismo conhecido como endocitose direcionada pelo patógeno, processo mediado pela porina PorB. Este é o canal de transporte de nutrientes mais abundante do gonococo (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Essa porina é responsável pela formação de pseudópodes e, quando na célula do hospedeiro, desencadeia uma série de sinais para iniciar a endocitose direcionada. Após esse processo, o vacúolo contendo o gonococo é transportado para a região basal da célula e liberado por transcitose. Uma vez no tecido subepitelial, a bactéria continua sua proliferação. Embora diversos e diferentes mecanismos moleculares estejam envolvidos durante o estabelecimento da bactéria na mucosa superficial de homens e mulheres, a infecção frequentemente culmina para um processo infeccioso com influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN); os gonococos capturados pelos PMN são secretados no lúmen e podem assim serem transmitidos ao parceiro (Figura 3) (QUILLIN; SEIFERT, 2018; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Figura 3. Processo infeccioso por *Neisseria gonorrhoeae*.



No início da infecção, o gonococo se adere à célula epitelial por meio de *pili* do tipo IV (1), a qual sofre retração e permite uma interação mais próxima entre a bactéria e o tecido humano. Após a adesão inicial, o gonococo sofre replicação, forma colônias e possivelmente biofilme e compete com outras bactérias por nutrientes (2). Quando consegue colonizar o epitélio, o gonococo é capaz de invadir e realizar transcitose. Durante o estágio inicial, o gonococo libera peptidoglicano, LOS e vesículas de membrana externa (3), que ativam o receptor do tipo Toll e receptores contendo domínio de oligomerização em células epiteliais, macrófagos e células dendríticas (5), levando a ativação de fatores de transcrição inflamatórios e liberação de citocinas e quimiocinas (4). Isso recruta um grande número de leucócitos polimorfonucleares para o sítio da infecção (6), onde eles interagem e fagocitam o gonococo. O influxo de neutrófilos forma um exsudato purulento que facilita a transmissão (7). Fonte: adaptado de (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

### 2.2.2 Dados epidemiológicos de *N. gonorrhoeae*

A gonorreia é a segunda IST mais comum e a principal causa de morbidade entre indivíduos sexualmente ativos no mundo (GHANEM, 2015; ROWLEY et al., 2019). Suas reais prevalência e incidência são difíceis de estabelecer, uma vez que ocorre subnotificação dos casos por falta de capacidade diagnóstica e sistemas de notificação. Segundo dados da OMS, estimou-se que em 2012, 78 milhões de novos casos ocorreram em adolescentes e adultos entre 15 e 49 anos em todo o mundo, com uma incidência global de 19 casos para 1000 mulheres e 24 casos para 1000 homens. A prevalência estimada de 27 milhões de casos no mesmo ano revela uma prevalência de gonorreia de 0,8% entre mulheres e 0,6% entre homens, sendo que algumas regiões apresentaram uma prevalência mais alta, como é o caso do Sul e Leste da Ásia (11,4 milhões de casos) e regiões do Pacífico Ocidental (35,2 milhões de casos) (CDC, 2015; MURRAY et al., 2007; NEWMAN et al., 2015; WHO, 2016).



No Brasil, os dados sobre a infecção por *N. gonorrhoeae* provêm de estudos em regiões específicas e em populações diversas. Dessa forma, a taxa de infecção varia muito, chegando até 18,4% em um estudo de homens que procuraram atendimento em clínicas de IST em 2010 (BARBOSA et al., 2010; BRASIL, 2015). Em gestantes e parturientes, essa taxa variou de 1,0 a 1,5% (JALIL et al., 2008; MARTINS et al., 2004). Entre usuários de clínicas para tratamento familiar, a taxa foi de 0,5% em um estudo de 2002 na cidade de Salvador (CODES et al., 2002) e chegou a 3,0% em um estudo de 2010 em Campinas, São Paulo (FERNANDES et al., 2009). Um estudo conduzido por Codes e colaboradores (2006) revelou uma maior taxa de infecções gonocócicas entre indivíduos moradores de favela (3,2% em mulheres e 2,2% em homens) quando comparados a indivíduos frequentadores de escola secundária (0,8% em mulheres e 1,0% em homens) (CODES et al., 2006). Dois estudos publicados no ano de 2010 observaram as infecções gonocócicas em indivíduos que procuraram atendimento em clínicas de IST. Um deles encontrou uma taxa de 7,1% em mulheres na cidade de Manaus (BENZAKEN et al., 2010). Já o outro estudo, que coletou amostras de seis cidades brasileiras localizadas nas mais diversas regiões, encontrou uma taxa de 18,4% em homens (BARBOSA et al., 2010). A organização do Sistema Único de Saúde no Brasil é dividida em três esferas (nacional, estadual e municipal). Muitos municípios brasileiros têm gestão plena e os atendimentos das IST estão espalhados por todas as unidades básicas de saúde. Este fato, aliado a abordagem sindrômica e a não obrigatoriedade de notificação, resulta em ausência de dados epidemiológicos no Brasil, restando apenas dados de estudos pontuais.

A manutenção e transmissão da gonorreia podem ser atribuídas a um conjunto de indivíduos transmissores principais, os quais têm relações sexuais desprotegidas com múltiplos e novos parceiros e, ou são assintomáticos, ou preferem ignorar os sintomas (SPAARGAREN et al., 2001). Tanto os fatores sociais de risco (por exemplo, baixo padrão socioeconômico, residência urbana, acesso precário ao sistema de saúde e prostituição) quanto os fatores ambientais de risco (relações sexuais desprotegidas, múltiplos parceiros, parceiros de alto risco e uso de drogas) têm sido identificados como alvos por programas de controle de ISTs. O risco para adquirir gonorreia é multifatorial e está relacionado ao número e sítios de exposição. Para homens heterossexuais o risco de aquisição de infecção uretral por meio de uma mulher infectada é de 20% para uma única exposição e acima de 80% para quatro exposições. Devido a questões anatômicas, esse risco de infecção sobe para 50% a 70% para mulheres em uma única exposição a um homem infectado (GOLUB et al., 1998; MURRAY et al., 2007).

### 2.2.3 Manifestações clínicas da infecção por *Neisseria gonorrhoeae*

*N. gonorrhoeae*, independente do sítio de isolamento no ser humano, é sempre considerada patogênica, podendo causar infecção na mucosa genital, anal e orofaringe e, com menos frequência, na conjuntiva de recém-nascidos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Infecções anal e de orofaringe, as quais são na maioria das vezes assintomáticas, são principalmente identificadas em homens que fazem sexo com homens. Entretanto, dependendo da prática sexual, podem ser encontradas em ambos os sexos. A conjuntivite por *N. gonorrhoeae* pode ocorrer em adultos, mas ocorre de forma mais comum em recém-nascidos, e pode levar à cegueira. A infecção gonocócica disseminada pode ocorrer em ambos os sexos, embora tenha sido raramente relatada (UNEMO; SHAFER, 2014).

A gonorreia é classificada como uma IST cujo agente etiológico é a *N. gonorrhoeae*, bactéria que infecta apenas humanos na natureza, ocasionando uretrite em homens e cervicite em mulheres. Uma minoria de homens, mas uma grande quantidade de mulheres pode ter infecções urogenitais assintomáticas. Se as infecções urogenitais permanecerem não tratadas ou se forem tratadas de forma inadequada, a bactéria pode ascender o trato genital e resultar em muitas complicações, especialmente em mulheres. Dentre as complicações que podem ocorrer, destacam-se a endometrite, doença inflamatória pélvica, edema no pênis e epididimite. Essas complicações tornam-se um grave problema uma vez que podem resultar em infertilidade e gravidez ectópica. A falha na contenção da disseminação da gonorreia também pode promover a transmissão de outras ISTs, o que inclui a infecção pelo HIV (MURRAY et al., 2007; UNEMO; SHAFER, 2014).

O colo uterino, mais especificamente na endocérvice, é o sítio de infecção por *N. gonorrhoeae* mais comum na mulher. Apesar disso, a maioria das mulheres (70 a 80% dos casos) com cervicite é assintomática (BRASIL, 2015; PENNA; ABRAHÃO; MAGALHÃES, 2000). O período de incubação varia mais e é menos definido do que nos homens, mas na maioria das mulheres inicia-se com aproximadamente 10 dias de exposição (PENNA; ABRAHÃO; MAGALHÃES, 2000; PLATT; RICE; MCCORMACK, 1983). Os sintomas mais comuns são o corrimento vaginal, disúria e sangramento intermenstrual (PENNA; ABRAHÃO; MAGALHÃES, 2000). De maneira importante, os sinais e sintomas da infecção cervical por gonococo, quando presentes, são indistinguíveis daqueles observados em cervicite aguda por outras causas (GHANEM, 2015). A ausência de sintomas na maioria das mulheres resulta em infecções não reconhecidas e conseqüentemente não tratadas. Frequentemente essas infecções

têm uma resolução espontânea, mas podem levar a complicações sérias, como a doença inflamatória pélvica (DIP) (WHO, 2016). Considerada como a principal causa de problemas reprodutivos na mulher, 10 a 20% das mulheres com gonorreia evoluem para a DIP, a qual abrange variadas manifestações como endometrite, salpingite e peritonite pélvica (MILLER, 2006; SIMMS et al., 2006). Essas manifestações podem causar infertilidade em 15% das pacientes, sendo que aproximadamente 50% das pacientes que apresentam três ou mais episódios de infecção desenvolvem infertilidade (CDC, 2002; MILLER, 2006).

Em indivíduos do gênero masculino, uretrite com disúria e corrimento uretral são as principais manifestações clínicas não complicadas e podem ser assintomáticas em menos de 10% dos casos. Quando a sintomatologia está presente, observa-se corrimento em mais de 80% e disúria em mais de 50% dos casos. O período de incubação tem uma média de dois a sete dias (BRASIL, 2015; MICHAUD; PLATZ; GIOVANNUCCI, 2007; MURRAY et al., 2007). Após esse período, 95% a 99% dos homens infectados evidenciam um corrimento uretral purulento. Se não tratada, a maior parte dos casos de gonorreia possui resolução espontânea. As complicações da gonorreia no homem são incomuns e incluem a epididimite, linfangite peniana, prostatite aguda, abscesso periuretral, vesiculite seminal e estenose uretral, e ocorrem pela disseminação da infecção a partir do sítio inicial (BRASIL, 2006; 2015; PENNA; ABRAHÃO; MAGALHÃES, 2000).

#### **2.2.4 Diagnóstico de infecção por *Neisseria gonorrhoeae***

O diagnóstico de infecção por *N. gonorrhoeae* é determinado pela pesquisa do agente etiológico ou do seu material genético em amostras da região genital ou extragenital pelos seguintes métodos: microscopia, cultura ou testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT, do inglês *Nucleic Acid Amplification Test*). A coleta das amostras para o diagnóstico de infecção por gonococo depende do gênero e da prática sexual do paciente e da apresentação clínica. Em todos os casos, amostras do sítio genital devem ser coletadas. Se o paciente tem histórico de contato sexual orogenital e/ou anogenital, a coleta de amostras desses sítios também deve ser realizada. A recuperação máxima do gonococo é obtida quando as amostras são semeadas diretamente em meio de cultura apropriado (como ágar chocolate e Thayer-Martin) logo após a coleta. Por essa prática não ser sempre possível, é indispensável a utilização de meios de transporte capazes de manter a viabilidade do gonococo até que a amostra chegue ao laboratório (MURRAY; BARON, 2007).

#### 2.2.4.1 Microscopia

O gonococo possui uma medida de 0,6 µm por 1,0 µm e pode ser identificado como diplococo intracelular em leucócitos PMN por microscopia (aumento de 1.000x) em coloração de Gram ou com azul de metileno. Essa metodologia é barata, fornece resultados rápidos e tem alta sensibilidade (90 a 95%) e especificidade (95 a 100%) para o diagnóstico de homens sintomáticos com corrimento uretral (MURRAY; BARON, 2007; UNEMO; SHAFER, 2014). Para mulheres, a coloração de Gram de amostras coletadas da endocérvice pode ser útil ao diagnóstico. No entanto, a microscopia não é recomendada como único método para diagnóstico de amostras cervical, da faringe ou retal ou ainda para pacientes assintomáticos, por causa da baixa sensibilidade<sup>2</sup> e baixa especificidade<sup>3</sup> (MURRAY; BARON, 2007). Além disso, o desempenho da técnica depende altamente da experiência do microscopista (UNEMO; SHAFER, 2014).

#### 2.2.4.2 Cultura

Por muitas décadas, a cultura de *N. gonorrhoeae* foi considerada o padrão áureo para o diagnóstico de gonorreia genital e extragenital. É uma técnica sensível e altamente específica em circunstâncias otimizadas, relativamente barata quando comparada à NAAT, e de forma importante permite a realização de testes de sensibilidade antimicrobiana. A confiabilidade de uma cultura para o diagnóstico de gonorreia está condicionada a alguns fatores: técnica utilizada e *swabs* utilizados para coleta de amostras, condições e duração do transporte ao laboratório, composição e qualidade do meio de cultura, condições de inoculação e incubação, entre outros. A prevalência de isolados sensíveis a concentrações de antimicrobianos geralmente utilizados em meios de cultura seletivos é negligenciada na maioria dos países. Por isso, protocolos indicam a utilização de um meio de cultura nutritivo seletivo como Thayer-Martin, meio Thayer-Martin modificado ou ágar New York City associado, se possível, a um meio de cultura nutritivo não seletivo, como o ágar chocolate (BIGNELL; UNEMO, 2013; WHO, 2013).

O gonococo pode produzir diferentes morfologias coloniais, que estão relacionadas à formação de *pili*. As colônias típicas tendem a ser pequenas, brilhantes e elevadas (MURRAY; BARON, 2007). Uma identificação presuntiva pode ser feita por meio da aparência das colônias

---

<sup>2</sup> Nesses tipos de amostras, a sensibilidade da coloração de Gram diminui para 50 a 70%.

<sup>3</sup> Nesses sítios anatômicos é comum a colonização por espécies comensais.

na placa de meio de cultura, por coloração de Gram de colônias suspeitas e pela prova da oxidase. A produção da oxidase associada a colônias com morfologia típica oferece uma identificação suficiente e confiável de *N. gonorrhoeae* para um diagnóstico presuntivo e altamente preditivo para pacientes de alto risco, com exceção das amostras de orofaringe. Novamente, nos locais onde os recursos são limitados, isso é suficiente para o início do tratamento (WHO, 2013).

#### 2.2.4.3 Testes de identificação confirmatória

*N. gonorrhoeae* pode ser diferenciada de outras espécies de *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella* e outras espécies comensais com base na produção de ácido a partir de carboidratos, como glicose, maltose, lactose, sacarose e frutose, redução de nitrato e superóxido (teste de catalase). Para este fim, diversos testes rápidos e sistemas automatizados podem ser utilizados em laboratório para identificação da espécie a partir da bactéria em cultura (MURRAY; BARON, 2007).

Sua identificação confirmatória também tem sido realizada por meio de análise proteômica, com a utilização de espectrometria de massa. O sistema de ionização/dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo ou MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*), é um método com uma boa acurácia para identificação bacteriana e tem sido utilizado em rotina laboratorial. Somente uma colônia é necessária para introdução em uma matriz polimérica, seguida de irradiação por laser, fazendo com que a amostra sofra uma vaporização e ionização de proteínas. Essas moléculas são aspiradas e direcionadas para um detector, o qual gera um espectro de acordo com o tempo de chegada de cada molécula. Esse sistema faz a identificação comparando o espectro gerado com uma base de dados do próprio sistema (BUCHANAN et al., 2016).

#### 2.2.4.4 Testes de amplificação de ácidos nucleicos

Os NAATs são projetados para amplificar sequências específicas de ácido nucleico (DNA ou RNA) de *N. gonorrhoeae* de um determinado gene ou conjunto de genes alvo utilizando técnicas como reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), amplificação mediada por transcrição ou amplificação por deslocamento de cadeia (GHANEM, 2015; MURRAY; BARON, 2007). Essa metodologia tem substituído de uma

forma rápida a utilização da cultura em laboratórios com mais recursos e infraestrutura por possuírem algumas vantagens: detecção de gonococos não viáveis; resultados rápidos; sensibilidade superior aos outros métodos, principalmente em amostras de orofaringe e retal; ser menos exigente quanto a coleta<sup>4</sup>, transporte e armazenamento (GHANEM, 2015; UNEMO; SHAFER, 2014). A principal desvantagem desse método é que não permite a determinação da sensibilidade antimicrobiana, a qual é primordial em casos não responsivos ao tratamento ou que se suspeita de resistência antimicrobiana (GHANEM, 2015). Além disso, os testes disponíveis comercialmente e os testes *in house* mostram diferentes sensibilidades e especificidades (UNEMO; SHAFER, 2014). Por esse motivo, a recomendação da OMS é a utilização de dois alvos para detecção por NAAT a fim de evitar resultados falso-positivos (WHO, 2013).

#### 2.2.4.5 Detecção de resistência antimicrobiana em *Neisseria gonorrhoeae*

O padrão ouro para detecção da concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) é o método de ágar-diluição. Apesar disso, esse método é trabalhoso e não é ideal para a rotina, principalmente para testagem de poucos isolados. Para isso, o método quantitativo fita de gradiente de concentração ou E-test® (do inglês, *Epsilometer test*), o qual é comparável com o método de ágar-diluição, pode ser utilizado para determinação da MIC. De outra forma, uma determinação qualitativa da resistência antimicrobiana pode ser obtida por meio de disco-difusão, mas essa determinação só é recomendada nos casos em que a MIC não pode ser determinada, seja por falta de recursos ou outras razões (UNEMO; SHAFER, 2014; WHO, 2013).

#### 2.2.5 Tratamento de infecções por *Neisseria gonorrhoeae*

*N. gonorrhoeae* tem apresentado ao longo dos anos uma rápida mudança nos padrões de sensibilidade aos antimicrobianos, dificultando a escolha terapêutica. Desde a publicação da OMS em 2003 sobre a conduta para o tratamento de ISTs, mudanças na epidemiologia e avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento exigiram alterações no manejo dessas infecções. Altos níveis de resistência às quinolonas e diminuição de sensibilidade/resistência às

---

<sup>4</sup> Utilização de coleta não invasiva e autocoleta (como urina em homens e *swab* vaginal em mulheres).

cefalosporinas de espectro estendido (ESC) começaram a ser observados em diversos países. Dessa forma, foi evidenciada uma necessidade urgente em atualizar as recomendações de tratamento para infecções gonocócicas para se adequar às mudanças nos padrões da resistência aos antimicrobianos (WHO, 2016).

Em 2016 a OMS publicou protocolos para o tratamento das infecções gonocócicas, com orientações baseadas em evidências, para auxiliar no desenvolvimento local de protocolos de tratamento, conforme a realidade de cada país. Esses protocolos oferecem seis opções de tratamento para infecções específicas causadas por *N. gonorrhoeae*. As recomendações estão descritas no Quadro 1, e são aplicadas a adultos e adolescentes (10 a 19 anos), incluindo pessoas com HIV e populações específicas, incluindo profissionais do sexo, homens que fazem sexo com homens, pessoas transgênero e mulheres grávidas. Recomendações específicas também estão disponíveis para profilaxia e tratamento de oftalmia neonatal causada pelo gonococo.

Quadro 1. Resumo das recomendações para tratamento das infecções gonocócicas segundo a Organização Mundial da Saúde.

<b>RECOMENDAÇÕES</b>
<b>Infecções gonocócicas genitais e anorretais</b>
<p><b>Recomendação 1</b> Terapia dupla: 1) Ceftriaxona 250 mg, IM, dose única E azitromicina 1 g oral dose única; 2) Cefixima 400 mg, VO, dose única E azitromicina 1 g oral dose única; Terapia simples (com base em recentes dados de resistência local confirmando sensibilidade ao antimicrobiano): 1) Ceftriaxona 250 mg, IM, dose única; 2) Cefixima 400 mg, VO, dose única; 3) Estreptomicina 2 g, IM, dose única.</p>
<b>Infecções gonocócicas de orofaringe</b>
<p><b>Recomendação 2</b> Terapia dupla: 1) Ceftriaxona 250 mg, IM, dose única E azitromicina 1 g oral dose única; 2) Cefixima 400 mg, VO, dose única E azitromicina 1 g oral dose única; Terapia simples (com base em recentes dados de resistência local confirmando sensibilidade ao antimicrobiano): 1) Ceftriaxona 250 mg, IM, dose única;</p> <p><i>Observação:</i> em adultos e adolescentes com infecção gonocócica de orofaringe sugere-se terapia dupla</p>
<b>Retratamento de infecção gonocócica após falha no tratamento</b>
<p><b>Recomendação 3</b> Se suspeita de reinfecção: tratar novamente com as recomendações preconizadas e reforçar recomendação de abstinência sexual ou uso de camisinha e fornecer tratamento ao parceiro; Se falha após tratamento não recomendado pela OMS: tratar novamente com regime recomendado; Se ocorrer falha e o local possuir dados de resistência: tratar novamente de acordo com a sensibilidade; Se falha após tratamento recomendado com terapia simples: tratar novamente com terapia dupla; Se falha após tratamento recomendado com terapia dupla: tratar novamente com uma das seguintes terapias duplas: 1) Ceftriaxona 500 mg, IM, dose única E azitromicina 2 g oral dose única;</p>

<p>2) Cefixima 800 mg, VO, dose única E azitromicina 2 g oral dose única;  3) Gentamicina 240 mg, IM, dose única E azitromicina 2 g oral dose única;  4) Espectinomicina 2 g, IM, dose única* E azitromicina 2 g oral dose única.</p> <p>*Caso não for infecção de orofaringe.</p>
<p><b>Oftalmia gonocócica em neonatos</b></p>
<p><b>Recomendação 4</b></p> <p>1) Ceftriaxona 50 mg/kg (máximo 150 mg), IM, dose única;  2) Canamicina 25 mg/kg (máximo 75 mg), IM, dose única;  3) Espectinomicina 25 mg/kg (máximo 75 mg), IM, dose única</p>
<p><b>Recomendação 5</b></p> <p>Para todos os neonatos recomenda-se profilaxia ocular tópica para prevenção de oftalmia gonocócica e por <i>C. trachomatis</i>. Sugere-se uma das seguintes opções para aplicação nos dois olhos logo após o nascimento:</p> <p>1) Cloridrato de tetraciclina 1% (pomada oftálmica);  2) Eritromicina 1% (pomada oftálmica);  3) Iodo povidine 2,5% (solução aquosa);  1) Solução de nitrato de prata 1%;  2) Cloranfenicol 1% (pomada oftálmica).</p>

Legenda: IM: intramuscular; VO: via oral. Fonte: adaptado de (WHO, 2016).

Em 2020, foram publicadas atualizações na diretriz europeia para o diagnóstico e tratamento da gonorreia em adultos. As atualizações e recomendações enfatizam o aumento significativo da incidência de gonorreia e recomendam a utilização de dupla terapia antimicrobiana com ceftriaxona 1 g intramuscular em dose única com azitromicina 2 g oral em dose única para casos de infecções gonocócicas não complicadas quando a sensibilidade aos antimicrobianos são desconhecidas. Para os casos em que a administração intramuscular é contraindicada ou recusada pelo paciente, recomenda-se a utilização de cefixima 400 mg oral em dose única mais azitromicina 2 g oral em dose única (UNEMO et al., 2020).

No Brasil, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis, lançado em 2015 e atualizado em 2020 pelo Ministério da Saúde, faz as seguintes recomendações para tratamento das infecções por *N. gonorrhoeae* (Quadro 2):

Quadro 2. Resumo das recomendações para tratamento das infecções gonocócicas segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde.

<b>Tipo de infecção</b>	<b>Tratamento recomendado</b>
Uretrite sem identificação do agente etiológico	1) Ceftriaxona 500 mg, IM, dose única E azitromicina 500 mg, 2 comprimidos, VO, dose única. 2) Ceftriaxona 500 mg, IM, dose única E doxiciclina 100 mg, 1 comprimido, VO, 2x / dia, por 7 dias.
Uretrite gonocócica e demais infecções gonocócicas NÃO	1) Ceftriaxona 500 mg, IM, dose única E azitromicina 500 mg, VO, dose única.



complicadas (uretra, colo do útero, reto e faringe)	
Uretrite não gonocócica	1) Azitromicina 500 mg, 2 comprimidos, VO, dose única. 2) Doxiciclina 100 mg, 1 comprimido, VO, 2x / dia, por 7 dias.
Retratamento de infecções gonocócicas	1) Ceftriaxona 500 mg, IM, dose única E azitromicina 500 mg, 4 comprimidos, VO, dose única. 2) Gentamicina 240 mg, IM E azitromicina 500 mg, 4 comprimidos, VO, dose única.
Infecção gonocócica disseminada (exceto meningite e endocardite)	1) Ceftriaxona 1 g, IM ou IV, completando ao menos 7 dias de tratamento E azitromicina 500 mg, 2 comprimidos, VO, dose única.
Conjuntivite gonocócica no adulto	1) Ceftriaxona 1 g, IM, dose única.

Legenda: IM: intramuscular; VO: via oral; IV: intravenoso. Fonte: adaptado de (BRASIL, 2020).

O manejo sindrômico, isto é, com base em sinais e sintomas das ISTs, tem sido implementado desde 1993 no Brasil (MOHERDAUI et al., 1998). Isso resulta em uma falta de diagnóstico laboratorial, incluindo cultura do gonococo e testes de sensibilidade (BAZZO et al., 2018; GOLPARIAN et al., 2020). Consequentemente, antes da implantação do Programa de Vigilância Antimicrobiana do Gonococo no Brasil (BAZZO et al., 2018; GOLPARIAN et al., 2020), a publicação de dados de resistência do gonococo aos antimicrobianos era muito escassa. Até 2017, a primeira opção para o tratamento de uretrites gonocócicas não complicadas era o uso de ciprofloxacino 500 mg mais azitromicina 1 g, menos para os estados de Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo. Com base em estudos nesses locais, o uso de ciprofloxacino foi contraindicado por causa da circulação de isolados de gonococo com taxas de resistência antimicrobiana igual ou maior que 5% (BELDA JUNIOR et al., 2007; COSTA BEDESCHI et al., 2013; UEHARA et al., 2011). Em 2018 foram publicados os resultados do primeiro estudo de vigilância da sensibilidade de *N. gonorrhoeae* no Brasil. Esses resultados mostraram uma alta porcentagem de resistência ao ciprofloxacino (55,6%), até então recomendado para tratamento de infecções gonocócicas nos outros Estados (BAZZO et al., 2018). Esses dados levaram à publicação de uma nota informativa Nº 6-sei/2017-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS em 2017 pelo Ministério da Saúde, atualizando a recomendação nacional do tratamento preferencial da infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo de útero e reto) (BRASIL, 2017).

[...] Diante do exposto, e considerando a portaria número - 1.897, de 26 de julho de 2017, que estabelece a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - Renome 2017, o esquema terapêutico

preferencial, preconizado para a infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto) em todo o país, passa a ser constituído pela terapia dupla de ceftriaxona 500 mg intramuscular (IM) associada à azitromicina 1 g (VO) em dose única [...] (BRASIL, 2017).

### **2.2.6 Resistência aos antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae***

Na ausência de vacina contra o gonococo, o principal foco do controle da gonorreia permanece inteiramente na prevenção, notificação do contato sexual, vigilância epidemiológica, diagnóstico e particularmente na disponibilidade de tratamento antimicrobiano efetivo. Desde a introdução das sulfonamidas para tratamento da gonorreia (meados dos anos 1930), *N. gonorrhoeae* tem demonstrado uma excelente capacidade de adquirir e desenvolver resistência aos antimicrobianos introduzidos no tratamento. Atualmente, a prevalência de isolados com resistência à maioria dos antimicrobianos, previamente e/ou ainda recomendados em alguns países para o tratamento de infecções gonocócicas (como sulfonamidas, penicilinas, tetraciclina, macrolídeos e fluoroquinolonas), é alta em várias regiões do mundo (UNEMO; RIO; SHAFER, 2016).

Durante as décadas de 1990 e 2000 isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes às ESCs (ceftriaxona e cefixima), descritos inicialmente no Japão, têm se disseminado pelo mundo. O aumento na resistência às ESC tem sido associado ao uso em diferentes regimes de doses e em monoterapia (AKASAKA et al., 2001; CHISHOLM et al., 2010; DEGUCHI et al., 2003; TANAKA, M. et al., 2002; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; SHAFER, 2014). No Japão, a ceftriaxona não era aprovada para o tratamento de gonorreia entre 1999 e começo dos anos 2000. Consequentemente, muitas cefalosporinas de uso oral e com diferentes dosagens foram prescritas para uso como monoterapia (AKASAKA et al., 2001; TANAKA et al., 2002; UNEMO; SHAFER, 2014). Além disso, quando o tratamento com dose única de cefixima foi utilizado, era comum incluir apenas 300 mg de cefixima, diferente da recomendação internacional de 400 mg (TAKAHASHI et al., 2013; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; SHAFER, 2014). Em 1995 foi isolado o primeiro caso de resistência à cefixima na cidade de Fukuoka, Japão (SHIMUTA et al., 2015). De 1999 a 2003, 12 casos de falha no tratamento com cefixima foram registrados no Japão e, em 2006, o uso de cefixima para o tratamento de gonorreia não complicada foi suspenso. Ceftriaxona (1 g IV), cefodizima (1 g IV) e

espectinomomicina (2 g IM) foram recomendados como primeira linha do tratamento empírico para infecções anogenitais não complicadas (DEGUCHI et al., 2003; YOKOI et al., 2007).

Durante o início da década de 2010, observou-se um aumento mundial na descrição de isolados de *N. gonorrhoeae* com diminuição de sensibilidade/resistência às ESC (BALA et al., 2013; HESS et al., 2012; KIRKCALDY et al., 2013; LAHRA; LO; WHILEY, 2013; NDOWA et al., 2013; SPITERI et al., 2013; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; SHAFER, 2011; 2014). Falhas no tratamento com cefixima foram confirmadas no Japão, Canadá, África do Sul e em diversos países europeus, e raras falhas no tratamento com ceftriaxona (apenas em *N. gonorrhoeae* de orofaringe) foram identificadas no Japão, alguns países da Europa e Austrália (UNEMO, 2015; UNEMO; RIO; SHAFER, 2016). Os primeiros isolados extensivamente resistentes (XDR<sup>5</sup>, do inglês *Extensively Drug-Resistant*), exibindo altos níveis de resistência às ESC em combinação com resistência à quase todos os outros antimicrobianos disponíveis para o tratamento, foram identificados no Japão (OHNISHI et al., 2011), na França (UNEMO et al., 2012), na Espanha (CÁMARA et al., 2012) e mais recentemente na Inglaterra (ENGLAND, 2018). A maior parte desses foram isolados em populações de alto risco, como trabalhadores do sexo ou homens que fazem sexo com homens.

#### 2.2.6.1 Resistência à tetraciclina

A tetraciclina atua inibindo a ligação do tRNA aminoacil ao complexo do RNA mensageiro ribossômico ao se ligar na subunidade 30S do ribossomo, resultando em uma inibição da síntese proteica. A tetraciclina foi utilizada nas primeiras décadas do descobrimento e desenvolvimento dos antimicrobianos para o tratamento de gonorreia, mas em pouco tempo foi observado um aumento da concentração inibitória mínima devido ao acúmulo de determinantes de resistência cromossômica (REYN; KORNER; BENTZON, 1958; UNEMO; RIO; SHAFER, 2016). Esses determinantes incluem principalmente mutações no gene *rpsJ*, o qual codifica uma forma alterada da proteína ribossômica S10, sendo a principal V57M<sup>6</sup> (HU et al., 2005). Além dessas modificações, a resistência pode ocorrer devido a um aumento do efluxo e diminuição do influxo devido a mutações em *mtrR* (regulador do sistema de efluxo MtrCDE) e *penB* (proteína de membrana externa – porina), respectivamente (FOLSTER et al.,

---

<sup>5</sup> *N. gonorrhoeae* XDR é definida como um isolado com resistência às ESC e três ou mais dos seguintes antimicrobianos ou classe de antimicrobianos: penicilina, fluoroquinolonas, azitromicina, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (TAPSALL, 2009).

<sup>6</sup> Uma tabela com o nome dos aminoácidos e suas respectivas siglas encontra-se no Anexo A.

2009; OHNECK et al., 2011; ZHAO et al., 2009). A tetraciclina possui um determinante de resistência (gene *tetM*) o qual é disseminado por um plasmídeo. Altos níveis de resistência à tetraciclina ocorrem pela presença deste gene, o qual codifica uma proteína que é capaz de ligar-se ao ribossomo e causar a liberação da molécula de tetraciclina, permitindo a síntese proteica (BURDETT, 1986; MORSE et al., 1986; UNEMO; SHAFER, 2014). A emergência deste plasmídeo contendo o gene *tetM* levou a exclusão da tetraciclina do tratamento da gonorreia em meados de 1980 na maioria dos países e hoje encontra-se disseminado globalmente (UNEMO; RIO; SHAFER, 2016; UNEMO; SHAFER, 2014).

#### 2.2.6.2 Resistência a macrolídeos

Os antimicrobianos da classe dos macrolídeos são capazes de inibir a síntese de proteínas ao se ligarem à subunidade ribossomal 50S e interagirem com o 23S rRNA, bloqueando a saída de peptídeos dessa subunidade (DOUTHWAITE; CHAMPNEY, 2001; UNEMO; SHAFER, 2014). A resistência a essa classe de antimicrobianos pode ser originada de: (1) modificações em enzimas metilases do 23S rRNA; (2) por mutações específicas no 23S rRNA, sendo as mais comuns C2611T e A2059G, as quais conferem altos níveis de resistência aos macrolídeos (CHISHOLM; DAVE; ISON, 2010; GALARZA et al., 2010; KATZ et al., 2012; UNEMO; GOLPARIAN; HELLMARK, 2014; UNEMO; SHAFER, 2014); (3) e/ou devido a super expressão em sistemas de bombas de efluxo, particularmente de MtrCDE (LUCAS et al., 1997; UNEMO; SHAFER, 2014), mas também de MacAB (ROUQUETTE-LOUGHLIN; BALTHAZAR; SHAFER, 2005) e a proteína de efluxo de macrolídeos (codificada pelo gene *mef*) (COUSIN; WHITTINGTON; ROBERTS, 2003).

A azitromicina, antimicrobiano da classe dos macrolídeos, começou a ser utilizada para o tratamento da gonorreia nos anos 1980 e na metade dos anos de 1990 foram relatados casos de resistência na América Latina (DILLON et al., 2006; DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013; STARNINO et al., 2012) e subsequentemente em outros países (LAHRA; LO; WHILEY, 2013; UNEMO; RIO; SHAFER, 2016). Atualmente, a azitromicina é recomendada para o tratamento da gonorreia em dupla terapia com ceftriaxona ou cefixima (BRASIL, 2020; UNEMO et al., 2020; WHO, 2016).

#### 2.2.6.3 Resistência a fluoroquinolonas

A classe de antimicrobianos fluoroquinolonas atua inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV. Suas ações incluem a separação e o reagrupamento da dupla fita de DNA no processo de replicação da célula bacteriana. *N. gonorrhoeae* desenvolve resistência a essa classe por meio de mutações nessas enzimas, alterando a interação do antimicrobiano pelas mesmas. A DNA girase possui quatro subunidades: duas subunidades GyrA e duas GyrB, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*. Já a topoisomerase IV é formada de duas subunidades de ParC e duas de ParE, codificadas pelos genes *parC* e *parE*. Em gonococo, mutações somente no gene *gyrA* (de forma mais comum S91F e D95N) podem causar resistência, mas somente uma combinação de mutações em ParC (de forma mais comum S88P e E91K) pode elevar a resistência a altos níveis. Essas mutações podem ser facilmente selecionadas pela exposição da bactéria a concentrações mínimas do antimicrobiano (BELLAND et al., 1994; TREES et al., 1999; UNEMO; SHAFER, 2014).

O ciprofloxacino, antimicrobiano pertencente a essa classe, foi introduzido para o tratamento empírico da gonorreia em diversos países da metade para o final dos anos 1980. Entretanto, a resistência a este antimicrobiano aumentou rapidamente e disseminou-se mundialmente (BERGLUND et al., 2002; TANAKA et al., 1994; UNEMO; RIO; SHAFER, 2016). Em alguns países seu uso já foi desaconselhado na metade dos anos de 1990 (UNEMO; DILLON, 2011; UNEMO; RIO; SHAFER, 2016). No Brasil, após os resultados do primeiro estudo nacional de vigilância da resistência ao gonococo em 2017, o ciprofloxacino deixou de ser utilizado como primeira linha do tratamento da gonorreia (BAZZO et al., 2018).

#### 2.2.6.4 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos

A classe de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, a qual inclui penicilinas e cefalosporinas, atuam inibindo a enzima transpeptidase, também conhecida como proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês *penicillin-binding protein*), a qual é responsável pela formação da parede celular bacteriana. Quatro tipos de PBP foram identificadas em *N. gonorrhoeae*, sendo que PBP1 e PBP2 são essenciais para viabilidade bacteriana e são os alvos dos  $\beta$ -lactâmicos (BARBOUR, 1981; STEFANOVA et al., 2004).

Após o início da resistência às sulfonamidas no final da década de 1940, a penicilina rapidamente foi recomendada como primeira linha no tratamento da gonorreia. Durante as décadas seguintes houve um aumento na concentração inibitória mínima (MIC) para penicilina devido a alterações em determinantes de resistência cromossômica. Na maioria dos casos, essa

resistência cromossômica deve-se a inserção de um aspartato após o aminoácido 345 desta proteína de PBP2 (Asp345a) (UNEMO; RIO; SHAFER, 2016). Além disso, isolados possuindo alto nível de resistência à penicilina também possuem uma mudança de aminoácidos na proteína PBP1 (L421P) (ROPP et al., 2002; UNEMO; SHAFER, 2014). A resistência também pode ocorrer por um aumento do efluxo do antimicrobiano, principalmente devido à super expressão de uma bomba de efluxo MtrCDE, e pela diminuição da permeabilidade do antimicrobiano por modificação na principal porina de *N. gonorrhoeae*, PorB (codificada pelo gene *penB*) (FOLSTER et al., 2009; OHNECK et al., 2011; OHNISHI et al., 2011; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; SHAFER, 2014). Por fim, isolados de *N. gonorrhoeae* também podem apresentar uma enzima  $\beta$ -lactamase do tipo TEM (codificada pelo gene *bla<sub>TEM</sub>*) que é capaz de hidrolisar a penicilina, deixando-a inativa. Essa presença foi descrita pela primeira vez em 1976 e atualmente é comum em todas as regiões do mundo (UNEMO; RIO; SHAFER, 2016; UNEMO; SHAFER, 2014).

De forma diferente dos isolados com resistência à penicilina (inserção Asp345a no gene *penA*), em isolados com diminuição de sensibilidade ou resistência às ESC, o gene *penA* é mais frequentemente encontrado na forma de um mosaico. Notavelmente, os isolados que apresentam o mosaico não possuem a inserção Asp345a (AMEYAMA et al., 2002; UNEMO; SHAFER, 2014). Acredita-se que essa forma de mosaico do gene *penA* tenha surgido por transformação de DNA seguido de recombinação com genes parciais de espécies de *Neisseria* comensais da orofaringe, como *N. perflava*, *N. sicca*, *N. polysaccharea*, *N. cinerea*, e/ou *N. flavescens* (AMEYAMA et al., 2002; ITO et al., 2005; OSAKA et al., 2008).

Em gonococo com diminuição de sensibilidade ou resistência à cefixima, três mutações em PBP2 (I312M, V316T e G545S) foram descritas inicialmente como responsáveis por tal fato (OSAKA et al., 2008; TANAKA et al., 2006). Posteriormente, verificou-se que a retirada dessas mutações do mosaico *penA* diminuiu consideravelmente a MIC para ESC, entretanto, a inserção dessas mutações em gene *penA* não-mosaico não aumentou ou aumentou pouco a MIC de cefixima e ceftriaxona. Essas mutações adicionais parecem atuar de forma compensatória ou estabilizadora para restaurar a atividade da enzima transpeptidase, a qual é essencial para sobrevivência do gonococo (TOMBERG et al., 2010; UNEMO; SHAFER, 2014).

No ano de 2000 foi verificada no Japão uma considerável redução de sensibilidade de isolados de *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas, quando comparada a MIC com isolados coletados no ano de 1995 (TANAKA et al., 2002). No mesmo ano, é descrito o primeiro isolado considerado XDR no Japão, contendo 12 alterações de aminoácidos quando comparado ao

mosaico *penA* dos primeiros casos de resistência à cefixima naquele país (AMEYAMA et al., 2002). Mais recentemente, foi verificado que três dessas alterações (A311V, V316P e T483S) resultaram em um significativo aumento da MIC para as ESC (TOMBERG et al., 2013). Após o primeiro relato de *N. gonorrhoeae* XDR, novos casos foram relatados em 2012 na França e Espanha e ambos os isolados são pertencentes ao ST1901 (tipagem por MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) e ST1407 (tipagem por NG-MAST, do inglês *Neisseria gonorrhoeae Multi Antigen Sequence Typing*), declarado como um clone resistente a diversos antimicrobianos e responsável em grande proporção pela diminuição da sensibilidade às ESC em diversos países (UNEMO; NICHOLAS, 2012). Ambos possuem um gene mosaico *penA* do tipo XXXIV<sup>7</sup> (OHNISHI et al., 2011) com uma alteração adicional A501P, e altos níveis de resistência às ESC (CÁMARA et al., 2012; UNEMO et al., 2011).

A primeira falha de tratamento utilizando a dupla terapia com ceftriaxona/cefixima e azitromicina foi relatada em 2016 no Reino Unido (FIFER et al., 2016; GOLPARIAN et al., 2020) e o primeiro isolado de gonococo com resistência a ceftriaxona e altos níveis de resistência a azitromicina foi descrito pela primeira vez em 2018, também no Reino Unido (EYRE et al., 2018; GOLPARIAN; BAZZO et al., 2020). Além disso, desde 2015, isolados do ST1903 (NG-MAST) contendo um novo mosaico do gene *penA* (tipo 60.001), o qual possui resistência à ceftriaxona, têm sido disseminados internacionalmente e têm causado falhas no tratamento com a utilização deste antimicrobiano (EYRE et al., 2019; GOLPARIAN et al., 2018; GOLPARIAN et al., 2020; KO et al., 2019; LAHRA et al., 2018; LEFEBVRE et al., 2018; NAKAYAMA et al., 2016; PONCIN et al., 2018; TERKELSEN et al., 2017).

No Brasil, em um inquérito de resistência realizado no Rio de Janeiro com amostras obtidas de serviços públicos e privados entre 2006 e 2015, foi observada a circulação de sete isolados apresentando MIC de 0,250 µg/mL para cefixima, mas sensíveis à ceftriaxona. Todos eles eram pertencentes ao ST1901 (MLST) e possuíam mosaico do gene *penA* (tipo XXXIV), um clone que tem se disseminado com sucesso na América do Norte, continentes asiático e europeu (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). No ano seguinte, com isolados coletados entre 2015 e 2016, o primeiro estudo de vigilância de resistência no Brasil mostrou 100% de sensibilidade à cefixima e ceftriaxona utilizando os pontos de corte de resistência do CLSI (MIC ≤ 0,25 µg/mL). Entretanto, de acordo com o Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos

---

<sup>7</sup> Historicamente, a nomenclatura em algarismos romanos utilizada para o gene *penA* tem sido associada ao tipo de alteração de aminoácido em PBP2 (tipos I ao XXXVIII). Uma nova nomenclatura em algarismos arábicos passou a ser utilizada para diferenciar uma mudança em nucleotídeo, sem alteração de aminoácidos (DEMCZUK, 2017). Dessa forma, as duas nomenclaturas foram utilizadas neste estudo.

Antimicrobianos (BrCAST) um isolado de Brasília foi resistente à cefixima (MIC = 0,25 µg/mL) e outros 38 isolados tinham valor de MIC de 0,125 µg/mL, o qual está no limite de resistência de acordo com este comitê (MIC ≤ 0,125 µg/mL) (BAZZO et al., 2018). Dados de sequenciamento do genoma total desses mesmos isolados, mostraram uma diminuição de sensibilidade a cefixima (6,9% dos isolados) e ceftriaxona (0,4%), principalmente em isolados com mosaico *penA* XXXIV. Além disso, o segundo ST mais predominante foi o ST1407 nessa amostragem (GOLPARIAN et al., 2020).

Além do principal mecanismo, a diminuição de sensibilidade e resistência às ESC também pode ocorrer devido ao aumento do efluxo e diminuição do influxo de cefalosporinas. A superexpressão da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE contribui para tal feito por aumentar o efluxo dessa classe de antimicrobianos (GOLPARIAN et al., 2014; HAGMAN; SHAFER, 1995; OHNECK et al., 2011). A bomba de efluxo Mtr é composta de proteínas do envelope celular, similares às encontradas em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que atuam juntas exportando diversos antimicrobianos hidrofóbicos (HAGMAN et al., 1995; PAN; SPRATT, 1994; WADSWORTH et al., 2018). A produção das proteínas dessa bomba de efluxo é controlada a nível de transcrição pelo gene *mtrR* (LUCAS et al., 1997). A principal alteração que ocasiona a superexpressão do *operon* MtrCDE é a deleção de uma adenina na região promotora do gene *mtrR* na sequência de repetição invertida de 13 pb entre as regiões -10 (5'-TATAAT-3') e -35 (5'-TTGCAC-3') (HAGMAN et al., 1995; ZARANTONELLI et al., 1999). Essa deleção faz com que diminua a distância entre a região -10 e -35, o que desfavorece a ligação da RNA polimerase (HAGMAN; SHAFER, 1995; UNEMO; SHAFER, 2014). De forma mais rara, uma troca de uma citosina por uma timidina 120 pb a montante do códon inicial de tradução do gene *mtrC* faz com que seja gerada uma nova região promotora -10 do *operon*<sup>8</sup> MtrCDE, a qual promove altos níveis de transcrição independente do controle de *mtrR* (OHNECK et al., 2011; WARNER; SHAFER; JERSE, 2008). Outra alteração mais rara que aumenta a expressão de MtrCDE é a inserção de uma sequência de repetição CR de 153 pb entre a região promotora *mtrR/mtrC* e o gene *mtrC* (JOHNSON et al., 2003; ROUQUETTE-LOUGHLIN et al., 2004). O surgimento desse elemento sugere que ele é proveniente de outra parte do cromossomo do gonococo ou que sequências de CR de *N. meningitidis* flanqueadas por DNA de *mtr* foram recombinadas neste local (UNEMO; SHAFER, 2014).

Certos antimicrobianos, como penicilinas, tetraciclina e ESC, se difundem para o espaço periplasmático da bactéria por meio de canais formados pelas porinas. O aumento da

---

<sup>8</sup> Mais de um gene sob regulação de um mesmo promotor.



MIC para ESC também pode ocorrer por mutações na principal proteína de membrana externa: PorB (codificada pelo gene *penB*). O gonococo produz um de dois tipos de porinas: PorB1a ou PorB1b. Alterações encontradas na alça 3 da porina do tipo PorB1b confere resistência às ESC, penicilina e tetraciclina por contrair seu poro em relação à PorB1a (GILL et al., 1998; OLESKY; HOBBS; NICHOLAS, 2002; ZHAO, S. et al., 2005; 2009). Penicilina e ceftriaxona são mais afetadas do que cefixima, sugerindo que cefixima não realiza difusão para o espaço periplasmático por PorB1b ou que tal difusão não é alterada por esse determinante (UNEMO; SHAFER, 2014). Isolados que possuem PorB1a são mais sensíveis à penicilina e tetraciclina do que os que expressam PorB1b (GILL et al., 1998; OLESKY; HOBBS; NICHOLAS, 2002; SPARLING; SARUBBI; BLACKMAN, 1975; UNEMO; SHAFER, 2014). Interessantemente, ambos os determinantes de resistência *mtrR* e *penB* influenciam principalmente a MIC de ceftriaxona, sugerindo que a cefixima não é um substrato ideal para esse tipo de sistema de efluxo e porina (ZHAO et al., 2009).

Mutações em PBP1 e em *pilQ*, que são determinantes de resistência para penicilinas, parecem não afetar a MIC de ESC em isolados clínicos de gonococo (ROPP et al., 2002; UNEMO; NICHOLAS, 2012; ZHAO et al., 2005; 2009). Isso porque penicilinas e ESC possuem uma maior afinidade por PBP2. A mutação E666K em *pilQ* não possui efeito sobre a MIC de penicilina, tetraciclina e ciprofloxacino na ausência de determinantes de resistência *mtrR* e *penB*. Além disso, nenhuma mutação de *pilQ* acarretando perda de função foi identificada em isolados clínicos, uma vez que romperia a formação de *pili* e consequentemente seu potencial patogênico (HELM; BARNHART; SEIFERT, 2007; UNEMO; NICHOLAS, 2012; WHILEY et al., 2010).

Finalmente, existem determinantes de resistência desconhecidos, referidos como “Fator X” em experimentos de transformação, onde os principais determinantes de resistência (*penA*, *mtrR* e *penB*) com mutações quando transformados no mesmo isolado, não apresentaram aumento da MIC. Esse fator têm sido descrito como associado ao aumento da MIC para as ESC. (LEE et al., 2010; LIAO et al., 2011; NABU et al., 2017; OHNISHI et al., 2011; UNEMO et al., 2012).

Além destes mecanismos de resistência descritos e bem consolidados como causadores de resistência de *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas, recentemente novos genes parecem estar envolvidos com resistência à ceftriaxona. Genes que codificam transportadores ABC FarB, Tfq, Hfq e ExbB foram superexpressos, enquanto os genes *pilM*, *pilN* e *pilQ* sofreram uma regulação

negativa quando isolados de *N. gonorrhoeae* foram submetidos a concentrações crescentes de ceftriaxona (GONG et al., 2016).

### 2.2.7 Tipagem de isolados de *Neisseria gonorrhoeae*

Muitos métodos de tipagem têm sido desenvolvidos para caracterização de isolados de *N. gonorrhoeae*, tanto fenotípicos quanto genotípicos. Esses métodos de tipagem podem ser utilizados para uma variedade de propostas, dentre elas para o entendimento da filogenia (estudos de evolução), na identificação de isolados com disseminação global em populações específicas e identificação de mudanças temporais e geográficas entre isolados (UNEMO; DILLON, 2011).

Dentre os métodos genotípicos utilizados em *N. gonorrhoeae*, destacam-se a tipagem de sequências em múltiplos *locus* (MLST, do inglês *multilocus sequence typing*) e o NG-MAST (do inglês, *Neisseria gonorrhoeae Multi Antigen Sequence Typing*). O MLST foi inicialmente desenvolvido para tipagem de isolados de *N. meningitidis* como abordagem para epidemiologia molecular de casos de meningite (MAIDEN et al., 1998). Neste método são analisadas sequências de nucleotídeos de fragmentos internos de sete genes conservados. Diferentes sequências recebem uma numeração diferente e a combinação dessa numeração resulta em um ST (do inglês, *sequence type*) (UNEMO; DILLON, 2011).

O NG-MAST é um método que analisa a variabilidade de um fragmento interno da sequência de nucleotídeos de dois genes altamente polimórficos: *porB* (o qual codifica uma porina) e *tbpB* (o qual codifica uma subunidade da proteína ligadora de transferrina) (MARTIN, et al., 2004). A sequência de cada gene recebe uma numeração e a combinação resulta em um ST. Este método tem sido utilizado mundialmente por ter um alto poder discriminatório e ter um menor custo quando comparado ao MLST. NG-MAST tem sido utilizado para identificar grupos de infecção (CHISHOLM et al., 2013; CHOUDHURY et al., 2006; DE JONGH et al., 2008), rastreamento de contatos sexuais (BILEK et al., 2007; CHEN et al., 2008) e para investigar falhas de tratamento em estudos de vigilância de resistência (LO et al., 2008; OTA et al., 2009; TAPSALL et al., 2009).

A combinação de determinantes genéticos de resistência também pode ser utilizada para identificação de linhagens, o que pode ser muito útil em estudos de vigilância de resistência. Este é o objetivo do esquema de tipagem de determinantes de resistência, NG-STAR (DEMCZUK et al., 2017). Este esquema é fundamentado na sequência de sete genes de

resistência bem caracterizados e cria uma nomenclatura (tipagem) para rastreamento da disseminação, podendo ser comparável entre estudos em todo o mundo.

### 2.3 *Neisseria elongata*

Por não ser considerada patogênica, estar distante filogeneticamente de *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* e geralmente ser considerada sensível a uma ampla gama de antimicrobianos, *N. elongata* tem sido pouco estudada. A grande maioria dos estudos publicados baseiam-se em relatos de caso. Inicialmente evidenciada pertencer ao gênero *Moraxella*, a primeira descrição, identificação da espécie e proposta de inclusão de *N. elongata* como uma bactéria pertencente ao gênero *Neisseria* ocorreu somente em 1970 (BOVRE; HOLTEN, 1970), quase 100 anos após a identificação de *N. gonorrhoeae*. Sua possível patogenicidade foi relatada em 1983: um caso de endocardite de uma paciente de 31 anos com prolapso de válvula mitral e relato de procedimento odontológico anterior à internação (SIMOR; SALIT, 1983). A paciente precisou de intervenção cirúrgica para substituição da válvula e recebeu alta hospitalar.

Foram relatados mais dois casos de infecção por *N. elongata* em 1986: novamente um caso de endocardite (PEREZ, 1986) e um caso de osteomielite (GARNER; BRIANT, 1986). Até então, esses casos foram relatados serem causados por uma bactéria formalmente denominada Grupo CDC M-6. Em 1990, em um estudo conduzido pelo CDC com um banco de 95 isolados pertencentes ao Grupo M-6, esses isolados foram identificados como *N. elongata* subesp. *nitroreducens*<sup>9</sup> (GRANT et al., 1990). De fato, essa subespécie é a que mais tem sido relatada causando infecções em humanos (KNOX; HUME; JOHNSON, 2015; LIN, M. et al., 2014; STRUILLLOU; RAFFI; BARRIER, 1993). De 1983 até o momento, foram descritos 25 casos de endocardite causados por *N. elongata*, sendo 21 deles causados pela subespécie *nitroreducens*. As primeiras descrições de endocardite por *N. elongata* subesp. *glycolytica* e *elongata* foram em 1995 (ANDERSEN et al., 1995) e 1996 (NAWAZ; HARDY; BONNEZ, 1996), respectivamente.

---

<sup>9</sup>As demais subespécies (*N. elongata* subesp. *elongata* e *N. elongata* subesp. *glycolytica*) já haviam sido identificadas como tal, mas nenhum caso de infecção havia sido relatado.

### 3 JUSTIFICATIVA

Avanços na área de biotecnologia possibilitam que pesquisas respondam de forma eficiente a importantes questões em diferentes escalas. A genômica por exemplo, pode ser utilizada para pesquisar mecanismos moleculares, para agrupar amostras ou indivíduos, ou para prever desfechos como sobrevivência ou eficácia de uma terapia (FACHIN, 2017). O presente estudo propôs a utilização dessa ferramenta para contribuir no conhecimento sobre a patogenicidade e a resistência antimicrobiana em isolados clínicos do gênero *Neisseria*. A diminuição de sensibilidade/resistência de *N. gonorrhoeae* à ceftriaxona e cefixima, considerados um dos últimos recursos para tratamento da gonorreia, já é observada em muitos países (GOLPARIAN; HARRIS et al., 2020). Aliado a isso, falhas de tratamento utilizando esses antimicrobianos estão sendo observadas (FIFER et al., 2016; JENNISON et al., 2019). Em maio de 2016, a OMS publicou um plano mundial de estratégias do setor da saúde a serem adotadas para redução dos casos de ISTs. Dentre as estratégias estão o fortalecimento de vigilância do gonococo e pesquisa para otimização do uso de agentes antimicrobianos (WHO, 2016). Recentemente no Brasil, em 2017, o tratamento preferencial da infecção gonocócica anogenital não complicada foi alterado para ceftriaxona mais azitromicina devido a presença de mais de 50% de isolados com resistência ao ciprofloxacino, antimicrobiano utilizado até então para o tratamento dessas infecções (BAZZO et al., 2018). Os resultados desse primeiro estudo nacional de vigilância da resistência dos isolados de *N. gonorrhoeae* também demonstraram 100% de sensibilidade às ESC (BAZZO et al., 2018), mas comprovam a circulação de isolados ST1407 (GOLPARIAN et al., 2020), os quais tem sido frequentemente associado com diminuição de sensibilidade/resistência a estes antimicrobianos (CÂMARA et al., 2012; UNEMO et al., 2011). Com a mudança recente do tratamento para essas infecções no Brasil e visto que *N. gonorrhoeae* possui uma alta capacidade de alterar seu DNA, particularmente quando exposta à pressão seletiva, reforçam, além da vigilância contínua da resistência, a importância de estudos que visam uma predição da evolução de resistência aos antimicrobianos nesse microrganismo. Além disso, um número substancial de determinantes de resistência aos antimicrobianos e alterações compensatórias no genoma de *N. gonorrhoeae* permanecem desconhecidos (EYRE et al., 2017; OHNISHI et al., 2011; UNEMO et al., 2011).

Em 2018, um caso de endocardite infecciosa causada por *N. elongata*, uma espécie incomum nesse tipo de infecção, alertou a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre essa espécie comensal de *Neisseria*. O relato para a comunidade científica desses casos

infrequentes é importante para auxiliar microbiologistas e equipe clínica para atentarem-se a uma rápida identificação do microrganismo, tratamento imediato e monitoramento contínuo da necessidade cirúrgica. Associado ao relato do caso, um estudo genômico comparando o sequenciamento do isolado deste estudo com dados de sequenciamento de *N. elongata* disponíveis na literatura, pode melhorar o entendimento de como este microrganismo tipicamente comensal pode causar uma doença invasiva e assim evitar desfechos desfavoráveis ao paciente.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de mutações em genomas de *N. gonorrhoeae* após a indução de resistência à cefixima e caracterizar o genoma de *N. elongata* isolada de paciente com endocardite infecciosa.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar os genomas dos isolados de *N. gonorrhoeae* incluídos no estudo.
- b) Avaliar a presença de SNPs (polimorfismos de único nucleotídeo), inserções e deleções no genoma de *N. gonorrhoeae* após indução da resistência à cefixima.
- c) Relatar um caso de endocardite infecciosa causada por *N. elongata* e comparar com outros casos descritos na literatura.
- d) Identificar genes de resistência e virulência nos isolados de *N. elongata*.
- e) Realizar análise pangenômica de isolados de *N. elongata*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/CCS/UFSC) localizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC/EBSERH, Florianópolis).

### 5.2 *Neisseria gonorrhoeae*

#### 5.2.1 Seleção dos isolados

Foram incluídos no estudo um total de oito isolados de *N. gonorrhoeae*, sendo um de hemocultura e cinco de secreção uretral masculina, além de duas cepas de referência. O isolado de hemocultura é proveniente da rotina do Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises

Clínicas do HU/UFSC/EBSERH. Os demais são provenientes de um banco de isolados clínicos coletados entre 2008 e 2016 na região da grande Florianópolis no Estado de Santa Catarina, Brasil. As cepas de referência, denominadas “WHO F” e “WHO Y” são provenientes da OMS (UNEMO et al., 2016). A seleção dos isolados de *N. gonorrhoeae* foi realizada segundo resultados da tese de Golfetto (2018), com base no ST, determinado pela técnica NG-MAST (MARTIN et al., 2004). Para isso, foram selecionados isolados clínicos de dois STs: ST1407, o qual tem se disseminado com resistência às cefalosporinas (CÂMARA et al., 2012; UNEMO et al., 2011); e ST338, que foi o ST mais prevalente na região da grande Florianópolis, de acordo com estudo de Golfetto (GOLFETTO, 2018). Esses isolados clínicos são provenientes do estudo nacional “Vigilância da resistência antimicrobiana das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* circulantes no Brasil” (BAZZO et al., 2018) (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae* incluídos no estudo.

<b>Isolado</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Local de Isolamento</b>	<b>Sequence Type (ST)*</b>
<b>M009</b>	2018	HM	4630
<b>M043</b>	2013	UP	1407
<b>M107</b>	2015	UP	338
<b>M110</b>	2015	UP	338
<b>M111</b>	2015	UP	1407
<b>M128</b>	2016	UP	1407
<b>WHO F</b>	1991	NI	3303
<b>WHO Y</b>	2010	UP	1407

\*ST determinado pela técnica de tipagem NG-MAST (GOLFETTO, 2018). Legenda: HM: hemocultura; UP: uretra peniana; NI: não informado. Fonte: adaptado de (GOLFETTO, 2018; UNEMO et al., 2016).

### 5.2.2 Indução *in vitro* de resistência à cefixima

Na indução da resistência, os isolados de *N. gonorrhoeae* foram selecionados em meio de cultivo contendo antimicrobiano cefixima, com o aumento gradativo da concentração do antimicrobiano, iniciando o crescimento com uma concentração de 0,002 µg/mL de cefixima incorporado ao meio de cultura. Os isolados foram descongelados em meio ágar chocolate (Laborclin, Brasil), incubados em estufa à temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  e subcultivados após 18 a 24 horas em nova placa de ágar chocolate (Laborclin, Brasil) e incubados nas mesmas condições. A seguir, uma colônia foi subcultivada em meio GC (Difco™, EUA) suplementado com 1% de Vitox (Oxoid, Inglaterra) contendo 0,002 µg/mL de

cefixima. Após crescimento em meio GC por 18 a 24 horas, colônias foram subcultivadas em duas novas placas de meio GC: uma contendo a mesma concentração de cefixima, e outra contendo uma concentração maior do antimicrobiano. Quando observado crescimento de isolados característicos de *N. gonorrhoeae* na placa com maior concentração do antimicrobiano, estes foram subcultivados como descrito anteriormente e armazenados em caldo Casoy (BD, Difco™) com 20% de glicerol, à temperatura de -80°C. A cada crescimento em meio GC contendo uma maior concentração de cefixima foi realizada coloração de Gram para verificação da presença de diplococos gram-negativos (exclusão de contaminação por outro microrganismo). A indução de resistência à cefixima foi finalizada quando se verificou que todos os isolados estavam com crescimento estável (aproximadamente sete subcultivos consecutivos) em uma placa com concentração superior ao ponto de corte de resistência à cefixima (segundo BrCAST, > 0,125 µg/mL). Ao final da indução todos os isolados foram confirmados novamente em sistema automatizado (Vitek® 2/bioMérieux©).

### **5.2.3 Sequenciamento do genoma total dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae* antes da indução de resistência**

Para os isolados antes da indução de resistência, a extração de DNA foi realizada utilizando esferas magnéticas com um protocolo proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). O material genético obtido após a extração foi quantificado utilizando o fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, EUA), com o kit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após a quantificação, o DNA foi diluído a 0,5 ng/µL. As bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando o kit Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, Inc., EUA). Os genomas foram sequenciados utilizando o equipamento MiSeq (Illumina, Inc., EUA), com o kit MiSeq Reagent Kit V2, 500 ciclos e biblioteca *paired-end* (leituras 2 x 250 pb). As leituras no formato fasta com qualidade (fastq) foram obtidas utilizando o programa bcl2fastq2 versão 2.20.2 (disponível em: <https://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq-conversion-software-v2-20.html>. Acesso em 21/01/21). A qualidade das leituras encontra-se no APÊNDICE A.



#### **5.2.4 Sequenciamento do genoma total dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae* após indução de resistência**

Para os isolados após a indução da resistência, o DNA foi extraído utilizando o kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após a extração, foi realizada a quantificação do material genético utilizando o kit Picogreen (Thermo Fisher Scientific, EUA) no equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific, EUA). As bibliotecas foram preparadas com o kit Nextera Flex (Illumina, Inc., EUA) utilizando CD index (Illumina, Inc., EUA). O sequenciamento foi realizado utilizando o kit V2, 500 ciclos, *paired-end* 2 x 250 pb (Illumina, Inc., EUA). As leituras no formato fasta com qualidade (fastq) foram obtidas utilizando o programa bcl2fastq2 versão 2.20.2 (disponível em: <https://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq-conversion-software-v2-20.html>. Acesso em 21/01/21). A qualidade das leituras encontra-se no APÊNDICE A.

#### **5.2.5 Teste de estabilidade dos isolados após indução de resistência**

Para testar a estabilidade da resistência após criopreservação, os isolados pós seleção foram armazenados à temperatura de -80°C por mais de um mês. Após esse período, os isolados foram descongelados em ágar chocolate para determinação da MIC.

Os isolados pós-seleção da resistência à cefixima foram subcultivados diariamente por sete dias em ágar chocolate (Laborclin, Brasil) e incubados à temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse processo, foi realizada determinação da MIC para avaliação da estabilidade da resistência à cefixima sem a pressão utilizada na seleção.

#### **5.2.6 Determinação da concentração inibitória mínima após indução de resistência**

Os resultados da MIC aos antimicrobianos dos isolados antes da indução de resistência foram obtidos do projeto “Vigilância da resistência antimicrobiana das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* circulantes no Brasil” (BAZZO et al., 2018). A determinação da MIC nos isolados após a indução de resistência foi realizada para os antimicrobianos azitromicina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino, penicilina e tetraciclina pelo método de ágar-diluição, o qual é considerado referência para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*, de acordo com o CLSI (CLSI, 2019). Como controle de qualidade para o teste, foram incluídas

cinco cepas referência de *N. gonorrhoeae* da OMS (WHO F, G, K, L e M) (UNEMO et al., 2016). A interpretação dos pontos de corte para os antimicrobianos foi realizada utilizando BrCAST (disponível em: <http://brcast.org.br/documentos>. Acesso em: 10/02/2021) e CLSI (CLSI, 2019), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Pontos de corte utilizados para interpretação da concentração inibitória mínima (MIC) dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae*.

Antimicrobianos	BrCAST		CLSI		
	≤ S	R >	S	I	R
<b>Azitromicina</b>	-	1*	≤1	-	-
<b>Cefixima</b>	0,125	0,125	≤0,25	-	-
<b>Ceftriaxona</b>	0,125	0,125	≤0,25	-	-
<b>Ciprofloxacino</b>	0,03	0,06	≤0,06	0,125-0,5	≥1
<b>Penicilina</b>	0,06	1	≤0,06	0,125-1	≥2
<b>Tetraciclina</b>	0,5	1	≤0,25	0,5-1	≥2

Legenda: S: sensível; I: sensibilidade intermediária; R: resistente. \*Ponto de corte epidemiológico. Fonte: adaptado de BrCAST (disponível em: <http://brcast.org.br/documentos>). Acesso em: 20 de janeiro de 2021) e (CLSI, 2019).

### 5.2.7 Montagem dos genomas e anotação

Foi realizada a montagem dos isolados antes da indução de resistência. Para isso, a qualidade das leituras brutas obtidas no sequenciamento foi avaliada utilizando o programa FastQC versão 0.11.8 (disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Os adaptadores e as leituras com uma qualidade baixa foram removidos utilizando o programa Trimmomatic versão 0.39 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Os genomas foram montados *de novo* utilizando o programa SPAdes versão 3.13.1 (BANKEVICH et al., 2012). A anotação dos *scaffolds*<sup>10</sup> foi realizada utilizando o programa Prokka versão 1.14.0 (SEEMANN, 2014).

<sup>10</sup> Sequência contígua formada pela união de dois ou mais *contigs*.

### 5.2.8 Tipagem dos isolados e caracterização de determinantes de resistência

A tipagem dos isolados pelo método de NG-MAST foi determinada pelo estudo de Golfetto, 2018 e foi utilizada para seleção dos isolados do estudo. A determinação do ST dos isolados antes da indução de resistência pelo método de genotipagem MLST, foi realizada utilizando a ferramenta online MLST 2.0 (disponível em <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>, acesso em 04/01/2021), submetendo as leituras obtidas no sequenciamento.

Mutações em determinantes de resistência foram avaliadas a partir da montagem do genoma dos isolados antes da indução utilizando a base de dados CARD (*The Comprehensive Antimicrobial Resistance Database*) versão 3.1.1 (disponível em: <https://card.mcmaster.ca/>, acesso em 06/01/2021) (MCARTHUR et al., 2013) e o programa Artemis (CARVER et al., 2005). Sequências de captação de DNA foram identificadas procurando pelo padrão GCCGTCTGAA, utilizando a ferramenta fuzznuc, do pacote de programas EMBOSS (disponível em: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc>, acesso em 10/01/2021).

### 5.2.9 Avaliação de mutações nos isolados após indução de resistência

Após a indução da resistência à cefixima, foi realizada uma análise das mutações adquiridas no genoma total dos isolados. Para isso, foram analisadas mutações em proteínas hipotéticas<sup>11</sup> e em regiões codificantes que resultaram em mudança de quadro de leitura, códon de parada ou mutações não sinônimas<sup>12</sup>. Essas mutações incluem SNPs e inserções/deleções (INDEL). Essa análise foi feita por meio do chamamento de variantes (do inglês, *SNP-call*), realizando o mapeamento das leituras do sequenciamento após a indução, nos *scaffolds* gerados a partir da montagem do genoma dos isolados antes da indução (Figura 4).

Para mapeamento das leituras foi utilizado o programa bwa versão 0.7.17-r1188 (LI, H.; DURBIN, 2009). Para manipulação das leituras alinhadas, mesclagem e indexação foi utilizada a ferramenta Samtools versão 1.7 (LI, H. et al., 2009). O chamamento de variantes foi realizado utilizando BCFtools (LI, H., 2011), com filtro para variantes com qualidade de Phred mínima de nucleotídeo de 23. O *pipeline* vcfutils.pl, do pacote de ferramentas Samtools (LI, H.

---

<sup>11</sup> Prováveis proteínas ou proteínas sem função conhecida.

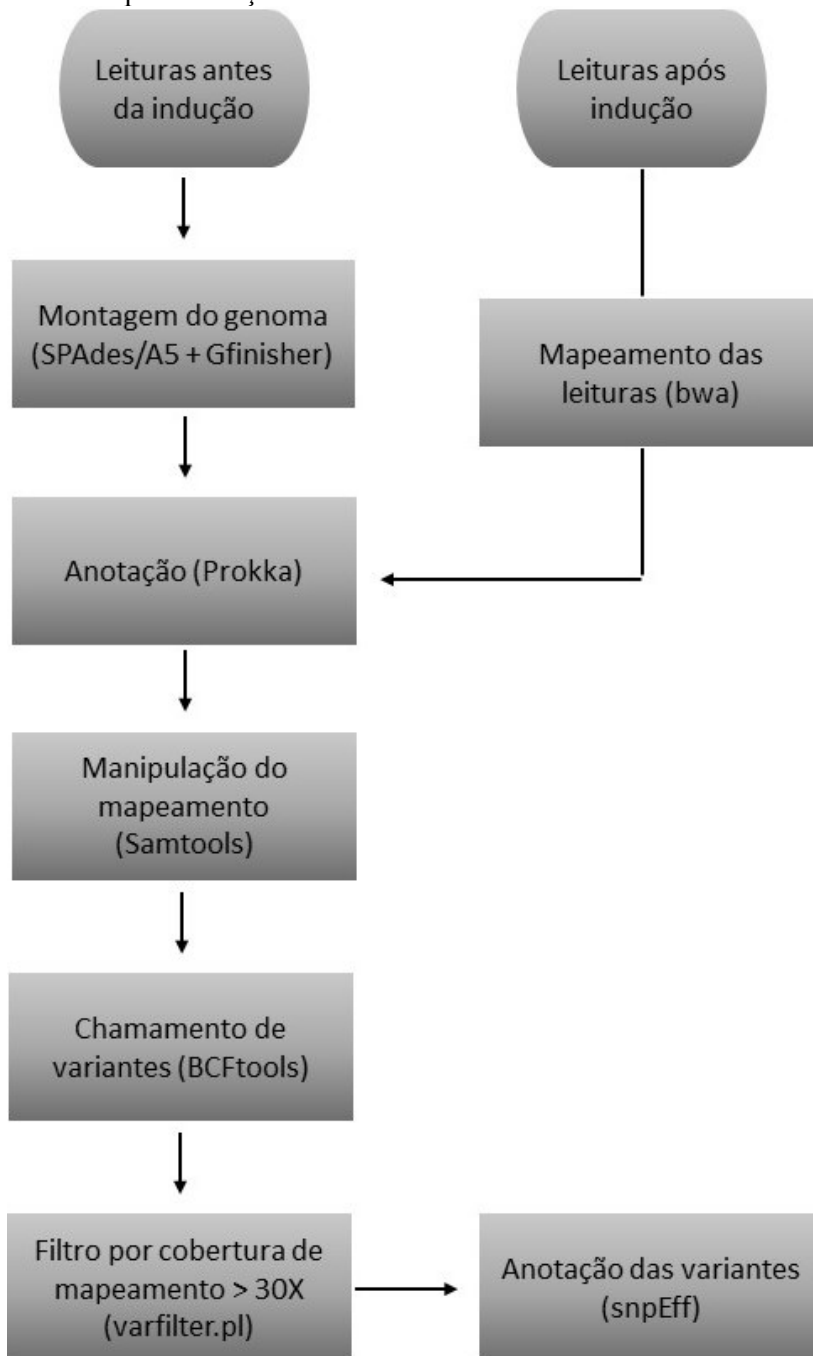
<sup>12</sup> Mutações que acarretam troca de aminoácido.

et al., 2009), foi utilizado para filtrar apenas as variantes com cobertura mínima de 20x. Os *scaffolds* com os genes anotados foram utilizados para criação de uma base de dados no programa SnpEff (CINGOLANI et al., 2012). Este programa foi utilizado para fazer a anotação das variantes, isto é, para obter informações de qual o tipo de alteração encontrada, em qual região do genoma foi localizada essa alteração e se resultou em mudança de quadro de leitura<sup>13</sup>, códon de parada ou mutação não sinônima. Para as cepas de referência foram utilizadas as sequências fasta disponíveis no NCBI (WHO F: número de acesso GenBank LT591897.1, e WHO Y: número de acesso GenBank LT592161.1).

---

<sup>13</sup> Mutação causada por inserção ou deleção de nucleotídeos diferente de três e seus múltiplos em uma sequência de DNA. Esse tipo de mutação geralmente leva a formação de uma proteína não funcional.

Figura 4. Fluxograma do processo de avaliação de mutações nos isolados após a indução de resistência com cefixima.



Fonte: autor, 2021.

### 5.3 *Neisseria elongata*

#### 5.3.1 Aprovação ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob número de protocolo CAAE 13727619.4.0000.0121.

#### 5.3.2 Isolamento, identificação e sequenciamento

O isolado de *N. elongata*, nomeado como M001, foi recuperado de hemocultura no setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas de um paciente internado no HU/UFSC/EBSEH. Primeiramente, foi identificado como *Neisseria animaloris* utilizando o sistema BD BBL™ Crystal™ (Becton, Dickinson, and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA). Por ser uma espécie incomum em hemocultura optou-se por uma nova identificação, dessa vez utilizando o equipamento VITEK® MS (BioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, França) (em parceria com o Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), a qual revelou tratar-se de *N. elongata*. Testes bioquímicos de D-glicose, catalase e provas de nitrato e nitrito foram utilizados para discriminação da subespécie, identificando o isolado como *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens*. Este isolado foi enviado à empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Brasil) para sequenciamento do genoma total. A extração de DNA foi realizada utilizando pérolas magnéticas, com um protocolo proprietário da empresa. Após a extração, o kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina, Inc., EUA) foi utilizado para preparar a biblioteca. O sequenciamento foi feito usando o equipamento MiSeq (Illumina, Inc., EUA) com o kit MiSeq v2 (Illumina, Inc., EUA) e bibliotecas *paired-end* 2 x 250 pb. A qualidade das leituras encontra-se no APÊNDICE A. As leituras do isolado M001 foram depositadas no GenBank sob número de acesso SRR13183145. Os dados clínicos do paciente foram recuperados de forma retrospectiva por meio de prontuário médico.

#### 5.3.3 Busca por isolados para genômica comparativa, montagem dos genomas e anotação

As leituras do sequenciamento do isolado M001 foram usadas no programa Mash versão 2.1.1 (ONDOV, 2016) (distância  $\leq 0.05$ ) para recuperar todas as sequências de *N.*

*elongata* disponíveis no NCBI (atualizado em junho de 2019). Um total de 16 sequências de *N. elongata* depositadas neste banco foram recuperadas e suas leituras brutas foram obtidas. Uma lista das amostras de *Neisseria elongata* incluídas neste estudo, e dados adicionais obtidos do NCBI encontram-se na Tabela 8, APÊNDICE B. A qualidade das leituras foi verificada com o programa FastQC versão 0.11.5 (disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Os adaptadores e as leituras de baixa qualidade foram removidos utilizando o programa Trimmomatic versão 0.35 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Os genomas foram montados *de novo* utilizando o programa SPAdes versão 3.13.1 (BANKEVICH et al., 2012) e *scaffolds* finais foram obtidos usando Gfinisher versão 1.4 (GUIZELINI et al., 2016). Após esse processo, sequências menores do que 500 nucleotídeos foram excluídas. O nível de completude foi avaliado utilizando o programa BUSCO versão 3.0 (SIMÃO et al., 2015) usando a base de dados de beta-proteobactéria como organismo de referência. PlasmidSPAdes versão 3.13.1 (ANTIPOV et al., 2016) foi utilizado para montagem e a base de dados PLSDB (GALATA et al., 2019) (disponível em: <https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/>. Atualizada em junho de 2019) foi utilizada para predição de sequências de plasmídeos. Prokka versão 1.12 foi utilizado para predizer e anotar sequências (SEEMANN, 2014). Para uma análise da diversidade entre os isolados de *N. elongata*, foi realizada uma análise de identidade média de nucleotídeos (ANI, do inglês *Average Nucleotide Identity*) utilizando o programa PYANI versão 0.2.0 (PRITCHARD et al., 2016).

### 5.3.4 Pangenoma e análise filogenética

Para análise do pangenoma das sequências de *N. elongata*, foi utilizado o programa Roary versão 3.6.0 (PAGE et al., 2015) com o critério de clusterização de proteínas de 95%. Foram realizadas duas árvores filogenéticas: uma com base no genoma core, cgMLST (do inglês, *core genome Multi Locus Sequence Typing*) e outra com base em ortólogos de única cópia. Para realização do cgMLST, os genes do genoma core foram extraídos e alinhados utilizando o programa MAFFT versão 7.271 (KATO; STANDLEY, 2013). Após o alinhamento, os SNPs foram extraídos com o programa SNP-sites versão 2.3.3 (PAGE et al., 2016). O alinhamento resultante com os sítios variáveis foi utilizado como dado de entrada para realização da filogenia utilizando o método de máxima verossimilhança com o programa RAxML versão 8.2 (STAMATAKIS, 2014). Foram utilizadas 1.000 replicatas de *bootstrap*.

Por outro lado, também foi realizada uma árvore filogenética adicionando *N. gonorrhoeae* FA1090 como *outgroup*. Os ortólogos foram determinados com o programa UCLUST versão 1.2.22q (EDGAR, 2010) com 50% de identidade. Após isso, o programa RAxML versão 8.2 (STAMATAKIS, 2014) foi utilizado para a reconstrução filogenética com o método de máxima verossimilhança, com a detecção do melhor modelo de substituição automática e 1.000 replicatas de *bootstrap*.

### 5.3.5 Análise de virulência e resistência aos antimicrobianos

A presença de genes de resistência aos antimicrobianos foi analisada utilizando a base de dados CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, atualizada em julho de 2019) versão 3.0.3 (MCARTHUR et al., 2013). As sequências de proteínas das amostras foram confrontadas com essa base de dados utilizando BLASTp com os seguintes pontos de corte: valor de  $e \leq 10^{-5}$ , >60% de similaridade, e >50% de identidade e cobertura. Fatores de virulência foram pesquisados contra a base de dados VFDB (*Virulence Factor Database*, atualizada em julho de 2019) (CHEN et al., 2005). Esta análise foi conduzida utilizando as proteínas associadas à virulência descritas para o gênero *Neisseria*. O programa UCLUST versão 1.2.22q (EDGAR, 2010) foi utilizado para obter uma base de dados não redundante. Os pontos de corte foram os mesmos adotados para análise dos genes de resistência.



## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *6.1 Neisseria gonorrhoeae*

#### **6.1.1 Caracterização genômica dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae***

Uma caracterização genotípica foi feita nos isolados sequenciados antes da indução, visando identificar alterações nos principais determinantes de resistência aos antimicrobianos que esses isolados já possuíam. Na Tabela 3, estão descritos os principais determinantes de resistência para os antimicrobianos analisados.

Tabela 3. Características genótípicas dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae* incluídos no estudo.

		<b>M009</b>	<b>M043</b>	<b>M107</b>	<b>M110</b>	<b>M111</b>	<b>M128</b>	<b>WHO F</b>	<b>WHO Y</b>
<b>Tipagem</b>	MLST	8161	1901	1588	1588	1901	1901	10934	1901
	NG-MAST	4630	1407	338	338	1407	1407	3303	1407
<b>Determinantes de resistência</b>	Tipo de <i>penA</i>	XIV	XXXIV	XIX	XIX	XXXIV	XXXIV	XV	42
	PBP2 345insD	sim (P)	-	sim (P)	sim (P)	-	-	-	-
	Promotor <i>mtrR</i> delA	-	sim (PTCM)	-	-	sim (PTCM)	sim (PTCM)	-	sim (PTCM)
	<i>mtrR</i> MQL	-	-	sim (PTCM)	sim (PTCM)	-	-	-	-
	PBP1 L421P	sim (P)	sim (P)	sim (P)	sim (P)	sim (P)	sim (P)	-	sim (P)
	Proteína 30S V57M	sim (T)	sim (T)	sim (T)	sim (T)	sim (T)	sim (T)	-	sim (T)
	GyrA S91F	-	sim (Q)	sim (Q)	sim (Q)	sim (Q)	sim (Q)	-	sim (Q)
	GyrA D95G	-	sim (Q)	-	-	sim (Q)	sim (Q)	-	sim (Q)
	ParC S87R	-	sim (Q)	sim (Q)	sim (Q)	sim (Q)	sim (Q)	-	sim (Q)
	PorB1b G120K	NA	sim (PTC)	NA	NA	sim (PTC)	sim (PTC)	NA	sim (PTC)
	PorB1b A121N	NA	sim (PTC)	NA	NA	sim (PTC)	sim (PTC)	NA	-
	PorB1b A121D	NA	-	NA	NA	-	-	NA	sim (PTC)
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	-	-	TEM-1	TEM-1	-	-	-	-
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>P</sup>	-	-	Africano	Africano	-	-	-	-
	<i>tetM</i> <sup>P</sup>	Holandês	-	-	-	-	-	-	-
Quantidade de DUS	1.946	1.954	1.927	1.928	1.899	1.945	1.965	1.974	

Legenda: A ausência de determinantes de resistência está anotada como “-”. A presença de determinantes de resistência está anotada como “sim”. Entre parênteses, o antimicrobiano ou classe de antimicrobiano ao qual o determinante está associado à resistência. P: penicilina; T: tetraciclina; C: cefalosporinas; M: macrolídeos; Q: quinolonas; MQL: mudança de quadro de leitura devido a inserção de AGAAAAACCAAACG entre os nucleotídeos 3 e 4 de *mtrR*; NA: não aplicável, pois produzem PorB1a; DUS: sequência de capturação de DNA. <sup>P</sup>: tipo de plasmídeo carreador do gene de resistência. Fonte: autor, 2021.

Apesar da infecção gonocócica disseminada ser relatada de forma mais rara na literatura (UNEMO; SHAFER, 2014), o isolado de *N. gonorrhoeae* M009 foi proveniente de uma amostra de hemocultura de um paciente internado no HU/UFSC/EBSERH. Os dados clínicos do paciente não foram recuperados para análise pois este caso não foi submetido à aprovação ética. Dentre os isolados deste estudo, M009 foi o mais sensível aos antimicrobianos analisados, apresentando apenas uma inserção de ácido aspártico (D) na posição 345 de PBP2, troca de aminoácido L421P em PBP1 e uma troca de aminoácido V57M na proteína ribossomal 30S. Esse isolado também foi o único a possuir um plasmídeo carregando o gene *tetM*, o qual é descrito por conferir alto nível de resistência à tetraciclina (BURDETT, 1986; MORSE et al., 1986; UNEMO; SHAFER, 2014). O plasmídeo carreador do gene *tetM* foi descrito pela primeira vez em *N. gonorrhoeae* nos Estados Unidos e, então, denominado de plasmídeo *tetM* americano (MORSE et al., 1986). Em 1991 um novo tipo de plasmídeo carregando o gene *tetM* foi descrito, sendo identificado como plasmídeo *tetM* holandês (GASCOYNE et al., 1991; UNEMO; SHAFER, 2014). Anterior a identificação desse gene em *N. gonorrhoeae*, a presença de plasmídeo carregando o gene *tetM* só havia sido descrito no gênero *Streptococcus* e em *Ureaplasma urealyticum* e *Gardnerella vaginalis*, sendo que essas duas espécies podem coabitar o trato genital humano (MORSE et al., 1986).

As amostras M107 e M110 apresentaram um plasmídeo carreador do gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, o qual codifica uma β-lactamase capaz de hidrolisar penicilina. A presença de plasmídeo carreador desse gene em *N. gonorrhoeae* foi descrito em 1976 (ASHFORD; GOLASH; HEMMING, 1976) e rapidamente se disseminou nessa espécie, tendo atualmente alta prevalência mundial (UNEMO; RIO; SHAFER, 2016). Isolados de gonococo com resistência à penicilina mediada por plasmídeo geralmente possuem genes de β-lactamase *bla*<sub>TEM-1</sub> ou *bla*<sub>TEM-135</sub>. Até o momento, nenhuma enzima β-lactamase de espectro estendido foi adquirida por *N. gonorrhoeae*. Entretanto, mutações nessa enzima ou aquisição de outras β-lactamases, poderia tornar *N. gonorrhoeae* capaz de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, o que reforça a importância do monitoramento dessa enzima nos isolados de *N. gonorrhoeae* (OHNISHI et al., 2010). Três tipos de plasmídeos carregando o gene *bla*<sub>TEM</sub> são os mais descritos: Africano, Asiático e Toronto/Rio. As duas amostras possuem o plasmídeo do tipo Africano, que apresenta um tamanho aproximado de 5,5 kb e têm disseminação global (TAPSALL et al., 2009; UNEMO et al., 2009). A maior parte dos determinantes de resistência em *N. gonorrhoeae* estão localizados no seu cromossomo. Apenas *bla*<sub>TEM</sub> e *tetM* são carregados por plasmídeos.

As amostras de secreção uretral peniana (M043, M107, M110, M111 e M128) apresentaram determinantes de resistência muito semelhantes e conseqüentemente um perfil de resistência parecido entre as que possuem o mesmo ST. Nesse sentido, as amostras que são ST338/ST1588 apresentaram o tipo XIX do gene *penA*, com inserção de ácido aspártico na posição 345 dessa proteína, e a troca de aminoácido L421P na proteína PBP1. Essas duas mutações são descritas por conferirem resistência à penicilina (ROPP et al., 2002; UNEMO; SHAFER, 2014). Além disso, esses isolados possuem a troca de aminoácido V57M na proteína ribossomal 30S, que confere resistência à tetraciclina (HU et al., 2005) e, diferente do isolado M009, possuem também uma mutação em GyrA (S91F) e uma mutação em ParC (S87R). Essas mutações em GyrA (DNA girase) e ParC (topoisomerase) são descritas por conferir resistência ao ciprofloxacino (BELLAND et al., 1994). Além disso, como já descrito, essas amostras possuem o gene *bla*<sub>TEM-1</sub>. Esse determinante levou a um aumento da MIC para a penicilina em relação aos outros isolados. Certos determinantes podem resultar em alto nível de resistência, ocasionando falhas no tratamento, como é o caso de *bla*<sub>TEM</sub>. Em outros casos, a aquisição de um único determinante confere apenas um aumento da MIC, sem importância clínica. No entanto, o efeito cumulativo de vários determinantes também pode ter efeito clinicamente significativo na MIC (UNEMO; SHAFER, 2014).

Já as amostras pertencentes ao ST1407/ST1901 também apresentaram um perfil de sensibilidade semelhante entre si. Todas apresentaram mutação na principal proteína de membrana externa do gonococo (PorB G120K/A121N), que pode aumentar a MIC de penicilina, tetraciclina e ESCs. Além disso, a troca de aminoácido V57M na proteína ribossomal 30S, troca de aminoácido S87R em ParC, troca de aminoácido S91F em GyrA e, diferente dos isolados ST338/ST1588, uma troca de aminoácido D95G em GyrA. Diferentes trocas de aminoácidos têm sido descritas na proteína PorB, como G120K/A121D, G120D/A121D, G120N/A121N, entre outras (THAKUR et al., 2014). No Canadá, estudos relataram predominância dessa mesma dupla mutação em PorB encontrada nos isolados deste estudo, com diminuição de sensibilidade às ESC (ALLEN et al., 2011; MARTIN et al., 2012). De forma interessante, o impacto fenotípico mediante alterações no gene *penB* somente é aparente em isolados com alguma alteração em *mtrR*, que resulta em superexpressão da bomba de efluxo MtrCDE, e alterações no gene *penA* (OLESKY et al., 2006; SHAFER; FOLSTER, 2006; THAKUR et al., 2014). Essa associação de alterações *penB/mtrR/penA* foi observada nas amostras pertencentes ao ST1407. Todas possuem um mosaico *penA* do tipo XXXIV e uma deleção de uma adenina entre a região -10 e -35 da região promotora do gene *mtrR*. Esses

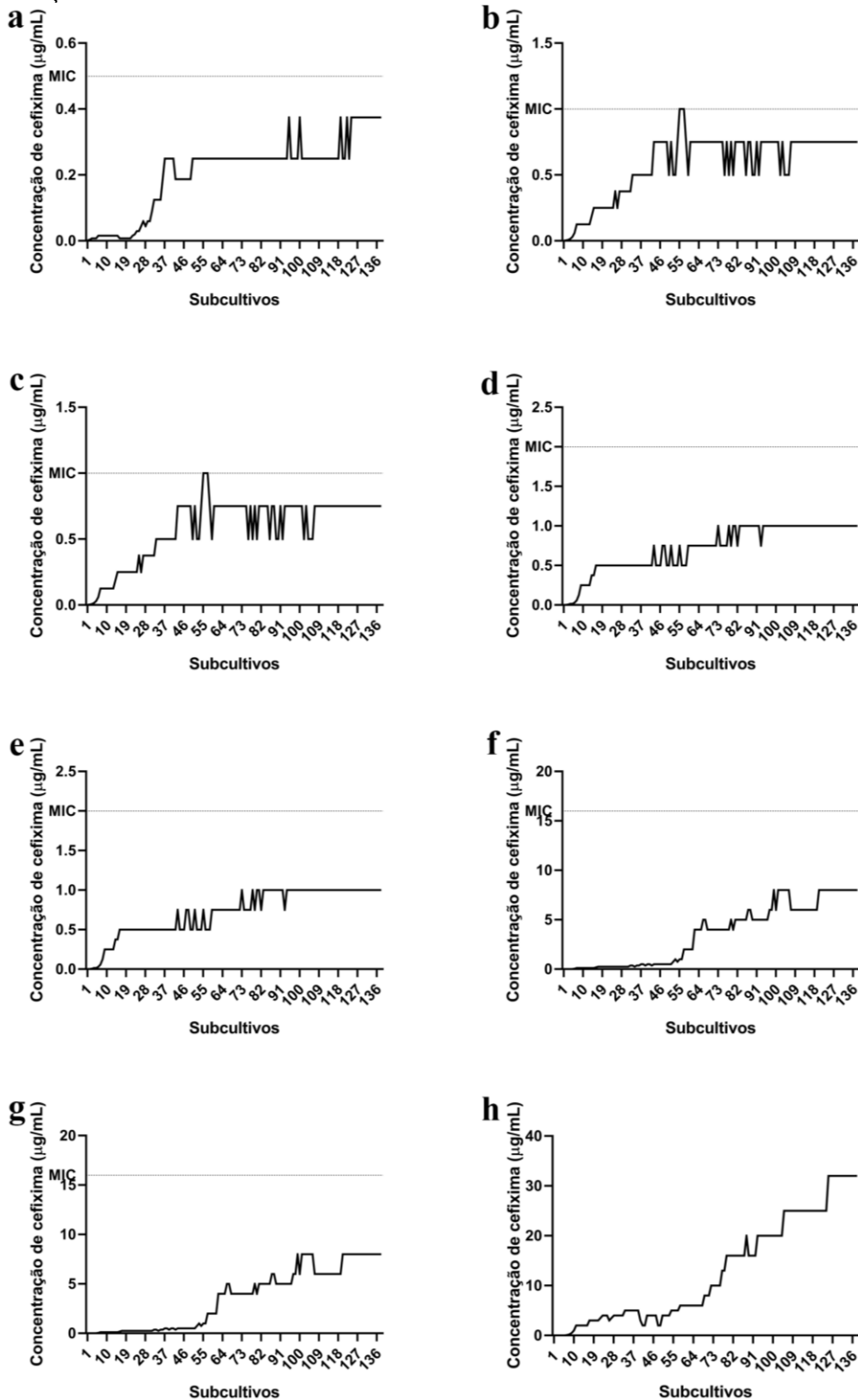
isolados apresentaram MIC próxima ao ponto de corte para resistência de acordo com o BrCAST, o que concorda com o padrão de mutações encontradas.

Já as cepas de referência da OMS utilizadas neste estudo, WHO F e WHO Y foram caracterizadas de forma fenotípica e genotípica por Unemo e colaboradores (2016). Elas foram selecionadas para o estudo por apresentarem perfil de sensibilidade bem distintos entre si: WHO F possui sensibilidade a todos os antimicrobianos e WHO Y possui resistência às ESC além de pertencer ao ST1407, mesmo ST dos isolados com diminuição de sensibilidade incluídos neste estudo.

### **6.1.2 Indução de resistência à cefixima e determinação da concentração inibitória mínima**

A indução de resistência à cefixima nos isolados de *N. gonorrhoeae* totalizou 138 subcultivos. Na Figura 5 estão representadas as curvas de crescimento para cada isolado no decorrer da indução.

Figura 5. Curva de crescimento dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae* durante a indução de resistência com cefixima.



Representação do crescimento dos isolados de *N. gonorrhoeae* em uma determinada concentração de cefixima, de acordo com cada subcultivo realizado. A linha contínua indica a MIC após a indução. Legenda: (a) M009; (b) M043; (c) M107; (d) M110; (e) M111; (f) M128; (g) WHO F; (h) WHO Y. A MIC para WHO Y, como foi > 32 µg/mL, não está representada na figura. Fonte: autor, 2021.

WHO Y, que possuía a MIC para cefixima antes da indução mais alta dentre todos os isolados (2 µg/mL), cresceu até uma concentração de cefixima de 32 µg/mL, enquanto o isolado que cresceu na menor concentração deste antimicrobiano foi WHO F (0,25 µg/mL), a qual possuía a MIC mais baixa dentre todos os isolados.

Os isolados após a seleção de resistência foram armazenados a -80°C por mais de dois meses. Depois desse período, a determinação da MIC após a indução de resistência foi realizada para os mesmos antimicrobianos em dois momentos diferentes: imediatamente após o descongelamento dos isolados e após sete dias de subcultivos em meio sem antimicrobiano. Os valores da MIC antes e após a indução da resistência estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima dos isolados antes e após a indução de resistência à cefixima.

		<b>M009</b>	<b>M043</b>	<b>M107</b>	<b>M110</b>	<b>M111</b>	<b>M128</b>	<b>WHO F</b>	<b>WHO Y</b>
<b>MIC antes</b>	Azitromicina	0,125 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	1 (S)
	Cefixima	0,016 (S)	0,125 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,004 (S)	2 (R)
	Ceftriaxona	0,004 (S)	0,06 (S)	0,008 (S)	0,008 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	0,001 (S)	1 (R)
	Ciprofloxacino	0,004 (S)	16 (R)	4 (R)	4 (R)	16 (R)	16 (R)	0,004 (S)	>32 (R)
	Penicilina	8 (R)	2 (R)	8 (R)	8 (R)	4 (R)	2 (R)	0,03 (S)	1 (I)
	Tetraciclina	16 (R)	4 (R)	0,5 (S)	0,25 (S)	2 (R)	2 (R)	0,25 (S)	4 (R)
<b>MIC após</b>	Azitromicina	0,06 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	0,06 (S)
	Cefixima	0,5 (R)	1 (R)	2 (R)	2 (R)	8 (R)	16 (R)	0,5 (R)	>32 (R)
	Ceftriaxona	0,06 (S)	0,5 (R)	0,25 (R)	0,25 (R)	4 (R)	4 (R)	0,06 (S)	32 (R)
	Ciprofloxacino	0,004 (S)	16 (R)	4 (R)	4 (R)	16 (R)	32 (R)	0,004 (S)	32 (R)
	Penicilina	0,5 (S)	4 (R)	8 (R)	0,5 (S)	8 (R)	8 (R)	0,06 (S)	8 (R)
	Tetraciclina	16 (R)	2 (R)	0,5 (S)	0,5 (S)	2 (R)	2 (R)	0,25 (S)	2 (R)
<b>MIC após 7 dias</b>	Azitromicina	0,125 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	0,06 (S)
	Cefixima	0,5 (R)	1 (R)	2 (R)	2 (R)	8 (R)	16 (R)	0,5 (R)	>32 (R)
	Ceftriaxona	0,125 (S)	0,5 (R)	0,25 (R)	0,25 (R)	4 (R)	4 (R)	0,06 (S)	32 (R)
	Ciprofloxacino	0,004 (S)	16 (R)	4 (R)	4 (R)	16 (R)	32 (R)	0,004 (S)	32 (R)
	Penicilina	1 (I)	8 (R)	16 (R)	1 (I)	16 (R)	8 (R)	0,125 (S)	16 (R)
	Tetraciclina	16 (R)	4 (R)	0,5 (S)	0,5 (S)	4 (R)	4 (R)	0,25 (S)	4 (R)

Os valores representam a concentração inibitória mínima dos isolados para cada antimicrobiano. Entre parênteses encontra-se o perfil de sensibilidade de acordo com os pontos de corte do BrCAST. Legenda: R (vermelho): resistente; I (laranja): sensibilidade intermediária; S (verde): sensível. Fonte: autor, 2021.



A MIC dos isolados após a indução de resistência foi condizente com a concentração de cefixima na qual estavam crescendo ao final dos subcultivos, visto que seu valor ficou acima desta concentração para todos os isolados. Além disso, não foi verificada diminuição da MIC para cefixima em nenhum isolado após sete dias de subcultivos em meio sem antimicrobiano nos isolados após indução, o que sugere uma estabilidade das alterações sofridas com a indução utilizando este antimicrobiano.

Para cefixima, ocorreu um aumento da MIC tal que todos os isolados que eram sensíveis tornaram-se resistentes, tanto nos critérios do CLSI (sensível  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ ) quanto nos critérios do BrCAST (sensível  $\leq 0,125$   $\mu\text{g/mL}$ ). A menor variação da MIC foi observada no isolado M043, com aumento de 8 vezes da MIC inicial, enquanto o maior aumento foi observado no isolado M128, de 128 vezes. A cepa de referência WHO Y, o único isolado já resistente antes do processo de indução, apresentou uma MIC maior do que 32  $\mu\text{g/mL}$ .

De forma geral, ocorreu uma variação da MIC para os antimicrobianos cefixima e ceftriaxona, enquanto para ciprofloxacino, tetraciclina e penicilina a MIC se manteve estável. Cefixima e ceftriaxona são antimicrobianos da classe de  $\beta$ -lactâmicos. Mais especificamente, fazem parte do grupo das cefalosporinas, as quais diferem do antimicrobiano penicilina por apresentarem alterações em sua estrutura química. Dessa forma, apesar de pertencerem à mesma classe de antimicrobianos e compartilharem do mesmo mecanismo de ação, mutações em determinantes de resistência dessa classe podem conferir resistência às cefalosporinas e sensibilidade à penicilina e vice-versa (TOOKE et al., 2019). Por isso, a indução utilizando cefixima pode não ter efeito sobre a MIC de penicilina. Foi verificada uma redução da MIC para penicilina nos isolados M009 e M110, sendo que, de resistentes, passaram a ser sensíveis a este antimicrobiano. O isolado M110, que possuía plasmídeo carreador do gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, perdeu este plasmídeo ao final dos subcultivos. Plasmídeos são elementos genéticos móveis que geralmente trazem uma vantagem para a bactéria, como por exemplo, determinantes de resistência a antimicrobianos. Sob condições sem pressão seletiva, a presença do plasmídeo pode não ser mais uma vantagem para a célula bacteriana, podendo sofrer a perda deste elemento durante a divisão celular (PONCIANO et al., 2007). Já a WHO Y, que possuía uma sensibilidade intermediária à penicilina, ficou resistente a este antimicrobiano após a indução (MIC = 8  $\mu\text{g/mL}$ ). De forma interessante, foi observada uma redução pontual em WHO Y de quatro concentrações para azitromicina após a indução. Essa redução não interferiu no perfil de sensibilidade do isolado, que já era considerado sensível antes do processo de indução.

Um estudo conduzido por Gong e colaboradores (2016) utilizou cinco cepas de referência WHO e um isolado clínico e realizou a indução de resistência utilizando ceftriaxona. Apenas uma cepa de referência (WHO D) adquiriu resistência após 136 subcultivos, aumentando a MIC para 1 µg/mL (MIC inicial de 0,016 µg/mL). WHO D possuía *penA* XII (não mosaico), deleção de adenina na região promotora de *mtrR* e troca de aminoácido L421P em PBP1 (GONG et al., 2016). Isso pode demonstrar uma menor capacidade de indução de resistência à ceftriaxona *in vitro*.

### 6.1.3 Mutações no genoma dos isolados após indução de resistência com cefixima

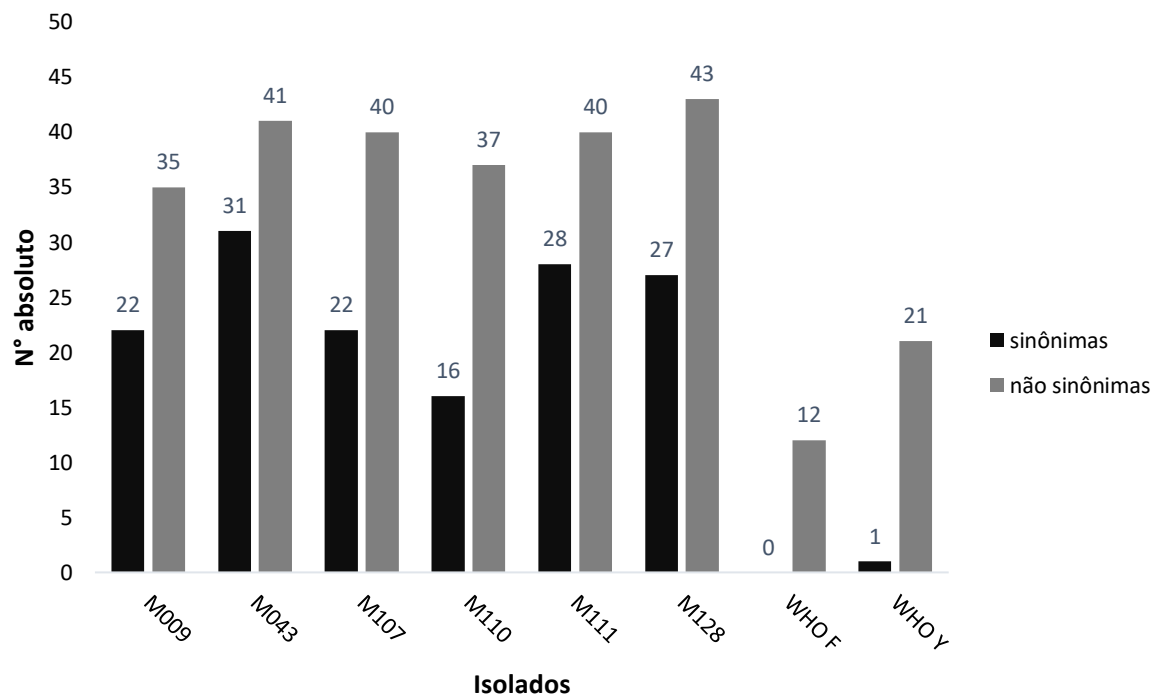
A maioria dos determinantes e mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae* já estão bem caracterizados (UNEMO; RIO; SHAFER, 2016; UNEMO; SHAFER, 2014). Alguns estudos têm utilizado dados do sequenciamento do genoma total para prever a sensibilidade ou resistência e até mesmo a MIC aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae* e outras bactérias (DEMCZUK, Walter et al., 2016; EYRE et al., 2017; 2019). As principais aplicações dessa abordagem incluem a caracterização da base genética da resistência ou a evidência de predisposição para desenvolvimento da resistência, principalmente como parte de programas de vigilância nacional e internacional (EYRE et al., 2019). Esses estudos evidenciam uma concordância entre os determinantes de resistência e a MIC. Apesar disso, informações sobre a presença de determinantes de resistência ainda não conhecidos ou novas mutações em determinantes já caracterizados são perdidas nessa abordagem.

A análise de alterações, sejam SNPs, inserções ou deleções, no genoma total de *N. gonorrhoeae* após o estudo de indução de resistência à cefixima, pode auxiliar na descoberta de novas mutações em genes que podem estar envolvidos com a resistência às ESC. A fim de determinar as alterações no genoma dos isolados de *N. gonorrhoeae* após a indução de resistência utilizando cefixima, foi realizado o chamamento de variantes, comparando o genoma dos isolados antes e após a indução.

Na Figura 6 está representado o total de mutações: SNPs e inserções/deleções (INDEL) para cada um dos isolados. O isolado M043 apresentou a maior quantidade de mutações (72) enquanto a cepa de referência WHO F apresentou a menor quantidade (12). Nota-se claramente que as cepas de referência incluídas no estudo possuem menos alterações do que os isolados clínicos. Os genomas das cepas de referência não foram sequenciados antes da indução, uma vez que os dados de sequenciamento estão disponíveis em bases de dados públicas. Esses

isolados foram sequenciados utilizando a plataforma PacBio RS II (Pacific Biosciences, CA, USA) e apresentaram uma cobertura de montagem de 168x para WHO F e 186x para WHO Y, números consideravelmente maiores do que a cobertura de montagem dos outros isolados deste estudo. Logo, a cobertura de montagem pode ter impactado na quantidade total de mutações encontradas. Os dados de qualidade das leituras brutas e as métricas da montagem dos isolados antes da indução estão nos APÊNDICES A e C, respectivamente.

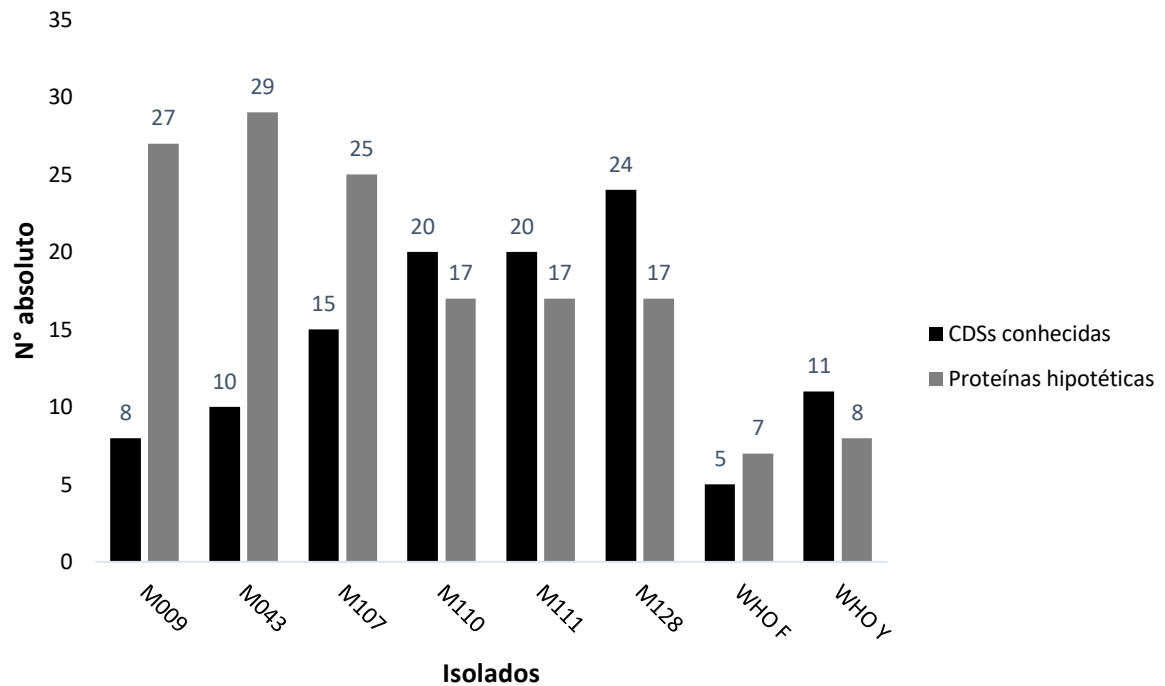
Figura 6. Número total de mutações em cada isolado, diferenciadas entre sinônimas e não sinônimas.



Fonte: autor, 2021.

A quantidade de mutações não sinônimas, com mudança de quadro de leitura ou códon de parada e que, portanto, podem impactar na formação e na função da proteína está representada na Figura 7.

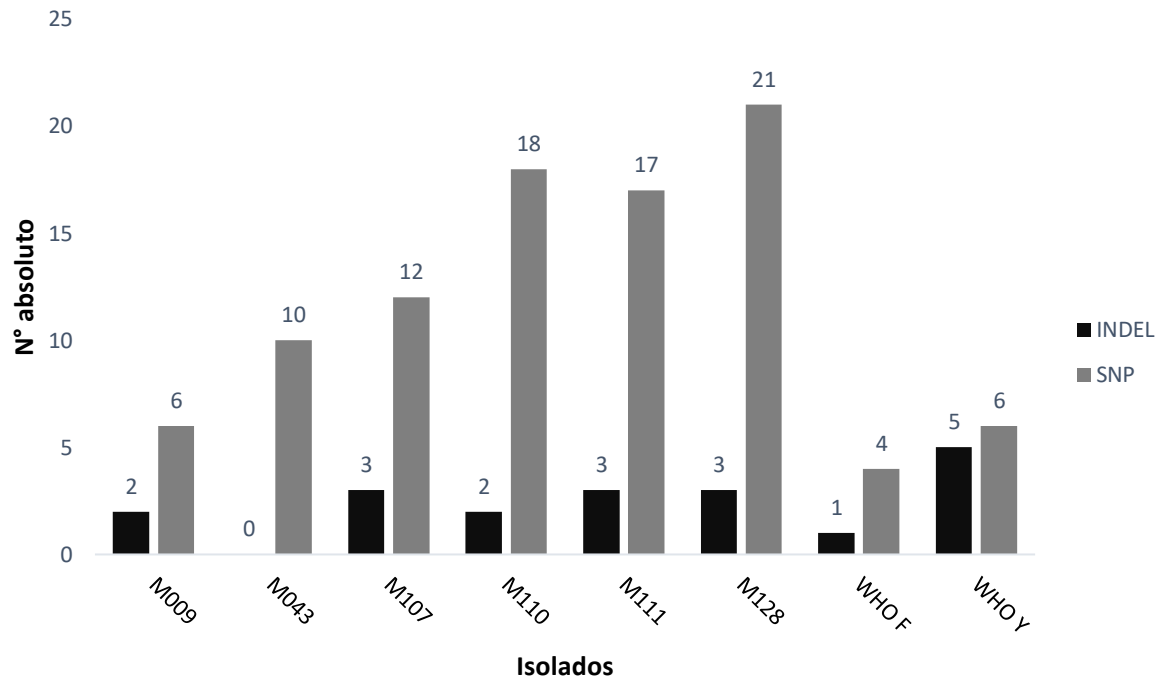
Figura 7. Mutações não sinônimas em sequências codificadoras e proteínas hipotéticas.



Legenda: CDS, sequência codificadora. Fonte: autor, 2021.

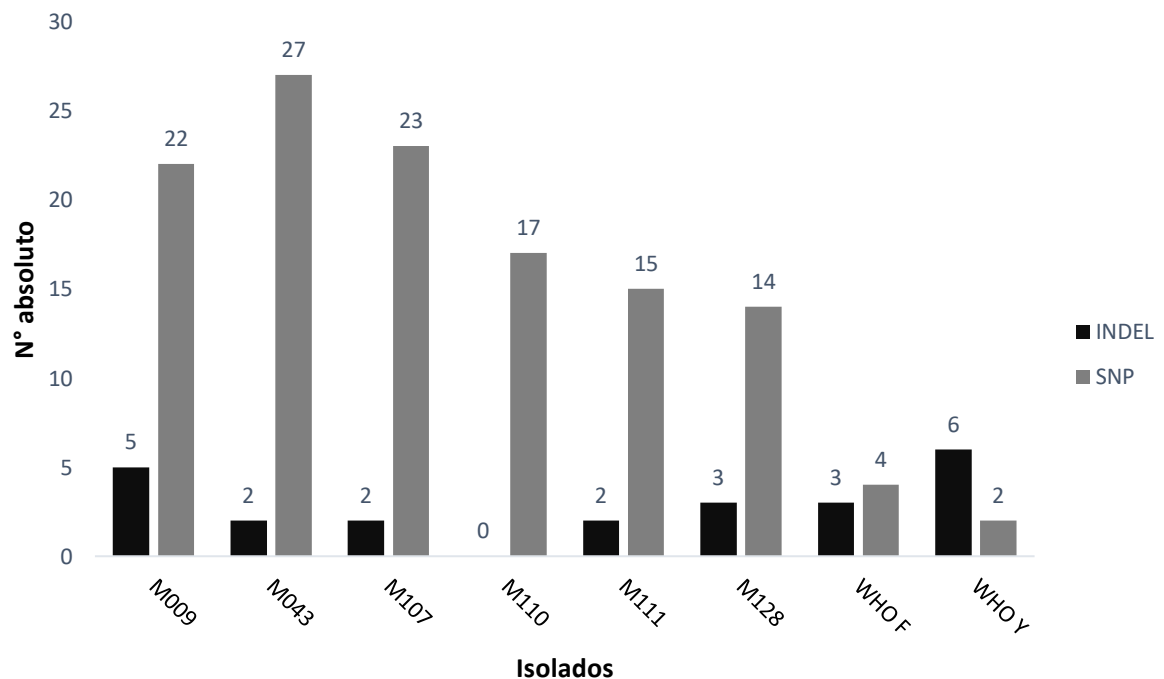
As Figuras 8 e 9 representam o tipo de alteração encontrado nas sequências codificadoras com uma função conhecida e nas proteínas hipotéticas. O tipo de mutação mais comumente encontrada nos isolados foram mutações do tipo SNP.

Figura 8. Quantidade de polimorfismos de único nucleotídeo e inserções/deleções em sequências codificadoras conhecidas.



Legenda: INDEL, inserção/deleção; SNP, polimorfismo de único nucleotídeo. Fonte: autor, 2021.

Figura 9. Quantidade de polimorfismos de único nucleotídeo e inserções/deleções em proteínas hipotéticas.



Legenda: INDEL, inserção/deleção; SNP, polimorfismo de único nucleotídeo. Fonte: autor, 2021.

O determinante de resistência primário às ESC em *N. gonorrhoeae* apresenta-se na forma de alterações na PBP2, isso porque essa proteína é o alvo de inibição desse grupo de antimicrobianos (CÁMARA et al., 2012; TOMBERG et al., 2010; UNEMO et al., 2011; UNEMO; SHAFER, 2014; ZHAO et al., 2009). A diminuição de sensibilidade ou resistência às ESC acontece com maior frequência em isolados que possuem de 60 a 70 alterações de aminoácidos em PBP2, adquiridas por meio de recombinação parcial com espécies comensais de *Neisseria* (LINDBERG et al., 2007; OHNISHI et al., 2011; UNEMO; NICHOLAS, 2012). Na Figura 10 estão representadas as trocas de aminoácidos dos isolados deste estudo em relação à referência e em destaque as mudanças de cada isolado após a indução de resistência. Foram incluídos nessa figura, isolados com resistência às ESC com diferentes tipos de *penA* e diferentes STs. Na Tabela 5 encontram-se as características dos isolados com resistência às ESC que foram utilizados para comparação da sequência de aminoácidos da proteína PBP2. Além da resistência às ESC, esses isolados foram escolhidos por apresentarem diferentes tipos de *penA*.



Tabela 5. Características dos isolados incluídos na comparação de PBP2 com os isolados deste estudo.

Isolado	Referência	NG-MAST	Tipo de <i>penA</i>	MIC cefixima	MIC ceftriaxona
H041	(OHNISHI et al., 2011)	4220	37	4	2
A8806	(LAHRA; RYDER; WHILEY, 2014)	4220	64	NI	0,5
Áustria	(UNEMO, M. et al., 2011)	1407	XXXIV + T534A	1	0,5
GU140106	(DEGUCHI et al., 2016)	6543	XXXIV + A311V, T483S	2	0,5
FC428	(NAKAYAMA et al., 2016)	3435	60	NI	0,5

Legenda: NI: Não informado. Valor da MIC em µg/mL. Fonte: autor, 2021.

Neste estudo, somente os isolados pertencentes ao ST1407 demonstraram possuir a forma de mosaico de *penA*, enquanto os outros isolados clínicos possuíam a inserção de ácido aspártico (D) na posição 345 de PBP2. Após a indução de resistência com cefixima, a troca de aminoácidos em PBP2 foi observada em quatro isolados: WHO F e M009, os quais não possuem a forma de mosaico, e nos isolados M111 e M128, que pertencem ao ST1407. O isolado M128 apresentou a maior quantidade de modificações em PBP2 após indução, seguido do isolado M111. Dentre os isolados clínicos, esses foram os que apresentaram o maior valor de MIC, tanto à cefixima, quanto à ceftriaxona.

A proteína PBP2 faz parte da classe B de proteínas ligadora de penicilina, as quais possuem a atividade de catalisar a última etapa da formação de peptidoglicano por meio de ligações cruzadas entre peptídeos (GHUYSEN, 1991). O sítio ativo de PBP2, no qual ocorre a ligação dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos por meio de uma reação de acilação, contém três motivos conservados: SxxK, o qual contém os aminoácidos Ser-310 e Lis-313 (hélice  $\alpha$ 2); SxN, o qual contém os aminoácidos Ser-362 e Asn-364 (entre as hélices  $\alpha$ 4 e  $\alpha$ 5); e KTG, compreendendo os aminoácidos nas posições Lis-497, Tre-498 e Gli-499 (folha  $\beta$ 3) (POWELL et al., 2009). A presença do mosaico *penA* associado ao surgimento de mutações próximas a esses motivos que fazem parte do sítio ativo da enzima, alteram a conformação da proteína restringindo a ligação do antimicrobiano ou impedem mudanças conformacionais que são



necessárias para acilação pelos  $\beta$ -lactâmicos, sendo responsáveis pelo surgimento de isolados resistentes às ESC (OSAKA et al., 2008; POWELL et al., 2009). O primeiro isolado apresentando alto nível de resistência às ESC foi relatado no Japão (H041) (OHNISHI et al., 2011; UNEMO; SHAFER, 2014). Esse isolado apresentou valores de MIC de 2  $\mu\text{g/mL}$  para ceftriaxona e 4  $\mu\text{g/mL}$  para cefixima. Um estudo posterior demonstrou que as mutações A311V (encontrada neste estudo nos isolado M009 e M128), V316P e T483S resultaram em um significativo aumento na MIC para cefixima e ceftriaxona (TOMBERG et al., 2013; UNEMO; SHAFER, 2014). De fato, a alteração A311V está presente na maioria dos isolados com resistência às ESC (Figura 6) e emergiu nos isolados M009 e M128 após a indução de resistência, o que provavelmente contribuiu para o aumento da MIC para as ESC nesses isolados.

A troca de aminoácidos T534A, encontrada neste estudo somente no isolado M111, foi descrita na Áustria em um isolado pertencente ao ST1407 com mosaico de *penA* do tipo XXXIV, o qual causou falha de tratamento com o uso de cefixima. Experimentos de transformação confirmaram que apenas essa nova mutação foi responsável pela resistência às ESC (UNEMO et al., 2011). Este isolado austríaco também possuía deleção na região promotora de *mtrR*, mutações G120K e A121N em PorB e L421P em PBP1, assim como o isolado M111. Porém, o isolado austríaco apresentou MIC mais baixa do que M111 (1  $\mu\text{g/mL}$  para cefixima e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para ceftriaxona).

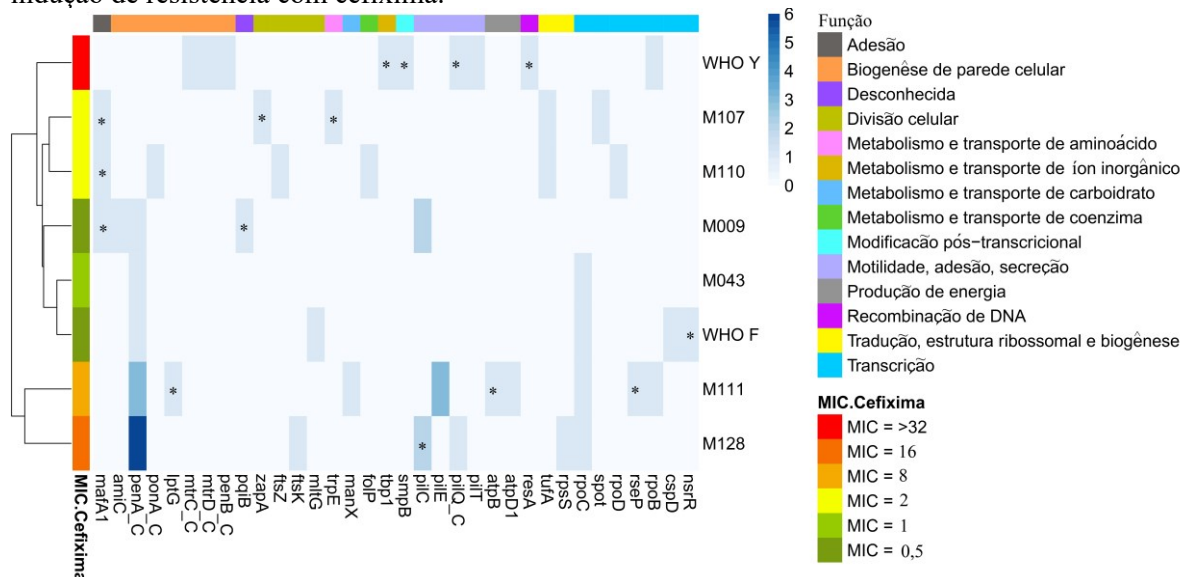
A mutação mais frequente nos isolados foi a troca de uma prolina por uma serina na posição 551 de PBP2 (P551S). Essa alteração foi observada na WHO F e nos isolados pertencentes ao ST1407. Nos isolados com resistência às ESC, essa mutação é mais frequentemente observada naqueles que não possuem o mosaico do gene *penA*. A análise cinética da reação de acilação de  $\beta$ -lactâmicos no sítio ativo da proteína PBP2 indica que duas mutações (P551S e F504L) são responsáveis pela redução no índice de acilação, o que reduz a afinidade de formação do complexo PBP2-antimicrobiano (POWELL et al., 2009). Essas mutações geralmente são encontradas em PBP2 do tipo não mosaico, entretanto, emergiram nos isolados pertencentes ao ST1407 com *penA* do tipo XXXIV após indução.

De forma interessante, os isolados com MIC mais elevada às ESC apresentaram trocas de aminoácidos não descritas até então: M128 apresentou quatro trocas de aminoácidos A318V, R356H, N506H e G546A; e o isolado M111 apresentou a mutação A488V, também não descrita anteriormente. Essas mutações aparecem próximas aos motivos conservados e que fazem parte do sítio ativo de PBP2. Além disso, a presença das mutações T534A no isolado M111 e A311V

no isolado M128, associadas à mutação P551S, cuja ocorrência simultânea em isolados com resistência às ESC não é comum, podem ser responsáveis pela MIC mais elevada nos isolados deste estudo (M111 e M128). Destaca-se que além das mutações adquiridas em *penA*, esses isolados já possuíam mutações em *PorB1b* e na região promotora de *mtrR*, as quais auxiliam para o aumento da MIC. A contribuição das mutações após indução encontradas nos isolados M111 e M128 em PBP2, bem como a aptidão do microrganismo frente a essas alterações ainda necessitam ser investigadas. A forma como *N. gonorrhoeae* alcança um nível de distinção molecular, na qual mutações diminuem a sensibilidade para as ESC sem comprometer a função natural da enzima, permanece um assunto de considerável interesse.

Além de mutações no gene *penA*, as quais foram encontradas, pós indução, na maioria dos isolados deste estudo, mutações pontuais em genes com contribuição na resistência às ESC e em outros genes foram observadas. A Figura 11 apresenta um *heatmap* de todas as mutações que acarretaram troca de aminoácidos, mudança de quadro de leitura ou códon de parada em sequências codificadoras conhecidas. Todas as mutações dos genes representados na nessa figura encontram-se no Apêndice D.

Figura 11. Presença de mutações em sequências codificadoras conhecidas nos isolados após a indução de resistência com cefixima.



Para construção da figura foi utilizado o programa R versão 4.0.2, com o pacote pheatmap versão 1.0.12. Isolados e genes estão representados em linhas e colunas, respectivamente. A escala de cor azul representa a quantidade de mutações adquiridas. A barra lateral esquerda representa o valor de concentração inibitória mínima (MIC) para cefixima em  $\mu\text{g/mL}$ . A barra superior indica a função de cada gene. Legenda: \_C: determinantes relacionados com resistência às cefalosporinas de espectro estendido (ESC); \*genes que apresentaram mudança de janela de leitura. Fonte: autor, 2021.

Pode-se observar uma grande variação no padrão de mutações encontradas após a indução com cefixima, sendo que nenhum gene sofreu alteração em todos os isolados. Os isolados M111 e M128 foram agrupados pela maior quantidade de mutações encontradas no gene *penA*. Nota-se também o agrupamento dos isolados M107 e M110, os quais pertencem ao ST338. Além disso, houve um agrupamento dos isolados WHO F, M009 e M043, os quais apresentaram os menores valores de MIC para cefixima. De certa forma, essa variação de mutações nos isolados demonstra a aquisição de resistência às ESC por diferentes mecanismos. WHO Y, que não apresentou nenhuma mutação em PBP2, mas que mesmo assim aumentou a MIC para as ESC, sofreu mutações em alguns genes conhecidos de resistência a esses antimicrobianos. Este isolado apresentou mutação na principal porina de membrana externa em *N. gonorrhoeae* PorB1b (A26V) e nas proteínas MtrC (S23P) e MtrD (M570K) que constituem a bomba de efluxo MtrCDE.

As mutações que têm sido associadas à diminuição da permeabilidade dos antimicrobianos para o interior de *N. gonorrhoeae* são substituições de aminoácidos nas posições 120 e 121 de PorB1b (OLESKY; HOBBS; NICHOLAS, 2002; UNEMO; SHAFER, 2014). O impacto que essas mutações causam na resistência às cefalosporinas em isolados clínicos apenas torna-se aparente com a superexpressão da bomba de efluxo MtrCDE (OLESKY et al., 2006; SHAFER; FOLSTER, 2006; UNEMO; SHAFER, 2014), fazendo com que haja uma diminuição da entrada do antimicrobiano e um aumento de sua saída. A mutação em *penB* observada neste estudo em WHO Y não é descrita na literatura relacionando-a o aumento da MIC para ESC. Por isso, experimentos complementares são necessários para comprovar se existe algum efeito dessa mutação na resistência às ESC.

MtrD, em conjunto com a proteína de fusão de membrana (MtrC) e a proteína de canal de membrana externa (MtrE), exportam antimicrobianos para fora da célula bacteriana (DELAHAY et al., 1997; HAGMAN et al., 1995). Mutações em isolados clínicos que causam resistência a diversos antimicrobianos por meio dessa bomba de efluxo estão associadas a alterações em seu repressor (*mtrR*) (HAGMAN et al., 1995; UNEMO; SHAFER, 2014; ZARANTONELLI et al., 1999). Essas alterações compreendem geralmente uma deleção de adenina na região promotora de *mtrR* (encontrada nos isolados ST1407 deste estudo) e troca de aminoácido G45D na proteína MtrR (HAGMAN et al., 1995; UNEMO; SHAFER, 2014; ZARANTONELLI et al., 1999). Em 2018, verificou-se de forma experimental que a presença de uma série de mutações na bomba de efluxo *mtr* foi associada com resistência à azitromicina (WADSWORTH et al., 2018). Assim, como acontece no gene *penA*, essa estrutura do tipo

mosaico foi adquirida de outras espécies de *Neisseria* (JOHNSON et al., 2003; MCLEAN et al., 2004). A proteína MtrD contém o sítio de ligação ao antimicrobiano e, em um estudo recente, foi demonstrado que o aminoácido M570 encontra-se nesse sítio, mas é conservado em relação ao mesmo sistema de efluxo encontrado em *Escherichia coli* (LYU et al., 2020). Até o presente momento, não foram encontrados na literatura casos de resistência em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* devido a mutações pontuais em MtrC e MtrD, como as encontradas neste estudo. Entretanto, essas mutações em PorB e MtrC/D, associadas às mutações que WHO Y possuía antes da indução podem ter contribuído para o aumento da MIC.

WHO Y, bem como o isolado M128, apresentaram alteração em PilQ. M128 apresentou a mutação G590D enquanto em WHO Y houve a inserção de uma guanina entre os nucleotídeos 1566 e 1567, o que resultou em uma mudança no quadro de leitura. PilQ pertence a uma família de proteínas de membrana externa chamadas secretinas. Em *N. gonorrhoeae*, PilQ é a única secretina e atua na formação de um canal ou poro por onde a *pilus* é externalizada (DRAKE; KOOMEY, 1995; TØNJUM et al., 1998). Mutações específicas em PilQ, como a mutação E666K, podem levar a alteração da permeabilidade de antimicrobianos como penicilina e tetraciclina, mas não parece ter efeito sobre a MIC das ESC (ROPP et al., 2002; UNEMO; SHAFER, 2014; ZHAO et al., 2005; 2009). Mutação com mudança no quadro de leitura em *pilQ* também foi observada *in vitro* por Johnson e colaboradores (2014), e resultou em aumento da MIC para ceftriaxona em 10 vezes (JOHNSON et al., 2014). Isso evidencia a contribuição de mutação em *pilQ* na resistência às ESC. Dessa forma, a mutação de *pilQ* observada em WHO Y pode ter contribuído ao aumento da MIC para penicilina e ESC. Entretanto, uma vez que o processo de adesão do gonococo às células epiteliais ocorre por meio de adesão mediada por *pili* do tipo IV, a expressão dessa proteína é essencial para a patogênese de *N. gonorrhoeae*. Dessa forma, a indução com cefixima ocasionou um aumento da MIC em WHO Y. Em contrapartida pode ter transformado este isolado em não competente para infecção.

De forma interessante, os isolados M107 e M110 aumentaram em 125 vezes a MIC para cefixima. Esse aumento foi menor para ceftriaxona (31,25 vezes). Apesar deste estudo não ter focado em mutações nas regiões intergênicas, foi realizada uma busca por alterações na região promotora de *mtrR* e nenhuma mutação foi encontrada em M107 e M110. Esses isolados não possuíam mutações nos principais determinantes de resistência às ESC antes da indução. Após a indução, M110 adquiriu uma mutação no gene *ponA* (PBP1), que resultou em uma troca de aminoácido A615V. Em isolados clínicos, a contribuição de PBP1 para aumento da MIC

para as ESC só é observada quando associada a outros determinantes, *mtrR* e *penA*, uma vez que as ESC possuem uma maior afinidade por PBP2 (ZHAO et al., 2009). Portanto, somente essa alteração não explicaria o aumento da MIC no isolado M110. No estudo conduzido por Gong e colaboradores (2016), WHO D apresentou a mutação A501V em PBP2 (não mosaico), a qual contribuiu para a resistência às ESC (GONG et al., 2016; ITO et al., 2005; OSAKA et al., 2008; STABLER et al., 2010). Entretanto, quando *penA* foi transformado no mesmo isolado antes da indução, foi observado um menor aumento da MIC em relação ao aumento na indução. No estudo de Gong, foi encontrada uma mutação na subunidade de um transportador do tipo ABC relacionado à divisão celular (gene *ftsX*) que aumentou a MIC para ceftriaxona tanto em isolados sem a mutação A501V, quanto em isolados com essa mutação (GONG et al., 2016). Nos isolados M107 e M110 foi observada mutação em dois genes que estão envolvidos na divisão celular. Em M107, ocorreu uma inserção de guanina entre os nucleotídeos 299 e 300 resultando em um códon de parada no gene *zapA*, enquanto M110 apresentou uma troca de aminoácido A318V na proteína FtsZ. O gene *ftsZ* é parte de um grupo de genes envolvidos tanto na divisão celular quanto na síntese de peptidoglicano, que atua iniciando a divisão celular com a formação de um polímero chamado de anel Z. Essa estrutura dá origem à formação de uma nova célula bacteriana (AYALA et al., 1994). Já a proteína ZapA é um regulador de *ftsZ*, que atua inicialmente auxiliando na formação do polímero e depois estabiliza essa formação (LOW; MONCRIEFFE; LÖWE, 2004). A deleção de *zapA* em *E. coli* não resulta em alteração fenotípica, mas pode ser letal quando os níveis de FtsZ estão reduzidos (JOHNSON et al., 2004). Assim, a mudança do quadro de leitura observada no gene *zapA* do isolado M107, associada ao ambiente de pressão seletiva a um antimicrobiano que atua inibindo a formação de parede celular, pode fazer com que haja um favorecimento da divisão bacteriana. Como este mecanismo não é observado em isolados clínicos circulantes no mundo, mais estudos serão necessários para elucidar os mecanismos que causaram resistência nestes isolados. Apesar disso, este mecanismo parece estar mais envolvido com a resistência à cefixima do que com a ceftriaxona.

Por fim, uma série de mutações em transposases foram observadas nos isolados clínicos, mas não foram observadas nas cepas de referência utilizadas neste estudo (APÊNDICE D).

ST1407 já havia sido descrito no Brasil, com o *penA* do tipo mosaico XXXIV e uma MIC para cefixima acima do que os isolados deste estudo. Esses isolados foram identificados no Rio de Janeiro, o qual desde 2015 já havia alterado o tratamento de ciprofloxacino mais

azitromicina para ceftriaxona mais azitromicina (BRASIL, 2015). No Brasil, esse ST foi o segundo mais prevalente de acordo com o primeiro estudo nacional de vigilância de resistência em *N. gonorrhoeae* (GOLPARIAN, 2020). Os isolados M107 e M110 (NG-MAST ST338) foram selecionados para este estudo por serem o ST mais prevalente na região da grande Florianópolis, de acordo com Golfetto, 2018. Mais tarde, verificou-se que este ST é o mais prevalente no Brasil (GOLPARIAN, 2020). Esses isolados não possuem a forma de mosaico do tipo *penA* e não apresentaram nenhuma mutação nesse gene, mas após a indução aumentaram a MIC de cefixima para 2 µg/mL e de ceftriaxona para 0,25 µg/mL, por meio de outros mecanismos que precisam ser investigados.

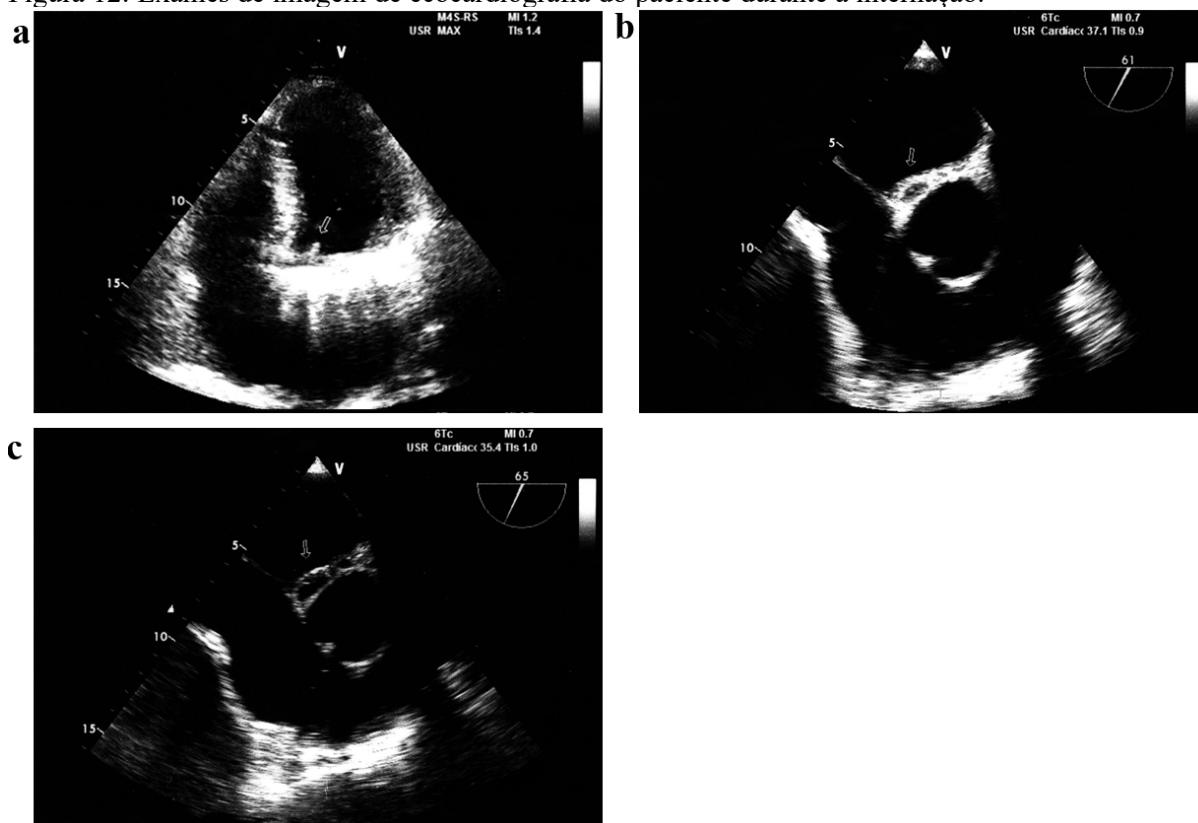
## 6.2 *Neisseria elongata*

### 6.2.1 Relato do caso e revisão dos casos publicados

Um paciente do gênero masculino com 71 anos completos foi admitido no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina HU/UFSC/EBSERH (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) após apresentar febre intermitente por oito dias, queda do estado geral, inapetência, tontura e sudorese noturna. Paciente possui histórico de hipertensão arterial sistêmica, hiperuricemia, câncer de tireoide papilífero e cardiopatia com duas trocas valvares em 2009 e presença de marca-passo cardíaco (2013). Relata ter sido submetido a procedimento odontológico recente, sendo tratado com amoxicilina. Na admissão apresentou-se em bom estado geral, corado, hidratado e eupneico. Seus sinais vitais após 24 horas da admissão eram de pressão arterial (PA) 100-131/72-94 mmHg, frequência cardíaca (FR) 86-104 bpm, frequência respiratória de 18-20/min e temperatura de 36,1-36,7 °C. Possuía uma contagem de leucócitos totais de 16.360/mm<sup>3</sup> (74,7% de neutrófilos segmentados e 10% de bastonetes), contagem de plaquetas de 112.000/mm<sup>3</sup> e proteína C reativa de 139,0 mg/L. Ao primeiro dia de internação verificou-se por ecocardiograma transtorácico: prótese metálica em posição mitral e aórtica normofuncionantes; imagem sugestiva de vegetação na prótese aórtica em sua face ventricular; aumento moderado do átrio esquerdo; dilatação leve da aorta ascendente; e ventrículo esquerdo com hipertrofia leve e boa função contrátil (Figura 12.a). Foi iniciada administração de penicilina 3.000.000 UI endovenosa (EV) e foram coletados quatro frascos de hemocultura: dois para aerobiose e dois para anaerobiose. Dentro de 19 horas de incubação (BACTEC™ FX/BD©), os dois frascos de aerobiose foram positivos. Após verificação da

presença de bacilos Gram-negativos na amostra, suspendeu-se o uso de penicilina e iniciou-se tratamento com gentamicina (90 mg EV 2x ao dia) e ceftriaxona (2 g EV 1x ao dia). A bactéria isolada foi identificada por espectrometria de massa (VITEK® MS/bioMérieux©) como *Neisseria elongata* e confirmada como *Neisseria elongata* subesp. *nitroreducens* por meio de provas bioquímicas. Durante o período de internação apresentou melhora da astenia, sem novas queixas ou intercorrências, persistindo com sudorese noturna. Após três dias, não se observou a imagem de vegetação que havia no exame anterior, porém observou-se imagem sugestiva de abscesso em formação na base da prótese aórtica (Figura 12.b). No décimo dia de internação, verificou-se presença de abscesso de aproximadamente 2,4x1 cm na raiz da aorta por meio de ecocardiograma transesofágico (Figura 12.c), e indicou-se a necessidade de intervenção cirúrgica. Após 11 dias de internação e afebril há três dias, o paciente apresentou dor em hipocôndrio esquerdo, sudorese profusa, taquipneia e hipotensão. Estava responsivo, mas letárgico, com PA 50/30 mmHg e FC de 45 bpm. Paciente evoluiu com duas paradas cardiorrespiratórias (19 e 4 min) de ritmo não chocável, sendo realizada intubação orotraqueal, com retorno da circulação espontânea em altas doses de noradrenalina (120 mL/hora). Em aproximadamente duas horas após piora do estado, foi constatado o óbito do paciente por choque cardiogênico como consequência de EI.

Figura 12. Exames de imagem de ecocardiografia do paciente durante a internação.



(a) ecocardiografia transtorácica mostrando imagem sugestiva de vegetação pediculada e móvel na face ventricular da prótese metálica aórtica; (b) ecocardiografia transesofágica mostrando imagem sugestiva de abscesso em formação na base da prótese aórtica; (c) ecocardiografia transesofágica demonstrando presença de abscesso na raiz da aorta. Fonte: imagens gentilmente cedidas pelo Setor de Cardiologia do HU/UFSC/EBSERH, 2020.

A partir de uma busca na literatura de casos definitivos ou de possível endocardite infecciosa (EI) causada por *N. elongata*, chegou-se a um total de 23 trabalhos publicados até 2016 e já revisados por Hsiao e colaboradores (2008) e Samannodi e colaboradores (2016). Após isso, foi incluído mais um relato de caso publicado em 2016 (ROSSELLA et al., 2016) e outro relato de 2007 não revisado anteriormente (EVANS et al., 2007) (Tabela 6).



Tabela 6. Resumo dos relatos de caso de endocardite infecciosa causada por *Neisseria elongata*.

Referência	Idade (anos)	Fatores de risco	HCP	Subespécie	Achados Eco	Crítérios de Duke	Medicação/duração	Complicações	Cirurgia	Desfecho
(SIMOR; SALIT, 1983)	31	Procedimento dentário, PVM	6/6	<i>nitroreducens</i>	VM Veg	2 maiores	pen/2d gen/2d amp/4s	Abcesso de miocárdio, falha renal, FCC	SVM	alta hospitalar
(PEREZ, 1986)	57	DCR, RA, cateterização de EI	11/11	<i>nitroreducens</i>	nenhum	1 maior, 2 menores <sup>b</sup>	amp/43d tob/26d	FCC	SVA	alta hospitalar
(GARNER, J.; BRIANT, 1986)	31	PVM	NI	<i>nitroreducens</i>	VM Veg	1 maior, 3 menores	naf, gen, pen/65d	Derrame	Debridement	alta hospitalar
(GARNER, J.; BRIANT, 1986)	25	nenhum	6/6	<i>nitroreducens</i>	RM	2 maiores	naf, gen, pen/NI	FCC, falha renal	SVM	alta hospitalar
(ROSE; GROSSMAN; GILES, 1990)	65	nenhum	NS	<i>nitroreducens</i>	RA, RM	3 menores <sup>b</sup>	cro/4s	PTT, confusão, hemiparesia	nenhum	alta hospitalar
(KAPLAN; FLAHERTY, 1991)	82	Procedimento dentário, mixomatoso VM	4/5	<i>nitroreducens</i>	VM Veg, RM	2 maiores	cef/10d gen/16d amp/4s	FCC, falha renal	SVM	alta hospitalar
(KOCIUBA; MUNRO; DALEY, 1993)	33	Procedimento dentário, bicúspide VA	3/3	<i>nitroreducens</i>	VA Veg, RA, abcesso	2 maiores	pen/9d amp/4s gen/4s	abcesso do miocárdio, embolia sistêmica	SVA	alta hospitalar
(STRUILLOU; RAFFI; BARRIER, 1993)	27	PVM, infecção dentária	NS	<i>nitroreducens</i>	PVM	1 maior, 3 menores	cro/6s gen/3s	infarto esplênico, FCC	SVM	alta hospitalar
(ANDERSEN et al., 1995)	57	nenhum	6/6	<i>glycolytica</i>	VA Veg	2 maiores	pen/5s gen/5s	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
(IMPERIAL; JOHO; ALCID, 1995)	31	nenhum	2/2	<i>nitroreducens</i>	VM Veg	1 maior, 2 menores <sup>b</sup>	amp, gen, cro/4s	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar

Continuação Tabela 6

Referência	Idade (anos)	Fatores de risco	HCP	Subespécie	Achados Eco	Crítérios de Duke	Medicação/duração	Complicações	Cirurgia	Desfecho
(MEULEMAN et al., 1996)	74	infecção dentária, bioprostética VA	19/24	<i>nitroreducens</i>	nenhum	1 maior, 2 menores <sup>b</sup>	amp/6s gen/2s	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
(NAWAZ; HARDY; BONNEZ, 1996)	29	nenhum	3/5	<i>elongata</i>	VM Veg, RM	2 maiores	amp/3d van/3d cro/6s gen/6s	pseudoaneurisma braquial	remoção de pseudoaneurisma	alta hospitalar
(DOMINGUEZ, E. A.; SMITH, 1998)	50	válvula protética	NI	<i>nitroreducens</i>	VA Veg, abscesso subvalvar	1 maior, 4 menores	van, gen, amp/4s	derrame, HSA, abscesso subvalvar	SVA	alta hospitalar
(HOFSTAD; HOPE; FALSEN, 1998)	30	CHO	3/3	<i>nitroreducens</i>	nenhum	1 maior, 2 menores <sup>b</sup>	pen/2s net/2s cro/2s	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
(APISARNTHAN ARAK; DUNAGAN; DUNNE, 2001)	65	nenhum	2/2	<i>elongata</i>	VM Veg, RM	1 maior, 2 menores <sup>b</sup>	cro/2s	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
(HADDOW et al., 2003)	54	bicúspide VA, procedimento dentário	3/3	<i>nitroreducens</i>	VA Veg, abscesso, RA	2 maiores	cef/7s gen/4s	FCC, abscesso da raiz da aorta, abscesso do miocárdio	SVA	alta hospitalar
(PICU et al., 2003)	79	protética VA, dente infectado	3/3	<i>nitroreducens</i>	None	1 maior, 3 menores	cro/6s gen/2s	Azotemia	nenhuma	alta hospitalar

Continuação Tabela 6

Referência	Idade (anos)	Fatores de risco	HCP	Subespécie	Achados Eco	Crítérios de Duke	Medicação/duração	Complicações	Cirurgia	Desfecho
(HOSHINO et al., 2005)	7	Transposição da grande artéria após reparo de Rastelli, procedimento dentário	4/4	<i>nitroreducens</i>	None	1 maior, 3 menores	amp/2s gen/2s cro/6s	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
(EVANS et al., 2007)	70	VA prostética, síndrome de Klinefelter	3/3	<i>elongata</i>	SVA	NI	cef, gen/NI amo, gen/3s cro/6s	falha renal, acidose metabólica, fibrilação atrial	nenhuma	alta hospitalar
(HSIAO et al., 2008)	42	procedimento dentário	2/7	<i>glycolytica</i> <sup>a</sup>	VM Veg, RM	1 maior, 3 menores	pen/1s gen/1s cro/7s	infarto talâmico, infarto esplênico, abscesso cerebral	SVM	alta hospitalar
(HERBERT, 2014)	43	nenhum	2/2	<i>nitroreducens</i>	VM Veg	2 maiores	cip/7s	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
(YOO et al., 2014)	27	celulite	3/3	<i>nitroreducens</i>	VT Veg, DSV	2 maiores	cez/1d van/2s mer/4d	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
(OSUKA et al., 2015)	78	nenhum	2/3	<i>nitroreducens</i>	VA Veg, RA	1 maior, 3 menores	cro/2s amp/2s	nenhuma	SVA	alta hospitalar
(SAMANNODI et al., 2016)	56	viagem recente	2/2	<i>nitroreducens</i>	VA Veg, RA	2 maiores, 1 menor	cro/6s	FCC	SVA	alta hospitalar

Continuação da Tabela 6

Referência	Idade (anos)	Fatores de risco	HCP	Subespécie	Achados Eco	Crítérios de Duke	Medicação/duração	Complicações	Cirurgia	Desfecho
(ROSSELLA et al., 2016)	40	Síndrome de Marfan	NS	<i>nitroreducens</i>	PVM	1 maior, 3 menores	amo+cla/3d gen/2d cef/3d	nenhuma	nenhuma	alta hospitalar
Este caso (2018)	71	procedimento dentário, protético VA e VM	2/2	<i>nitroreducens</i>	VA Veg	1 maior, 3 menores	cro, gen/11d	abscesso na raiz da aorta	nenhuma	óbito

Legenda: EI, endocardite infecciosa; RA, regurgitação da aorta; VA, válvula aórtica; SVA, substituição de válvula aórtica; FCC, falha cardíaca congestiva; CHO, cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva; VM, válvula mitral; PVM, prolapso da válvula mitral; SVM, substituição da válvula mitral; RM, regurgitação mitral; NI, não informado; HCP, hemocultura positiva; DCR, doença cardíaca reumática; HSA, hemorragia subaracnóide; PTT, púrpura trombocitopênica trombótica; VT, válvula tricúspide; Veg, vegetação; DSV, defeito do septo ventricular; pen, penicilina; gen, gentamicina; amp, ampicilina; tob, tobramicina; naf, nafcilina; cro, ceftriaxona; cef, ceftazidima; van, vancomicina; net, netilmicina; amo, amoxicilina; cip, ciprofloxacino; cez, cefazolina; mer, meropenem; amo+cla, amoxicilina + ácido clavulânico; s, semanas; d, dias. <sup>a</sup> Análise de 500 pb da subunidade 16S rRNA. <sup>b</sup> Possível endocardite infecciosa de acordo com os critérios modificados de Duke. Fonte: autor, 2010.



A EI é normalmente um diagnóstico de síndrome que é determinado com base na presença de múltiplos achados clínicos, ao invés de um único teste definitivo. A definição prática de casos de endocardite é importante para o manejo clínico do paciente. Em 1994, Durack e colaboradores propuseram um conjunto de critérios diagnósticos para a diferenciação entre casos possíveis e definitivos de EI, que ficaram conhecidos como critérios de Duke. Esses critérios foram reavaliados e modificados no ano de 2000 (LI et al., 2000). Os critérios são diferenciados em maiores e menores, sendo que é considerada EI a presença de 2 critérios maiores, 1 critério maior e 3 critérios menores ou 5 critérios menores. Este foi um caso de endocardite infecciosa causada por *N. elongata* subesp. *nitroreducens*, definido pelos critérios modificados de Duke (LI et al., 2000) pela presença de um critério maior (presença de massa intracárdica oscilante) e três critérios menores (presença de válvula cardíaca, febre acima de 38°C e hemocultura positiva). O microrganismo foi isolado em amostra de hemocultura e identificado por provas bioquímicas, espectrometria de massa e sequenciamento do genoma total. Este microrganismo é imóvel, geralmente assacarolítico e capaz de reduzir nitrato, o que o diferencia das outras duas subespécies (GRANT et al., 1990). *N. elongata*, considerada uma espécie comensal que pode estar presente em orofaringe, raramente é responsável por infecções em humanos. De acordo com nossa revisão da literatura, desde o primeiro relato de sua patogenicidade em 1983 (SIMOR; SALIT, 1983), existem 25 casos publicados de EI causada por *N. elongata*, sendo esse o caso número 26 (não publicado).

Das três subespécies descritas, a maioria dos casos de EI (80,8%, 21/26) tem sido relatado pela subespécie *nitroreducens*. Apenas três casos foram causados pela subespécie *elongata* e dois pela subespécie *glycolytica*. A utilização da sequência da subunidade 16S do rRNA não parece ser suficiente para diferenciação entre as subespécies de *N. elongata*, uma vez que elas são muito próximas entre si, como relatado anteriormente (EVANS et al., 2007; OSUKA et al., 2015). Dessa forma, provas bioquímicas, como utilização de D-glicose, redução de nitrato e catalase, ainda se mostram necessárias.

A EI por *N. elongata* geralmente causa febre intermitente, vegetação em válvulas cardíacas e leva a complicações sistêmicas e cardíacas, como falha renal, falha cardíaca congestiva, acidente vascular encefálico e abscesso. A média de idade dos pacientes acometidos é de 48,2 anos, com uma amplitude de idade de 7 a 82 anos. Alguns fatores de risco são associados à EI por *N. elongata*, como histórico de problemas relacionados a válvulas cardíacas e procedimento odontológico anterior à infecção (APISARNTHANARAK; DUNAGAN;

DUNNE, 2001). O paciente deste caso era cardiopata com presença de marca-passo e duas trocas valvares (aórtica e mitral). Além disso, realizou um procedimento odontológico antes de apresentar febre e procurar o atendimento hospitalar, onde recebeu tratamento profilático com amoxicilina. Em 38,5% (10/26) dos casos descritos o paciente realizou um procedimento odontológico ou possuía infecção dentária anterior à EI, sendo este o fator de risco mais descrito. Um recente estudo sobre o tropismo oral das espécies de *Neisseria* usando metagenoma revelou predominância da espécie *N. elongata* em placa gengival, o que aponta o procedimento odontológico como provável foco da infecção (DONATI et al., 2016). Ainda assim, oito casos de EI por *N. elongata*, definitiva ou não pelos critérios de Duke, não relataram nenhum fator de risco (ANDERSEN et al., 1995; APISARNTHANARAK; DUNAGAN; DUNNE, 2001; GRANT et al., 1990; HERBERT, 2014; IMPERIAL; JOHO; ALCID, 1995; NAWAZ; HARDY; BONNEZ, 1996; OSUKA et al., 2015; ROSE; GROSSMAN; GILES, 1990). Isso sugere que *N. elongata* pode causar EI sem fatores de risco evidentes.

Até o momento, os pontos de corte de resistência aos antimicrobianos para *N. elongata* não estão estabelecidos. Desde seu primeiro isolamento (BOVRE; HOLTEN, 1970) este microrganismo é descrito por possuir sensibilidade a diversos antimicrobianos, como aminoglicosídeos e aminopenicilinas (BROUQUI; RAOULT, 2001). Apesar disso, EI por *N. elongata* requer um tratamento prolongado. Em 76,0% (19/25) dos casos em que o tempo de tratamento com antimicrobianos foi especificado, o mesmo estendeu-se por no mínimo um mês. Isso provavelmente está relacionado à formação de biofilme pela bactéria. Vegetação em válvulas cardíacas foi observada em 61,5% (16/26) dos casos. As válvulas cardíacas mais afetadas são a válvula mitral (38,5%, 10/26) e válvula aórtica (30,8%, 8/26). Sem dúvidas, a presença de válvula cardíaca protética constitui uma superfície ideal para adesão bacteriana e consequente formação de biofilme. Uma vez que a presença de biofilme caracteriza um potencial aumento da resistência aos antimicrobianos, recomenda-se avaliar a possibilidade de troca do objeto infectado ou aumentar o tempo de tratamento nos casos que não for possível a remoção (WU et al., 2015).

O paciente deste caso evoluiu com formação de abscesso na base da prótese aórtica. Observou-se imagem sugestiva de sua formação no terceiro dia de internação e confirmação no nono dia por meio de ecocardiografia transesofágica. Em apenas quatro casos foi relatada a formação de abscesso: três deles na região do miocárdio (HADDOW et al., 2003; KOCIUBA; MUNRO; DALEY, 1993; SIMOR; SALIT, 1983) e em um caso mais raro, um abscesso cerebral

(HSIAO et al., 2008). Todos eles possuíam um processo inicial de vegetação em válvula mitral ou em válvula aórtica e realizaram uma intervenção cirúrgica de substituição valvar. Neste relato, como o paciente veio a óbito e não realizou um processo cirúrgico durante a internação, não foi possível a obtenção de uma amostra do abscesso. Em dois casos que foi possível a coleta de material proveniente do abscesso, a cultura microbiológica desse sítio foi negativa (HADDOW et al., 2003; SIMOR; SALIT, 1983). De acordo com as diretrizes para o manejo de EI da Sociedade Europeia de Cardiologia, a presença de abscesso requer indicação de intervenção cirúrgica com urgência (dentro de poucos dias) (AKSOY et al., 2007; HABIB et al., 2015; LALANI et al., 2013). Infelizmente, em menos um dia da verificação de necessidade cirúrgica, o paciente apresentou duas paradas cardiorrespiratórias e foi a óbito.

### 6.2.2 Características genômicas de *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* M001

A montagem do genoma do isolado M001 resultou em um total de 26 sequências contíguas com mais de 500 pb, totalizando 2.595.012 pb. O N50 foi de 230.084 pb. O L50 foi igual a 4 e o *contig*<sup>14</sup> de maior tamanho apresentou 541.257 pb. O genoma montado do isolado M001 possui um total de 2.498 sequências codificadoras (CDS), 49 tRNA e 2 rRNA. Nenhum plasmídeo foi identificado em seu genoma. Em uma busca na lista de genomas de *N. elongata* na base de dados *online* NCBI (disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/2005](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/2005), acesso em: 06/01/2021) existem 15 genomas montados, que variam em tamanho de 2,25 Mb a 2,53 Mb.

### 6.2.3 Análise genômica comparativa

Uma análise genômica comparativa foi realizada utilizando todas as sequências de *N. elongata* disponíveis no NCBI, juntamente com a sequência do isolado M001. É importante notar que um isolado do banco de dados, previamente caracterizado como *Neisseria* sp. (NCBI BioSample SAMN03436258), foi reclassificado como *N. elongata*. Todos os genomas apresentaram no mínimo 96,2% de proteínas esperadas, de acordo com o programa BUSCO (SIMÃO et al., 2015).

---

<sup>14</sup> Sequência contígua formada pela sobreposição das leituras do sequenciamento.



A análise de identidade média de nucleotídeos mostrou uma alta diversidade genética entre os isolados de *N. elongata* (Figura 13).

Figura 13. Identidade média de nucleotídeos (ANI) entre os isolados de *Neisseria elongata*.

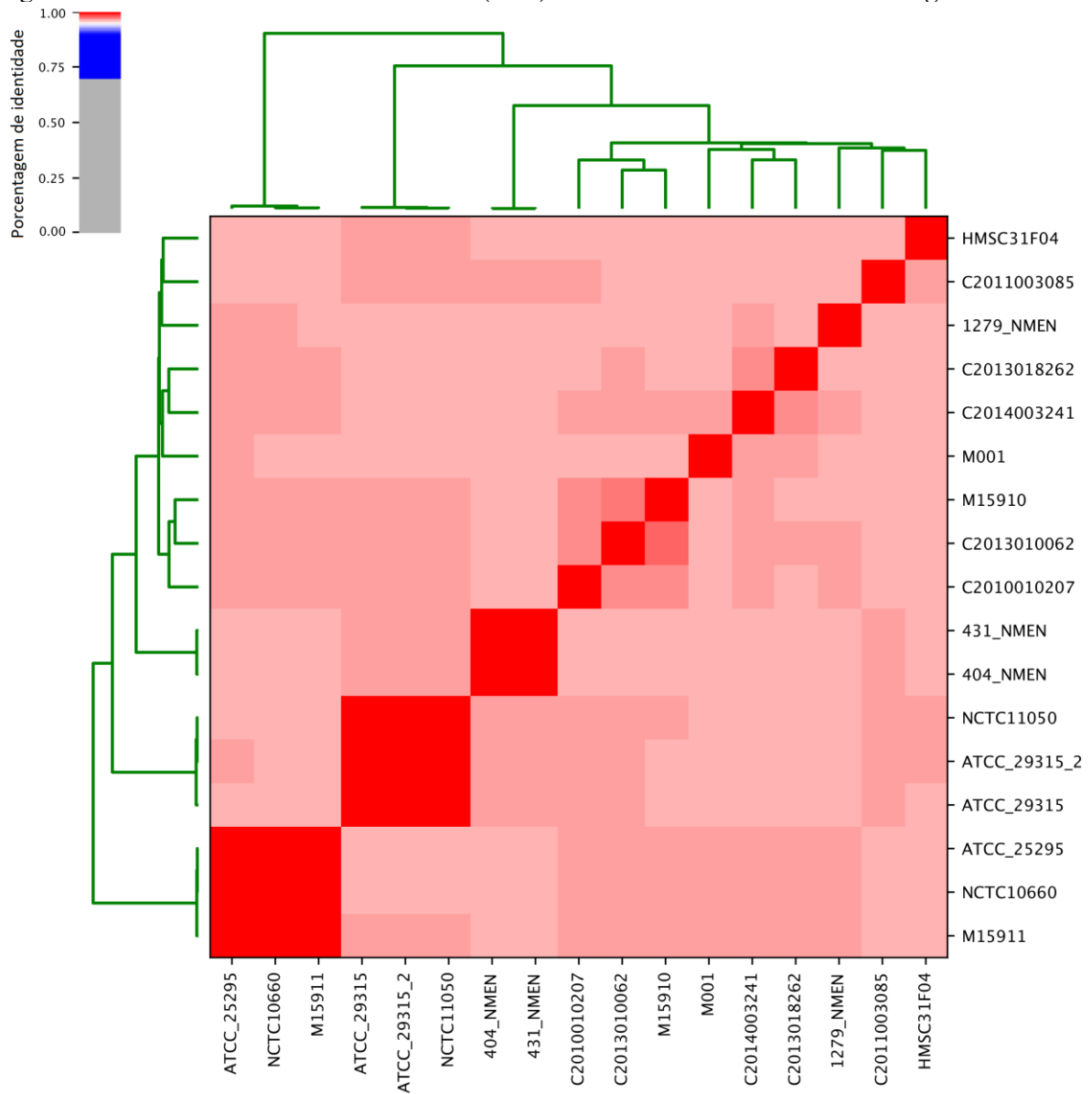
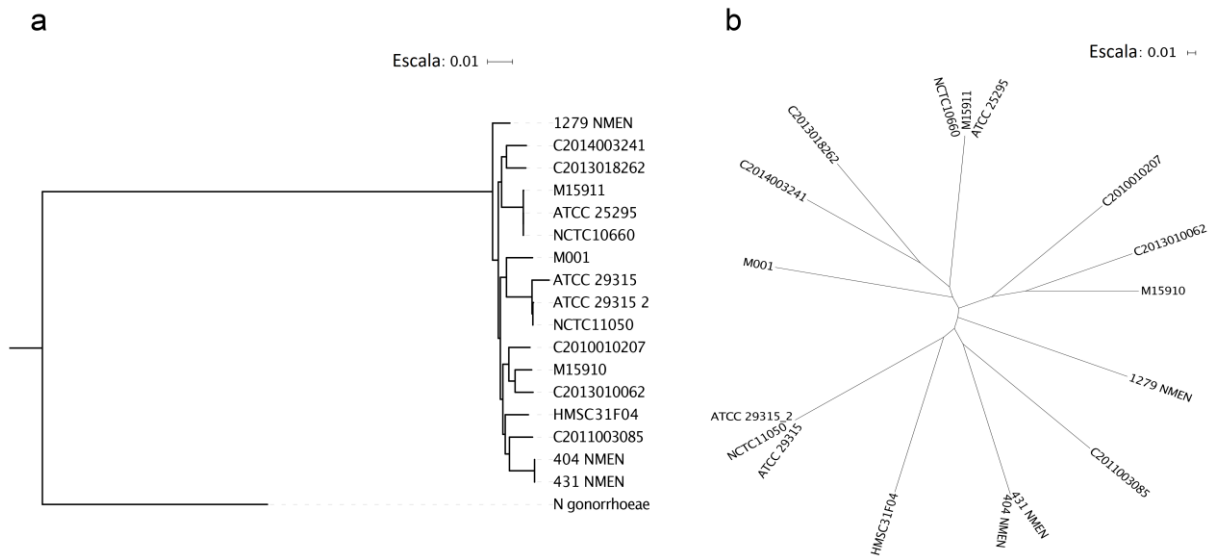


Figura gerada utilizando o programa PYANI. Os isolados estão representados nas linhas e colunas. Fonte: autor, 2019.

Apesar disso, todos os isolados apresentaram uma identidade mínima de 96% entre si, confirmando que todos pertencem à mesma espécie (GORIS et al., 2007). É importante notar que alguns isolados foram sequenciados e depositados mais do que uma vez porque foram

enviados para armazenamento em banco de isolados de diferentes grupos de pesquisa (HENRIKSEN; HOLTEN, 1976). Entretanto, foram observadas diferenças entre a identidade de nucleotídeos do mesmo isolado, como pode ser observado com ATCC29315 e ATCC29315\_2 na árvore filogenética de ortólogos de única cópia (Figura 14.a). Essas duas sequências apresentaram 99,96% de identidade, a qual pode ser atribuída às diferentes estratégias de sequenciamento adotadas, bem como a cobertura de leituras alcançada em cada sequenciamento (ATCC29315: PacBio cobertura de 100x; ATCC29315\_2: 454 Roche cobertura de 33x).

Figura 14. Filogenia dos isolados de *Neisseria elongata*.



(a) proteínas ortólogas utilizando *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 como *outgroup* e (b) SNPs extraídos do *core* genoma. O programa RAxML versão 8.2 foi utilizado para a reconstrução filogenética com o método de máxima verossimilhança, com 1.000 replicatas de *bootstrap*. Fonte: autor, 2019.

A árvore filogenética construída utilizando os SNPs do *core* genoma (Figura 14.b) mostrou uma diversidade entre os isolados de *N. elongata*. Apenas os isolados 431\_NMEN e 404\_NMEN e aqueles com duplicidade de depósito foram agrupados. Três subespécies de *N. elongata* foram descritas até hoje: *nitroreducens*, *elongata* e *glycolytica*. Esta classificação foi inicialmente proposta por possuírem diferenças na produção de ácido a partir da D-glicose, na redução de nitrato e na positividade da prova de catalase (GRANT et al., 1990). Até o momento, não há um consenso de qual o melhor método para definição de espécies em procaríotos (COHAN, 2002). A taxonomia fenotípica convencional não tem se provado uma solução

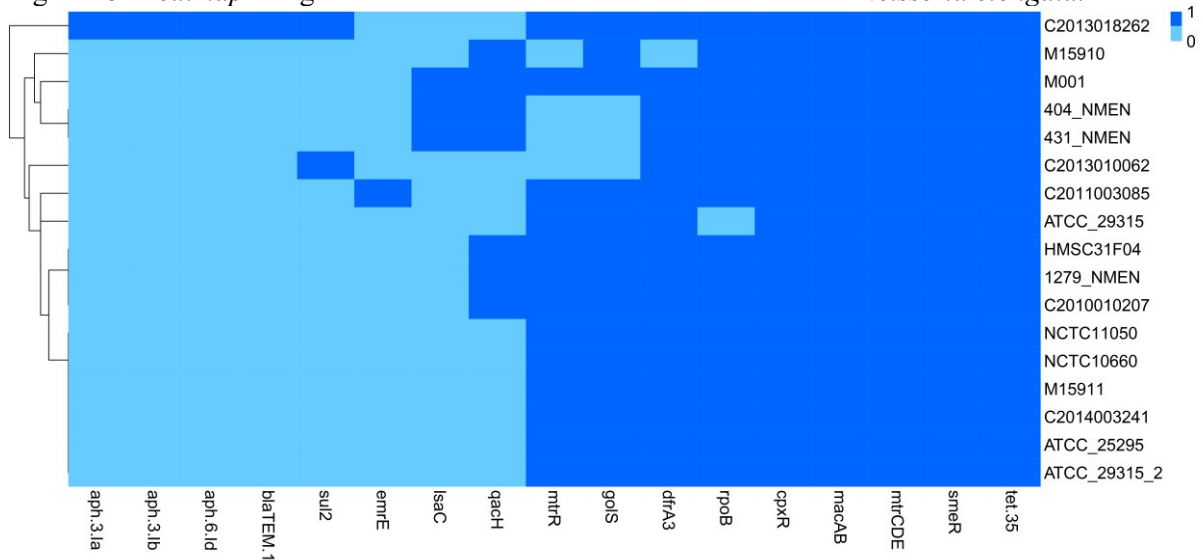
satisfatória para definir e identificar espécies não patogênicas dentro do gênero *Neisseria* (BENNETT et al., 2012). A análise da sequência da subunidade 16S do rRNA tem demonstrado um baixo poder discriminatório na diferenciação das espécies de *Neisseria* (GEVERS et al., 2005). Com o advento de metodologias de sequenciamento de nova geração, a introdução de abordagens utilizando sequências multilocus (MLST), como MLST do genoma total (BENNETT et al., 2007; MAIDEN et al., 1998), MLST ribossomal (rMLST) (JOLLEY et al., 2012) e cgMLST (BENNETT et al., 2010; 2012), tem levado a uma melhoria na resolução da classificação das espécies de *Neisseria*. Mais recente, sete possíveis novas espécies de *Neisseria* foram identificadas utilizando cgMLST (DIALLO et al., 2019), confirmando a ampla diversidade desse gênero bacteriano. Entretanto, apesar de não estarem disponíveis para todos os isolados o resultado das provas bioquímicas que distinguem as subespécies, fica claro pela análise dos SPNs do genoma core, que *N. elongata* não segue a classificação proposta utilizando as provas bioquímicas (GRANT et al., 1990). Uma reclassificação em subespécies pode ser considerada.

*N. elongata* subsp. *nitroreducens* difere das outras subespécies por ser a única capaz de reduzir nitrato (GRANT et al., 1990). Subsp. *glycolytica* difere das outras por ser a única catalase positiva (GRANT et al., 1990). Subsp. *elongata* difere das demais por não ser produzir ácido a partir da D-glicose (HENRIKSEN; HOLTEN, 1976). Foram encontrados sete isolados apresentando o gene *kata*, o qual é produz a enzima catalase capaz de decompor peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sugerindo que esses isolados são positivos para o teste da catalase. Outros quatro isolados, incluindo o isolado deste estudo (M001), apresentaram uma ampla variedade de genes envolvidos na redução de nitrato (*nar*), sugerindo que esses isolados pertencem a subespécie *nitroreducens*. De forma interessante, em apenas um isolado (1279\_NMEN) foi identificada a presença, tanto do gene *kata* quanto de diversos genes *nar*. Este isolado foi classificado, de acordo com o depósito no NCBI, como *N. elongata* subsp. *glycolytica* (APÊNDICE B). Esses resultados indicam que este isolado pode pertencer a uma nova subespécie.

#### **6.2.4 Perfis de resistência e virulência**

Um total de 17 diferentes genes relacionados com resistência aos antimicrobianos foram encontrados entre todos os isolados de *N. elongata* (Figura 15).

Figura 15. Heatmap dos genes de resistência detectados nos isolados de *Neisseria elongata*.



Legenda: 1, presença; 0, ausência. Fonte: autor, 2021.

O mecanismo de resistência com maior predominância entre esses isolados são as bombas de efluxo. Oito genes relacionados a sistemas de bombas de efluxo foram encontrados em todos os isolados: *cpxR*, *macAB*, *mtrCDE*, *smeR*, and *tet(35)*. Até o momento, não estão estabelecidos pontos de corte de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos para *N. elongata*. Apesar disso, desde a classificação como espécie, este microrganismo é descrito como tendo sensibilidade a diversos antimicrobianos, como a classe dos aminoglicosídeos e aminopenicilinas (BOVRE, K. AND HOLTEN, 1970; BROUQUI; RAOULT, 2001).

Foi observada uma baixa prevalência de plasmídeos em *N. elongata*. Apenas um isolado apresentou um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncQ1 (C2013018262). Este isolado foi também o único que apresentou o gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, o qual codifica uma enzima de  $\beta$ -lactamase, e genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (*aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, and *aph(6)-Id*). Tanto o grupo de incompatibilidade quanto esses genes de resistência estavam localizados em um *contig* de 58.037 pb após a montagem. A presença do plasmídeo IncQ1 carregando *bla*<sub>TEM-1</sub> tem sido descrita em *N. gonorrhoeae* e espécies comensais, como *N. sicca* (ROTGER; NOMBELA, 1983; ROTGER; RUBIO; NOMBELA, 1986). Embora plasmídeos são principalmente observados em *N. gonorrhoeae*, estudos tem demonstrado algumas espécies comensais de *Neisseria* carregando plasmídeos com genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e outros antimicrobianos (PINTADO et al., 1985; ROBERTS, 1989; ROTGER;



isolado M001. Embora *N. gonorrhoeae* e algumas espécies de *Neisseria* não patogênicas possuam esses genes, a falta do *loci ccsABC*, o qual é responsável pela biossíntese de cápsula, faz com que esse importante fator de virulência seja restrito apenas a *N. meningitidis* (HARRISON et al., 2013; MARRI et al., 2010).

Uma variedade de genes responsáveis pela formação de *pili* do tipo IV, que medeiam transferência horizontal de genes entre espécies de *Neisseria*, foram detectados nos isolados de *N. elongata*. Aproximadamente 20 genes já foram descritos por estarem envolvidos na biogênese de Tfp, mas a presença de *pilD*, *pilE*, *pilF* e *pilQ* é essencial para a completa montagem dessa estrutura (WOLFGANG et al., 2000). Os pontos de corte para avaliação da presença de genes de virulência utilizados neste estudo não foram capazes de identificar *pilE* em alguns isolados, incluindo o isolado M001 e ATCC29315, por causa da baixa identidade e cobertura. Isso pode ser explicado pela base de dados utilizada conter, em sua maioria, sequências de proteínas das espécies consideradas patogênicas (*N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*). Em um estudo conduzido por Higashi e colaboradores em 2011, verificou-se que *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* (ATCC® 29315™) é capaz de produzir *pili* do tipo IV. Outros genes não essenciais para a formação de *pili* foram encontrados em praticamente todos os isolados, mas apenas o isolado M001 apresentou duas cópias dos genes *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP* e *pilQ*. Enquanto o tipo IV de *pili* tem uma importante participação na formação de biofilme em bactérias (ESQUIVEL; POHLSCHRODER, 2014; GILTNER; NGUYEN; BURROWS, 2012; LASSAK; GHOSH; ALBERS, 2012), a presença de uma cópia a mais desses genes pode significar uma capacidade maior de adesão e também uma maior capacidade de transferência horizontal de genes.

De forma interessante, somente o isolado M001 não apresentou o gene *nspA*, sendo que alguns isolados apresentaram até duas cópias desse gene. NspA, assim como PorB, é uma proteína de superfície encontrada em *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* que se liga ao fator H humano, aumentando a resistência da bactéria ao sistema complemento (ERIKSSON et al., 2015; LEWIS et al., 2010; LEWIS; RICE; RAM, 2019). A presença do gene *nspA* em M001 pode indicar uma redução na proteção deste isolado frente ao sistema complemento do hospedeiro. Como o isolado M001 foi encontrado formando biofilme na prótese metálica aórtica do paciente, é provável que essa estrutura bacteriana seja capaz de realizar proteção contra as respostas imunes do hospedeiro. No entanto, a função protetora do gene *nspA* em espécies comensais de *Neisseria* precisa ser melhor investigada.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo com indução de resistência em *N. gonorrhoeae* utilizando cefixima comprovam a habilidade deste microrganismo em adquirir resistência a esse antimicrobiano por diferentes mecanismos. Enquanto os isolados que possuíam a forma de mosaico *penA*, pertencentes ao ST1407, foram mais propensos a adquirirem mutações neste determinante de resistência, os isolados do ST338 não adquiriram mutações em determinantes de resistência às ESC, mas aumentaram em 127 vezes a MIC para cefixima. A recente mudança para ceftriaxona no tratamento da gonorreia reforça a importância da vigilância contínua da resistência aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae* no país uma vez que isolados destes STs são os mais prevalentes no Brasil. Embora não observado em isolados clínicos, WHO Y que possuía resistência às ESC antes da indução, adquiriu mais mutações por pressão seletiva à cefixima e desenvolveu alto nível de resistência a essa classe de antimicrobianos. Apesar desse aumento da MIC, este isolado pode ter se tornado não competente para infecção pela mutação encontrada em *pilQ*.

Os resultados do estudo de *N. elongata* revelam uma variedade de genes de resistência, principalmente relacionados a bombas de efluxo e uma baixa prevalência de plasmídeos. Embora considerada sensível a diversas classes de antimicrobianos, *N. elongata* compartilha genes de resistência e virulência encontrados em outras espécies de *Neisseria*, inclusive das espécies consideradas patogênicas. A variedade de genes de virulência observada neste estudo, principalmente relacionados à formação de *pili*, demonstra que *N. elongata* tem uma grande capacidade de realizar transferência horizontal para outras espécies de *Neisseria*. Além disso, este microrganismo tem habilidade para formação de biofilme e abscessos, como ocorreu no presente caso, tornando o tratamento mais difícil. Portanto, mais atenção deve ser dada pela equipe médica às complicações que a endocardite infecciosa por *N. elongata* pode causar. Pela dificuldade na identificação microbiológica, relatos de caso e uma análise de todo o genoma do microrganismo são essenciais para melhorar o entendimento da patogênese e alertar equipe médica e microbiologistas para a necessidade de uma rápida identificação, tratamento e outros procedimentos médicos necessário para evitar desfechos desfavoráveis. De um ponto de vista genômico, este estudo fornece evidências de porque este microrganismo, considerado comensal, pode causar endocardite infecciosa e pode contribuir para outras investigações biológicas em espécies de *Neisseria* comensais.

## 8 PERSPECTIVAS

- Determinar a expressão de genes relacionados à resistência às cefalosporinas (*penA*, *penB*, *ponA*, *mtrR*, *pilQ*) e de genes com mutações nos isolados após a indução com cefixima por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR);
- Realizar a transformação de genes que apresentaram mutações após a indução de resistência e que possam estar associados com resistência às cefalosporinas. De forma principal o gene *penA* dos isolados M111 e M128;
- Avaliar as mutações encontradas em proteínas hipotéticas após a indução de resistência com cefixima;
- Avaliar as mutações encontradas em regiões intergênicas;
- Finalizar, com estes dados, o segundo artigo relacionado à tese.



## REFERÊNCIAS

- AKASAKA, S. et al. Emergence of cephem- and aztreonam-high-resistant *Neisseria gonorrhoeae* that does not produce  $\beta$ -lactamase. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s.l.], v. 7, n° 1, p. 49–50, 2001.
- AKSOY, O. et al. Early Surgery in Patients with Infective Endocarditis: A Propensity Score Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 44, n° 3, p. 364–372, 2007.
- ALLEN, V. G. et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 55, n° 2, p. 703–712, 2011.
- AMBUR, O. H.; FRYE, S. A.; TØNJUM, T. New functional identity for the DNA uptake sequence in transformation and its presence in transcriptional terminators. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 189, n° 5, p. 2077–2085, 2007.
- AMEYAMA, S. et al. Mosaic-Like Structure of Penicillin-Binding Protein 2 Gene (*penA*) in Clinical Isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with Reduced Susceptibility to Cefixime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 46, n° 12, p. 3744–3749, 2002.
- ANDERSEN, B. M. et al. Characterization of *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* isolates obtained from human wound specimens and blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 33, n° 1, p. 76–78, 1995.
- ANDERSON, J. E.; SPARLING, P. F.; CORNELISSEN, C. N. Gonococcal transferrin-binding protein 2 facilitates but is not essential for transferrin utilization. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 176, n° 11, p. 3162–3170, 1994.
- ANTIPOV, D. et al. PlasmidSPAdes: Assembling plasmids from whole genome sequencing data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 32, n° 22, p. 3380–3387, 2016.
- APISARNTHANARAK, A.; DUNAGAN, W. C.; DUNNE, W. M. *Neisseria elongata* subsp. *elongata*, as a cause of human endocarditis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s.l.], v. 39, n° 4, p. 265–266, 2001.
- ASHFORD, W. A.; GOLASH, R. G.; HEMMING, V. G. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **The Lancet**, [s.l.], p. 657–658, 1976.
- AYALA, J. A. et al. Molecular biology of bacterial septation. **New Comprehensive Biochemistry**, [s.l.], v. 27, n° C, p. 73–101, 1994.
- BALA, M. et al. Monitoring antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in selected

- countries of the WHO South-East Asia Region between 2009 and 2012: A retrospective analysis. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n° SUPPL. 4, 2013.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, [s.l.], v. 19, n° 5, p. 455–477, 2012.
- 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**, [s.l.], v. 43, n° 5, p. 500–503, 2010.
- BARBOUR, A. G. Properties of penicillin-binding proteins in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 19, n° 2, p. 316–322, 1981.
- BAZZO, M. L. et al. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015-16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 73, n° 7, p. 1854–1861, 2018.
- BELDA JUNIOR, W. et al. Evaluation of the in vitro activity of six antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s.l.], v. 49, no 1, p. 55–58, 2007.
- BELLAND, R. J. et al. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 14, n° 2, p. 371–380, 1994.
- BENNETT, J. S. et al. Species status of *Neisseria gonorrhoeae*: Evolutionary and epidemiological inferences from multilocus sequence typing. **BMC Biology**, [s.l.], v. 5, p. 1–11, 2007.
- BENNETT, J. S. et al.. Independent evolution of the core and accessory gene sets in the genus *Neisseria*: Insights gained from the genome of *Neisseria lactamica* isolate 020-06. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 11, n° 1, p. 652, 2010.
- BENNETT, J. S. et al.. A genomic approach to bacterial taxonomy: An examination and proposed reclassification of species within the genus *Neisseria*. **Microbiology (United Kingdom)**, [s.l.], v. 158, n° 6, p. 1570–1580, 2012.
- BENNETT, J. S. et al. A common gene pool for the *Neisseria* FetA antigen. **Enrope PMC Funders Group**, [s.l.], v. 299, n° 2, p. 133–139, 2014.
- BENTLEY, S. D. et al. Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18. **PLoS Genetics**, [s.l.], v. 3, n° 2, p. 0230–

0240, 2007.

BENZAKEN, A. S. et al. Prevalência da Infecção por Clamídia e Gonococo em Mulheres Atendidas na Clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, [s.l.], v. 22, n° 3, p. 129–134, 2010.

BERGLUND, T. et al. One year of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in sweden: The prevalence study of antibiotic susceptibility shows relation to the geographic area of exposure. **International Journal of STD and AIDS**, [s.l.], v. 13, n° 2, p. 109–114, 2002.

BIGNELL, C.; UNEMO, M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **International journal of STD & AIDS**, [s.l.], v. 24, p. 85–92, 2013.

BILEK, N. et al. Concordance between *Neisseria gonorrhoeae* genotypes recovered from known sexual contacts. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 45, n° 11, p. 3564–3567, 2007.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 30, n° 15, p. 2114–2120, 2014.

BOVRE, K. AND HOLTEN, E. *Neisseria elongata* sp.nov., a Rod-shaped Member of the Genus *Neisseria*. Re-evaluation of Cell Shape as a Criterion in Classification. **J. gen. Microbiol.**, [s.l.], v. 60, p. 67–75, 1970.

BRASIL. Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis DST. **Brasília - DF**, [s.l.], p. 140, 2006.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT). Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). **Ministerio da Saúde**, [s.l.], 2015.

BRASIL. NOTA INFORMATIVA Nº 6-SEI / 2017-COVIG / CGVP /. DIAHV / SVS / MS. [s.l.], v. 6, n° Im, p. 1–2, 2017.

BRASIL. Atenção Integral Às Pessoas Com Infecções Sexualmente Transmissíveis (Ist) Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas Para. [s.l.], 2019.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapeuticas para Atenção às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis**, [s.l.], n° 0014125063, p. 1–248, 2020.

BROUQUI, P.; RAOULT, D. Endocarditis Due to Rare and Fastidious Bacteria. [s.l.], v. 14, n° 1, p. 177–207, 2001.

BUCHANAN, R. et al. Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass

- spectrometry for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 22, n° 9, p. 815.e5-815.e7, 2016.
- BUISINE, N.; TANG, C. M.; CHALMERS, R. Transposon-like Correia elements: Structure, distribution and genetic exchange between pathogenic *Neisseria* sp. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 522, n° 1–3, p. 52–58, 2002.
- BURDETT, V. Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 165, n° 2, p. 564–569, 1986.
- CÁMARA, J. et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 67, n° 8, p. 1858–1860, 2012.
- CARVER, T. J. et al. ACT: The Artemis comparison tool. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 21, n° 16, p. 3422–3423, 2005.
- CDC. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep**, [s.l.], v. 51, n° RR-6, p. 1–78, 2002.
- CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2015. **Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services**, [s.l.], 2015.
- CEHOVIN, A.; LEWIS, S. B. Mobile genetic elements in *Neisseria gonorrhoeae*: Movement for change. **Pathogens and Disease**, [s.l.], v. 75, n° 6, p. 1–12, 2017.
- CHEN, H. et al. Typing of *Neisseria gonorrhoeae* Opa and NG-MAST gene of 12 pairs of sexual contact gonorrhea patients in China. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, [s.l.], v. 28, n° 4, p. 472–475, 2008.
- CHEN, L. et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 33, n° DATABASE ISS., p. 325–328, 2005.
- CHISHOLM, S. A. et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrugresistant clone. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 18, n° 3, p. 1–10, 2013.
- CHISHOLM, Stephanie A. et al. Cephalosporin MIC creep among gonococci: Time for a pharmacodynamic rethink? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 65, n° 10, p. 2141–2148, 2010.
- CHISHOLM, Stephanie A.; DAVE, J.; ISON, C. A. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n° 9, p. 3812–3816, 2010.

- CHISHOLM, Stephanie A et al. An outbreak of high-level azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* in England. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 92, n° 5, p. 365–367, 2016.
- CHOUHDURY, B. et al. Identification of individuals with gonorrhoea within sexual networks: a population-based study. **Lancet**, [s.l.], v. 368, n° 9530, p. 139–146, 2006.
- CINGOLANI, P. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118 ; iso-2; iso-3. **Landes Bioscience**, [s.l.], v. 6, n° 2, p. 80–92, 2012.
- CLEMENCE, M. E. A.; MAIDEN, M. C. J.; HARRISON, O. B. Characterization of capsule genes in non-pathogenic *Neisseria* species. **Microbial Genomics**, [s.l.], 2018.
- CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Journal of Services Marketing**. [s.l.]: [s.n.], 2019. v. 8, 1–320 p.
- CODES, J. et al. Detecção de Doenças Sexualmente Transmissíveis em Clínica de Planejamento Familiar da Rede Pública no Brasil. **Rbgo**, [s.l.], v. 24, n° 2, p. 101–106, 2002.
- CODES, J. S. De et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na Cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 22, n° 2, p. 325–334, 2006.
- COHAN, F. M. What are bacterial species? **Annual Review of Microbiology**, [s.l.], v. 56, p. 457–487, 2002.
- CORNELISSEN, C. N. et al. Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to *tonB*-dependent outer membrane receptors. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 174, n° 18, p. 5788–5797, 1992.
- CORREIA, F. F.; INOUE, S.; INOUE, M. A family of small repeated elements with some transposon-like properties in the genome of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 263, n° 25, p. 12194–12198, 1988.
- COSTA BEDESCHI, M. L. 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**, [s.l.], v. 46, no January, p. 304–309, 2013.
- COSTA-LOURENÇO, A. P. R. et al. Reduced susceptibility to cefixime but not ceftriaxone: an uncertain perspective for the treatment of gonorrhoea in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 49, n° 4, p. 515–516, 2017.

- COUSIN, S. L.; WHITTINGTON, W. L. H.; ROBERTS, M. C. Acquired macrolide resistance genes and the 1 bp deletion in the *mtrR* promoter in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 51, n° 1, p. 131–133, 2003.
- DEGUCHI, T. et al. Treatment of uncomplicated gonococcal urethritis by double-dosing of 200mg cefixime at a 6-h interval. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 35–39, 2003.
- DEGUCHI, T. et al. New clinical strain of neisseria gonorrhoeae with decreased susceptibility to ceftriaxone, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 22, n° 1, p. 142–144, 2016.
- DELAHAY, R. M. et al. Involvement of the gonococcal MtrE protein in the resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to toxic hydrophobic agents. **Microbiology**, [s.l.], v. 143, n° 7, p. 2127–2133, 1997.
- DEMCZUK, W et al. *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance (NG-STAR): a novel antimicrobial resistance multilocus typing scheme for tracking the global dissemination of *N. gonorrhoeae* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], n° February, p. JCM.00100-17, 2017.
- DEMCZUK, Walter et al. Genomic epidemiology and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant neisseria gonorrhoeae in Canada from 1997 to 2014. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 54, n° 5, p. 1304–1313, 2016.
- DIALLO, K. et al. Genomic characterization of novel *Neisseria* species. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 1–11, 2019.
- DILLON, J. A. R. et al. Challenges in the control of gonorrhoea in South America and the Caribbean: Monitoring the development of resistance to antibiotics. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 33, n° 2, p. 87–95, 2006.
- 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**, [s.l.], v. 89, n° SUPPL. 4, 2013.
- DOMINGUEZ, E. A.; SMITH, T. L. Endocarditis Due to *Neisseria elongata* Subspecies *nitroreducens* : Case Report and Review. [s.l.], v. 26, p. 1471–1473, 1998.
- DONATI, C. et al. Uncovering oral *Neisseria* tropism and persistence using metagenomic sequencing. **Nature Microbiology**, [s.l.], v. 1, n° 7, 2016.
- DOUTHWAITE, S.; CHAMPNEY, W. S. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. **Journal of Antimicrobial**

**Chemotherapy**, [s.l.], v. 48, n° TOPIC T1, p. 1–8, 2001.

DRAKE, S. L.; KOOMEY, M. The product of the *pilQ* gene is essential for the biogenesis of type IV pili in *Neisseria gonorrhoeae*. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 18, n° 5, p. 975–986, 1995.

DUFFIN, P. M.; SEIFERT, H. S. DNA uptake sequence-mediated enhancement of transformation in *Neisseria gonorrhoeae* is strain dependent. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 192, n° 17, p. 4436–4444, 2010.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.

**Bioinformatics**, [s.l.], v. 26, n° 19, p. 2460–2461, 2010.

ENGLAND, P. H. UK case of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin and resistance to ceftriaxone acquired abroad.

**Assets.Publishing.Service.Gov.Uk**, [s.l.], v. 12, n° 11, p. 4, 2018.

ERIKSSON, J. et al. Characterization of motility and piliation in pathogenic *Neisseria*. **Microbial biochemistry, physiology and metabolism. BMC Microbiology**, [s.l.], v. 15, n° 1, p. 1–13, 2015.

ESQUIVEL, R. N.; POHLSCHRODER, M. A conserved type IV pilin signal peptide H-domain is critical for the post-translational regulation of flagella-dependent motility.

**Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 93, n° 3, p. 494–504, 2014.

EVANS, M. et al. Prosthetic valve endocarditis due to *Neisseria elongata* subsp. *elongata* in a patient with Klinefelter's syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 56, n° 6, p. 860–862, 2007.

EYRE, D. W. et al. WGS to predict antibiotic MICs for *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 72, n° 7, p. 1937–1947, 2017.

EYRE, D. W. et al. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018.

**Eurosurveillance**, [s.l.], v. 23, n° 27, p. 1–6, 2018.

EYRE, D. W. et al. Detection in the United Kingdom of the *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, october to december 2018. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 24, n° 10, 2019.

FERNANDES, A. M. dos S. et al. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres atendidas em serviço de planejamento familiar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [s.l.], v. 31, n° 5, p. 235–240, 2009.

- FIFER, H. et al. Failure of Dual Antimicrobial Therapy in Treatment of Gonorrhoea. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 374, n° 25, p. 2502–2504, 2016.
- FOLSTER, J. P. et al. MtrR modulates *rpoH* expression and levels of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 91, n° 1, p. 287–297, 2009.
- GALARZA, P. G. et al. New mutation in 23S rRNA gene associated with high level of azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n° 4, p. 1652–1653, 2010.
- GALATA, V. et al. PLSDB: A resource of complete bacterial plasmids. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 47, n° D1, p. D195–D202, 2019.
- GARNER, J.; BRIANT, R. H. Osteomyelitis caused by a bacterium known as M-6. **J. Infect. (England)**, [s.l.], v. 13, p. 298–300, 1986.
- GASCOYNE, D. M. et al. Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmids carrying TetM found in *neisseria gonorrhoeae* from different countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 28, n° 2, p. 173–183, 1991.
- GEVERS, D. et al. Defining prokaryotic species Reevaluating prokaryotic species. **Microbiology**, [s.l.], v. 3, n° September, p. 733–739, 2005.
- GHANEM, K. G. Clinical manifestations and diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection in adults and adolescents. **UpToDate**, [s.l.], p. 1–23, 2015.
- GHUYSEN, J.-M. Serine Beta-Lactamases and Penicillin-Binding Proteins. **Annual Reviews**, [s.l.], v. 45, p. 37–67, 1991.
- GILL, M. J. et al. Gonococcal resistance to  $\beta$ -lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the penB locus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 42, n° 11, p. 2799–2803, 1998.
- GILTNER, C. L.; NGUYEN, Y.; BURROWS, L. L. Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 76, n° 4, p. 740–772, 2012.
- GOLFETTO, L. Caracterização molecular e determinação do perfil de resistência de isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae* circulantes na Grande Florianópolis: série histórica 2008-2016. 1–127 p. 2018.
- GOLPARIAN, D. et al. Importance of multidrug efflux pumps in the antimicrobial resistance property of clinical multidrug-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 58, n° 6, p. 3556–3559, 2014.



- GOLPARIAN, D. et al. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate, belonging to the internationally spreading Japanese FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, Ireland, August 2018. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 23, n° 47, p. 1–4, 2018.
- GOLPARIAN, D.; BAZZO, M. L. et al. Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* elucidating the gonococcal antimicrobial resistance and lineages/sublineages across Brazil, 2015–16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 75, n° 11, p. 3163–3172, 2020.
- GOLPARIAN, D.; HARRIS, S. R. et al. Genomic evolution of *Neisseria gonorrhoeae* since the preantibiotic era (1928–2013): Antimicrobial use/misuse selects for resistance and drives evolution. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 21, n° 1, p. 1–13, 2020.
- GOLUB, J. E. et al. Transmission of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among Men with Urethritis and Their Female Sex Partners. [s.l.], v. 178, p. 1707–1711, 1998.
- GONG, Z. et al. Novel genes related to ceftriaxone resistance found among ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains selected in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n° 4, p. 2043–2051, 2016.
- GOODMAN, S. D.; SCOCCAT, J. J. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. [s.l.], v. 85, n° September, p. 6982–6986, 1988.
- GORIS, J. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 57, n° 1, p. 81–91, 2007.
- GRANT, P. E. et al. *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* subsp. nov., formerly CDC group M-6, a gram-negative bacterium associated with endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 28, n° 12, p. 2591–2596, 1990.
- GREGORIO, E. DE et al. The abundant class of nemis repeats provides RNA substrates for ribonuclease III in Neisseriae. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, [s.l.], v. 1576, n° 1–2, p. 39–44, 2002.
- GUIZELINI, D. et al. GFinisher: A new strategy to refine and finish bacterial genome assemblies. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n° October, p. 1–8, 2016.
- HABIB, G. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis. **European Heart Journal**. [s.l.]: [s.n.], 2015. v. 36, 3075–3123 p.
- HADDOW, L. J. et al. *Neisseria elongata* endocarditis: Case report and literature review.

- Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 9, n° 5, p. 426–430, 2003.
- HAGMAN, K. E. et al. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system. **Microbiology**, [s.l.], v. 141, n° 3, p. 611–622, 1995.
- HAGMAN, K. E.; SHAFER, W. M. Transcriptional control of the mtr efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 177, n° 14, p. 4162–4165, 1995.
- HARRISON, O. B. et al. Description and Nomenclature of *Neisseria meningitidis* Capsule Locus. [s.l.], v. 19, n° 4, 2013.
- HELM, R. A.; BARNHART, M. M.; SEIFERT, H. S. *pilQ* missense mutations have diverse effects on PilQ multimer formation, piliation, and pilus function in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 189, n° 8, p. 3198–3207, 2007.
- HENRIKSEN, S. D.; HOLTEN, E. *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s.l.], v. 26, n° 4, p. 478–481, 1976.
- HERBERT, D. A. Successful Oral Ciprofloxacin Therapy of *Neisseria elongata* Endocarditis. **Annals of Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 48, n° 11, p. 1529–1530, 2014.
- HESS, D. et al. Genome Sequencing of a *Neisseria gonorrhoeae* Isolate of a Successful International Clone with Decreased Susceptibility and Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 56, n° 11, p. 5633–5641, 2012.
- HIGASHI, D. L. et al. *N. elongata* produces type IV pili that mediate interspecies gene transfer with *N. gonorrhoeae*. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 6, n° 6, 2011.
- HOFFMAN, O.; WEBER, J. R. Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, [s.l.], v. 2, n° 6, p. 401–412, 2009.
- HOFSTAD, T.; HOPE, O.; FALSEN, E. Septicaemia with *Neisseria elongata* ssp. *nitroreducens* in a patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 30, n° 2, p. 200–201, 1998.
- HOSHINO, T. et al. *Neisseria elongata* Subsp. *nitroreducens* endocarditis in a seven-year-old boy [4]. **Pediatric Infectious Disease Journal**, [s.l.], v. 24, n° 4, p. 391–392, 2005.
- HSIAO, J. F. et al. *Neisseria elongata* endocarditis complicated by brain embolism and abscess. **Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 57, n° 3, p. 376–381, 2008.
- 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**, [s.l.], v. 49, n° 10, p. 4327–4334, 2005.

IMPERIAL, H. L.; JOHO, K. L.; ALCID, D. V. Prosthetic-Valve endocarditis caused by peptostreptococcus anaerobius. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20, n° 5, p. 1431–1432, 1995.

ITO, M. et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in central Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n° 1, p. 137–143, 2005.

JALIL, E. M. et al. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, [s.l.], v. 30, n° 12, p. 1–6, 2008.

JENNISON, A. V. et al. Genetic relatedness of ceftriaxone-resistant and highlevel azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* cases, United Kingdom and Australia, February to April 2018. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 24, n° 8, p. 1–4, 2019.

JOHNSON, J. E. et al. ZipA Is Required for Targeting of DMinC/DicB, but Not DMinC/MinD, Complexes to Septal Ring Assemblies in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 186, n° 8, p. 2418–2429, 2004.

JOHNSON, S. R. et al. Mutations causing in vitro resistance to azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 21, n° 5, p. 414–419, 2003.

JOHNSON, S. R. et al. In vitro selection of *Neisseria gonorrhoeae* mutants with elevated MIC values and increased resistance to cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 58, n° 11, p. 6986–6989, 2014.

JOLLEY, K. A. et al. Ribosomal multilocus sequence typing: Universal characterization of bacteria from domain to strain. **Microbiology**, [s.l.], v. 158, n° 4, p. 1005–1015, 2012.

JONGH, M. DE et al. *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) of ciprofloxacin resistant isolates of Pretoria, South Africa. **Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 61, n° 5, p. 686–687, 2008.

KAPLAN, L. J.; FLAHERTY, J. Centers for Disease Control Group M-6: A Cause of Destructive Endocarditis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 164, p. 822–823, 1991.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:

- Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 30, n° 4, p. 772–780, 2013.
- KATZ, A. R. et al. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: Case report of the first isolate identified in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 54, n° 6, p. 841–843, 2012.
- KIM, W. J. et al. Commensal *Neisseria* Kill *Neisseria gonorrhoeae* through a DNA-Dependent Mechanism Article. [s.l.], p. 1–12, 2019.
- 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**, [s.l.], v. 89, n° SUPPL. 4, 2013.
- KNAPP, J. S. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 1, n° 4, p. 415–431, 1988.
- KNOX, J.; HUME, S.; JOHNSON, D. Sternoclavicular septic arthritis caused by *Neisseria elongata* subspecies *nitroreducens*. **Pathology**, [s.l.], v. 45, n° 5, p. 490–492, 2015.
- KO, K. K. K. et al. First Case of Ceftriaxone-Resistant Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Singapore. [s.l.], v. 63, n° 5, p. 11–13, 2019.
- KOCIUBA, K.; MUNRO, R.; DALEY, D. M-6 endocarditis report of an Australian case. **Pathology**, [s.l.], v. 25, p. 310–312, 1993.
- KORCH, C. et al. Cryptic plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*: Complete nucleotide sequence and genetic organization. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 163, n° 2, p. 430–438, 1985.
- LAHRA, M. M. et al. Cooperative recognition of internationally disseminated ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 24, n° 4, p. 735–740, 2018.
- LAHRA, M. M.; LO, Y. R.; WHILEY, D. M. Gonococcal antimicrobial resistance in the Western Pacific Region. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n° SUPPL. 4, p. 19–23, 2013.
- LAHRA, M. M.; RYDER, N.; WHILEY, D. M. A New Multidrug-Resistant Strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 371, n° 19, p. 1849–1850, 2014.
- LALANI, T. et al. In-hospital and 1-year mortality in patients undergoing early surgery for prosthetic valve endocarditis. **JAMA Internal Medicine**, [s.l.], v. 173, n° 16, p. 1495–1504, 2013.

- LASSAK, K.; GHOSH, A.; ALBERS, S. V. Diversity, assembly and regulation of archaeal type IV pili-like and non-type-IV pili-like surface structures. **Research in Microbiology**, [s.l.], v. 163, n° 9–10, p. 630–644, 2012.
- LEE, K. et al. Clonal expansion and spread of the ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain FC428, identified in Japan in 2015, and closely related isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 74, n° 7, p. 1812–1819, 2019.
- LEE, S. G. et al. Various *penA* mutations together with *mtrR*, *porB* and *ponA* mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime or ceftriaxone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 65, n° 4, p. 669–675, 2010.
- LEFEBVRE, B. et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria Gonorrhoeae*, Canada, 2017. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 24, n° 2, p. 381–383, 2018.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 4, n° 3, p. 203–221, 1987.
- LEWIS, L. A. et al. The meningococcal vaccine candidate neisserial surface protein a (NspA) binds to factor H and enhances meningococcal resistance to complement. **PLoS Pathogens**, [s.l.], v. 6, n° 7, p. 1–20, 2010.
- LEWIS, L. A.; RICE, P. A.; RAM, S. Role of gonococcal neisserial surface protein A (NSpA) in serum resistance and comparison of its factor H binding properties with those of its meningococcal counterpart. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 87, n° 2, p. 1–16, 2019.
- LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 25, n° 16, p. 2078–2079, 2009.
- LI, H. et al. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 27, n° 21, p. 2987–2993, 2011.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 25, n° 14, p. 1754–1760, 2009.
- LI, J. S. et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 30, n° 4, p. 633–638, 2000.
- LIAO, M. et al. Analysis of mutations in multiple loci of *Neisseria gonorrhoeae* isolates reveals effects of PIB, PBP2 and MtrR on reduced susceptibility to ceftriaxone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 66, n° 5, p. 1016–1023, 2011.
- LIN, M. et al. Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis Caused by *Neisseria Elongata* Subsp.

*Nitroreducens*, The First Report. **Peritoneal Dialysis International**, [s.l.], v. 34, n° 7, p. 816–817, 2014.

LIN, Y. H.; RYAN, C. S.; DAVIES, J. K. Neisserial correia repeat-enclosed elements do not influence the transcription of pil genes in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 193, n° 20, p. 5728–5736, 2011.

LINDBERG, R. et al. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: Association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 51, n° 6, p. 2117–2122, 2007.

LIU, G.; TANG, C. M.; EXLEY, R. M. Non-pathogenic *Neisseria*: Members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. **Microbiology (United Kingdom)**, [s.l.], v. 161, n° 7, p. 1297–1312, 2015.

LO, J. Y. C. et al. Ceftributen resistance and treatment failure of *Neisseria gonorrhoeae* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 52, n° 10, p. 3564–3567, 2008.

LOW, H. H.; MONCRIEFFE, M. C.; LÖWE, J. The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 341, n° 3, p. 839–852, 2004.

LUCAS, C. E. et al. The MtrR repressor binds the DNA sequence between the *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 179, n° 13, p. 4123–4128, 1997.

LYU, M. et al. Cryo-EM structures of a gonococcal multidrug efflux pump illuminate a mechanism of drug recognition and resistance. **mBio**, [s.l.], v. 11, n° 3, p. 1–15, 2020.

MAIDEN, M. C. J. et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 95, n° 6, p. 3140–3145, 1998.

MARRI, P. R. et al. Genome sequencing reveals widespread virulence gene exchange among human *Neisseria* species. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 5, n° 7, 2010.

MARTIN, I. et al. Emergence and characterization of neisseria gonorrhoeae isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and cefixime in Canada: 2001-2010. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 39, n° 4, p. 316–323, 2012.

MARTIN, I. M. C. et al. Rapid Sequence-Based Identification of Gonococcal Transmission

- Clusters in a Large Metropolitan Area. **The Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 189, n° 8, p. 1497–1505, 2004.
- MARTINS, T. A. et al. AS DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS SÃO PROBLEMAS ENTRE GESTANTES NO CEARÁ? **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, [s.l.], v. 16, n° 3, p. 50–58, 2004.
- MAYER, L. W.; HOLMES, K. K.; FALKOW, S. Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Neisseria gonorrhoeae*. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 10, n° 4, p. 712–717, 1974.
- MAZZONE, M. et al. Whole-genome organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences conserved in pathogenic *Neisseriae*. **Gene**, [s.l.], v. 278, n° 1–2, p. 211–222, 2001.
- MCARTHUR, A. G. et al. The comprehensive antibiotic resistance database. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 57, n° 7, p. 3348–3357, 2013.
- MCLEAN, C. A. et al. The Emergence of *Neisseria gonorrhoeae* with Decreased Susceptibility to Azithromycin in Kansas City, Missouri, 1999 to 2000. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 31, n° 2, p. 73–78, 2004.
- MERZ, A. J.; SO, M. Interactions of Pathogenic *Neisseriae* with Epithelial Cell Membranes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. [s.l.]: [s.n.], 2000. v. 16, 423–457 p.
- MEULEMAN, P. et al. Bioprosthetic valve endocarditis caused by *Neisseria elongata* subspecies *nitroreducens*. **Infection**, [s.l.], v. 24, n° 3, p. 258–260, 1996.
- MICHAUD, D. S.; PLATZ, E. A.; GIOVANNUCCI, E. Gonorrhoea and male bladder cancer in a prospective study. **British journal of cancer**, [s.l.], v. 96, n° 1, p. 169–71, 2007.
- MILLER, K. E. Diagnosis and treatment of *Neisseria gonorrhoeae* infections. **American Family Physician**, [s.l.], v. 73, n° 10, 2006.
- MOHERDAUI, F. et al. Validation of national algorithms for the diagnosis of sexually transmitted diseases in Brazil: results from a multicentre study. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 74, p. 38–43, 1998.
- MORSE, S. A. et al. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal *tetM* determinant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 30, n° 5, p. 664–670, 1986.
- MOXON, R.; BAYLISS, C.; HOOD, D. Bacterial Contingency Loci: The Role of Simple Sequence DNA Repeats in Bacterial Adaptation. **Annual Review of Genetics**, [s.l.], v. 40, n°

1, p. 307–333, 2006.

MURRAY, P. R. et al. Gram-negative Bacteria - *Neisseria*. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th Editio ed. Washington DC: [s.n.], 2007. p. 601–620.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J. Manual of clinical microbiology. 9 ed. Washington DC: ASM Press, 2007.

NABU, S. et al. Comparative Proteomics Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* strains in response to extended-spectrum cephalosporins. **EXCLI Journal**, [s.l.], v. 16, p. 1207–1229, 2017.

NAKAYAMA, S. et al. Strain with a Novel Mosaic *penA* Gene Isolated in Japan. **The New England journal of medicine**, [s.l.], v. 60, n° 7, p. 4339–4341, 2016.

NAWAZ, T.; HARDY, D. J.; BONNEZ, W. *Neisseria elongata* subsp. *elongata*, a case of human endocarditis complicated by pseudoaneurysm. **Journal of clinical microbiology**, [s.l.], v. 34, n° 3, p. 756–758, 1996.

NDOWA, F. J. et al. Gonococcal antimicrobial resistance: Perspectives from the African region. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n° SUPPL. 4, p. 11–15, 2013.

NEWMAN, L. et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 10, n° 12, p. 1–17, 2015.

OHNECK, E. A. et al. A novel mechanism of high-level, broad-spectrum antibiotic resistance caused by a single base pair change in *Neisseria gonorrhoeae*. **mBio**, [s.l.], v. 2, n° 5, p. 1–8, 2011.

OHNISHI, M. et al. Spread of a chromosomal cefixime-resistant *penA* gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n° 3, p. 1060–1067, 2010.

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**, [s.l.], v. 55, n° 7, p. 3538–3545, 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**, [s.l.], v. 188, n° 7, p. 2300–2308, 2006.

OLESKY, M.; HOBBS, M.; NICHOLAS, R. A. Identification and analysis of amino acid



- mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 46, n° 9, p. 2811–2820, 2002.
- OSAKA, K. et al. Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s.l.], v. 14, n° 3, p. 195–203, 2008.
- OSUKA, H. et al. Native Valve Endocarditis Caused by *Neisseria elongata* Subsp. *nitroreducens*. **Internal Medicine**, [s.l.], v. 54, n° 7, p. 853–856, 2015.
- OTA, K. V. et al. Incidence and treatment outcomes of pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in men who have sex with men: A 13-Year retrospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 48, n° 9, p. 1237–1243, 2009.
- PAGE, A. J. et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 31, n° 22, p. 3691–3693, 2015.
- PAGE, A. J. et al. SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. **Microbial genomics**, [s.l.], v. 2, n° 4, p. e000056, 2016.
- PAN, W.; SPRATT, B. G. Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the mtr system. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 11, n° 4, p. 769–775, 1994.
- PAYNE, S. M. Iron acquisition in microbial pathogenesis. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 1, n° 2, p. 66–69, 1993.
- PENNA, G. O.; ABRAHÃO, L.; MAGALHÃES, T. Gerson Oliveira Penna 1 , Ludhmila Abrahão Hajjar 2 e Tatiana Magalhães Braz 3. **Revisra da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 33, n° 5, p. 451–464, 2000.
- PEREZ, R. E. Endocarditis with Moraxella-like M-6 after cardiac catheterization. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 24, n° 3, p. 501–502, 1986.
- PERKINS-BALDING, D.; RATLIFF-GRIFFIN, M.; STOJILJKOVIC, I. Iron Transport Systems in *Neisseria meningitidis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 68, n° 1, p. 154–171, 2004.
- PICU, C. et al. Aortic prosthetic endocarditis with *Neisseria elongata* subspecies *nitroreducens*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 35, n° 4, p. 280–282, 2003.
- PINTADO, C. et al. Multiresistance plasmid from commensal *Neisseria* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 27, n° 1, p. 120–124, 1985.

- PLATT, R.; RICE, P. A.; MCCORMACK, W. M. Risk of Acquiring Gonorrhea and Prevalence of Abnormal Adnexal Findings Among Women Recently Exposed to Gonorrhea. **JAMA**, [s.l.], v. 250, n° 23, p. 3205–3209, 1983.
- PONCIANO, J. M. et al. The population biology of bacterial plasmids: A hidden Markov model approach. **Genetics**, [s.l.], v. 176, n° 2, p. 957–968, 2007.
- PONCIN, T. et al. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* failing treatment with ceftriaxone and doxycycline in France, november 2017. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 23, n° 21, p. 2–4, 2018.
- POWELL, A. J. et al. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 284, n° 2, p. 1202–1212, 2009.
- PRITCHARD, L. et al. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analytical Methods**, [s.l.], v. 8, n° 1, p. 12–24, 2016.
- QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 16, n° 4, p. 226–240, 2018.
- QVARNSTROM, Y.; SWEDBERG, G. Variations in gene organization and DNA uptake signal sequence in the *folP* region between commensal and pathogenic *Neisseria* species. **BMC Microbiology**, [s.l.], v. 6, p. 1–9, 2006.
- RANKIN, D. J.; ROCHA, E. P. C.; BROWN, S. P. What traits are carried on mobile genetic elements, and why. **Heredity**, [s.l.], v. 106, n° 1, p. 1–10, 2011.
- REYN, A.; KORNER, B.; BENTZON, M. W. Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. **The British journal of venereal diseases**, [s.l.], v. 34, n° 4, p. 227–239, 1958.
- ROBERTS, M. C. Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 2, n° SUPPL., p. 18–23, 1989.
- ROPP, P. A. et al. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 46, n° 3, p. 769–777, 2002.
- ROSE, R. C.; GROSSMAN, A. M.; GILES, J. W. Infective endocarditis due to the CDC group M6 bacillus. **Journal of the Tennessee Medical Association**, [s.l.], v. 83, n° 12, p.

603–604, 1990.

ROSSELLA, P. et al. Native Mitral Valve Endocarditis Caused by *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* in a Patient with Marfan Syndrome: First Case in Italy and Review of the Literature. **Case Reports in Infectious Diseases**, [s.l.], v. 2016, p. 1–4, 2016.

ROTGER, R.; NOMBELA, C. Characterization of penicillin-resistant beta-lactamase producing-strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Spain (1978-81). **Microbiologia espanola**, [s.l.], v. 36, n° 3–4, p. 115–122, 1983.

ROTGER, R.; RUBIO, F.; NOMBELA, C. A multi-resistance plasmid isolated from commensal *Neisseria* species is closely related to the enterobacterial plasmid RSF1010. **Journal of General Microbiology**, [s.l.], v. 132, n° 9, p. 2491–2496, 1986.

ROTMAN, E.; SEIFERT, H. S. The Genetics of *Neisseria* Species. **Annual Review of Genetics**, [s.l.], v. 48, n° 1, p. 405–431, 2014.

ROUQUETTE-LOUGHLIN, C. E. et al. Modulation of the mtrCDE-encoded efflux pump gene complex of *Neisseria meningitidis* due to a *Correia* element insertion sequence. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 54, n° 3, p. 731–741, 2004.

ROUQUETTE-LOUGHLIN, C. E.; BALTHAZAR, J. T.; SHAFER, W. M. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 56, n° 5, p. 856–860, 2005.

ROWLEY, J. et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis. **Bulletin of the World Health Organization**, [s.l.], v. 97, n° 8, p. 548–562, 2019.

SAMANNODI, M. et al. *Neisseria elongata* endocarditis of a native aortic valve. **BMJ Case Reports**, [s.l.], p. bcr2015213311, 2016.

SÁNCHEZ-BUSÓ, L. et al. The impact of antimicrobials on gonococcal evolution. **Nature Microbiology**, [s.l.], v. 4, n° 11, p. 1941–1950, 2019.

SCHEUERPFLUG, I. N. A. et al. Roles of PilC and Pile Proteins in Pilus-Mediated Adherence of. **Microbiology**, [s.l.], v. 67, n° 2, p. 834–843, 1999.

SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 30, n° 14, p. 2068–2069, 2014.

SHAFER, W. M.; FOLSTER, J. P. Towards an understanding of chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Evidence for a porin-efflux pump collaboration. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 188, n° 7, p. 2297–2299, 2006.

SHIMUTA, K. et al. Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-

resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 15, n° 1, p. 1–11, 2015.

SIMÃO, F. A. et al. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 31, n° 19, p. 3210–3212, 2015.

SIMMS, I. et al. Risk factors associated with pelvic inflammatory disease. **Sexually transmitted infections**, [s.l.], v. 82, n° 6, p. 452–457, 2006.

SIMOR, A. E.; SALIT, I. E. Endocarditis caused by M6. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 17, n° 5, p. 931–933, 1983.

SNYDER, L. A. S.; COLE, J. A.; PALLEN, M. J. Comparative analysis of two *Neisseria gonorrhoeae* genome sequences reveals evidence of mobilization of Correia Repeat Enclosed Elements and their role in regulation. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 10, p. 1–10, 2009.

SPAARGAREN, J. et al. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of a core group of *Neisseria gonorrhoeae* transmitters in the population attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 39, n° 6, p. 2335–2337, 2001.

SPARLING, P. F.; SARUBBI, F. A.; BLACKMAN, E. Inheritance of low level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 124, n° 2, p. 740–749, 1975.

SPITERI, G. et al. The European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP)-a sentinel approach in the European Union (EU)/European Economic Area (EEA). **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n° SUPPL. 4, p. 16–18, 2013.

STABLER, R. A. et al. Identification of pathogen-specific genes through microarray analysis of pathogenic and commensal *Neisseria* species. **Microbiology**, [s.l.], v. 151, n° 9, p. 2907–2922, 2005.

STABLER, R. A. et al. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 4, n° 1, p. 1–15, 2010.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 30, n° 9, p. 1312–1313, 2014.

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

- ceftriaxone. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 39, n° 10, p. 813–821, 2012.
- STEFANOVA, M. E. et al. Overexpression and enzymatic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 271, n° 1, p. 23–32, 2004.
- STEIN, D. C.; GREGOIRE, S.; PIEKAROWICZ, A. Restriction of plasmid DNA during transformation but not conjugation in *Neisseria gonorrhoeae*. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 56, n° 1, p. 112–116, 1988.
- STRUILLOU, L.; RAFFI, F.; BARRIER, J. H. Endocarditis caused by *Neisseria elongata* subspecies *nitroreducens*: Case report and literature review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s.l.], v. 12, n° 8, p. 625–627, 1993.
- TAKAHASHI, S. et al. Antimicrobial susceptibility and penicillin-binding protein 1 and 2 mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolated from male urethritis in Sapporo, Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s.l.], v. 19, n° 1, p. 50–56, 2013.
- TANAKA, M. et al. High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones in Japan. **Genitourinary Medicine**, [s.l.], v. 70, n° 2, p. 90–93, 1994.
- TANAKA, M. et al. A remarkable reduction in the susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to cepheems and the selection of antibiotic regimens for the single-dose treatment of gonococcal infection in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s.l.], v. 8, n° 1, p. 81–86, 2002.
- TANAKA, Masatoshi et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 27, n° 1, p. 20–26, 2006.
- TAPSALL, J. W. et al. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [s.l.], v. 7, n° 7, p. 821–834, 2009.
- TERKELSEN, D. et al. Multidrug-resistant neisseria gonorrhoeae infection with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, Denmark, 2017. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 22, n° 42, p. 1–4, 2017.
- THAKUR, S. D. et al. Unique combined *penA/mtrR/porB* mutations and NG-MAST strain types associated with ceftriaxone and cefixime MIC increases in a “susceptible” *Neisseria*

- gonorrhoeae* population. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 69, n° 6, p. 1510–1516, 2014.
- TOBIASON, D. M.; SEIFERT, H. S. The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid. **PLoS Biology**, [s.l.], v. 4, n° 6, p. 1069–1078, 2006.
- TOBIASON, D. M.; SEIFERT, H. S. Genomic content of neisseria species. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 192, n° 8, p. 2160–2168, 2010.
- TOMBERG, J. et al. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. **NIH Public Access Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n° 37, p. 8062–8070, 2010.
- TOMBERG, J. et al. Identification of amino acids conferring high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins in the *penA* gene from *Neisseria gonorrhoeae* strain H041. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 57, n° 7, p. 3029–3036, 2013.
- TØNJUM, T. et al. Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the *Neisseria meningitidis* PilQ protein. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 29, n° 1, p. 111–124, 1998.
- TOOKE, C. L. et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 431, n° 18, p. 3472–3500, 2019.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. 1–760 p.
- TREES, D. L. et al. Alterations within the quinolone resistance-determining regions of GyrA and ParC of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in the Far East and the United States. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 12, n° 4, p. 325–332, 1999.
- UEHARA, A. A. et al. Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 49, no 12, p. 4208–4212, 2011.
- UNEMO, M. et al. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 16, n° 43, p. 3–5, 2011.
- UNEMO, M. et al. 2020 European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **International Journal of STD and AIDS**, [s.l.], 2020.
- UNEMO, Magnus et al. NIH Public Access. [s.l.], v. 115, n° 3, p. 231–241, 2009.

- 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**, [s.l.], v. 56, n° 3, p. 1273–1280, 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**, [s.l.], v. 56, n° 3, p. 1273–1280, 2012.
- UNEMO, M. et al. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea - the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 15, p. 364, 2015.
- UNEMO, M. et al. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: Phenotypic, genetic and reference genome characterization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 71, n° 11, p. 3096–3108, 2016.
- UNEMO, Magnus; 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**, [s.l.], v. 24, n° 3, p. 447–458, 2011.
- UNEMO, Magnus; GOLPARIAN, D.; HELLMARK, B. First three neisseria gonorrhoeae isolates with high-Level resistance to azithromycin in sweden: A threat to currently available dual-Antimicrobial regimens for treatment of gonorrhea? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 58, n° 1, p. 624–625, 2014.
- UNEMO, Magnus; NICHOLAS, R. A. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 7, n° 12, p. 1401–1422, 2012.
- UNEMO, Magnus; RIO, C. Del; SHAFER, W. M. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. **Microbiology spectrum**, [s.l.], v. 4, n° 3, p. 1–32, 2016.
- UNEMO, Magnus; SHAFER, W. M. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s.l.], v. 1230, p. 1–15, 2011.
- UNEMO, Magnus. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 27, n° 3, p. 587–613,

2014.

VÉLEZ ACEVEDO, R. N. et al. Identification of regulatory elements that control expression of the *tbpBA* operon in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 196, n° 15, p. 2762–2774, 2014.

VERLI, H. Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 1ª. ed. ed. São Paulo: [s.n.], 2014. v. 53, 1689–1699 p.

VIRJI, M. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. **Nature reviews. Microbiology**, [s.l.], v. 7, n° 4, p. 274–86, 2009.

WADSWORTH, C. B. et al. Azithromycin Resistance through Interspecific Acquisition of an Epistasis-Dependent Efflux Pump Component and Transcriptional Regulator in *Neisseria gonorrhoeae*. [s.l.], v. 9, n° 4, p. 1–17, 2018.

WHILEY, D. M. et al. Alterations of the *pilQ* gene in *Neisseria gonorrhoeae* are unlikely contributors to decreased susceptibility to ceftriaxone and cefixime in clinical gonococcal strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 65, n° October, p. 2543–2547, 2010.

WHO. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. **World Health Organization**, [s.l.], p. 1–228, 2013.

WHO. Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. **Who**, [s.l.], 2016.

WINTHER-LARSEN, H. C. et al. *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 98, n° 26, p. 15276–15281, 2001.

WOLFGANG, M. et al. Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. **The EMBO journal**, [s.l.], v. 19, n° 23, p. 6408–18, 2000.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, [s.l.], v. 7, n° July 2014, p. 1–7, 2015.

YOKOI, S. et al. Threat to cefixime treatment for gonorrhoea [14]. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 13, n° 8, p. 1275–1277, 2007.

YOO, Y. P. et al. Infective Endocarditis Caused by *Neisseria elongata* on a Native Tricuspid Valve. **Texas Heart Institute Journal**, [s.l.], v. 41, n° 2, p. 227–230, 2014.

ZARANTONELLI, L. et al. Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to *mtrR* mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 43, n° 10, p.



2468–2472, 1999.

ZHAO, S. et al. The *penC* mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. **NIH Public Access Mol Microbiol.**, [s.l.], v. 57, n° 5, p. 1238–1251, 2005.

ZHAO, S. et al.. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 53, n° 9, p. 3744–3751, 2009.

## ANEXO A – Tabela de aminoácidos

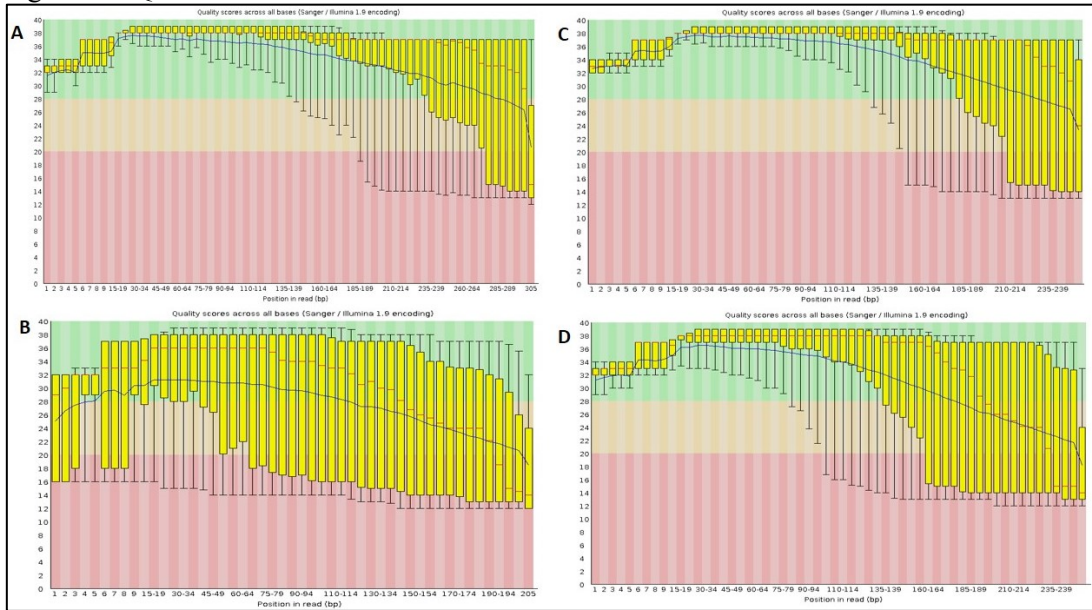
Tabela 7. Tabela de aminoácidos e suas respectivas siglas.

<b>Aminoácido</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Abreviação de uma letra</b>
Alanina	Ala	A
Fenilalanina	Fen	F
Glicina	Gli	G
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cis	C
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Tirosina	Tir	Y
Treonina	Tre	T
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Lisina	Lis	K
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E

Fonte: adaptado de (VERLI, 2014)

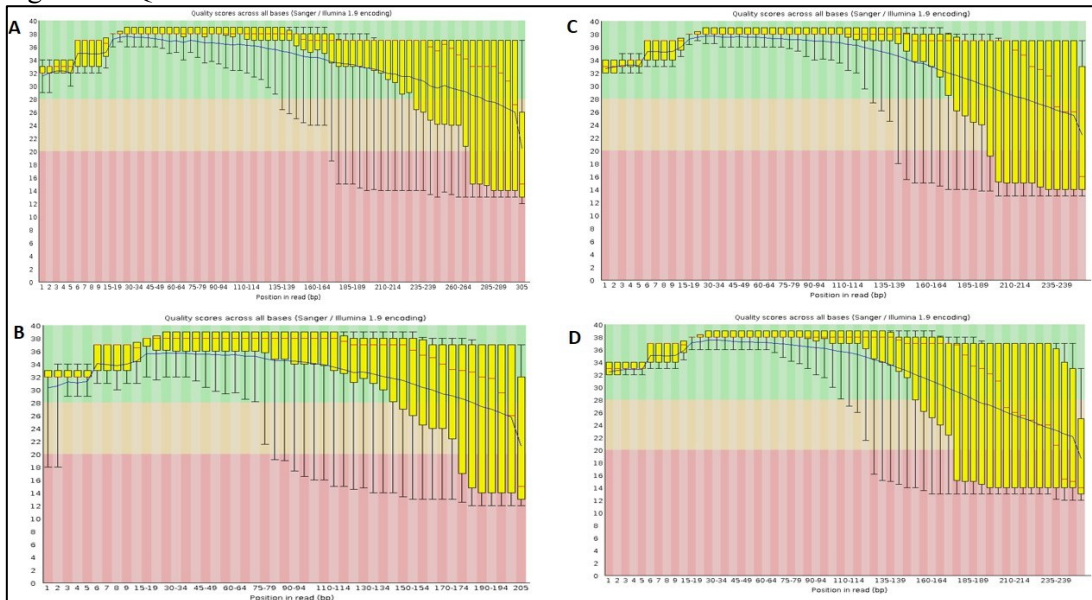
## APÊNDICE A – Qualidade Phred das leituras do sequenciamento dos isolados

Figura 17. Qualidade Phred das leituras do isolado M009.



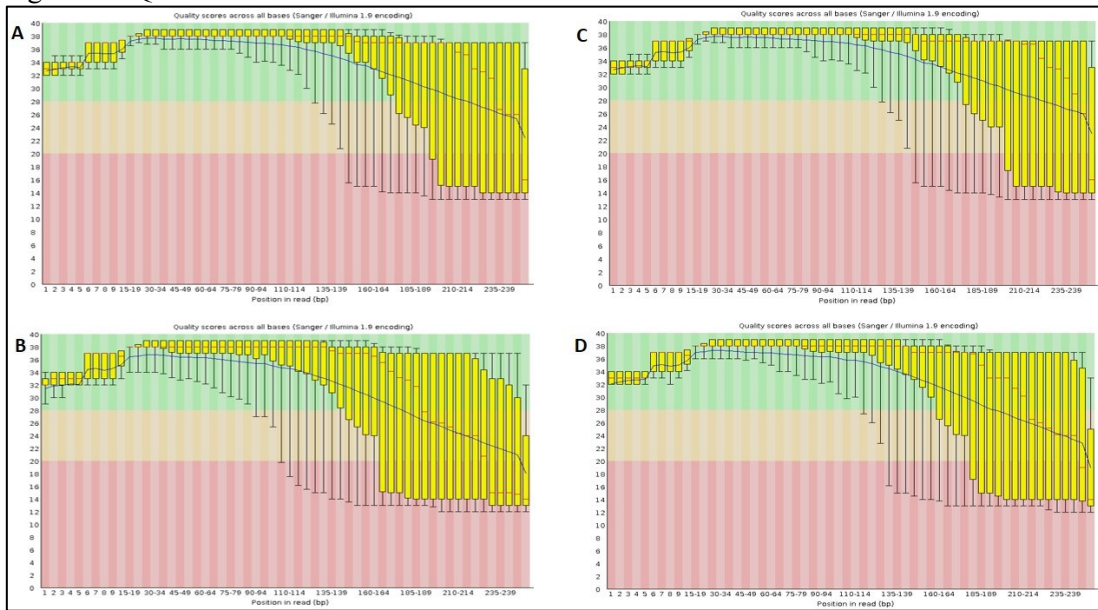
No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 antes da indução de resistência; (b) leituras R2 antes da indução de resistência (c) leituras R1 após a indução de resistência (d) leituras R2 após a indução de resistência. Fonte: autor, 2021.

Figura 18. Qualidade Phred das leituras do isolado M043.



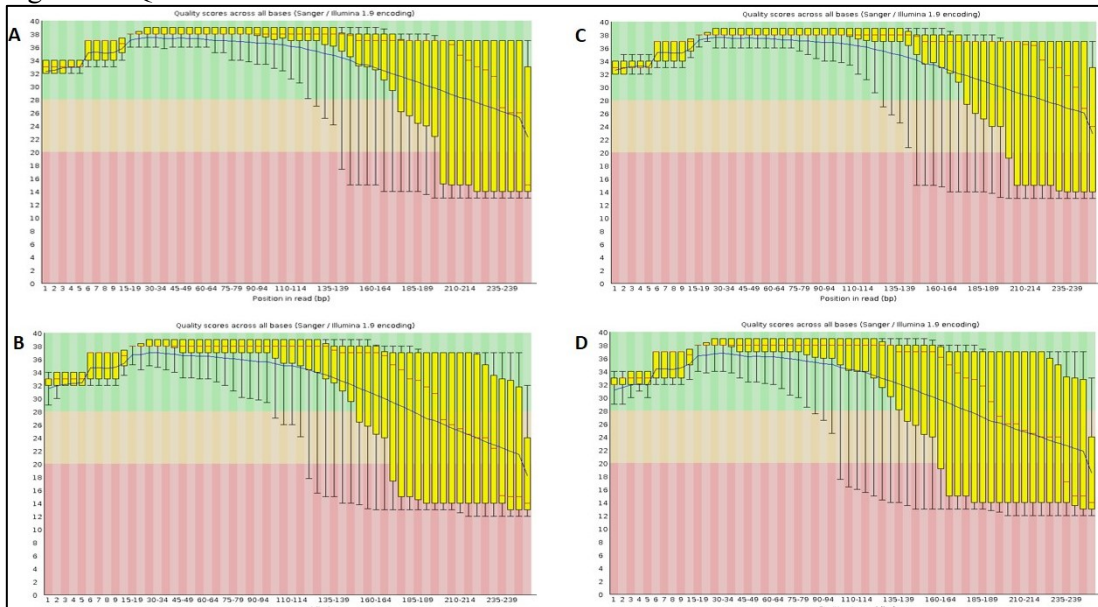
No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 antes da indução de resistência; (b) leituras R2 antes da indução de resistência (c) leituras R1 após a indução de resistência (d) leituras R2 após a indução de resistência. Fonte: autor, 2021.

Figura 19. Qualidade Phred das leituras do isolado M107.



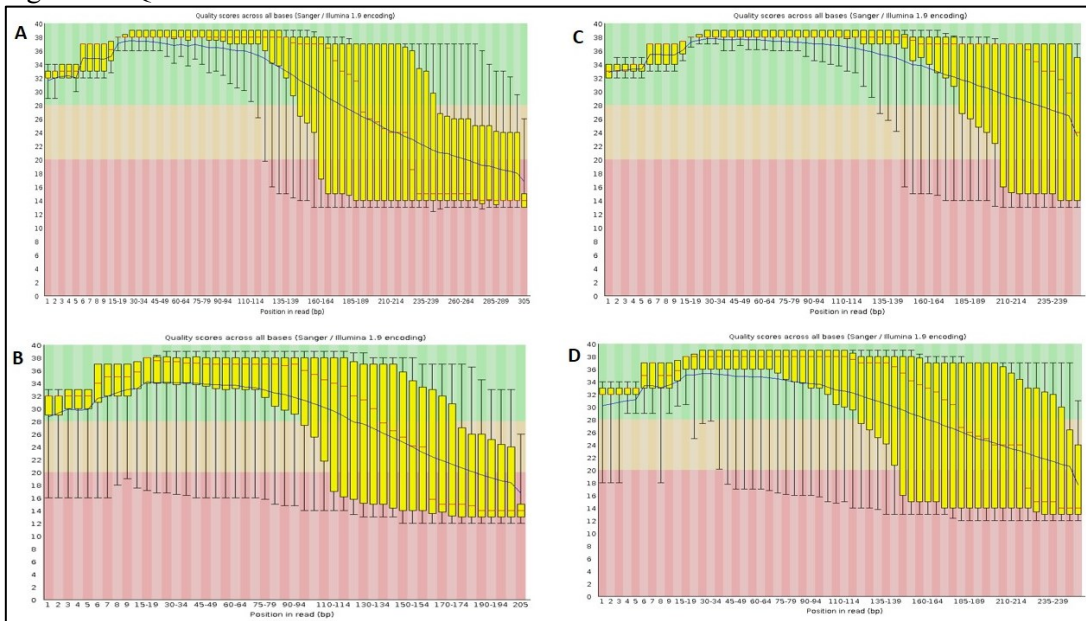
No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 antes da indução de resistência; (b) leituras R2 antes da indução de resistência (c) leituras R1 após a indução de resistência (d) leituras R2 após a indução de resistência. Fonte: autor, 2021.

Figura 20. Qualidade Phred das leituras do isolado M110.



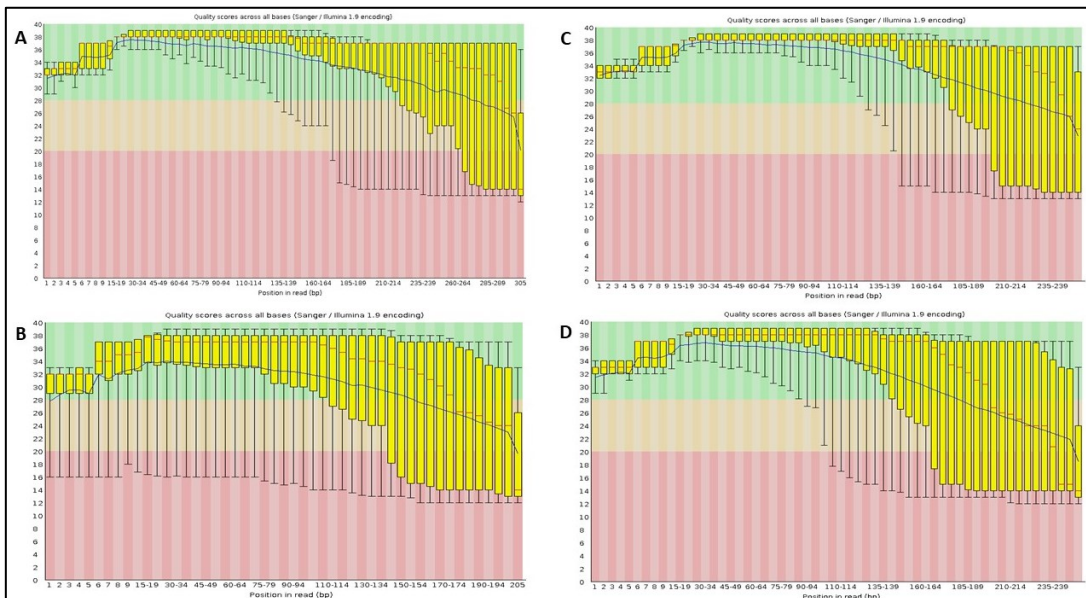
No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 antes da indução de resistência; (b) leituras R2 antes da indução de resistência (c) leituras R1 após a indução de resistência (d) leituras R2 após a indução de resistência. Fonte: autor, 2021.

Figura 21. Qualidade Phred das leituras do isolado M111.



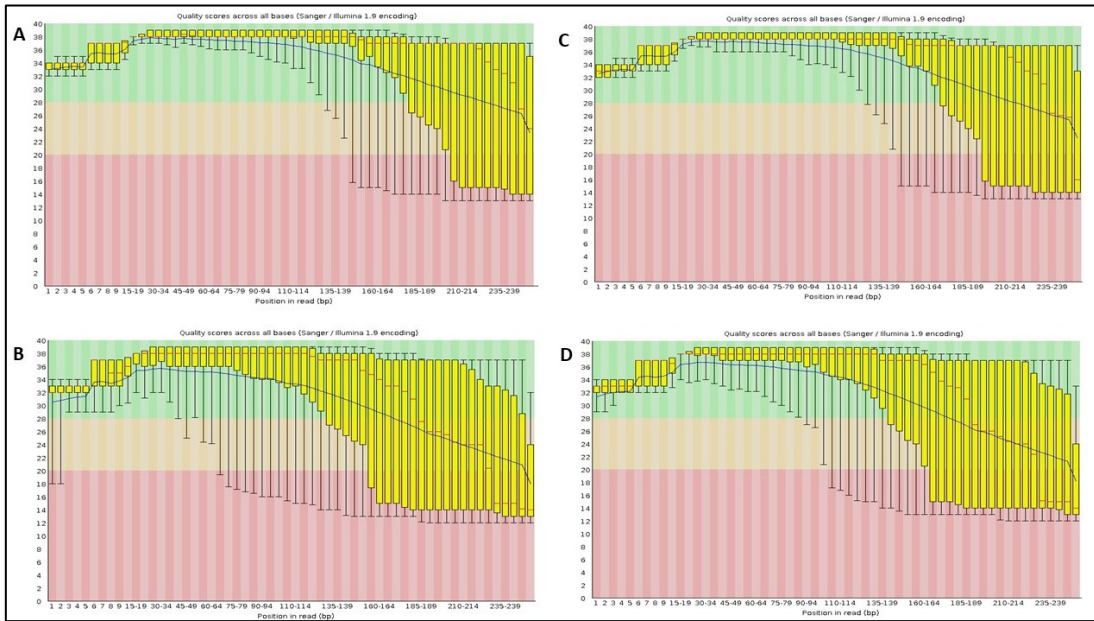
No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 antes da indução de resistência; (b) leituras R2 antes da indução de resistência (c) leituras R1 após a indução de resistência (d) leituras R2 após a indução de resistência. Fonte: autor, 2021.

Figura 22. Qualidade Phred das leituras do isolado M128.



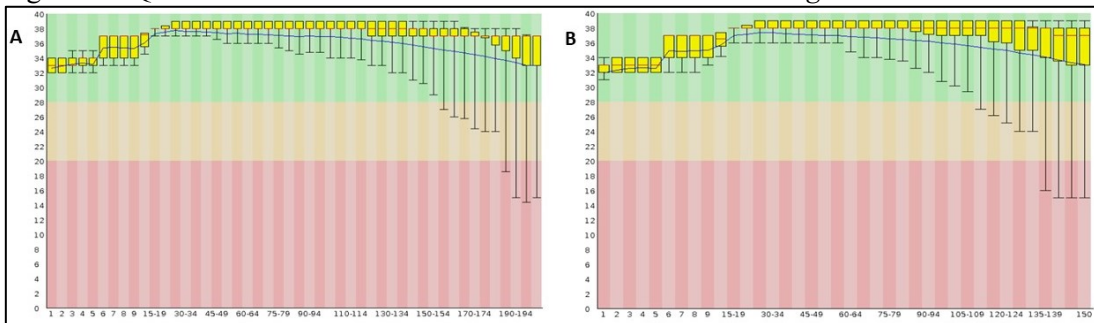
No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 antes da indução de resistência; (b) leituras R2 antes da indução de resistência (c) leituras R1 após a indução de resistência (d) leituras R2 após a indução de resistência. Fonte: autor, 2021.

Figura 23. Qualidade Phred das leituras dos isolados WHO F e WHO Y.



No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 de WHO Y após indução de resistência; (b) leituras R2 WHOY após indução de resistência (c) leituras R1 de WHO F após a indução de resistência (d) leituras R2 de WHO F após a indução de resistência. Fonte: autor, 2021.

Figura 24. Qualidade Phred das leituras do isolado de *Neisseria elongata*.



No eixo x está representada a posição da leitura. No eixo y, a qualidade Phred. Legenda: (a) leituras R1 do isolado M001 de *Neisseria elongata*; (b) leituras R2 do isolado M001 de *Neisseria elongata*. Fonte: autor, 2021.



**APÊNDICE B – Lista de amostras de *Neisseria elongata* incluídas no estudo**

Tabela 8. Lista de amostras de *Neisseria elongata* incluídas neste estudo, e dados adicionais obtidos do NCBI.

<b>Organismo</b>	<b>Isolado</b>	<b>Nº bioamostra Genbank</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>Local</b>	<b>Local de isolamento</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Plataforma Seq.</b>	<b>Cobertura montagem</b>	<b>Seq Date</b>
<i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i> ATCC 29315	ATCC 29315_2	SAMN02797820	1970	EUA	Orofaringe	<i>Homo sapiens</i>	PacBio	100×	14/01/2015
<i>N. elongata</i>	M15911	SAMN09704973	NI	NI	NI	<i>Homo sapiens</i>	PacBio	95×	01/08/2018
<i>N. elongata</i>	M15910	SAMN09704972	NI	NI	NI	<i>Homo sapiens</i>	PacBio	63×	01/08/2018
<i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i>	NCTC11050	SAMEA53328418	1970/1976	Noruega, Oslo	Orofaringe	<i>Homo sapiens</i>	PacBio	100×	17/06/2018
<i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i> ATCC 29315	ATCC 29315	SAMN00008838	1970/1976	Noruega, Oslo	Orofaringe	<i>Homo sapiens</i>	454 Roche	33×	09/11/2009
<i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i>	1279_NMEN	SAMN03197249	NI	EUA, Washington	NI	<i>Homo sapiens</i>	Illumina HiSeq	18×	10/07/2015
<i>N. elongata</i>	C2010010207	SAMN08299212	01/01/2010	EUA, Minnesota	NI	<i>Homo sapiens</i>	Illumina MiSeq	18×	09/04/2018
<i>N. elongata</i>	C2013018262	SAMN08299226	01/01/2013	EUA, Minnesota	NI	<i>Homo sapiens</i>	Illumina MiSeq	10×	09/04/2018



Continuação da Tabela 8

Organismo	Isolado	Nº bioamostra Genbank	Data de coleta	Local	Local de isolamento	Hospedeiro	Plataforma Seq.	Cobertura montagem	Data Seq.
<i>N. elongata</i>	C2014003241	SAMN08299229	01/01/2014	EUA, Minnesota	NI	<i>Homo sapiens</i>	Illumina MiSeq	20×	09/04/2018
<i>N. elongata</i>	C2013010062	SAMN08299223	01/01/2013	EUA, Minnesota	NI	<i>Homo sapiens</i>	Illumina MiSeq	35×	09/04/2018
<i>N. elongata</i> subsp. <i>elongata</i>	NCTC10660	SAMEA3672883	1900/1969	NR	Faringe	<i>Homo sapiens</i>	PacBio	100×	01/08/2018
<i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i>	404_NMEN	SAMN03197594	NI	EUA, Washington	NI	<i>Homo sapiens</i>	Illumina HiSeq	25×	10/07/2015
<i>N. elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i>	431_NMEN	SAMN03197625	NI	EUA, Washington	NI	<i>Homo sapiens</i>	Illumina HiSeq	12×	10/07/2015
<i>N. elongata</i> subsp. <i>elongata</i>	ATCC 25295	SAMN05421815	NI	Noruega	Nasofaringe	<i>Homo sapiens</i>	Illumina HiSeq	628×	02/11/2016
<i>Neisseria</i> sp.	HMSC31F04	SAMN03436258	NI	NI	Trato respiratório	<i>Homo sapiens</i>	Illumina HiSeq	220×	21/10/2016
<i>N. elongata</i> subsp. <i>nitroreducens</i>	M001	SUB8675363	02/07/2018	Brasil, Florianópolis	Hemocultura	<i>Homo sapiens</i>	Illumina Miseq	120×	13/07/2018

Legenda: Seq, sequenciamento; NI, não informado. Fonte: autor, 2019.

### APÊNDICE C - Montagem dos isolados antes da indução de resistência

O genoma dos isolados antes da indução foram montados a fim de realizar o mapeamento das leituras do sequenciamento após a indução e assim fazer o chamamento das variantes. Na Tabela 9 estão descritas as principais métricas da qualidade da montagem dos genomas.

Tabela 9. Métricas da qualidade da montagem do genoma dos isolados antes da indução de resistência com cefixima.

<b>Isolado</b>	<b>Nº <i>contigs</i></b>	<b>Tamanho total (Mb)</b>	<b>Maior <i>contig</i></b>	<b>N50</b>	<b>L50</b>	<b>Cobertura de montagem</b>	<b>Nº CDSs</b>
M009	94	2,16	207.673	57.306	14	51x	2.113
M043	97	2,14	208.087	53.381	11	74x	2.089
M107	88	2,09	207.568	52.194	13	30x	2.035
M110	85	2,09	172.672	52.922	12	51x	2.038
M111	236	2,13	44.576	16.665	49	43x	2.048
M128	118	2,13	136.785	47.120	15	48x	2.070
WHO F	1	2,29	2.292.467	2.292.467	1	168x	2.321
WHO Y	1	2,23	2.228.980	2.228.980	1	186x	2.267

Legenda: N50: dado um conjunto de *contigs*, N50 é definido como o tamanho do menor *contig* que está a 50% do total de bases montadas. L50: dado um conjunto de *contigs*, é o *contig* que, somado aos maiores, representa 50% do total de bases montadas. Fonte: autor, 2021.

**APÊNDICE D – Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima**

Tabela 10. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M009.

Isolado	<i>Scaffold</i>	Posição no <i>scaffold</i>	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
M009	NODE_5_length_79663_cov_35.177505	74561	<i>amiC</i>	COG0860	<i>N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase</i> AmiC	G613A	A205T
	NODE_9_length_60169_cov_23.946587	36951			<i>IS3 family transposase</i> ISBcen16	C299A	P100Q
	NODE_17_length_50117_cov_31.568674	15286	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase</i> PenA	C932T	A311V
	NODE_17_length_50117_cov_31.568674	49719	<i>pilC</i>		<i>Outer membrane protein</i> PilC	A353G	N118S
	NODE_17_length_50117_cov_31.568674	49969	<i>pilC</i>		<i>Outer membrane protein</i> PilC	A103G	S35G
	NODE_48_length_9518_cov_27.120009	2968	<i>pqiB</i>	COG3008	<i>Paraquat-inducible protein</i> B	498delC	L167fs
	NODE_58_length_6104_cov_51.932073	944	<i>mafA1</i>		<i>Adhesin</i> MafA	840dupC	Y281fs
	NODE_82_length_959_cov_286.189904	225			<i>IS110 family transposase</i> ISNgo2	A172C	K58Q

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.

Tabela 11. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M043.

Isolado	<i>Scaffold</i>	Posição no <i>scaffold</i>	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
M043	NODE_5_length_102130_cov_50.650255	87011	<i>rpoC</i>	COG0086	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta</i>	C3427T	P1143S
	NODE_9_length_63333_cov_46.179318	46682			IS1595 family transposase IS1016	T437C	I146T
	NODE_9_length_63333_cov_46.179318	46794			IS1595 family transposase IS1016	G325A	D109N
	NODE_21_length_34173_cov_51.241379	18209	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase PenA</i>	C1651T	P551S
	NODE_31_length_20120_cov_45.059271	17989			IS1595 family transposase IS1016	A151G	T51A
	NODE_31_length_20120_cov_45.059271	18056			IS1595 family transposase IS1016	A218G	Y73C
	NODE_31_length_20120_cov_45.059271	18185			IS1595 family transposase IS1016	T347C	L116P
	NODE_31_length_20120_cov_45.059271	18341			IS1595 family transposase IS1016	A503G	N168S
	NODE_31_length_20120_cov_45.059271	18433			IS1595 family transposase IS1016	T595C	F199L
NODE_31_length_20120_cov_45.059271	18451			IS1595 family transposase IS1016	T613C	S205P	

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.

Tabela 12. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M107.

Isolado	Scaffold	Posição no scaffold	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
M107	NODE_3_length_95270_cov_14.046278	87421	<i>trpE</i>	COG0147	<i>Anthranilate synthase component 1</i>	370_392de IGGTTAC GAAACC GTCTAC AATTT	G124fs
	NODE_10_length_64407_cov_21.486248	18898	<i>zapA</i>		<i>Cell division protein ZapA</i>	299_300in sG	E101fs
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44490			IS1595 family transposase IS1016	A151G	T51A
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44532			IS1595 family transposase IS1016	G193C	G65R
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44551			IS1595 family transposase IS1016	G212C	G71A
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44566			IS1595 family transposase IS1016	G227T	G76V
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44580			IS1595 family transposase IS1016	A241G	R81G
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44659			IS1595 family transposase IS1016	C320A	A107E
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44686			IS1595 family transposase IS1016	T347C	L116P
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44758			IS1595 family transposase IS1016	C419T	S140L
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44842			IS1595 family transposase IS1016	A503G	N168S
	NODE_13_length_52194_cov_13.978739	44952			IS1595 family transposase IS1016	C613T	P205S
	NODE_17_length_45027_cov_19.702160	18704	<i>mafA1</i>		<i>Adhesin MafA</i>	840dupC	Y281fs
	NODE_21_length_40705_cov_21.469762	2778	<i>tufA</i>	COG0050	<i>Elongation factor Tuf</i>	C845T	T282I

Continuação da Tabela 12

<b>Isolado</b>	<b><i>Scaffold</i></b>	<b>Posição no <i>scaffold</i></b>	<b>Gene</b>	<b>Número COG</b>	<b>Produto</b>	<b>Mutação em nt</b>	<b>Troca de aa</b>
<b>M107</b>	NODE_42_length_11398_cov_16.050306	2816	<i>spoT</i>	COG0317	<i>Bifunctional (p)ppGpp synthase/hydrolase</i> SpoT	G871A	G291S

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.

Tabela 13. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M110.

Isolado	Scaffold	Posição no scaffold	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
M110	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	67635			IS1595 family transposase IS1016	T595C	F199L
	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	67811			IS1595 family transposase IS1016	T419C	L140S
	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	67905			IS1595 family transposase IS1016	G325A	D109N
	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	67910			IS1595 family transposase IS1016	A320C	E107A
	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	67989			IS1595 family transposase IS1016	G241A	G81R
	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	68003			IS1595 family transposase IS1016	G227T	G76V
	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	68018			IS1595 family transposase IS1016	G212C	G71A
	NODE_3_length_112657_cov_27.356136	68037			IS1595 family transposase IS1016	G193C	G65R
	NODE_5_length_88576_cov_30.494884	47549			IS1595 family transposase IS1016	G212C	G71A
	NODE_5_length_88576_cov_30.494884	47564			IS1595 family transposase IS1016	G227T	G76V
	NODE_5_length_88576_cov_30.494884	47657			IS1595 family transposase IS1016	A320C	E107A
	NODE_5_length_88576_cov_30.494884	47756			IS1595 family transposase IS1016	T419C	L140S
	NODE_5_length_88576_cov_30.494884	47840			IS1595 family transposase IS1016	A503G	N168S
	NODE_8_length_75393_cov_37.360016	45485	<i>mrcA</i>	COG5009	Penicillin-binding protein 1A	C1844T	A615V
	NODE_10_length_67541_cov_31.913134	50665	<i>folP</i>	COG0294	Dihydropteroate synthase	T277G	W93G

Continuação da Tabela 13

Isolado	Scaffold	Posição no scaffold	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
M110	NODE_11_length_53161_cov_36.293057	15527	<i>tufA</i>	COG0050	<i>Elongation factor Tuf</i>	C845TT	T282I
	NODE_12_length_52922_cov_28.421555	45509	<i>rpoD</i>	COG0568	<i>RNA polymerase sigma factor RpoD</i>	275_286de 1ACGATG ATGCCG	D92_A95d el
	NODE_13_length_49612_cov_38.018147	32388	<i>ftsZ</i>	COG0206	<i>Cell division protein FtsZ</i>	C953T	A318V
	NODE_15_length_44806_cov_36.686005	26318	<i>mafA</i>		<i>Adhesin MafA</i>	835_836in sC	Y281fs

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.



Tabela 14. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M111.

Isolado	Scaffold	Posição no scaffold	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
M111	NODE_5_length_30629_cov_37.658449	16856	<i>rseP</i>	COG0750	Regulator of sigma-E protease RseP	207_208de ITA	T70fs
	NODE_6_length_28549_cov_35.291042	12585	<i>penA</i>	COG0768	putative peptidoglycan D,D-transpeptidase PenA	C1651T	P551S
	NODE_6_length_28549_cov_35.291042	12636	<i>penA</i>	COG0768	putative peptidoglycan D,D-transpeptidase PenA	A1600G	T534A
	NODE_6_length_28549_cov_35.291042	12773	<i>penA</i>	COG0768	putative peptidoglycan D,D-transpeptidase PenA	C1463T	A488V
	NODE_17_length_23244_cov_36.247567	10225	<i>atpB</i>	COG0356	ATP synthase subunit a	195dupA	A66fs
	NODE_17_length_23244_cov_36.247567	15651	<i>atpD1</i>		ATP synthase subunit beta 1	C881T	S294F
	NODE_48_length_16670_cov_41.178807	7139	<i>manX</i>		PTS system mannose-specific EIIB component	A217G	T73A
	NODE_52_length_15653_cov_32.039289	6710	<i>lptG</i>	COG0795	LipopoKaccharide export system permease protein LptG	49_50insG T	V17fs
	NODE_56_length_15169_cov_25.900080	1536	<i>rpoB</i>		DNA-directed RNA polymerase subunit beta	C1237A	R413S
	NODE_56_length_15169_cov_25.900080	5823	<i>rpoC</i>	COG0086	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	C1193A	A398D
	NODE_132_length_5056_cov_25.078109	88			IS1595 family transposase IS1016	G55A	A19T
	NODE_132_length_5056_cov_25.078109	149			IS1595 family transposase IS1016	G116C	G39A
	NODE_132_length_5056_cov_25.078109	164			IS1595 family transposase IS1016	T131G	V44G
	NODE_132_length_5056_cov_25.078109	241			IS1595 family transposase IS1016	A208G	T70A

Continuação da Tabela 14

Isolado	<i>Scaffold</i>	Posição no <i>scaffold</i>	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
MIII	NODE_132_length_5056_cov_25.078109	262			IS1595 family transposase IS1016	A229G	N77D
	NODE_132_length_5056_cov_25.078109	356			IS1595 family transposase IS1016	T323C	L108S
	NODE_132_length_5056_cov_25.078109	539			IS1595 family transposase IS1016	T506C	F169S
	NODE_178_length_2140_cov_27.248882	173	<i>pilE</i>		<i>Fimbrial protein</i>	A364T	T122S
	NODE_178_length_2140_cov_27.248882	178	<i>pilE</i>		<i>Fimbrial protein</i>	A359C	E120A
	NODE_178_length_2140_cov_27.248882	179	<i>pilE</i>		<i>Fimbrial protein</i>	G358A	E120K

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.

Tabela 15. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima do isolado M128.

Isolado	Scaffold	Posição no scaffold	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
M128	NODE_3_length_109594_cov_34.027460	57390	<i>pilQ</i>		<i>Type IV pilus biogenesis and competence protein PilQ</i>	G1769A	G590D
	NODE_8_length_60316_cov_36.670289	17293	<i>rpsS</i>	COG0185	<i>30S ribosomal protein S19</i>	C26T	P9L
	NODE_8_length_60316_cov_36.670289	29014	<i>rpoC</i>	COG0086	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta</i>	C3437T	A1146V
	NODE_10_length_59604_cov_28.533954	35618			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	G196C	A66P
	NODE_10_length_59604_cov_28.533954	35634			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	G212C	G71A
	NODE_10_length_59604_cov_28.533954	35841			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	T419C	L140S
	NODE_10_length_59604_cov_28.533954	36024			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	T602C	F201S
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47034			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	G151A	A51T
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47076			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	G193C	G65R
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47095			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	G212C	G71A
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47110			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	T227G	V76G
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47187			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	A304G	T102A
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47208			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	A325G	N109D
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47302			<i>IS1595 family transposase</i> IS1016	T419C	L140S

Continuação da Tabela 15

Isolado	<i>Scaffold</i>	Posição no <i>scaffold</i>	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
	NODE_11_length_58779_cov_37.667275	47496			IS1595 family transposase IS1016	C613TT	P205S
	NODE_18_length_34895_cov_34.381328	18155	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase</i> PenA	C1651T	P551S
	NODE_18_length_34895_cov_34.381328	18169	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase</i> PenA	G1637C	G546A
	NODE_18_length_34895_cov_34.381328	18290	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase</i> PenA	A1516C	N506H
	NODE_18_length_34895_cov_34.381328	18739	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase</i> PenA	G1067A	R356H
	NODE_18_length_34895_cov_34.381328	18853	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase</i> PenA	C953T	A318V
	NODE_18_length_34895_cov_34.381328	18874	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase</i> PenA	C932T	A311V
	NODE_18_length_34895_cov_34.381328	33992	<i>pilC</i>		<i>Outer membrane protein</i> PilC	70_74delT CTTC	S24fs
	NODE_43_length_16827_cov_26.769042	15121	<i>ftsK</i>	COG1674	<i>DNA translocase</i> FtsK	881_883d eIGCA	S294del
	NODE_47_length_15521_cov_27.764908	10052	<i>pilC</i>		<i>Outer membrane protein</i> PilC	57_58insC TTCTCTAC C	F22fs

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.

Tabela 16. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima da cepa de referência WHO F.

Isolado	<i>Scaffold</i>	Posição no <i>scaffold</i>	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
WHO F	whof_1	242415	<i>mltG</i>	COG1559	<i>Endolytic murein transglycosylase</i>	T400C	W134R
	whof_1	407443	<i>cspD</i>	COG1278	<i>Cold shock-like protein CspD</i>	A37G	K13E
	whof_1	1617586	<i>nsrR</i>	COG1959	<i>HTH-type transcriptional repressor NsrR</i>	187_196d upGGGCT GAGGC	L66fs
	whof_1	1646413	<i>penA</i>	COG0768	<i>putative peptidoglycan D,D-transpeptidase PenA</i>	C1651T	P551S
	whof_1	1945044	<i>rpoC</i>	COG0086	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta</i>	C3427T	P1143S

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.

Tabela 17. Lista de genes com mutações após indução de resistência à cefixima da cepa de referência WHO Y.

Isolado	<i>Scaffold</i>	Posição no <i>scaffold</i>	Gene	Número COG	Produto	Mutação em nt	Troca de aa
WHO Y	whoy_1	103309	<i>pilQ</i>		<i>Type IV pilus biogenesis and competence protein PilQ</i>	1566_1567insG	G525fs
	whoy_1	241762			IS1595 family transposase IS1016	A304G	T102A
	whoy_1	699170	<i>smpB</i>	COG0691	<i>SsrA-binding protein</i>	147dupA	D50fs
	whoy_1	1161488		COG4942	<i>putative protein</i>	181delA	T63fs
	whoy_1	1371130	<i>mtrD</i>	COG0841	<i>Multidrug resistance protein MexB</i>	T1709A	M570K
	whoy_1	1374022	<i>mtrC</i>		<i>Multidrug resistance protein MexA</i>	T67C	S23P
	whoy_1	1510963	<i>tbp1</i>	COG1629	<i>Transferrin-binding protein 1</i>	529_530insC	A178fs
	whoy_1	1928889	<i>resA</i>		<i>Thiol-disulfide oxidoreductase ResA</i>	126dupC	V43fs
	whoy_1	1948729	<i>pilT</i>	COG2805	<i>Twitching mobility protein</i>	G104A	R35Q
	whoy_1	2013759	<i>rpoB</i>		<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta</i>	A1063G	T355A
	whoy_1	2047432	<i>porB</i>		<i>Major outer membrane protein PorB1b</i>	C77T	A26V

Legenda: COG, agrupamento de grupos ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*); nt, nucleotídeo; aa, aminoácido. Fonte: autor, 2021.