

Lisléia Golfetto

Caracterização molecular e determinação do perfil de resistência de isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae* circulantes na Grande Florianópolis: série histórica 2008-2016

Tese submetido(a) ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis
2018

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

Golfetto, Lisléia

Caracterização molecular e determinação do perfil de resistência de isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae* circulantes na Grande Florianópolis: série histórica 2008-2016 / Lisléia Golfetto ; orientador, Maria Luiza Bazzo, 2018.

169 p.

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

Inclui referências.

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

**“Caracterização molecular e determinação do perfil de
resistência de isolados clínicos de Neisseria
gonorrhoeae circulantes na Grande Florianópolis:
Série histórica 2008-2016”**

POR

Lisleia Golfetto

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

Banca Examinadora:



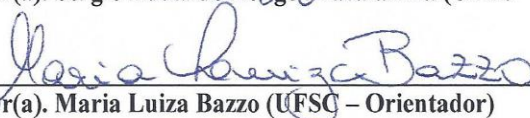
**Prof(a). Dr(a). Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro
Titular)**



**Prof(a). Dr(a). Adele Schwartz Benzaken (DIAHV – Membro
Titular)**



**Prof(a). Dr(a). Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (UFRJ - Membro
Titular)**



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

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 10 de agosto de 2018.

Este trabalho é dedicado aos meus pais
Lidenor e Sirlei Golfetto.

AGRADECIMENTOS

À professora orientadora Dra. Maria Luiza Bazzo pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação e exemplo de profissionalismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e demais órgãos: CAPES e Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis.

Ao Laboratório Médico Santa Luzia, em especial à Diretora Técnica Cássia Maria Zoccoli, por disponibilizar o banco de amostras, viabilizar e acreditar neste trabalho.

Às farmacêuticas-bioquímicas Nina e Emanuelle, do Laboratório Médico Santa Luzia, pela paciência, ensinamentos e disponibilidade em colaborar com o desenvolvimento deste trabalho.

À farmacêutica-bioquímica Dra. Mara Cristina Scheffer, pelo auxílio no estabelecimento da parceria com o Laboratório Médico Santa Luzia, pelo apoio técnico e científico e pela disponibilidade em corrigir o trabalho. Teus ensinamentos foram primordiais nesta caminhada.

À professora Dra. Ana Carolina Rabelo de Moraes pela orientação na estatística.

A todos os colegas e integrantes do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS), em especial aos colegas Hana, Thaís, Jéssica, Clarice, Manoela, Mirella e Prim pelo convívio, incentivo e apoio técnico e emocional.

Ao farmacêutico-bioquímico Marcos André Shörner, meu colega de laboratório e amigo, pelo apoio científico e técnico. Você foi fundamental nesta jornada.

Aos meus colegas do SAP, em especial: Jovana, Aline, Manoela, Daniella e Bruno, pelo convívio e incentivo.

Ao meu noivo, Felipe de Rocco, pelo carinho, paciência, e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e minha irmã, pelo amor, apoio emocional e, principalmente, incentivo em mais uma conquista.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Neisseria gonorrhoeae tem apresentado uma rápida e extraordinária capacidade de desenvolver resistência a todos os antimicrobianos introduzidos para o tratamento durante os últimos 70-80 anos. O presente estudo se constitui em uma análise retrospectiva da sensibilidade antimicrobiana, dos determinantes moleculares da resistência antimicrobiana e da genotipagem por NG-MAST de 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* circulantes na grande Florianópolis no período de 2008-2016. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi determinada pelo método de ágar diluição para os antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, azitromicina, ceftriaxona e cefixima. Detecção da enzima beta-lactamase foi realizada pelo método de nitrocefina em disco. Foram detectadas altas taxas de resistência à penicilina (26,1%), tetraciclina (41,2%) e ao ciprofloxacino (52,3%). Resistência à azitromicina foi detectada em 5,2% dos isolados. Todos os isolados de *N. gonorrhoeae* foram sensíveis às ESCs (cefixima e ceftriaxona). No entanto, 8,5% (n=13) apresentaram MIC=0,125µg/mL para cefixima, um log abaixo do ponto de corte de resistência estabelecido pelo EUCAST. Produção da enzima β-lactamase foi detectada em 12,4% dos isolados e um deles apresentou o plasmídeo Toronto/Rio carreando o alelo *bla*_{TEM-135}. Resistência plasmidial à tetraciclina foi observada em 5,2% dos isolados e ambos os genes *tetM* Americano e Holandês foram identificados. Nos anos de 2013-2016 a resistência à penicilina foi quase 2,5 vezes maior que no período de 2008-2012. A resistência à tetraciclina foi alta em todo o período estudado. A resistência ao ciprofloxacino foi elevada desde os primeiros anos do estudo e aumentou significativamente ao longo dos nove anos (p < 0,001). Mutações na região QRDR de *gyrA* e *parC* foram observadas em 87,5% dos isolados resistentes ao ciprofloxacino. Sessenta e quatro diferentes STs foram determinados, 15 *clusters* foram identificados e 19 STs foram descritos pela primeira vez. Os STs mais prevalentes foram: ST225 (n=11), ST2992 (n=11) ST1582 (n=10), ST338 (n=7), ST1407 (n=4), ST2202 (n=4) e ST6827 (n=4). Trinta e três isolados permaneceram com STs desconhecidos. Dois genogrupos G225 e G1407 foram formados. O genogrupo G225 foi significativamente associado à resistência ao ciprofloxacino (p<0,001) à penicilina (p=0,016) e à tetraciclina (p< 0,001) enquanto o genogrupo G1407 foi estatisticamente associado com MIC=0,125µg/mL para cefixima (p=0,001), resistência ao ciprofloxacino (p < 0,001), à penicilina (p=0,016) e à tetraciclina (p< 0,001). Isolados que

compartilharam o mesmo alelo *tbpB* 29 foram significativamente associados com resistência à azitromicina ($p= 0,008$) e à penicilina ($p= 0,035$). O ST338 foi associado com resistência plasmidial à penicilina (gene *bla*_{TEM-1}) ($p<0,001$) e à tetraciclina (*tetM*) ($p= 0,006$), enquanto o *cluster* que compartilhava o mesmo alelo *tbpB* 137, foi associado à resistência plasmidial à tetraciclina (gene *tetM*). Os resultados do presente estudo demonstraram altas taxas de resistência à penicilina, à tetraciclina e ao ciprofloxacino associadas à persistência e disseminação de linhagens gonocócicas com resistência ao ciprofloxacino e resistência cromossômica e plasmidial à penicilina e à tetraciclina. Além disso, ressalta-se a importância do estabelecimento da vigilância para monitorar possíveis mudanças no perfil de sensibilidade da ceftriaxona e azitromicina, atualmente utilizadas no tratamento da gonorreia no Brasil

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*. Concentração Inibitória Mínima. Resistência antimicrobiana. β -lactamase. NG-MAST.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND THE RESISTANCE PROFILE DETERMINATION IN CLINICAL ISOLATES OF *Neisseria gonorrhoeae* CIRCULATING IN FLORIANOPOLIS METROPOLICAN AREA: HISTORICAL SERIE 2008-2016.

Neisseria gonorrhoeae has shown a rapid and extraordinary ability to develop resistance to all antimicrobials introduced for the treatment during the last 70-80 years. The present study was based on a retrospective analysis of antimicrobial sensitivity, molecular determinants of antimicrobial resistance and genotyping by NG-MAST of 153 clinical isolates of *N. gonorrhoeae* circulating in the Greater Florianopolis in the period of 2008-2016. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined by agar dilution method for penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, azithromycin, ceftriaxone and cefixime antimicrobials. Beta-lactamase enzyme production was determined by nitrocefin disks method. High rates of resistance were detected to penicillin (26.1%), tetracycline (41.2%) and ciprofloxacin (52.3%). Resistance to azithromycin was detected in 5.2% of the isolates. All isolates of *N. gonorrhoeae* were sensitive to ESCs (cefixime and ceftriaxone). However, 8.5% (n=13) had MIC=0.125µg/ml for cefixime, one log below the resistance cut-off point established by EUCAST. β-lactamase enzyme production was detected in 12.4% of the isolates and one of them presented the Toronto/Rio plasmid carrying the *bla*_{TEM-135} allele. Plasmid resistance to tetracycline was observed in 5.2% of the isolates and both American and Dutch *tetM* genes were identified. In the years of 2013-2016 resistance to penicillin was almost 2.5 times higher than the 2008-2012 period. Tetracycline resistance was high throughout the study period. Resistance to ciprofloxacin was elevated from the early years of the study and increased significantly over the nine years (p<0.001). Mutations in the QRDR region of *gyrA* and *parC* were observed in 87.5% of isolates resistant to ciprofloxacin. Sixty-four different STs were determined, 15 clusters were identified and 19 STs were first described. The most prevalent STs were: ST225 (n=11), ST2992 (n=11), ST1582 (n=10), ST338 (n= 7), ST1407 (n=4), ST2202 (n= 4) and ST6827 (n= 4). Thirty three isolates belonged to unknown STs. Two genogroups were formed: G225 and G1407. G225 genogroup was significantly associated with resistance to ciprofloxacin (p<0.001), penicillin (p=0.016) and

tetracycline ($p < 0.001$) whereas G1407 genogroup was statistically associated with MIC=0.125 $\mu\text{g/ml}$ for cefixime ($p = 0.001$), resistance to ciprofloxacin, penicillin ($p = 0.016$) and tetracycline ($p < 0.001$). Isolates that shared the same *tbpB* 29 allele were significantly associated with resistance to azithromycin ($p = 0.008$) and penicillin ($p = 0.035$). ST338 was associated with plasmid resistance to penicillin (*bla*_{TEM-1} gene) ($p < 0.001$) and tetracycline (*tetM*) ($p = 0.006$), whereas the cluster that shared the same *tbpB* 137 allele was associated with plasmid resistance to tetracycline (*tetM* gene). The results of the study demonstrated high rates of resistance to penicillin, tetracycline and ciprofloxacin associated with persistence and dissemination of gonococcal strains resistant to ciprofloxacin and plasmid resistance to penicillin and tetracycline. In addition, it is important to establish surveillance to monitor possible changes in the sensitivity profile of ceftriaxone and azithromycin, currently used in the treatment of gonorrhea in Brazil.

Resumo traduzido para outros idiomas, neste caso, inglês. Segue o formato do resumo feito na língua vernácula. As palavras-chave traduzidas, versão em língua estrangeira, são colocadas abaixo do texto precedidas pela expressão “Keywords”, separadas por ponto.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*. Minimal Inhibitory Concentration. Antimicrobial resistance. β -lactamase. NG-MAST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Patogênese de <i>N. gonorrhoeae</i>	32
Figura 2 - A história da resistência antimicrobiana em <i>N. gonorrhoeae</i>	44
Figura 3 - Alvo dos antimicrobianos e correspondentes genes de resistência de <i>N. gonorrhoeae</i>	47
Figura 4 - MAMA-PCR para detecção do alelo $bla_{TEM-135}$	72
Figura 5 - Sequências para identificação dos alelos bla_{TEM-1} , $bla_{TEM-135}$ e $bla_{TEM-220}$, com destaque para o iniciador da PCR que detecta o alelo $bla_{TEM-220}$	73
Figura 6 - Evolução da resistência antimicrobiana dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> entre 2008-2016.	82
Figura 7 - Perfil de sensibilidade à penicilina dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> no período de 2008 a 2016.	83
Figura 8 - Perfil de sensibilidade à tetraciclina dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> no período de 2008 a 2016.	84
Figura 9 - Perfil de sensibilidade ao ciprofloxacino dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> no período de 2008 a 2016.	85
Figura 10 - Perfil de sensibilidade à azitromicina dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> no período de 2008 a 2016.	86
Figura 11 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para a penicilina no período no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).	87
Figura 12 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para a tetraciclina no período no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).	88
Figura 13 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para o ciprofloxacino no período no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).	89
Figura 14 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para a azitromicina no período no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).	90
Figura 15 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para a cefixima no período no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).	91
Figura 16 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para a ceftriaxona no período no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).	92
Figura 17 - Distribuição dos Sequence type (ST) por ano no período de 2008-2016.	94

Figura 18 - Árvore filogenética realizada pelo método de aproximação dos vizinhos (do inglês, Neighbor Joining) e bootstrap (MEGA software) com alelos de *porB* e *tbpB* concatenados dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, 2008- 2016..... 97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Recomendações da OMS para o tratamento de infecções por <i>N. gonorrhoeae</i>	42
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intervalo de concentração dos antimicrobianos para os testes de sensibilidade em isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	65
Tabela 2 - Critérios de interpretação da MIC aos antimicrobianos em isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	67
Tabela 3 - Fenótipos de resistência plasmidial à penicilina e à tetraciclina.....	68
Tabela 4 - Relação dos iniciadores utilizados da PCR multiplex e o tipo de plasmídeo gerado.....	75
Tabela 5 - Relação dos iniciadores utilizados na PCR para detecção dos tipos de gene <i>tetM</i>	75
Tabela 6 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos 153 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> , no período de 2008-2016 (n=153).	79
Tabela 7 - Associação das variáveis estudadas com perfil de sensibilidade antimicrobiana à penicilina e à tetraciclina.	80
Tabela 8 - Associação das variáveis estudadas com perfil de sensibilidade antimicrobiana ao ciprofloxacino e à azitromicina.	80
Tabela 9 - Associação dos genogrupos com o perfil de sensibilidade antimicrobiana ao ciprofloxacino e à MIC de 0,125 µg/mL para cefixima.....	99
Tabela 10 - Associação dos genogrupos com o perfil de sensibilidade antimicrobiana à penicilina e à tetraciclina.	99
Tabela 11 - Associação dos genogrupos com o perfil de sensibilidade antimicrobiana à azitromicina.	100
Tabela 12 - Descrição dos 13 isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> apresentando MIC=0,125 µg/mL e sua relação com as MICs para PEN, TET, CIP, AZT e CRO com o NG-MAST.....	101
Tabela 13 - Associação entre <i>tbpB</i> 29 com o perfil de sensibilidade antimicrobiana à azitromicina e tetraciclina.	103
Tabela 14 - Associação entre ST338 com determinantes genéticos de resistência plasmidial à penicilina e à tetraciclina.	103
Tabela 15 - Associação entre <i>tbpB</i> 137 com determinantes genéticos de resistência plasmidial à penicilina.	103
Tabela 16 - Associação das MICs dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> resistentes à penicilina e/ou a tetraciclina com determinantes da resistência plasmidial a esses antimicrobianos e NG-MAST.....	105
Tabela 17 - Associação das MICs dos 80 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> resistentes ao ciprofloxacino com determinantes da resistência em <i>gyrA</i> , <i>parC</i> e NG-MAST.....	107

Tabela 18: Intervalo de MIC aceitáveis e categorização sensibilidade das cepas referencia WHO recomendadas para o controle de qualidade da MIC..... 169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR	Resistência antimicrobiana, do inglês <i>antimicrobial resistance</i>
ASGP-R	Receptor asialoglicoproteína, do inglês <i>asialoglycoprotein receptors</i>
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMPR	<i>N. gonorrhoeae</i> com resistência cromossômica à penicilina, do inglês <i>chromosomally mediated penicillin resistant N gonorrhoeae</i>
CMTR	<i>N. gonorrhoeae</i> com resistência cromossômica à tetraciclina, do inglês <i>chromosomally mediated tetracycline resistant N gonorrhoeae</i>
CMRNG	<i>N. gonorrhoeae</i> com resistência cromossômica à penicilina e à tetraciclina, do inglês, <i>chromosomally mediated penicillin and tetracycline resistant N. gonorrhoeae</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CR3	Receptor do complemento 3, do inglês <i>complement receptor 3</i>
DCs	Células dendríticas, do inglês, <i>dendritic cells</i>
DHPS	Dihidropteroato sintase, do inglês <i>dihydropteroate synthase</i>
DIP	Doença inflamatória pélvica
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
ECV	<i>Epidemiological cutoff value</i>
ESCs	Cefalosporinas de espectro estendido, do inglês <i>extended-spectrum cephalosporins</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
g	Grama
GASP-	<i>Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance</i>
LAC	<i>Programme in Latin America and Caribbean</i>
GISP	<i>Gonococcal Isolate Surveillance Project</i>
GTPase	Enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam o GTP (GTP, do inglês Guanosine-5'-triphosphate)
gyrA	Gene que codifica a DNAGirase

HLR	Alto nível de resistência, do inglês <i>High-level resistant</i>
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
HBP	Heptose-1,7-bifosfato, do inglês, <i>heptose-1,7-bisphosphate</i>
IC	Intervalo de confiança
iC3b	Proteína do sistema complemento, fração C3b inativa, do inglês <i>inactivated C3b</i>
IDG	Infecção gonocócica disseminada, do inglês <i>Disseminated Gonococcal Infection</i>
IL-10	Interleucina 10, do inglês <i>Interleukin 10</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β , do inglês <i>Interleukin 1 β</i>
IL-6	Interleucina 6, do inglês <i>Interleukin 6</i>
IL-8	Interleucina 8, do inglês <i>Interleukin 8</i>
IM	Intramuscular
IST	Infecção sexualmente transmissível
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular Microbiologia e Sorologia
LLR	Baixo nível de resistência, do inglês <i>Low-level resistant</i>
LOS	Lipo-oligossacarídeo, do inglês <i>lipooligosaccharide</i>
mg	Miligrama
MIC	Concentração inibitória mínima, do inglês <i>minimal inhibitory concentrations</i>
ml	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>
NAATs	Testes de amplificação dos ácidos nucleicos, do inglês <i>nucleic acid amplification test</i>
ng	nanograma
NG-MAST	<i>Multi-antigen sequence typing</i>
NgPLD	Fosfolipase D, do inglês phospholipase D secreted by <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NOD	Proteínas contendo domínio de oligomerização, do inglês, <i>oligomerization domain-containing protein</i>
NWT	Tipo não selvagem, do inglês <i>non-wild-type</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
OMVs	Vesículas da membrana externa, do inglês, <i>outer membrane vesicles</i>
<i>Opa</i>	Proteína da opacidade, do inglês <i>opacity-associated proteins</i>
Pb	Pares de base
PBP1	Proteína ligadora de penicilina 1, do inglês <i>penicillin-binding protein 1</i>
PBP2	Proteína ligadora de penicilina 2, do inglês <i>penicillin-binding protein 2</i>
PMN	Leucócitos polimorfonucleares, do inglês <i>polymorphonuclear leukocytes</i>
porB	Porina
PorB1A	Subgrupo Porina 1A
PorB1B	Subgrupo Porina 1B
PPNG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, do inglês <i>penicillinase producing N gonorrhoeae</i>
QRDR	Região determinante de resistência as quinolonas, do inglês, <i>quinolone-resistance-determining regions</i>
PPTRNG	<i>N. gonorrhoeae</i> com resistência plasmidial à penicilina e à tetraciclina.
RC	Razão de chance
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
rRNA	RNA ribossômico, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês, <i>Single nucleotide polymorphism</i>
TIFA	Proteína de interação TRAF associado ao domínio <i>Forkhead</i> , do inglês, <i>TRAF interacting protein with forkhead associated domain</i>
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumour necrosis factor-alpha</i>
TRNG	<i>N. gonorrhoeae</i> com resistência plasmidial à tetraciclina, do inglês <i>plasmid mediated tetracycline resistant N. gonorrhoeae</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
VO	Via oral

VPP	Valor preditivo positivo
XDR	Extensivamente resistente aos fármacos, <i>do inglês extensive drug resistance</i>
µg	Micrograma
WT	Tipo selvagem, do inglês <i>wild-type</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO.....	29
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	29
2.3	PATOGENIA E IMUNIDADE	31
2.4	EPIDEMIOLOGIA	34
2.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	35
2.6	DIAGNÓSTICO	39
2.6.1	Microscopia.....	39
2.6.2	Cultura	39
2.6.3	Testes de amplificação de ácidos nucleicos NAATs	40
2.7	TRATAMENTO	41
2.8	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43
2.8.1	Histórico.....	43
2.8.2	Mecanismos de resistência.....	46
2.8.2.1	Resistência as sulfonamidas	48
2.8.2.2	Resistência à penicilina	49
2.8.2.2.1	<i>Resistência plasmídial à penicilina.....</i>	<i>49</i>
2.8.2.2.2	<i>Resistência cromossômica à penicilina.....</i>	<i>50</i>
2.8.2.3	Resistência à tetraciclina	51
2.8.2.3.1	<i>Resistência plasmídial a tetraciclina</i>	<i>51</i>
2.8.2.3.2	<i>Resistência cromossômica à tetraciclina</i>	<i>52</i>
2.8.2.4	Resistência à espectinomicina.....	52
2.8.2.5	Resistência às quinolonas.....	53
2.8.2.6	Resistência aos macrolídeos.....	54
2.8.2.7	Resistência às cefalsporinas	55
2.9	MULTI-ANTIGEN SEQUENCE TYPING (NG-MAST)....	57

3	HIPÓTESE DO ESTUDO.....	58
4	OBJETIVOS.....	59
4.1	OBJETIVO GERAL.....	59
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
5	MATERIAIS E MÉTODOS	60
5.1	DESCRIÇÃO DO ESTUDO	60
5.2	LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	60
5.3	AMOSTRAGEM.....	60
5.4	CULTIVO E ISOLAMENTO.....	60
5.5	IDENTIFICAÇÃO DE GÊNERO	61
5.5.1	Coloração de Gram.....	61
5.5.2	Reação da Catalase	61
5.5.3	Reação da Oxidase	62
5.6	CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE POR MALDI-TOF VITEK	
MS	62	
5.7	TESTE DA β -LACTAMASE.....	63
5.8	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	
	63	
5.8.1	Solução estoque dos antimicrobianos.....	64
5.8.2	Diluição dos antimicrobianos.....	64
5.8.3	Preparo do meio com antimicrobiano.....	65
5.8.4	Preparo do inóculo.....	66
5.8.5	Controle de qualidade da MIC	66
5.8.6	CrITÉrios de interpretação dos resultados.....	66
5.8.7	CrITÉrios de interpretação dos fenótipos de resistência	
	plasmidial à penicilina e a tetraciclina	67
5.9	TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	68
5.9.1	Extração do DNA	68
5.9.2	Amplificação dos genes <i>porB</i> e <i>tbpB</i>	69
5.9.2.1	Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR <i>porB</i> e	
<i>tbpB</i>	70	

5.9.2.2	Determinação e análise do NG-MAST de <i>N. gonorrhoeae</i> ..	70
5.10	INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	71
5.10.1	Caracterização do gene <i>bla</i> _{TEM} em isolados PPNG	71
5.10.2	Pesquisa do tipo de plasmídeo carreador do gene <i>bla</i> _{TEM} em isolados PPNG	74
5.10.3	Investigação molecular do gene <i>tetM</i> em isolados TRNG	75
5.10.4	Investigação molecular da resistência ao ciprofloxacino.	76
5.10.4.1	Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	77
5.10.4.2	Análise do sequenciamento.....	77
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
6	RESULTADOS.....	78
6.1	Comparação do perfil de sensibilidade antimicrobiana entre os períodos de 2008-2012 versus 2013-2016.....	80
6.2	Determinantes genéticos da resistência antimicrobiana em <i>N. gonorrhoeae</i>	92
6.3	NG-MAST e sua relação com a resistência antimicrobiana em isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	93
7	DISCUSSÃO.....	109
8	CONCLUSÃO	123
9	PERSPECTIVAS	124
	REFERÊNCIAS.....	125
	APÊNDICE 1 - DILUIÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC).....	161
	APÊNDICE 2 - PREPARO DO MEIO COM ANTIMICROBIANO	167
	APÊNDICE 3: PREPARO DA SUSPENÇÃO BACTERIANA E INOCULAÇÃO NAS PLACAS COM ANTIMICROBIANO	168
	APÊNDICE 4: CONTROLE DE QUALIDADE.....	169

1 INTRODUÇÃO

A gonorreia é uma infecção sexualmente transmissível (IST) muito antiga, relatos da doença podem ser encontrados nas antigas literaturas chinesa, egípcia, romana e grega, bem como no antigo testamento da Bíblia (Levítico 15:1-3). *Neisseria gonorrhoeae* (gonococo) é um patógeno humano obrigatório e agente etiológico da gonorreia. É transmitida a partir de um indivíduo infectado principalmente por contato humano direto entre as membranas mucosas do trato urogenital, do canal anal, ou da orofaringe, geralmente durante o intercurso sexual (DEL RIO et al., 1989; BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

Infecções gonocócicas não complicadas comumente manifestam-se como uretrites em homens e podem causar cervicite mucopurulenta em mulheres (WHO, 2016). Infecções de faringe e reto são caracterizadas, na sua maioria, pela ausência de sintomas e são mais frequentes em homens que fazem sexo com homens (HSH), entretanto, dependendo da prática sexual, podem ser encontradas em ambos os sexos (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016). Infecções gonocócicas em mulheres são frequentemente assintomáticas e a falta de sintomas resulta em infecções não diagnosticadas e conseqüentemente não tratadas. A ausência de tratamento pode levar a sérias complicações, incluindo doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica e infertilidade. Em homens, infecções uretrais não tratadas podem evoluir para epididimite, estenose uretral e infertilidade. Filhos de mães com infecção gonocócica podem adquirir conjuntivite neonatal durante o parto, que pode evoluir para perda da visão se não tratada (WHO, 2016). A infecção gonocócica disseminada é uma complicação rara, no entanto, pode cursar com artrite, meningite e endocardite (WHO, 2012; BIGNELL; UNEMO, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de um milhão de ISTs curáveis são adquiridas diariamente e, a cada ano, 500 milhões de pessoas são portadoras de uma das ITS curáveis (gonorreia, clamídia, sífilis e tricomoníase). Somente em 2012, 78 milhões de pessoas adquiriram a infecção por *N. gonorrhoea* (WHO 2016).

N. gonorrhoeae tem se caracterizado por uma rápida e extraordinária capacidade de desenvolver resistência a todos os antimicrobianos introduzidos para o tratamento da infecção nos últimos 70-80 anos. Fato repetidamente observado desde 1930, com a introdução das sulfonamidas para o tratamento da gonorreia (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; WHO, 2016). Devido a alta prevalência de

isolados resistentes à maioria dos antimicrobianos previamente utilizados para o tratamento (sulfonamidas, penicilina, cefalosporinas de primeira geração, tetraciclinas, macrolídeos e fluorquinolonas), a recomendação internacional vigente é a terapia combinada de ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, com azitromicina, um macrolídeo semi-sintético derivado da eritromicina. No entanto, a recente emergência de resistência às cefalosporinas de espectro estendido (ESCs), cefixima e ceftriaxona, e o isolamento de *N. gonorrhoeae* com altos níveis de resistência clínica a todas as ESCs, combinada com resistência aos demais antimicrobianos disponíveis para o tratamento, tem causado grande preocupação devido à possibilidade da ocorrência de gonorreia intratável (UNEMO; SHAFER, 2011; BOLAN; SPARLING; WASSERHEIT, 2012; NDOWA; LUSTI-NARASIMHAN; UNEMO, 2012; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016). Falhas no tratamento, particularmente com cefixima, mas também esporadicamente com ceftriaxona (principalmente em infecções de faringe) foram verificados no Japão, Austrália, diversos países Europeus, Canadá e África do Sul (UNEMO M et al., 2013; UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO, 2015).

Desta forma, na ausência de vacina para profilaxia da infecção gonocócica, a base para o controle da gonorreia em saúde pública depende inteiramente dos esforços de prevenção, notificação de contato sexual, vigilância epidemiológica e da resistência, diagnóstico e, sobretudo da disponibilidade de tratamento com antimicrobianos eficazes (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

Disponibilizar tratamento eficaz requer conhecimento prévio do perfil de sensibilidade local dos microrganismos circulantes. No Brasil, o tratamento da gonorreia, assim como de outras ISTs, é realizado, na maioria dos casos, de forma sindrômica. Estudos regionais foram realizados e seus resultados geraram alerta sobre a evolução da resistência antimicrobiana em *N. gonorrhoeae*. No entanto, somente a partir de 2016, quando foram divulgados os resultados do primeiro estudo de vigilância da resistência de *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos no Brasil (BAZZO et al., 2018), o tratamento deixou de ser baseado em dados internacionais de resistência. Neste contexto, a execução do presente estudo, que realizou a caracterização molecular e do perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de *N. gonorrhoeae* circulantes na Grande Florianópolis entre 2008 a 2016, pode contribuir para avaliar a epidemiologia da infecção e da emergência de resistência antimicrobiana na região estudada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

De acordo com a segunda edição do *Bergey's Manual of Systems Bacteriology*, *Neisseria gonorrhoeae* é classificada na categoria taxonômica: Reino Bactéria; Filo Proteobacteria; Classe Bproteobacteria; Ordem Neisseriales; Família Neisseriaceae; Gênero *Neisseria*; Espécie *Neisseria gonorrhoeae* (KRIEG et al., 2010) O gênero *Neisseria* possui cerca de 30 espécies não patogênicas a humanos e duas patogênicas principais: *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*. Dentre as espécies não patogênicas, destacam-se a *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. sineria*, *N. flavescens*, *N. subflava* e *N. mucosa*, que habitam o trato respiratório superior como comensais, sendo ocasionalmente encontradas no trato urogenital inferior (UNEMO M et al., 2013).

Ao contrário das demais espécies não patogênicas do gênero, *N. gonorrhoeae* é fastidiosa e possui crescimento lento. Adere à superfície da célula hospedeira por meio de uma estrutura denominada *pili* (ou pelo), um apêndice filamentosos de origem proteica da superfície bacteriana; é aeróbica, não flagelada, não formadora de esporos, produtora das enzimas catalase e oxidase e com preferência à umidade e concentrações aumentadas de dióxido de carbono (CO₂). Tem a habilidade de produzir ácido a partir da utilização da glicose, o que permite a sua diferenciação das demais espécies do gênero *Neisseria*. Apresenta-se na coloração de Gram tipicamente como diplococo gram-negativo, em forma de rim ou grão de café. Esses diplococos medem 0,6µm por 1,0µm e apresentam-se com faces côncavas adjacentes (UNEMO M et al., 2013).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

N. gonorrhoeae possui capacidade singular de modular seus antígenos de superfície (VAN DER WOUDE; BAUMLER, 2004) e sua integração à célula epitelial é mediada por fatores de virulência, tais como, *pili*, porina (*PorB*), proteína da opacidade (*Opa*) e lipooligosacarídeo (LOS) e seus receptores (KONEMAN et al., 2008).

Os *pilus* são polímeros de proteínas localizados na superfície da célula bacteriana e têm como principal função, a aderência às células mucosas do hospedeiro. Estão envolvidos na troca de material genético entre as bactérias e podem inibir a ação fagocítica dos neutrófilos frente

à infecção gonocócica. Os *pilis* não são obrigatoriamente expressos em todas as estirpes de *N. gonorrhoeae*, entretanto, quando expressos, podem apresentar novos tipos antigênicos (KONEMAN et al., 2008).

A porina é a proteína de superfície mais abundante, responsável por mais da metade do conteúdo de proteínas de membrana externa do gonococo. Ela é composta por um conjunto de moléculas (trímeros) que formam canais aquosos, permitindo o transporte de ânions por meio da membrana externa, que é hidrofóbica. A porina exibe variação antigênica estável entre as estirpes e constitui a base para a sorotipagem gonocócica. Existem dois alelos principais descritos: PorB1A, frequentemente relacionado à infecção gonocócica disseminada, e PorB1B geralmente associado apenas à infecções genitais. Os isolados do sorotipo PorB1A geralmente não desencadeiam resposta inflamatória local significativa. Tal característica pode estar relacionada à habilidade das estirpes PorB1A de interagirem com moléculas inibidoras do complemento, minimizando a resposta inflamatória. A porina pode migrar para a membrana citoplasmática do hospedeiro, facilitando a endocitose e invasão gonocócica (KASPER et al., 2017).

Outra proteína externa expressa nos gonococos é a proteína *Opa*, cuja expressão é regulada por uma sequência de cinco nucleotídeos (CTCTT) em triplicata, localizada na extremidade 3' dos genes que codificam a estrutura celular bacteriana (OLIVEIRA et al., 2004). *N. gonorrhoeae* expressa 12 diferentes genes *Opa* com sua própria região promotora. Eles são continuamente transcritos em ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e podem ser expressos simultaneamente. A proteína *Opa*, quando associada ao *pili*, promove a ligação do gonococo à célula do hospedeiro. Ela também atua na aderência da célula bacteriana para formação de colônias, e são assim denominadas, por conferir o fenótipo opaco das colônias no meio de cultura (HAUCK; MEYER, 2003).

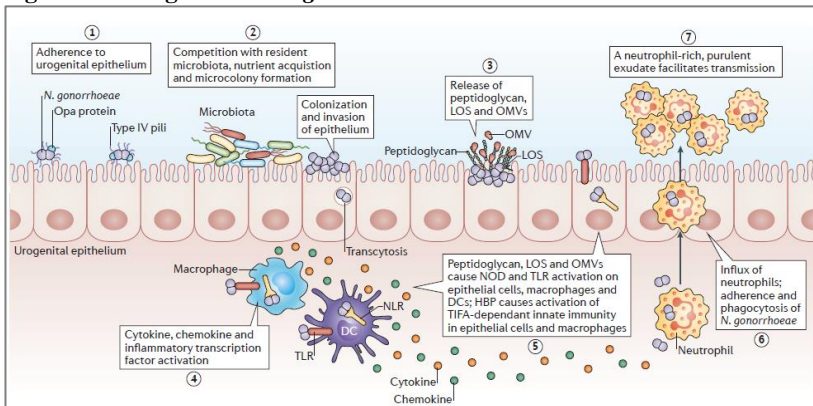
O LOS gonocócico é composto por um lipídio A e um oligossacarídeo central. Ao contrário do observado em outras bactérias gram-negativas, ele não possui cadeia lateral antigênica de carboidratos O repetidos. O LOS possui grande atividade endotóxica e auxilia para o efeito citotóxico local. Os açúcares centrais do LOS sofrem múltiplas variações de fases quando submetidos a diferentes ambientes de crescimento; essas variações determinam a regulação e expressão dos genes da glicosiltransferase que codificam a estrutura do carboidrato do LOS. Essas mudanças fenotípicas podem alterar as interações de *N. gonorrhoeae* com componentes do sistema imune humoral (anticorpos e complemento) e também podem induzir a interação direta dos

microrganismos aos fagócitos. Por exemplo, os gonococos providos de ácido siálico nos LOS ligam-se ao fator H do complemento e inibem a via alternativa do complemento; A sialilação dos LOS pode também dificultar a associação não opsônica com os neutrófilos por intermédio da *Opa* e bloquear a liberação de espécies reativas de oxigênio pelos polimorfonucleares. A ligação do resíduo de lactosamina terminal não sialilado do LOS a um receptor de asialoglicoproteína em células epiteliais masculinas favorece a adesão e a invasão subsequente dessas células pelos gonococos. As estruturas oligossacarídicas do LOS podem modular as respostas imunes do hospedeiro (KASPER et al., 2017).

2.3 PATOGENIA E IMUNIDADE

N. gonorrhoeae é um patógeno exclusivamente humano que infecta preferencialmente o epitélio urogenital. Embora a uretra e a cérvix uterina sejam os locais primários para a infecção gonocócica em homens e mulheres respectivamente, também são diagnosticadas infecções na conjuntiva, faringe e mucosa retal. A infecção por *N. gonorrhoeae* é adquirida principalmente por meio do contato sexual e se estabelece no trato urogenital por interação da bactéria com células epiteliais não ciliadas, resultando na invasão celular. Diferentes mecanismos moleculares estão envolvidos na fixação do gonococo à mucosa superficial (Figura 1). Ambos, fator de necrose tumoral (TNF) secretado por fagócitos e produtos gonocócicos, como o peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LOS), também causam danos às células epiteliais ciliadas da mucosa superficial (EDWARDS; APICELLA, 2004; VIRJI, 2009).

As infecções gonocócicas são usualmente localizadas no trato urogenital e provocam intensa resposta inflamatória dando origem a uma secreção uretral purulenta em homens, uma marca registrada da gonorreia. Citocinas e quimiocinas recrutam um grande número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o local da infecção, onde a *N. gonorrhoeae* é fagocitada. O influxo de neutrófilos forma um exsudato purulento que facilita a transmissão (QUILLIN; SEIFERT, 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Patogênese de *N. gonorrhoeae*.

Visão geral da infecção por *N. gonorrhoeae*: Durante a infecção inicial, *N. gonorrhoeae* adere a células epiteliais do hospedeiro por meio do *pili* tipo IV, que permite a interação com outras estruturas de superfície celular (PEARCE; BUCHANAN, 1978). Após a aderência, *N. gonorrhoeae* replica, forma microcolônias (2), possivelmente biofilmes (HIGASHI et al., 2007; STEICHEN et al., 2011) e compete com a microbiota do hospedeiro. Ao colonizar o epitélio, *N. gonorrhoeae* promove invasão e a transferência de elementos de um polo ao outro da célula por meio de vesículas. Durante esses estágios iniciais da infecção, a bactéria libera fragmentos de peptidoglicano, lipopolissacarídeos (LOS) e vesículas da membrana externa (do inglês, *outer membrane vesicles* – OMVs) (KAPARAKIS et al., 2010; MAVROGIORGOS et al., 2014; ZHOU et al., 2014) (3), que ativam o receptor *Toll-like* (TLR) e a sinalização de proteínas contendo domínio de oligomerização (do inglês, *oligomerization domain-containing protein* – NOD) em células epiteliais, macrófagos e células dendríticas (do inglês, *dendritic cells* – DCs) (SINGLETON; MASSARI; WETZLER, 2005; KAPARAKIS et al., 2010). A sinalização de NOD e TLR dessas células leva à ativação de fatores de transcrição inflamatória e à liberação de citocinas e quimiocinas (4). *N. gonorrhoeae* também libera heptose-1,7-bisfosfato (do inglês, *heptose-1,7-bisphosphate* – HBP), que estimula a imunidade por meio da ativação da proteína de interação TRAF associada ao domínio *Forkhead* (do inglês, *TRAF interacting protein with forkhead associated domain* – TIFA) (5) (GAUDET et al., 2015). A liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por essas vias de sinalização da imunidade inata cria gradientes de citocinas e quimiocinas que recrutam um grande número de PMN para o local da infecção (6), onde *N. gonorrhoeae* são fagocitadas. O influxo de neutrófilos forma um exsudato purulento que facilita a transmissão (7). **Fonte:** (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

Na mulher, o recrutamento do sistema imune ocorre pela ativação da via alternativa do complemento, por meio da produção e liberação de componentes dessa via pelas células epiteliais. O *pili* do gonococo se liga ao domínio I do Receptor do complemento 3 (CR3) permitindo que

a bactéria ultrapasse a repulsão eletrostática entre sua superfície celular e a da célula hospedeira. Essa proximidade com a superfície da célula endocervical permite que o componente do sistema complemento C3b se associe covalentemente com o LOS e seja rapidamente inativado a iC3b. A proximidade da porina ao LOS na membrana externa bacteriana favorece especialmente a associação entre iC3b e porina com o domínio I de CR3. O engajamento de CR3 desencadeia uma complexa cascata de transdução de sinais mediada pela tirosina quinase da família Src e Rho GTPase. Estes processos resultam na formação de complexos focais de vinculina e ezrina e na desestabilização da membrana, favorecendo a invasão celular. *N. gonorrhoeae* secreta a fosfolipase D (NgPLD) que modula a transdução de sinal da célula cervical, desempenhando um papel no recrutamento de CR3 para a superfície da célula cervical, modulando a reorganização do citoesqueleto. Adicionalmente essa proteína aumenta a sobrevivência intracelular dos gonococos após sua internalização dentro de macropinosomas.

A maioria dos gonococos transmitidos de homens para seus parceiros têm LOS sialilado. No entanto, a presença ou ausência de ácido siálico no LOS não influencia a interação do gonococo com as células epiteliais cervicais primárias (KALLSTROM et al., 1997)(63). No trato genital feminino inferior, os gonococos sialilados podem ser modificados para aumentar a transmissão da doença para os homens, ou seja, as neuraminidases produzidas pela microflora vaginal podem potencialmente remover o ácido siálico de gonococos sialilados. (EDWARDS; APICELLA, 2004).

A infecção por *N. gonorrhoeae* em homens apresenta-se como uma uretrite aguda na qual as células epiteliais que revestem a uretra, em resposta à infecção, produzem mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), e interleucina um β (IL-1 β) (HARVEY et al., 2000). A quimiotaxia de neutrófilos para o local da infecção perpetua o estado inflamatório, uma vez que, estas células geram mediadores pró-inflamatórios adicionais ao tentar combater a infecção. O influxo de neutrófilos, juntamente com a liberação de células epiteliais uretrais danificadas, é responsável pela secreção uretral purulenta, característica da infecção uretral gonocócica em homens (EDWARDS; BUTLER, 2011).

O gonococo tem capacidade de se ligar ao esperma humano, aumentando o risco transmissão da infecção por contato sexual com o parceiro infectado (EDWARDS; APICELLA, 2004; VIRJI, 2009). A ligação do gonococo ao esperma humano é mediada pela interação do

LOS do gonococo com o receptor asialoglicoproteína (ASGP-R), uma proteína de membrana plasmática, encontrada no próprio esperma (HARVEY et al., 2000).

A resposta inflamatória humana frente *N. gonorrhoeae* é localizada e a maioria dos indivíduos infectados não desenvolve resposta imunitária adaptativa de proteção, como demonstrado pela alta frequência de infecções recorrentes causadas pela mesma cepa de *N. gonorrhoeae* em pacientes com IST. Os mecanismos envolvidos na resposta imune adaptativa ineficaz podem ser tanto por variação antigênica das principais moléculas de superfície bacteriana como por supressão da sinalização do sistema imune do hospedeiro por este patógeno (ZHU et al., 2012; GIMENES et al., 2014).

N. gonorrhoeae também suprime o desenvolvimento da resposta imune adaptativa por meio da interação com células apresentadoras de antígeno. A variação molecular dos LOS de *N. gonorrhoeae* permite a manipulação seletiva da função das células dendríticas, alterando assim as respostas imunes subsequentes em favor da sobrevivência bacteriana (VAN VLIET et al., 2009). Além disso, *N. gonorrhoeae* induz a produção de células T reguladoras de interleucina 10 (IL-10) e células T1, que estão implicadas na supressão da imunidade adaptativa (GIMENES et al., 2014; LIU; LIU; RUSSELL, 2014).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

N. gonorrhoeae é muito frágil para a transmissão por alimentos, água, ar ou, raras exceções, por fômites, mesmo assim a gonorreia permaneceu como uma infecção muito comum na maior parte do mundo na era pré-antibiótica apesar dos esforços, por vezes, extenuantes para controlá-la (MORAN; TIETZ; MIETZNER, 2017).

O verdadeiro peso global da gonorreia é difícil de estabelecer devido à falta de capacidade diagnóstica e/ou de sistemas de notificação em várias partes do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de um milhão de ISTs curáveis são adquiridas diariamente. Somente no ano de 2012, foi estimada a ocorrência de 357 milhões de novos casos de ISTs curáveis (gonorreia, clamídia, sífilis e tricomonas) em adultos com idade entre 15-49 anos. Destas, 78 milhões foram casos de gonorreia (WHO, 2016). A maior carga da infecção foi atribuída às Regiões do Pacífico Ocidental (35,2 milhões de casos), do Sudeste da Ásia e África (11,4 de casos cada uma). No entanto, o número de casos notificados é muito menor, particularmente em locais com poucos

recursos, do que o verdadeiro número de casos (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

Em uma revisão das infecções durante a gravidez na África Subsaariana, a prevalência das IST foi comparável à da malária. A prevalência de infecção por *N. gonorrhoeae* durante a gravidez variou de 2,7% na África Ocidental e Central a 3,7% na África do Sul (CHICO et al., 2012). Nos Estados Unidos da América (EUA), a gonorreia é a segunda doença de notificação mais comumente reportada. Entre 2009 a 2012, a taxa nacional de casos de gonorreia reportados nos EUA subiu de 98,1 para 106,7 casos por 100 mil habitantes, apresentando uma ligeira diminuição em 2013 (105,3 casos por 100 mil habitantes), voltando a aumentar gradativamente a cada ano, chegando a 123,9 casos por 100 habitantes em 2015 (CDC, 2015).

No Brasil, estão disponíveis estudos epidemiológicos da infecção por *N. gonorrhoeae* que demonstram a magnitude da doença em populações diversas. No ano 2000 em Salvador, a prevalência da infecção foi de 3,2% entre mulheres moradoras de comunidades carentes (CODES et al., 2006). Resultados similares (prevalência de 3,0%) foram observados entre 2000-2003 em usuárias de uma clínica de planejamento familiar na cidade de Campinas (FERNANDES et al., 2009). Entretanto, foi encontrada uma prevalência da infecção de 7,1% entre usuárias de uma clínica de IST em Manaus no ano de 2008 (7,1%) (BENZAKEN et al., 2010). Dois anos mais tarde, um estudo multicêntrico relevou uma prevalência de gonorreia de 18,4% entre homens usuários de clínicas de IST (18,4%) (BARBOSA et al., 2010). Em Curitiba, a prevalência da infecção observada em mulheres jovens (16-23 anos) sem histórico prévio de verrugas genitais, alterações citológicas no colo do útero, esplenectomia, desordens imunes, uso de fármacos imunossupressores e vacina para HPV foi de 1,5% (PIAZZETTA et al., 2011).

Desta forma, o comportamento sexual, a prevalência da infecção e os determinantes sociais da saúde como, o status socioeconômico, a discriminação e o acesso a sistemas de saúde de qualidade, podem contribuir para o aumento da infecção na comunidade e consequentemente aumentar o risco de aquisição da gonorreia (CDC, 2015a).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

N. gonorrhoeae geralmente infecta o colo do útero ou a uretra masculina, provocando cervicite ou uretrite. Em aproximadamente 50%

dos indivíduos infectados ocorre infecção assintomática ou colonização das mucosas superficiais com resposta inflamatória mínima (KORENROMP et al., 2002). Estudos sugerem um efeito prejudicial da infecção por *N. gonorrhoeae* na fertilidade tanto em homens como em mulheres (EDWARDS; APICELLA, 2004; OCHSENDORF, 2008; PELLATI et al., 2008; ABUSARAH et al., 2013). Em estudo na Jordânia, envolvendo clínicas de urologia e fertilidade, o ácido desoxirribonucleico (DNA) de *N. gonorrhoeae* foi detectado no sêmen de 6,5% dos homens inférteis, em comparação com ausência de detecção em homens férteis (OCHSENDORF, 2008; GIMENES et al., 2014).

No homem, a infecção gonocócica pode causar uretrite, que é definida como uma inflamação do canal uretral. Corrimento no canal uretral e disúria são os principais sintomas da uretrite gonocócica aguda. Entretanto, sintomas como dor durante o intercurso sexual e/ou na ejaculação, aumento da frequência urinária também podem estar presentes (EDWARDS; APICELLA, 2004; PELLATI et al., 2008; SLEHA et al., 2013). Além disso, a inflamação da uretral pode levar a estenose uretral (DOHLE, 2003). O período típico de incubação é de dois a cinco dias após a exposição. A maioria dos estudos relata que somente uma minoria dos homens infectados permanecerá assintomático. Entretanto, diversos estudos populacionais contradizem essa suposição e relatam que até 60-80% dos pacientes do sexo masculino têm sintomas mínimos ou inexistentes (DETELS et al., 2011; MORGAN; DECKER, 2016).

A infecção na uretra pode estender-se a outros órgãos do sistema genitourinário causando epididite, orquite e prostatite (GIMENES et al., 2014; TAYLOR, 2015). O desenvolvimento da epidídimo-orquite acarreta o comprometimento da função testicular após dois anos de infecção (OSEGBE, 1991). Em homens sexualmente ativos com idade inferior a 35 anos e que tenham história prévia de corrimento uretral, a *N. gonorrhoeae* está entre os patógenos mais prevalentes (LUDWIG, 2008; OCHSENDORF, 2008; GIMENES et al., 2014). A infecção no trato genitourinário por *N. gonorrhoeae* também está associada à diminuição da fertilidade em homens (OCHSENDORF, 2008; APARI; DE SOUSA; MULLER, 2014).

As infecções urogenitais gonocócicas cursam de forma assintomática em mais de 85% das mulheres infectadas (DETELS et al., 2011). O período típico de incubação é de 5 a 10 dias após a exposição. As glândulas de Bartholin e os ductos de Skene também podem ser afetados (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012). A manifestação clínica

mais comum é a cervicite, que pode resultar em doença inflamatória pélvica (DIP). A infecção sintomática manifesta-se tipicamente como prurido vaginal e/ou secreção mucopurulenta. Algumas mulheres podem ter queixa de sangramento intermestruar ou menorragia. Concomitantemente, a uretrite está frequentemente presente e é a manifestação primária em mulheres após histerectomia. Dor abdominal ou dor durante o intercuro sexual sugerem o envolvimento do trato genital superior (FISHER; FLETCHER; BLAKE, 2004; MORGAN; DECKER, 2016).

A doença inflamatória pélvica (DIP) é uma infecção do trato genital superior feminino que pode acometer o útero, as tubas uterinas e os ovários. É causada principalmente por *N. gonorrhoeae* e por *C. trachomatis* a partir de infecções na vagina e endocérvice que ascendem para o trato genital superior. É assintomática na maioria dos casos, entretanto, quando sintomática, se apresenta como dor pélvica, corrimento vaginal e dor durante o intercuro sexual. Manifestações sistêmicas como febre, calafrios, náuseas, vômito e leucocitose podem ocorrer, porém são incomuns (BRUNHAM; GOTTLIEB; PAAVONEN, 2015). Complicações relacionadas à falta de tratamento incluem dor pélvica crônica, gravidez ectópica e infertilidade (MITCHELL; PRABHU, 2013). Adicionalmente, aproximadamente 15% das mulheres infectadas desenvolvem obstrução das tubas uterinas e infertilidade (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012).

Infecções anorretais são frequentemente assintomáticas e acometem homens que fazem sexo com homens (HSH) e mulheres (DE VRIES et al., 2014). Os homens adquirem a infecção por meio do intercuro anal receptivo desprotegido, enquanto nas mulheres, a infecção anorretal também pode ocorrer por contaminação perineal de secreções cervicais (KENT et al., 2005; JAVANBAKHT et al., 2012). Uma pequena parcela de pacientes, particularmente na população HSH, desenvolverá proctite, apresentando sintomas de prurido anal, dor retal, corrimento mucopurulento e tenesmo (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012). A proctite gonocócica em HSH está associada ao aumento do risco de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CRAIB et al., 1995; MORGAN; DECKER, 2016). Infecção de faringe também acomete HSH e mulheres heterossexuais em virtude da prática de sexo oral. Raramente, a infecção pode levar a sintomas de faringite, usualmente os pacientes são assintomáticos (KENT et al., 2005; DANBY et al., 2016).

A conjuntivite gonocócica é diagnosticada na maioria das vezes em neonatos (oftalmia neonatal) devido à passagem pelo canal do parto

de mães com infecção urogenital não tratada (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012). Entretanto, também pode ocorrer em adultos por auto inoculação e raramente, contato não sexual de pessoa por pessoa por intermédio de fômites em surtos (MAK et al., 2001). Eventualmente pode ocorrer por acidente laboral ao trabalhar com isolados de *Neisseria gonorrhoeae* sem proteção ocular. Se não tratada, essa infecção pode levar à cegueira (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012).

A infecção gonocócica urogenital em mulheres durante a gravidez está associada a corioamnionite, ruptura prematura de membranas, nascimento prematuro e aborto espontâneo (LIU et al., 2013; COUTANCEAU; BOUJENAH; PONCELET, 2015). Os neonatos expostos à infecção durante o nascimento correm risco de desenvolver sepse, oftalmia neonatal, meningite e artrite (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012).

Em crianças pré-adolescentes, a infecção gonocócica é primariamente indicativa de abuso sexual. Os sintomas são similares à infecção em adultos e a vaginite é o sintoma mais comum em meninas (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012; MORGAN; DECKER, 2016).

A infecção por *N. gonorrhoeae* pode disseminar-se hematologicamente e desenvolver a infecção gonocócica disseminada (IDG) (KENT et al., 2005). A DGI é rara, ocorrendo em somente 0,4-3% dos pacientes com gonorreia e tipicamente ocorre de duas a três semanas após a infecção primária. (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012; BUNKER; KERR, 2015). A raridade da IDG pode ser explicada, em parte, pelo fato da bactéria ser capaz de se ligar à moléculas que regulam negativamente o sistema complemento e evadir-se do sistema imune do hospedeiro. Os fatores do hospedeiro também desempenham um papel importante, aproximadamente 13% dos pacientes com IDG apresentam deficiência do sistema complemento (RICE, 2005; MORGAN; DECKER, 2016).

A manifestação mais comum de IDG é a síndrome artrite-dermatite. Durante a bacteremia, os pacientes apresentam febre alta, poliartalgias assimétricas e tenossinovite que afetam os joelhos, cotovelos e articulações distais. Lesões cutâneas desenvolvem-se em 75% dos pacientes. Complicações raras de IDG incluem osteomilite, endocardite, miopericardite, meningite e abscesso peridural (RICE, 2005; BUNKER; KERR, 2015).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da gonorreia não complicada é estabelecido pela detecção de *N. gonorrhoeae* ou de seu material genético em amostras genitais, retais, faríngeas ou oculares (BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO; SHAFER, 2014). *N. gonorrhoeae* pode ser detectada em cultura ou pelos testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs). O gonococo também pode ser visualizado por microscopia (coloração da secreção genital) para viabilizar um diagnóstico rápido em pacientes sintomáticos (BIGNELL; UNEMO, 2013). Idealmente, os testes de resistência antimicrobiana (AMR) em gonococos deveriam integrar o diagnóstico laboratorial (UNEMO; SHAFER, 2014).

2.6.1 Microscopia

A análise microscópica usando a coloração de Gram ou azul de metileno para identificação de diplococos dentro de leucócitos polimorfonucleares oferece uma boa sensibilidade ($\geq 95\%$) e especificidade (97%) para o diagnóstico da gonorreia em homens sintomáticos apresentando corrimento uretral (BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO M et al., 2013). Em mulheres, entretanto, a microscopia de secreção cervical detecta apenas 40-60% das amostras positivas na cultura, o que pode refletir um quantitativo menor de gonococos em mulheres. Podem ocorrer resultados falso-positivos em amostras cervicais, e a especificidade (80-95%) é dependente da expertise do microscopista (UNEMO M et al., 2013). A microscopia não é recomendada para o rastreio de indivíduos assintomáticos (UNEMO M et al., 2013) e para o diagnóstico de infecções de faringe devido à baixa especificidade e sensibilidade (BIGNELL; UNEMO, 2013).

2.6.2 Cultura

A cultura tem sido considerada o “padrão-ouro” para o diagnóstico de infecções gonocócicas (UNEMO; SHAFER, 2014). Ela oferece um diagnóstico específico e barato para identificação confirmatória. É o único método estabelecido que permite a realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana, essenciais para o monitoramento da evolução da AMR. Meios seletivos, como o ágar Thayer-Martin, são recomendados para realização da cultura. Já os meios não seletivos podem ser utilizados benéficamente em adição aos

meios seletivos para amostras urogenitais e de conjuntiva (BIGNELL; UNEMO, 2013).

A cultura é apropriada para amostras endocervicais, uretrais, retais, faríngeas e de conjuntiva, mas não para urina (UNEMO M et al., 2013). A sensibilidade da cultura é alta e a especificidade pode chegar a 100%. No entanto, o método é relativamente lento e, para obter alta sensibilidade e especificidade, é crucial aperfeiçoar as condições de coleta, transporte e armazenamento da amostra, bem como a metodologia da cultura, pois os gonococos são extremamente sensíveis a fatores ambientais externos (UNEMO; SHAFER, 2014).

A garantia da qualidade é necessária para a cultura do gonococo, uma vez que os meios comerciais e os procedimentos da cultura variam em sua seletividade e sensibilidade. A cultura é o método de escolha para pacientes sintomáticos, com infecção persistente, suspeita de falha no tratamento e monitoramento da cura, uma vez que, permite a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (UNEMO; GOLPARIAN; HESTNER, 2011; WHILEY et al., 2012).

2.6.3 Testes de amplificação de ácidos nucleicos NAATs

Em locais com mais recursos financeiros e com grande demanda de amostras (utilização de testes que detectam também a clamídia), os NAATs substituíram rapidamente a cultura para detecção de *N. gonorrhoeae*. Os NAATs têm muitas vantagens, detectam gonococos não viáveis (neste caso favorecem a coleta e transporte da amostra em locais distantes do laboratório que executará o teste) e têm sensibilidade superior a todos os outros métodos de diagnóstico, particularmente para amostras de faringe e reto. Entretanto, espécies de *Neisseria* comensais, frequentemente presentes na faringe e no reto e raramente no trato urogenital, possuem homologia genética com *N. gonorrhoeae* e podem ter reações cruzadas nos NAATs, resultando em resultados falsos positivos. Desta forma, a especificidade de vários NAAT para gonococos está longe da ideal para o diagnóstico de amostras urogenitais e, em particular, amostras extragenitais.

Os NAATs são menos exigentes quanto à coleta de amostras, transporte e armazenamento. Amostras não invasivas podem ser efetivamente utilizadas e obtidas por auto-coleta (urina de primeiro jato em homens e *swabs* vaginais em mulheres). Os NAATs são rápidos, permitem a automação e detecção simultânea de vários patógenos. No entanto, os NAATs têm desvantagens, ainda não permitem realização de testes de AMR, o tempo apropriado para o teste de cura ainda não tem

consenso e os NAATs disponíveis comercialmente e os *in-house* mostram diferentes níveis de sensibilidade e de especificidade. A especificidade sub-ótima dos NAATs resulta em baixos valores preditivos positivos (VPP), particularmente em populações com baixa prevalência (WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006; BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO M et al., 2013). Na Europa e Austrália, se o VPP do NAAT for $\leq 90\%$, é recomendado que um segundo teste NAAT, com um alvo diferente do primeiro teste, seja utilizado para todas as amostras positivas no rastreio (SMITH; TAPSALL; LUM, 2005; WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006; UNEMO; SHAFER, 2014).

Até o momento, não existem bons testes diagnósticos rápidos para detecção de antígenos para o diagnóstico de infecções gonocócicas (WATCHIRS SMITH et al., 2013; GAYDOS; HARDICK, 2014; BROOK, 2015).

2.7 TRATAMENTO

O tratamento de infecções gonocócicas é vem se complicando em virtude da rápida mudança nos padrões de sensibilidade antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*. Já foram descritos altos níveis de resistência às quinolonas, diminuição da sensibilidade às cefalosporinas de espectro estendido (ESCs) e mais recentemente isolados com altos níveis de resistência às ESCs, além de relatos de vários países sobre falha no tratamento com quinolonas preconizadas pela OMS em 2003. Esse cenário aumenta a preocupação em relação ao surgimento de infecções gonocócicas intratáveis com sérias consequências à saúde reprodutiva e sexual da população (WHO, 2016).

Em 2016 a OMS lançou um *guideline* com seis opções específicas de tratamento para infecções gonocócicas com o objetivo de fornecer orientações baseadas em evidências e dar suporte para adaptar as diretrizes de cada país conforme sua realidade. As recomendações estão descritas no Quadro 1 e se estendem a todos os adultos e adolescentes com idade entre 10 a 19 anos, incluindo pessoas vivendo com HIV e populações-chave: profissionais do sexo, HSH, transgêneros e gestantes. Também estão descritas recomendações específicas para profilaxia e tratamento de oftalmia em neonatos causada por *N. gonorrhoeae* (WHO, 2016).

Em 2015 o Ministério da Saúde Brasileiro lançou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (PCDT), com recomendações para o tratamento de infecções gonocócicas: anogenitais não

complicadas (uretra, colo do útero e reto), faríngea não complicada, disseminada e conjuntivite no adulto (BRASIL, 2015). Para infecções anogenitais não complicada e uretrite gonocócica complicada recomendava-se o uso de Ciprofloxacino¹ 500 mg, VO, dose única mais azitromicina 500 mg, dois comprimidos, VO, dose única ou ceftriaxona.², 500 mg, IM, dose única mais Azitromicina 500 mg, dois comprimidos, VO, dose única. O ciprofloxacino era contraindicado para menores de 18 anos e gestantes, sendo que a ceftriaxona seria o fármaco de escolha (BRASIL, 2015). Para infecções gonocócicas disseminadas recomendava-se o uso de ceftriaxona 1g, IM/dia, mantendo o tratamento até 24-48 horas após a melhora, quando o tratamento poderia ser trocado para ciprofloxacino 500 mg, VO, duas vezes ao dia, completando pelo menos sete dias de tratamento. Para infecções de conjuntivite gonocócica no adulto é recomendado o uso de Ceftriaxona² 1g, IM, dose única (BRASIL, 2015). Entretanto, os resultados do primeiro estudo de vigilância da resistência de *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos realizado no Brasil, mostraram que 50% das estirpes de *N. gonorrhoeae* circulantes no país apresentavam resistência ao ciprofloxacino (BAZZO et al., 2018), culminando em 2017 na publicação da NOTA INFORMATIVA Nº 6-sei/2017-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS desaconselhando o uso do ciprofloxacino e recomendando o uso da ceftriaxona no tratamento da infecção gonocócica anogenital não complicada (BRASIL, 2017).

Quadro 1: Recomendações da OMS para o tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae*.

Infecções genitais, anorretais e de orofaringe:

Recomendação 1 e 2:

Terapia dupla: ceftriaxona 250 mg IM com uma dose única de azitromicina 1g por VO ou cefixima 400 mg VO com uma dose única de azitromicina 1g por VO;

Terapia simples (baseada em dados de resistência antimicrobiana local): ceftriaxona 250 mg IM (dose única) ou cefixima 400 mg VO (dose única) ou espectinomicina 2g IM (dose única). Essa recomendação se aplica a mulheres grávidas.

Obs: Na terapia simples, cefixima e espectinomicina não são recomendadas para infecções de orofaringe.

¹O ciprofloxacino estava contraindicado para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, uma vez, que nesses estados já existiam estudos documentando resistência ao ciprofloxacino.

² Em caso de indisponibilidade da ceftriaxona, poderá ser utilizada outra cefalosporina de terceira geração como a cefotaxima 1000mg IM, dose única.

Tratamento de infecções gonocócicas após falha no tratamento:

Recomendação 3:

- Suspeita de reinfeção: tratar novamente com o regime preconizado pela OMS, reforçar uso de preservativo ou abstinência sexual e tratar o parceiro;
- Falha no tratamento com regime não recomendado pela OMS, tratar novamente com o regime preconizado pela OMS;
- Falha no tratamento após terapia simples recomendada pela OMS, tratar novamente com terapia dupla;
- Falha no tratamento após terapia dupla recomendada pela OMS, tratar novamente com uma das opções:
 - ✓ Ceftriaxona 500 mg IM (dose única) com uma dose única oral de azitromicina 2g;
 - ✓ Cefixima 800 mg VO (dose única) com uma dose única oral de azitromicina 2g;
 - ✓ Gentamicina 240 mg IM (dose única) com uma dose única oral de azitromicina 2g;
 - ✓ Espectinomicina 2g IM em dose única (infecções que não sejam de orofaringe) com uma dose única oral de azitromicina 2g;

- **Infecções gonocócicas oftálmicas em neonatos:**

Recomendação 4: ceftriaxona 50 mg/kg (máximo 150 mg) IM (dose única); Kanamicina 25mg/kg (máximo 75 mg) IM (dose única); ou espectinimocina 25 mg/kg (máximo 75 mg) IM (dose única);

Recomendação 5: para todos os neonatos, a OMS recomenda a profilaxia ocular tópica para a prevenção de oftalmia neonatal gonocócica e por clamídia.

Recomendação 6: para profilaxia ocular, a OMS recomenda aplicação tópica para ambos os olhos imediatamente após o nascimento de hidrocloreto de tetraciclina 1% (pomada oftálmica), eritromicina 0,5% (pomada oftálmica), iodo povidine 2,5% (solução aquosa), nitrato de prata 1% (solução) ou cloranfenicol 1% (pomada oftálmica).

Fonte: (WHO,2016).

2.8 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Neisseria gonorrhoeae*

2.8.1 Histórico

Ao longo do tempo, uma grande variedade de antimicrobianos tem sido utilizada para o tratamento da gonorreia. Entretanto, a fácil disponibilidade e o uso indiscriminado resultaram no surgimento e disseminação da resistência a esses medicamentos (GOIRE et al., 2014) (Figura 2). Após a rápida atuação das sulfonamidas no tratamento da gonorreia no início dos anos de 1940, as penicilinas tornaram-se o medicamento de escolha por quase 40 anos em âmbito mundial. Inicialmente em doses muito baixas e posteriormente, administrada em doses mais elevadas com probenecida, um derivado lipossolúvel do

mulheres grávidas com alergia às penicilinas ou nos isolados com resistência às cefalosporinas.

A partir do início dos anos de 1980, as fluoroquinolonas, como o ciprofloxacino e a ofloxacina, foram amplamente utilizadas no tratamento da gonorreia. Apesar de não ser indicado para gestantes e crianças, o ciprofloxacino tem a vantagem de ter efeitos colaterais mínimos, além da administração de uma única dose e apresenta excelente eficácia em todos os sítios anatômicos, incluindo a orofaringe. Inicialmente baixas doses de 250mg foram prescritas, mas em 1990, a falência do tratamento foi reportada (LEWIS, 2010). A terapia culminou no sucesso do tratamento por mais de uma década antes do aparecimento de isolados resistentes, encontrados inicialmente na região da Ásia-Pacífico e, posteriormente, nos Estados Unidos, Europa e África (DAN, 2004; LEWIS; LUKEHART, 2011).

Com o fim da era das quinolonas, as cefalosporinas, permaneceram como a única classe de antibiômicos eficaz para o tratamento da gonorreia. As cefalosporinas orais de terceira geração, como a cefixima e a cefpodoxima, ainda são utilizadas com sucesso como terapia de dose única em muitos países. Relatos de gonococos com diminuição de sensibilidade ou resistência às cefalosporinas orais foram reportados no Japão desde 2002 e mais recentemente em outros países da região do Pacífico Ocidental e Europa (ITO et al., 2004; TAPSALL et al., 2009; UNEMO et al., 2010; ISON et al., 2011). Embora a base genética da resistência às cefalosporinas orais ainda não tenha sido totalmente elucidada, a presença de um gene na forma de mosaico, o *PenA*, parece ser o mecanismo predominante (ITO et al., 2005; LEWIS, 2010). Recentemente foi isolada na Inglaterra, uma *N. gonorrhoeae* com resistência à ceftriaxona (MIC=0,5µg/mL) e apresentando altos níveis de resistência à azitromicina (MIC> 256µg/mL), terapia de primeira linha atualmente recomendada pela OMS para o tratamento da gonorreia. A *N. gonorrhoeae* foi sensível apenas a espectinomicina e parece ter sido importada do Sudeste Asiático (ENGLAND, 2018). A infecção foi tratada empiricamente com 1g de ceftriaxona e subsequentemente com espectinomicina. Entretanto a cultura com material proveniente da faringe permaneceu positiva, o que resultou em uma nova conduta de tratamento com meropenem intravenoso.

2.8.2 Mecanismos de resistência

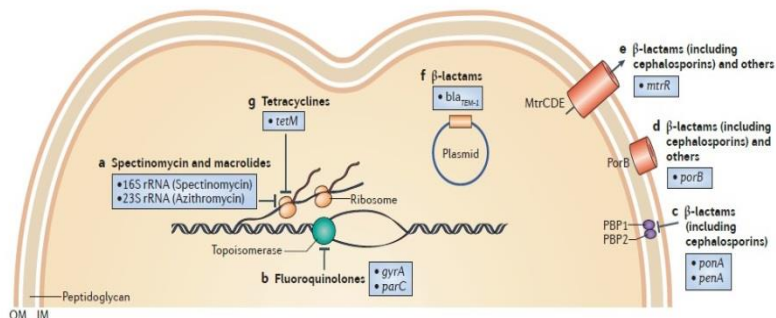
Para adaptar-se rapidamente e sobreviver em ambientes hostis, *N. gonorrhoeae* tem apresentado uma extraordinária capacidade de alterar seu DNA, esse microrganismo é naturalmente competente para a transformação durante todo o seu ciclo de vida. Quando exposto à pressão seletiva, altera de forma eficaz o seu genoma por intermédio de todos os tipos de mutações. Desta forma, *N. gonorrhoeae* evoluiu e adquiriu, ou desenvolveu todos os mecanismos de resistência fisiológica conhecidos, a todos os antimicrobianos utilizados para o tratamento da gonorreia. Dentre os mecanismos, podemos destacar: destruição ou modificação antimicrobiana por enzimas (β -lactamases); modificação estrutural ou bloqueio do sitio alvo, reduzindo a afinidade aos antimicrobianos; diminuição do influxo e aumento do efluxo de antimicrobianos (UNEMO; SHAFER, 2014) (Figura 3).

A seleção de estirpes resistentes também pode ser promovida pela exposição de gonococos ou outras espécies de *Neisseria* spp. aos antimicrobianos administrados para o tratamento da gonorreia ou de outras infecções. As espécies comensais de *Neisseria* spp. são um exemplo clássico, frequentemente compõem a biota humana, particularmente da faringe, e são frequentemente expostas aos antimicrobianos. Como consequência, a resistência pode emergir inicialmente em espécies comensais de *Neisseria* spp. que atuam como reservatório de genes de resistência. Estes genes podem ser facilmente transferidos para gonococos por transformação. A infecção gonocócica faríngea assintomática fornece os meios para esta transferência genética, uma vez que, *Neisseria gonorrhoeae* e outras espécies de *Neisseria* comensais podem coexistir por longos períodos (SAIKA et al., 2001; TANAKA et al., 2006; FURUYA et al., 2007; TAPSALL et al., 2009; UNEMO; SHAFER, 2011; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; SHAFER, 2014).

N. gonorrhoeae possui uma sequência específica de DNA que funciona como um sistema de captação e reconhecimento do seu próprio DNA e do DNA de espécies relacionadas (GOODMAN; SCOCCA, 1988; HAMILTON; DILLARD, 2006). A periodicidade de transformação do DNA genômico de gonococos é frequentemente elevada, embora as frequências de transformação de plasmídeos sejam substancialmente menores (SOX; MOHAMMED; SPARLING, 1979). Assim, embora a taxa de mutações espontâneas *missense* que resultem em AMR possa ser baixa, a transferência horizontal destes alelos por

transformação é muito eficiente na disseminação da AMR dentro da comunidade (UNEMO; SHAFER, 2014).

Figura 3 - Alvo dos antimicrobianos e correspondentes genes de resistência de *N. gonorrhoeae*.



Existem vários alvos para os antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*. **a.** A espectinomicina e azitromicina ligam-se ao ribossomo e inibem a síntese de proteínas. Mutações nos genes que codificam rRNA da subunidade 16S e 23S conferem resistência à espectinomicina e azitromicina, respectivamente; **b.** As fluoroquinolonas inibem a atividade das topoisomerasas que estão envolvidas na replicação do DNA. A resistência às fluoroquinolonas é conferida por mutações nos genes *gyrA* e *parC* que codificam a topoisomerase; **c.** Os β-lactâmicos têm como alvo a proteína ligadora de penicilina 1 (PBP1) e PBP2, que são requeridas para a síntese do peptidoglicano. Mutações em *ponA* e *penA*, que codificam PBP1 e PBP2 respectivamente, conferem resistência aos β-lactâmicos; **d.** Várias classes de antimicrobianos atravessam a membrana de *N. gonorrhoeae* por meio de PorB, a maior porina de membrana externa. Alterações em PorB reduzem a permeabilidade, conferindo resistência; **e.** A bomba de efluxo MtrCDE expulsa várias classes de antimicrobianos da célula de *N. gonorrhoeae*. Mutações nos genes da bomba de efluxo, particularmente no gene promotor de *mtrR*, que codifica a proteína repressora MtrR, levam à superexpressão e consequentemente ao aumento da atividade do complexo da bomba de efluxo, conferindo resistência; **f.** O plasmídeo que carrega a penicilinaase TEM-1 (codificada pelo gene *bla*_{TEM-1}) hidrolisa o anel β-lactâmico da penicilina, conferindo resistência por inativação; **g.** A tetraciclina liga-se ao ribossomo, e a interação entre a proteína de resistência TetM e o ribossomo confere altos níveis de resistência à tetraciclina. IM: membrana interna; OM: membrana externa. **Fonte:** (WHILEY; GOIRE; et al., 2010).

A maioria dos determinantes da AMR são localizados cromossomicamente e somente os genes, *bla*_{TEM} (ASHFORD; GOLASH; HEMMING, 1976; PHILLIPS, 1976) e *tetM* (MORSE et al., 1986) que conferem altos níveis de resistência à penicilina e tetraciclina, respectivamente, são mediados por plasmídeo. Estes determinantes

podem ser compartilhados entre estirpes gonocócicas por transformação ou conjugação. Para muitos antimicrobianos e determinantes da AMR, a aquisição de um único determinante de AMR confere apenas um aumento da concentração inibitória mínima (MIC) sem importância clínica, ou seja, a MIC permanece abaixo do ponto de corte para determinar a resistência. No entanto, é importante notar, que os efeitos cumulativos de vários determinantes da AMR e suas interações podem acarretar resistência de importância clínica, o que conseqüentemente, resultaria em falha terapêutica se o antimicrobiano utilizado fosse administrado em monoterapia (UNEMO; SHAFER, 2014).

Mecanismos de resistência bacteriana, em geral, representam uma vantagem somente na presença de antimicrobianos, pois acarretam diminuição do *fitness* biológico em relação às espécies sensíveis (NAGAEV et al., 2001; TRZCINSKI et al., 2006; ROZEN et al., 2007). A diminuição do *fitness* de estirpes resistentes pode, no entanto, ser restaurada por meio de mutações compensatórias, que ocorrem frequentemente *in vitro* e provavelmente, também *in vivo*. Alguns determinantes da AMR como, por exemplo, mutações em *mtrR* e *gyrA*, podem aumentar o *fitness* bacteriano de pelo menos algumas cepas de *N. gonorrhoeae* (WARNER; SHAFER; JERSE, 2008; KUNZ et al., 2012). Em *N. gonorrhoeae*, a maioria dos mecanismos de resistência não parece diminuir o *fitness* biológico, o que resulta na persistência de microrganismos resistentes também na ausência de uma seleção antimicrobiana por intermédio do tratamento da gonorreia (UNEMO; SHAFER, 2014). Além disso, a pressão antimicrobiana geral permanece na comunidade devido ao uso de antimicrobianos para tratamento de outras doenças infecciosas. Infelizmente, isso mostra que é extremamente improvável a possibilidade de reintroduzir antimicrobianos utilizados anteriormente, como penicilina, tetraciclina ou fluoroquinolonas para o tratamento da gonorreia (UNEMO; SHAFER, 2011; UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

2.8.2.1 Resistência as sulfonamidas

As Sulfonamidas têm como função a inibição da síntese do ácido fólico bacteriano por intermédio da inibição da enzima dihidropteroato sintase bacteriana (DHPS). A resistência às sulfonamidas pode ser mediada pela síntese aumentada do ácido p-aminobenzóico, que dilui o antimicrobiano, ou por alterações no gene *folP* (mutações pontuais ou a presença de um gene mosaico contendo seqüências de DNA de

Neisserias spp. comensais) que codifica a enzima DHPS. Alterações em DHPS resultam em significativa diminuição na afinidade de ligação e na atividade bacteriostática das sulfonamidas (SWEDBERG; FERMER; SKOLD, 1993; FERMER et al., 1995; UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

2.8.2.2 Resistência à penicilina

2.8.2.2.1 Resistência plasmídial à penicilina

Os antimicrobianos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) inibem a formação de ligações cruzadas de peptidoglicano na parede celular bacteriana por intermédio da ligação do anel β -lactâmico à enzima transpeptidase (proteína ligadora de penicilina [PBPs]), resultando em ação bactericida.

N. gonorrhoeae com altos níveis de resistência à penicilina mediada por plasmídeo, tradicionalmente contém plasmídeos com o gene *bla*_{TEM-1} codificando a β -lactamase TEM-1. Esta enzima hidrolisa a ligação amida cíclica de penicilinas susceptíveis à β -lactamases, abrindo o anel β -lactâmico e tornando a penicilina inativa. Os plasmídeos gonocócicos que produzem TEM-1 foram provavelmente adquiridos por transferência conjugal de *Haemophilus parainfluenzae*. Após a primeira descrição de estirpes gonocócicas com plasmídeos produtores de β -lactamase, em 1976, (ASHFORD; GOLASH; HEMMING, 1976; PHILLIPS, 1976), essas bactérias e seus plasmídeos (entre cepas gonocócicas) disseminaram-se rapidamente internacionalmente.

Atualmente, estirpes gonocócicas possuindo os plasmídeos Asiático (7.426pb) e africano (5.599pb), assim denominados devido a suas origens epidemiológicas, são globalmente difundidas (TAPSALL et al., 2009; COLE et al., 2015). Outros tipos de plasmídeos produtores de β -lactamase têm sido descritos em gonococos, incluindo o Toronto/Rio (5.153pb), Nimes, Nova Zelândia e Joanesburgo. O plasmídeo Asiático parece ser o ancestral, a partir do qual, os demais evoluíram, através de deleções e/ou inserções. Esses plasmídeos podem ser caracterizados como deleções derivadas do plasmídeo Asiático (Africano, Toronto/Rio e Joanesburgo) ou inserções derivadas do plasmídeo Asiático (NovaZelândia) e do Africano (Nimes) (PAGOTTO et al., 2000; PALMER; LEEMING; TURNER, 2000; MULLER; FAYEMIWO; LEWIS, 2011). Todos esses plasmídeos aparentemente contêm um elemento transponível, TnA (Tn2), que carrega o gene *bla*_{TEM-1} (UNEMO; SHAFER, 2014).

2.8.2.2.2 Resistência cromossômica à penicilina

A resistência cromossômica à penicilina é consequência de mutações específicas que modificam as proteínas alvo (alvo primário proteína ligadora de penicilina 2 [PBP2] codificado pelo gene *penA* e proteína ligadora de penicilina 1 [PBP1] codificada pelo gene *ponA*), aumentam o efluxo e/ou diminuem o influxo da penicilina (UNEMO; SHAFER, 2014).

Gonococos resistentes à penicilina, tradicionalmente contêm entre cinco e nove mutações no gene *penA*. Em conjunto, essas mutações diminuem as taxas de acilação de PBP2 e consequentemente, diminuem a sensibilidade à penicilina em seis a oito vezes (ROPP et al., 2002; POWELL et al., 2009). As mutações em *penA* provavelmente foram adquiridas por gonococos por meio da transformação de sequências de *penA* de *Neisserias* spp. comensais que possuem uma PBP2 com uma taxa reduzida de acilação para a penicilina (BRANNIGAN et al., 1990; BOWLER et al., 1994). A mutação PBP2 mais comum em estirpes gonocócicas resistentes à penicilina tem sido a inserção de um aspartato (denominado Asp345a). As demais mutações encontram-se na região carboxil-terminal da PBP2. Embora as mutações C-terminal afetem significativamente as taxas de acilação da penicilina, a estrutura cristalina de PBP2 permanece inalterada (POWELL et al., 2009), o que corrobora a necessidade da enzima PBP2 mutada manter a atividade com o seu substrato natural. Na ausência da estrutura cristalina de PBP2 contendo a inserção Asp345a, o impacto da mutação não é totalmente evidente, mas é mais significativo do que as substituições C-terminais. Durante a última década, muitos genes que contêm mosaico *penA* foram descritos. Os genes que contêm o mosaico apresentam entre 60 e 70 alterações de aminoácidos comparadas a um gene *penA* selvagem e podem resultar na resistência às penicilinas e às ECs (OHNISHI et al., 2011; CAMARA et al., 2012; UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012).

Embora alterações em PBP2 seja o mecanismo primário para resistência cromossômica à penicilina, estirpes exibindo altos níveis de resistência a este fármaco também exibem uma única mutação missense no gene *ponA* (denominada de alelo *ponA1*) que codifica PBP1, e tem aproximadamente 16 vezes menos acilação de penicilina do que a PBP2 selvagem (POWELL et al., 2009). A alteração Leu421Pro codificada pelo alelo *ponA1* reduz até quatro vezes a taxa de acilação da penicilina (ROPP et al., 2002). Curiosamente, em cepas resistentes à penicilina, a reversão do alelo *ponA* mutado para o selvagem diminui de duas a

quatro vezes a concentração inibitória mínima (MIC) da penicilina, entretanto, a introdução de *ponA* em uma cepa com os determinantes de resistência *penA*, *mtrR* e *penB* não promovem alteração da MIC. Isto pode indicar epistasia ou a presença de algum determinante de resistência desconhecido, como o “fator X” (UNEMO; SHAFER, 2014).

Além do mais, os valores da MIC da penicilina podem aumentar por mutações específicas que resultam no aumento do efluxo do antimicrobiano por meio da super expressão do sistema de bomba de efluxo MtrCDE (codificado pelo gene *mtrR*), que exporta a penicilina para fora da célula ou por mutações que resultam na diminuição do influxo de penicilina por meio da diminuição da permeabilidade pela porina PorB1b (codificado pelo gene *penB*) (OHNISHI et al., 2011; UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012; UNEMO; NICHOLAS, 2012).

2.8.2.3 Resistência à tetraciclina

2.8.2.3.1 Resistência plasmidial a tetraciclina

As tetraciclinas têm como mecanismo de ação a inibição da ligação do aminoacil-RNA transportador ao complexo mRNA ribossomo, especialmente por meio da interação com a subunidade 30S do ribossomo, impossibilitando a síntese proteica bacteriana e resultando num efeito bacteriostático (UNEMO; SHAFER, 2014).

O gene *tetM*, inicialmente descrito no gênero *Streptococcus*, confere altos níveis de resistência plasmidial à tetraciclina (MICs ≥ 16 µg/mL). A ligação do gene *tetM* ao ribossomo promove a liberação da molécula de tetraciclina, permitindo a síntese proteica. O sucesso da ação do *tetM* se dá pela sua semelhança com o fator de alongamento G (EF-G), envolvido na síntese de proteínas e pela sua atividade de GTPase dependente de ribossomo (BURDETT, 1986;1991; CHOPRA; ROBERTS, 2001). O gene *tetM* inicialmente estabeleceu-se nos gonococos por integração ao plasmídeo conjugado de 24,5 MDa, gerando um plasmídeo de 25,2 MDa (40,6kb) (KNAPP et al., 1988; ROBERTS; KNAPP, 1988). Uma vez estabelecido, manteve-se estável e transferível a outros gonococos (por conjugação), bem como a isolados de *Neisseria meningitidis* (DILLON; PAUZE; YEUNG, 1983; IKEDA et al., 1986), *Haemophilus influenzae* e *Escherichia coli* (FLETT; HUMPHREYS; SAUNDERS, 1981). O primeiro tipo de gene *tetM* foi descrito nos EUA e foi denominado *tetM* Americano (MORSE et al., 1986). Sete anos mais tarde, foi descrito o tipo *tetM* Holandês,

altamente homólogo (GASCOYNE-BINZI; HERITAGE; HAWKEY, 1993); subsequentemente foram identificados derivados destes plasmídeos como o *Uruguay* (MARQUEZ et al., 2002) e *South Africa* (CHALKLEY et al., 1997).

2.8.2.3.2 Resistência cromossômica à tetraciclina

A resistência cromossômica à tetraciclina ocorre devido a mutações que modificam a proteína ribossomal (alvo), numa interação com determinantes de resistência que promovem o aumento do efluxo e diminuem o influxo de tetraciclina (UNEMO; SHAFER, 2014).

Inicialmente esta resistência foi chamada de mutação *tet-2*, adicionalmente as mutações *mtrR* e *penB* (SPARLING; SARUBBI; BLACKMAN, 1975). Entretanto, posteriormente descobriu-se que *tet-2* é uma mutação no alelo *rpsJ*, que codifica uma forma alterada da proteína ribossomal S10. O alelo mutado de *rpsJ*, continha um polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês *single nucleotide polymorphism* (SNP) que substituiu a Val57 para uma Met57 em S10 (HU et al., 2005). Além disso, observou-se que a substituição da Leu57 para Gln57 conferia níveis idênticos de resistência (UNEMO; SHAFER, 2014). O aminoácido Val57 em S10 está localizado próximo a região aminoacil-RNA transportador que forma o sítio de ligação à tetraciclina. Tem sido sugerido que a substituição da Val57 por grandes aminoácidos não carregados altera a estrutura do RNA ribossômico (rRNA), reduzindo assim a afinidade de ligação do ribossomo à tetraciclina (HU et al., 2005).

Adicionalmente a estas modificações do alvo, assim como na penicilina, o aumento do efluxo e a diminuição do influxo da tetraciclina, devido aos genes de resistência *mtrR* (FOLSTER et al., 2009; ZHAO et al., 2009; OHNISHI et al., 2011) e *penB* (OLESKY; HOBBS; NICHOLAS, 2002; OLESKY et al., 2006; ZHAO et al., 2009) respectivamente, resultam no aumento da resistência à tetraciclina.

2.8.2.4 Resistência à espectinomicina

A espectinomicina inibe a tradução de proteínas por ligar-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, ou seja, ela interage com o RNA ribossômico 16S (16S rRNA) e durante o alongamento do polipeptídeo bloqueia a translocação catalisada pelo EF-G do peptidil-

tRNA do sítio A para o sítio P (RAMAKRISHNAN; WHITE, 1992; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

Altos níveis de resistência à espectinomicina ($MIC > 1024 \mu\text{g/mL}$) inicialmente foram atribuídos a um SNP em C1192U, localizado na região de ligação da espectinomicina (hélice 34 do 16S rRNA) (GALIMAND; GERBAUD; COURVALIN, 2000). Recentemente, também foram confirmadas alterações específicas (deleção de Val25³ e K26E⁴) em *rpsE*, que codifica a proteína S5 da subunidade 30S do ribossomo bacteriano, resultando em níveis elevados de resistência. Entretanto, a mutação T24P⁵ resulta em baixos níveis de resistência à espectinomicina ($MIC 128 \mu\text{g/mL}$) (ILINA et al., 2013; UNEMO; GOLPARIAN; et al., 2013). Outro fator envolvido na ligação da espectinomicina ao ribossomo é a possibilidade de ligação da fração N terminal da proteína S5 (forma um *loop*) à hélice 34 do 16S rRNA (DAVIES et al., 1998). Alterações na proteína ribossomal S5, provavelmente rompem a sua ligação ao 16S rRNA, o que resulta em resistência à espectinomicina (UNEMO; SHAFER, 2014).

2.8.2.5 Resistência às quinolonas

As quinolonas têm como mecanismo de ação a inibição da enzima DNA-girase e topoisomerase IV. Ambas são essenciais para o metabolismo do DNA na célula bacteriana, são altamente conservadas e pertencem às topoisomerases tipo II. Essas enzimas atuam catalisando a abertura, dependente de ATP, da dupla fita de DNA seguida do reagrupamento das cadeias quebradas (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

Bactérias desenvolvem resistência às quinolonas por meio de mutações que alteram o reconhecimento das enzimas alvo. A DNA girase liga-se ao DNA na forma de herotetrâmero composto por duas subunidades GyrA e duas GyrB. Nos gonococos, mutações no alvo primário das quinolonas, o gene *gyrA*, estão associadas à resistência. Essas mutações reduzem a afinidade de ligação da enzima às quinolonas, tornando-a resistente ao seu efeito inibitório. A enzima topoisomerase IV é composta por um tetrâmero de duas subunidades ParC, codificada pelo gene *parC*, e duas subunidades ParE, codificadas pelo gene *parE* (UNEMO; SHAFER, 2014).

³ **Val:** valina.

⁴ **K26E:** Troca do aminoácido Lisina por um Ácido Glutâmico no códon 26.

⁵ **T24P:** Troca do aminoácido Treonina por uma Prolina no códon 26.

Mutações SNP em *gyrA* promovem níveis de resistência baixos a intermediários. Altos níveis de resistência são determinados por diversas mutações específicas concomitantes em *parC*, principalmente no códon 88 (S88P⁶) e 91 (E91K⁷). Essas mutações podem ser transferidas entre gonococos por transformação ou ser facilmente selecionadas por exposição a concentrações sub-inibitórias de ciprofloxacino. Entretanto, foi observado em *E. coli* que a mutação *missense* no códon 91 em *gyrA* (S91F⁸), localizado dentro da região determinante de resistência às quinolonas (QRDR), confere aumento de 100 vezes na resistência ao ciprofloxacino enquanto a mutação no códon 95 (D95N⁹) duplica a resistência (BELLAND et al., 1994). Mutações nos genes *gyrB* e *parE* não parecem ter qualquer impacto significativo na resistência ao ciprofloxacino (TREES et al., 1999; LINDBACK et al., 2002; ALCALA et al., 2003).

2.8.2.6 Resistência aos macrolídeos

O efeito bacteriostático dos macrolídeos ocorre pela inibição da síntese proteica por meio da sua ligação à molécula 23S do rRNA, localizado na subunidade 50S do ribossomo. Assim, os macrolídeos impedem a translocação do peptidil-tRNA e promovem o bloqueio do canal de saída do peptídeo na subunidade 50S ribossomal, resultando na produção de polipeptídios incompletos (DOUTHWAITE; CHAMPNEY, 2001; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

A resistência bacteriana aos macrolídeos pode ser resultado da alteração da molécula alvo (ribossomo), seja por meio da modificação associada à rRNA metilase do 23S rRNA ou mutações específicas no 23S rRNA e/ou pela super expressão de bomba de efluxo. A resistência mediada pelas rRNA metilases ocorre pela metilação de um resíduo de adenosina na posição 2058 (numeração baseada em *E. coli*) do rRNA 23S, que está localizado no domínio V da peptidil transferase, impedindo a ligação do macrolídeo ao rRNA 23S. Os genes *erm* (*erythromycin ribosomal methylase*) descritos em gonococos no início da década de 1990, codificam a rRNA metilase e podem ser carregados por transposons conjugativos (ROBERTS et al., 1999). Na ausência de

⁶ **S88P**: Troca do aminoácido Serina por uma Prolina no códon 88.

⁷ **E91K**: Troca do aminoácido Ácido Glutâmico por uma Lisina no códon 91.

⁸ **S91F**: Troca do aminoácido Serina por uma Fenilalanina no códon 91.

⁹ **D95N**: Troca do aminoácido Ácido aspártico por uma Asparagina no códon 95.

outros genes de resistência, como *mtrR* ou *mef* (codifica bombas de efluxo), os genes *erm* podem conferir altos níveis de resistência à eritromicina (MICs 4-16 µg/mL) e diminuição da sensibilidade ou baixos níveis de resistência à azitromicina (MICs 1-4 µg/mL) (ROBERTS et al., 1999; COUSIN; WHITTINGTON; ROBERTS, 2003). No entanto, atualmente a frequência desses genes em estirpes resistentes é baixa. (CHISHOLM; DAVE; ISON, 2010; ALLEN et al., 2011). Mutações no alvo 23rRNA podem resultar tanto em resistência de baixo nível (mutação C2611T¹⁰) (NG et al., 2002) com em altos níveis de resistência (mutação A2059G) (CHISHOLM; DAVE; ISON, 2010; GALARZA et al., 2010; UNEMO; GOLPARIAN; HELLMARK, 2014) para a eritromicina e azitromicina. Os valores da MIC para gonococos resistentes aos macrolídeos são dependes de quantos, dos quatro alelos mutados do gene rRNA 23S, contêm a mutação. Desta forma, a mutação A2059G presente em três ou em todos os alelos resulta em altos níveis de resistência à azitromicina (MIC \geq 256 µg/mL), enquanto estirpes com somente um alelo mutado podem ter valores de MIC semelhantes às estirpes selvagens (UNEMO; GOLPARIAN; HELLMARK, 2014).

2.8.2.7 Resistência às cefalosporinas

Cefalosporinas, assim como outros antimicrobianos β -lactâmicos, inibem a formação de ligações cruzadas de peptidoglicano na parede celular bacteriana por meio da ligação à PBP2, resultando em atividade bactericida. A resistência às cefalosporinas ocorre pelo aumento do efluxo, diminuição do influxo dos antimicrobianos e principalmente por mutações em PBP2 (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

A resistência primária à ESC, assim como, a cromossômica para as penicilinas, é conferida por mutações específicas no gene *penA* que codifica a proteína PBP2 (ZHAO et al., 2009; TOMBERG et al., 2010; OHNISHI et al., 2011; CAMARA et al., 2012; UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012). No entanto, ao contrário do gene *penA*-Asp345a encontrado em estirpes resistentes à penicilina, o gene *penA* de isolados resistentes às ESC é na maioria das vezes um gene mosaico que contém de 60-70 alterações de aminoácidos, e curiosamente, esse mosaico *penA* não contém a inserção Asp345a (LINDBERG et al., 2007; OHNISHI et al., 2011; UNEMO;

¹⁰ C211T: Troca do aminoácido Cisteína por uma Treonina no códon 211.

GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012). Acredita-se que o alelo mosaico *penA*, originou-se em infecções gonocócicas faríngeas por meio da transformação do DNA, seguido por recombinação com genes parciais de *penA*, oriundos de espécies de *Neisseria* comensais que comumente habitam a orofaringe (*N. perflava*, *N. sicca*, *N. polysaccharea*, *N. cinera* e/ou *N. favescens*) (AMEYAMA et al., 2002; ITO et al., 2005; OSAKA et al., 2008; UNEMO; NICHOLAS, 2012). A presença do alelo mosaico *penA* parece aumentar mais os valores da MIC da cefixima do que ceftriaxona, fato que pode ser explicado pela relação estrutura atividade (cadeia lateral C3 da ceftriaxona é maior do que a da cefixima) (TAKAHATA et al., 2006; LINDBERG et al., 2007; OCHIAI et al., 2007; OSAKA et al., 2008; UNEMO; NICHOLAS, 2012).

A presença de três mutações no alelo mosaico *penA*, resultante das alterações nos aminoácidos G545S, I312M e V316T em PBP2, foi inicialmente sugerida como importante para a diminuição da sensibilidade às ESC, particularmente para cefixima (TAKAHATA et al., 2006; OSAKA et al., 2008). Entretanto, essas três mutações aumentam a resistência apenas na presença concomitante de mutações adicionais nos alelos do mosaico *penA*, utilizando-se do mecanismo de epistasia (TOMBERG et al., 2010; UNEMO; NICHOLAS, 2012). As mutações adicionais podem atuar como mutações “compensatórias” ou “estabilizadoras” para restaurar a atividade de transpeptidase, essencial para a viabilidade bacteriana. As três mutações estão localizadas próximo ao sítio ativo dos β -lactâmicos em PBP2, e sugere-se que a mutação G545S possa diminuir a taxa de acilação da penicilina, e consequentemente sua ação bactericida. Além disso, a alteração N512Y no mosaico em PBP2 também parece estar envolvida na diminuição da sensibilidade à ESCs, sem afetar a sensibilidade à penicilina (TOMBERG et al., 2010).

Algumas alterações adicionais em PBP2, como as mutações G542S, P551S e P551L, também têm sido associadas com elevadas MICs para ceftriaxona (WHILEY; GOIRE; et al., 2010). No entanto, seus efeitos na MIC da ceftriaxona ainda não foram elucidados (UNEMO; SHAFER, 2014).

N. gonorrhoeae XDR (*extensive drug resistance*), resistentes às ESCs têm sido isoladas na França (UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012) e Espanha (CAMARA et al., 2012). Ambas pertencentes à sequência *multilocus* ST1901 e a sequência multiantigênica de *N. gonorrhoeae* ST1407, presumindo que um clone resistente a múltiplos fármacos incluindo às ESCs, está circulando em

diferentes países (UNEMO; NICHOLAS, 2012). As duas estirpes também possuem um gene tipo XXXV no alelo mosaico *penA* (OHNISHI et al., 2011) com uma alteração A501P e apresentavam altos níveis de resistência à cefixima e ceftriaxona (OHNISHI et al., 2011; CAMARA et al., 2012). Assim, sugeriu-se que a presença do novo alelo mosaico *penA* resultou em alterações estruturais secundárias em PBP2, inibindo a ligação da ceftriaxona e cefixima à PBP2, resultando em resistência às ESC (UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012).

A elevação da MIC também pode ser resultado do aumento do efluxo e diminuição do influxo das ESCs, devido a presença dos genes de resistência *mtrR* (OHNISHI et al., 2011; UNEMO; NICHOLAS, 2012) (FOLSTER et al., 2009; ZHAO et al., 2009; OHNECK et al., 2011) e *penB*. Curiosamente, tanto *mtrR* quanto *penB* têm mais efeitos sobre a MIC da ceftriaxona do que da cefixima, sugerindo que a cefixima não é um substrato ideal para a bomba de efluxo MtrCDE e para a porina PorB1b (ZHAO et al., 2009).

As mutações *ponA* (L421P) e *pilQ* (E666K), determinantes de resistência à penicilina, não parecem ter efeito sobre a MIC para ESC em gonococos atualmente circulantes (ROPP et al., 2002; ZHAO et al., 2005; ZHAO et al., 2009; UNEMO; NICHOLAS, 2012). A maior parte das estirpes com sensibilidade diminuída ou resistente às ESC contêm o alelo *ponA1*. No entanto, isto provavelmente reflete apenas que essas linhagens evoluíram por transferência horizontal de alelos do mosaico *penA* dentro de estirpes com resistência cromossômica pré-existentes à penicilina e que permanecem altamente prevalentes na população de *N. gonorrhoeae* (ZHAO et al., 2009; UNEMO; NICHOLAS, 2012). A mutação *pilQ2* ou qualquer outra mutação que resulte em perda de função, nunca foi relatada em isolados clínicos, provavelmente porque interrompe a formação do *pilus* tipo IV e, conseqüentemente, o potencial patogênico (HELM; BARNHART; SEIFERT, 2007; WHILEY; JACOBSSON; et al., 2010; UNEMO; NICHOLAS, 2012). Assim como na resistência à penicilina, o fator X não transformado pode influenciar a MIC das ESCs (ZHAO et al., 2009; OHNISHI et al., 2011; UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012; UNEMO; NICHOLAS, 2012).

2.9 MULTI-ANTIGEN SEQUENCE TYPING (NG-MAST)

O NG-MAST é um método utilizado para a tipificação molecular de isolados de *N. gonorrhoeae*. É um sistema baseado na amplificação e análise de sequências internas altamente variáveis dos genes *porB* e

tbpB, que codificam as duas maiores proteínas externas de membrana do gonococo. O gene *porB* codifica uma porina responsável pela entrada de vários antibióticos na célula bacteriana enquanto o *tbpB* codifica a subunidade β da proteína de ligação à transferrina. Esse método possui um alto poder discriminatório e tem sido utilizado com principal interesse na caracterização de isolados gonocócicos pela identificação de *clusters* de microrganismos que compartilham a mesma descendência. O perfil alélico é obtido pelo sequenciamento das regiões internas dos genes *porB* e *tbpB* e posteriormente as sequências são reduzidas a um tamanho específico (490pb para *porB* e 390pb para *tbpB*) podendo então ser comparadas a todos os alelos já descritos (MARTIN et al., 2004).

3 HIPÓTESE DO ESTUDO

A evolução da resistência de isolados de *N. gonorrhoeae* circulantes na Grande Florianópolis à penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino e à azitromicina e o aumento da MIC à cefixima e ceftriaxona são semelhantes ao observado em estudos internacionais.

4 OBJETIVOS

4.1 OBEJETIVO GERAL

Caracterizar uma série histórica de *N. gonorrhoeae* por meio da determinação da concentração inibitória mínima aos antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino, cefixima, ceftriaxona e azitromicina, da detecção dos determinantes moleculares da resistência antimicrobiana e da genotipagem por NG-MAST de isolados circulantes na Grande Florianópolis entre 2008 a 2016.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (MICs) para os antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacina e azitromicina pelo método de ágar diluição;
- Identificar a presença de β -lactamase nos isolados estudados pelo método da cefalosporina cromogênica;
- Genotipar isolados de *N. gonorrhoeae* pelo método de *multi-antigen sequence typing* (NG-MAST);
- Caracterizar os determinantes moleculares da resistência ao ciprofloxacino por meio da detecção de mutações nos genes da subunidade A da DNA girase (*GyrA*) e subunidade *parC* da enzima topoisomerase IV;
- Identificar a presença dos genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-135} e *bla*_{TEM-220} em isolados de *N. gonorrhoeae* produtores de penicilinase (PPNG);
- Identificar os tipos de gene *tetM* em isolados com resistência plasmidial à tetraciclina.
- Correlacionar o *sequence typing* (ST) obtido pelo NG-MAST com o perfil de resistência dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um retrospectivo observacional de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*.

5.2 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) na cidade de Florianópolis, no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) e no Laboratório Médico Santa Luzia, na cidade de São José. O Laboratório Médico Santa Luzia possui 15 unidades de atendimento distribuídas nas quatro principais cidades da região da Grande Florianópolis: Florianópolis (10 unidades), São José (três unidades), Biguaçu (uma unidade) e Palhoça (uma unidade). Juntas essas cidades representam 97,4% da população metropolitana de Florianópolis (BRASIL, 2010).

5.3 AMOSTRAGEM

Foram avaliadas 197 amostras de um banco de culturas de *N. gonorrhoeae* isoladas no período de 2008 a 2016. Deste total, 153 isolados apresentaram viabilidade para o desenvolvimento do estudo. As amostras estavam armazenadas em caldo *brain heart infusion* (BHI) e sangue de carneiro com 20% de glicerol a temperatura de -20°C. As amostras foram cedidas pelo Laboratório Médico Santa Luzia, como isolados clínicos numerados de forma sequencial e desvinculados de identificação com paciente. Os isolados são originários de um banco de culturas após exames bacteriológicos cujos resultados já foram fornecidos aos pacientes. Entretanto, a MIC, a genotipagem e o estudo molecular da resistência antimicrobiana não haviam sido realizados. Essas técnicas são complementares à rotina diagnóstica microbiológica.

5.4 CULTIVO E ISOLAMENTO

O cultivo e reisolamento dos isolados clínicos foram realizados por meio de semeadura da bactéria em ágar chocolate (Laborclin, Brasil). Entretanto, foi utilizado o meio Thayer-Martin (Laborclin, Brasil) modificado quando os isolados apresentavam contaminação

abundante, com o objetivo de aumentar as chances de recuperação da bactéria. A incubação para ambos meios foi realizada a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ com 5% de CO_2 . As culturas foram incubadas por até 72 horas. As colônias características de *N. gonorrhoeae* apresentaram-se pequenas, brilhantes, viscosas e extremamente aderidas ao meio. Foi realizado um ciclo de descongelamento para o isolamento e identificação da bactéria, para os ensaios de sensibilidade antimicrobiana e extração do DNA a bactéria foi isolada a partir da raspagem do meio congelado.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE GÊNERO

5.5.1 Coloração de Gram

Foi realizada a técnica de coloração de Gram nas de colônias características de *N. gonorrhoeae* isoladas em meio Thayer-Martin (Laborclin, Brasil) modificado ou Ágar Chocolate (Laborclin, Brasil). Foi adicionada a uma lâmina de microscopia uma gota de salina estéril e em seguida com auxílio de uma alça bacteriológica foi adicionada uma colônia característica de *N. gonorrhoeae*. Fixou-se o esfregaço na lâmina com calor brando antes da coloração. As lâminas foram coradas pela metodologia de Gram *N. gonorrhoeae* é uma bactéria gram-negativa e apresenta-se como diplococos “riniformes” ou “grãos de café”, característica morfotintorial própria do gênero *Neisseria* (UNEMO M et al., 2013).

5.5.2 Reação da Catalase

Após a visualização de diplococos gram-negativos na coloração de Gram, as colônias foram submetidas à reação da catalase. A uma colônia suspeita de *N. gonorrhoeae* foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio 30% (Vetec, Brasil). A reação de catalase detecta uma enzima hemoprotéica que catalisa a quebra do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Na reação positiva, ocorre desprendimento abundante de bolhas e, na reação negativa, o líquido permanece inalterado. *N. gonorrhoeae* caracteriza-se por apresentar reação de catalase positiva, indicando a produção dessa enzima (UNEMO M et al., 2013).

5.5.3 Reação da Oxidase

A reação da oxidase é um procedimento qualitativo para determinar a presença da enzima citocromo C oxidase em bactérias. Esta oxidase é dependente da presença do sistema citocromo C oxidase intracelular que catalisa a oxidação do Citocromo C por meio do oxigênio molecular, que serve como receptor terminal de elétrons nos microrganismos. *N. gonorrhoeae* produz um composto denominado de indofenol-oxidase na presença de oxigênio, oxida as aminas aromáticas que atuam como receptor artificial de elétrons e produzem um composto colorido (GALARZA; GIANECINI, 2015). A reação da oxidase foi realizada por meio de fitas reativas de oxidase (New-Prov, Brasil) com o reagente dimetil-p-fenilenodiamina. Sobre a fita foi depositada por meio de um esfregão uma colônia característica de *N. gonorrhoeae*. O aparecimento de uma coloração púrpura entre 10 e 20 segundos caracteriza uma reação de oxidase positiva. Se a reação for negativa, a coloração do reagente no papel de filtro permanecerá inalterada. *N. gonorrhoeae* caracteriza-se por apresentar reação de oxidase positiva (UNEMO M et al., 2013).

5.6 CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE POR MALDI-TOF VITEK MS

Os diplococos gram-negativos com reação de oxidase e catalase positivas, foram repicados em ágar chocolate (Laborclin, Brasil), cultivados por até 24h em atmosfera de 5% de CO₂ a 35 ± 1°C para posterior identificação da espécie pela metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF VITEK MS no Laboratório Médico Santa Luzia.

O VITEK MS é um espectrômetro de massas que tem sua tecnologia baseada em MALD TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) ionização/dessorção a laser assistida por matriz e TOF (*time-of-flight*): tempo de voo. Uma colônia de cada amostra foi aplicada a um poço de uma lâmina VITEK MS-DS e a esse poço, aplicou-se uma solução matriz. Após a secagem completa a lâmina foi introduzida no equipamento. Os resultados foram apresentados na forma de picos (espectro), que correspondem a diferentes fragmentos de proteínas. A análise foi realizada pelo próprio equipamento, por comparação dos padrões de fragmentos gerados para o microrganismo teste (espectro) com uma base de dados formada por espectros de milhares de isolados de diferentes espécies de microrganismo. (BIOMÉRIEUX, 2012).

O procedimento foi realizado em lâmina de 48 poços, sendo dividido em três secções (grupo de aquisição). Cada secção contém um poço central, destinado à calibração. A calibração foi realizada, adicionando-se uma colônia de cultura de *E. coli* ATCC 8739, cultivada por 24h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A cada poço de amostra foi adicionada uma colônia suspeita de *N. gonorrhoeae* cultivada em ágar-chocolate (Laborclin, Brasil) a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em 5% de CO_2 juntamente com 1,0 μL de matriz. A identificação de cada grupo de aquisição só foi realizada quando a calibração foi adequada. O número mínimo de perfis adquiridos foi 30 e o máximo 100. Após a aquisição, os dados foram enviados ao banco de dados Myla para comparação e identificação. Foram aceitos resultados de identificação com similaridade igual ou superior a 99%.

5.7 TESTE DA β -LACTAMASE

A pesquisa de β -lactamase foi realizada pelo teste de Nitrocefina, que consiste em um procedimento qualitativo com uma cefalosporina cromogênica para detecção da produção da enzima β -lactamase por bactérias (O'Callaghan, 1972). Esta enzima é produzida por vários isolados de *N. gonorrhoeae*, sendo um mecanismo de resistência às penicilinas e cefalosporinas. A reação é baseada na produção de um composto colorido quando o substrato, nitrocefina, é exposto a uma cultura produtora de β -lactamase. Se a β -lactamase for produzida, hidrolisará o anel β -lactâmico da nitrocefina (cor amarelo-claro), produzindo ácido cefalosporânico (cor de rosa) (Montgomery et al., 1979). O teste foi realizado com disco comercial (Becton Dickinson, USA) de acordo com instruções do fabricante. Esse método é de fácil execução, apresenta boa sensibilidade e é amplamente utilizado para detecção de β -lactamase em gonococos. Um teste positivo para β -lactamase prediz resistência plasmidial às penicilinas (UNEMO M et al., 2013).

5.8 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Ágar diluição é o método de referência para determinação da sensibilidade antimicrobiana em isolados de *N. gonorrhoeae*. Este método mensura a habilidade de crescimento dos isolados em ágar suplementado com agentes antimicrobianos. Os isolados de *N. gonorrhoeae* são organismos fastidiosos e sensíveis a componentes tóxicos do ágar, por isso o teste de sensibilidade antimicrobiana foi realizado em meio base GC (Difco, USA) (Difco, USA), suplementado

com 1% de Vitox (Oxido, Inglaterra) e inoculado com 10^4 unidades formadoras de colônia (UFC). A sensibilidade foi definida pela concentração inibitória mínima (MIC). A MIC é definida como a menor concentração de antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$) capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano visível. Foram determinadas as MICs para os antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino e azitromicina.

5.8.1 Solução estoque dos antimicrobianos

As soluções estoques dos antimicrobianos foram preparadas em concentração final de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ para penicilina (Sigma-Aldrich, Israel) e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ para tetraciclina (Sigma-Aldrich, China), cefixima (Sigma-Aldrich, Israel), ceftriaxona (Sigma-Aldrich, Israel), ciprofloxacino (Sigma-Aldrich, USA) e azitromicina (Sigma-Aldrich, Israel). A água destilada foi utilizada como solvente para a preparação de penicilina, tetraciclina, ceftriaxona e ciprofloxacino, enquanto que etanol 100% grau de biologia molecular (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado para azitromicina e tampão fosfato pH 7,0 para cefixima. Uma vez, que nem todos os antimicrobianos são 100% puros, a atividade ou potência do antimicrobiano, tal como especificado pelo fabricante, foi considerada. Para o cálculo da concentração da solução estoque foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Volume (mL)} = \text{Peso (mg)} \times \frac{\text{Potência} (\mu\text{g/mL})}{\text{Concentração} (\mu\text{g/mL})}$$

Foram realizadas alíquotas das soluções estoques dos antimicrobianos e conservadas em freezer -80°C por até quatro meses, exceto para penicilina que a solução estoque foi preparada na hora do uso.

5.8.2 Diluição dos antimicrobianos

Foram preparadas diluições em série das soluções estoques de antimicrobianos a uma concentração dez vezes maior que a concentração final mais alta requerida, ou seja, para uma concentração final de $32\mu\text{g/mL}$, foi preparada uma solução de concentração de $320\mu\text{g/mL}$. A concentração final na placa, foi realizada por diluição da solução estoque no próprio ágar a 1:10 da concentração dez vezes maior

(320µg/mL) em ágar base GC (Difco, USA) (1 parte de antimicrobiano + 9 partes de ágar). Os intervalos de concentração dos antimicrobianos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Intervalo de concentração dos antimicrobianos para os testes de sensibilidade em isolados de *N. gonorrhoeae*.

Antimicrobiano	Intervalo de Concentração
Penicilina	0,016-128,0 µg/mL
Tetraciclina	0,06-32,0 µg/mL
Cefixima	0,0005- 1,0 µg/mL
Ceftriaxona	0,0005- 1,0 µg/mL
Ciprofloxacina	0,001-32,0 µg/mL
Azitromicina	0,03- 4,0 µg/mL

Fonte:(CLSI, 2015).

Para a diluição dos antibióticos tubos estéreis foram identificados com a concentração requerida (10 vezes maior) para cada um dos antimicrobianos e adicionado água destilada estéril segundo descrito no **Apêndice 1**. O tubo de diluição inicial para cada antimicrobiano bem como as quantidades indicadas para cada tubo, desde a primeira diluição até a última, estão descritos no **Apêndice 1**.

5.8.3 Preparo do meio com antimicrobiano

Para o preparo do meio com antimicrobiano, foram utilizadas as relações de 3,6g de meio base GC (Difco, USA) para cada 100 ml de água destilada. O meio base GC (Difco, USA) foi esterilizado por autoclave, 15 minutos a 121°C, posteriormente resfriado a 50°C em banho maria para a adição do suplemento Vitox (Oxide, Inglaterra) a uma concentração final de 1%. Para o preparo de cada um dos meios com as diluições específicas dos antibióticos foi adicionado assepticamente 2,5ml de cada diluição de antimicrobiano do item 5.8.2 a frascos estéreis. Em seguida, adicionou-se, ao frasco, 22,5 ml de meio base GC (Difco, USA) suplementado, agitou-se suavemente e verteu-se o conteúdo para uma placa de Petri com diâmetro de 100mm (**Apêndice 2**). As placas foram conservadas a 4°C por até sete dias. Também foram preparadas placas controles, que continham 25 ml de meio base GC

(Difco, USA) (Difco, USA) suplementado com 1% de Vitox (Oxido, Inglaterra).

5.8.4 Preparo do inóculo

Foi realizada uma suspensão bacteriana de cada isolado clínico de *N. gonorrhoeae* na escala 0,5 MacFarland em caldo Mueller Hinton (Difco, USA) a partir de um cultivo de 18 à 24h em ágar chocolate. Em seguida, foram transferidos 500µL do inóculo a um segundo tubo contendo 4,5 ml de caldo Mueller Hinton (diluição 1:10) e adicionou-se 250 ml do inóculo diluído a um poço da policubeta do Replicador do tipo Steers (**Apêndice 3**).

O tempo entre o preparo da suspensão bacteriana até a completa inoculação nos seis antibióticos foi de até uma hora. Os isolados foram incubados a uma atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido, a uma temperatura 35 ± 1°C por 22-24h. A cada rodada, foram adicionados controles inicial e final para cada antimicrobiano, bem como dois controles, um de esterilidade dos pinos (inoculação sem suspensão bacteriana) e outro controle de crescimento negativo (inoculação da suspensão bacteriana e incubação em estufa a 35°C sem atmosfera de CO₂). Desta forma, a cada rodada, foram realizadas catorze placas controles.

5.8.5 Controle de qualidade da MIC

Para verificar a eficiência do teste foram incluídas em cada determinação de MIC três cepas controles de *N. gonorrhoeae* denominadas de “Cepas WHO (*World Health Organization*)” (WHO F, G, K, L, M, N, O e P) (UNEMO et al., 2009) e a cepa de referência ATCC 49226 (única com dados disponíveis pelo CLSI). O intervalo de concentração das cepas WHO e da cepa ATCC 49226 estão descritos na (**Apêndice 4**).

5.8.6 Critérios de interpretação dos resultados

A interpretação da sensibilidade aos antimicrobianos baseada nos valores da MIC seguiu os critérios estabelecidos pelo CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2018) e EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Tabela 2) (EUCAST, 2018).

Tabela 2 - Critérios de interpretação da MIC aos antimicrobianos em isolados de *N. gonorrhoeae*.

Antimicrobiano	Padrões de interpretação de MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	CLSI			EUCAST		
	S	I	R	S	I	R
Penicilina	$\leq 0,06$	0,125-1,0	$\geq 2,0$	$\leq 0,06$	0,125-1,0	$> 1,0$
Tetraciclina	$\leq 0,25$	0,5-1,0	$\geq 2,0$	$\leq 0,5$	1,0	$> 1,0$
Ciprofloxacino	$\leq 0,06$	0,125-0,5	$\geq 1,0$	$\leq 0,03$	0,06	$> 0,06$
Ceftriaxona	$\leq 0,25$	NS ^a	NS ^a	$\leq 0,125$	-	$> 0,125$
Cefixima	$\leq 0,25$	NS ^a	NS ^a	$\leq 0,125$	-	$> 0,125$
Azitromicina	ND	ND	ND	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1,0$

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*; EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; MIC: Concentração inibitória mínima, S: Sensível, I: Intermediário; R: Resistente; -: valores de MIC não definidos para sensibilidade intermediária. ^a Sensibilidade intermediária e resistência à cefixima e ceftriaxona não definidos. Para esses casos, o CLSI recomenda classificar o isolado que possui $\text{MIC} > 0,25$ como “Não suscetível” (NS). ND: valores de MIC não determinados. Nesse caso, o CLSI recomenda o uso do *Epidemiological cutoff value* (ECV), ou seja, a MIC classifica as populações microbianas em populações com e sem resistência fenotipicamente detectável (*non-wild-type* [NWT] ou *wild-type* [WT]). O ECV define o valor mais alto da MIC para isolados classificados como WT. No caso da azitromicina, são classificados como WT gonococos com $\text{MIC} \leq 1,0\mu\text{g/mL}$ e NWT gonococos com $\text{MIC} \geq 2,0\mu\text{g/mL}$. Fonte: (CLSI, 2018; EUCAST, 2018).

5.8.7 Critérios de interpretação dos fenótipos de resistência plasmidial à penicilina e a tetraciclina

Os fenótipos de resistência plasmidial à penicilina e à tetraciclina foram determinados de acordo com *Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world* da OMS (WHO; CDC, 2003).

Tabela 3 - Fenótipos de resistência plasmidial à penicilina e à tetraciclina.

Fenótipo	CrITÉRIOS
PPNG ^a : <i>N. gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase	β -lactamase ^b (+)
CMPR: <i>N. gonorrhoeae</i> com resistência cromossômica à penicilina	β -lactamase (-) TET MIC < 2.0 μ g/mL PEN MIC \geq 2.0 μ g/mL
TRNG ^b : <i>N. gonorrhoeae</i> com resistência plasmidial à tetraciclina	β -lactamase (-) MIC tetraciclina \geq 16.0 μ g/mL
CMTR: <i>N. gonorrhoeae</i> com resistência cromossômica à tetraciclina	β -lactamase (-) PEN MIC < 2.0 μ g/mL TET MIC 2.0–8.0 μ g/mL
PPTRNG: <i>N. gonorrhoeae</i> com resistência plasmidial à penicilina e à tetraciclina	β -lactamase (+) MIC da tetraciclina \geq 16.0 μ g/mL
CMRNG: <i>N. gonorrhoeae</i> com resistência cromossômica à penicilina e à tetraciclina	β -lactamase (-), não-TRNG PEN MIC \geq 2.0 μ g/mL TET MIC 2.0–8.0 μ g/mL

^aPPNG é definida somente como produtora de β -lactamase independente do valor da MIC. Alguns isolados PPNG apresentam MICs reduzidos (0.25 μ g/mL) para penicilina e são β -lactamase positivos. ^b A identificação presuntiva do fenótipo é baseada nos valores da MIC para tetraciclina. A confirmação do fenótipo TRNG deve ser feita por PCR (TetM). Fonte: (WHO; CDC, 2003). ^bResultado positivo de β -lactamase no teste do disco de nitrocefina.

5.9 TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Todos os 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* foram submetidos ao método de tipificação molecular por NG-MAST. Sequências internas dos genes *porB* e *tbpB* foram amplificadas, sequenciadas e posteriormente reduzidas a um tamanho específico (490pb para *porB* e 390pb para *tbpB*). Desta forma, as sequências foram comparadas a todos os alelos de *porB* e *tbpB* depositados no banco de dados do NG-MAST (<http://www.ng-mast.net/>). Um *Sequence type* (ST) foi atribuído a cada isolado clínico a partir da combinação dos alelos *porB* e *tbpB* obtidos.

5.9.1 Extração do DNA

Foi realizada uma suspensão bacteriana de cada isolado clínico de *N. gonorrhoeae* na escala 2,0 MacFarland em tampão fosfato salino (PBS) - pH 7,3 (Laborclin, Pinhais, Brasil) a partir de um cultivo de 18 à 24h em ágar chocolate e incubação a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ com 5% de CO_2 . A suspensão foi centrifugada a 2000g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se 1,0 ml de PBS ao *pellet* celular e homogeneizou-se em agitador do tipo vórtex. A suspensão foi incubada a 100°C por 10 min. para promover a lise celular. O lisado bacteriano foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 1 min e 200 μl do sobrenadante que continha o DNA foram armazenados a -20°C (MARTIN et al., 2004).

5.9.2 Amplificação dos genes *porB* e *tbpB*

A amplificação dos genes *porB* e *tbpB* foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Martin et al. (2004). Para a amplificação do gene *porB* foi utilizado o conjunto de iniciadores POR Sense (5'- CAA GAA GAC CTC GGC AA - 3') e anti-sense (5'- CCG ACA ACC ACT TGG T- 3') que amplificam um segmento de 737 pb entre a região pre-loop 2 e pre-loop 8. Para a reação de amplificação do gene *tbpB* foi utilizado o conjunto de iniciadores *tbpB* Sense (5'- CAA GAA GAC CTC GGC AA - 3') *tbpB* anti-sense (5'- CCG ACA ACC ACT TGG T- 3') que amplificam um segmento de 589 pb.

A reação foi realizada em um volume final de 50 μL contendo 2,0mM MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen Life Technologies), 1,0 μM de cada iniciador; tampão GoTaq[®] Hot Start 1X, 2,5U da GoTaq[®] Hot Start Polymerase (Promega, USA) e 100ng do DNA molde. A reação foi realizada em termociclador Applied 5130 sob as seguintes condições: $95^\circ\text{C}/4\text{min}$ (desnaturação inicial), $95^\circ\text{C}/30\text{s}$ (desnaturação), $58^\circ\text{C}/30\text{s}$ para *porB* e $69^\circ\text{C}/30\text{s}$ para *tbpB* (pareamento dos iniciadores), $72^\circ\text{C}/1\text{min}$ (extensão) em 25 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 10min. Os *amplicons* foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (200V/10 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Ludwig). Em todas das reações de PCR foi utilizado como controle positivo uma das cepas de referência da OMS ou a cepa ATCC 49226.

5.9.2.1 Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR *porB* e *thpB*

A purificação dos produtos de PCR *porB* e *thpB* foi realizada com o PureLink[®] PCR *Purification Kit* (Invitrogen, USA) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram submetidos ao sequenciamento de Sanger no equipamento AB3500 Genetic Analyzer na empresa ACTGene Ludwig.

5.9.2.2 Determinação e análise do NG-MAST de *N. gonorrhoeae*

Phred quality score foi utilizada para a avaliação da qualidade do sequenciamento dos nucleotídeos no programa *FastQC High Throughput Sequence Quality Control Report* versão 0.11.5. Foram aceitas leituras com qualidade igual ou superior ao *score* 30. Os produtos de PCR foram reduzidos a 490 pb para *porB* a partir de uma região conservada TTGAA e 390 pb para *thpB* a partir de uma região conservada CGTCTGAA, podendo ser comparados a todos os alelos disponíveis na base de dados do NG-MAST (<http://www.ng-mast.net>). Um *Sequence Type* (ST) foi atribuído para cada um dos isolados de *N. gonorrhoeae* baseado nas sequências dos dois *loci*.

Em todas as reações de sequenciamento e PCR foram utilizadas uma das cepas de referência da WHO (UNEMO et al., 2009) ou a cepa ATCC 49226 que já possuem os alelos e ST caracterizados para garantir a confiabilidade dos resultados.

Os alelos que definiram os STs mais frequentes foram comparados com todos os alelos da base de dados para determinar se os STs predominantes faziam parte de um grupo intimamente relacionado (genogrupo). A similaridade dos alelos foi avaliada no programa BioEdit versão 7.2 por meio do alinhamento das sequências pelo método *ClustalW Multiple alignment* com o alelo mais frequente para determinar o número de pb diferentes. Por exemplo, para o ST2992 (*porB* 1808, *thpB* 29), os alelos *porB* de todos os isolados com alelo *thpB* 29 foram comparados por similaridade ao alelo *porB* 1808, e todos os alelos de *thpB* de isolados contendo o alelo *porB* 1808 foram comparados por similaridade ao alelo *thpB* 29. Diferentes STs foram classificados em um genogrupo, se um alelo idêntico foi compartilhado e o outro alelo apresentou similaridade $\geq 99\%$ (≤ 5 pb de diferença para *porB* e ≤ 4 pb para *thpB*). Os genogrupos foram nomeados usando a letra G seguida pelo número do ST predominante dentro de cada grupo. Por exemplo, G2992 é o genogrupo em que ST2992 é o ST predominante.

Para a construção da filogenia foi criado um arquivo fasta de *porB* e *thpB* concatenado para cada isolado clínico de *N. gonorrhoeae*. A partir desse arquivo fasta, foi criado um arquivo multi-fasta com todas as amostras. Foi realizado um alinhamento no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7* (MEGA7) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) pelo método *ClustalW*, utilizando os seguintes parâmetros-padrão: alinhamento par a par (do inglês *pairwise alignment*) e múltiplo alinhamento (do inglês *multiple alignment*) com os critérios de penalidade para lacunas (do inglês *gap opening penalty*): 15 e penalidades para lacunas de comprimento (do inglês *gap extension penalty*): 6,66, DNA Weight Matrix (do inglês DNA Weight Matrix): IUB, Transition weigh matrix¹¹: 0,5 e *delay divergente cutoff*: 30. Após o alinhamento, a filogenia foi realizada pelo método de aproximação dos vizinhos (do inglês, *Neighbor Joining*) e *Bootstrap* com 1000 replicatas.

A árvore filogenética foi editada no programa *Figtree Verison 1.4.3* (RAMBAUT, 2007).

5.10 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

5.10.1 Caracterização do gene *bla*_{TEM} em isolados PPNG

Isolados PPNG, teste de β -lactamase positivo, foram submetidos às reações de PCR para caracterização do gene *bla*_{TEM}. A reação foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Nakayama et al. (2012) para os alelos *bla*_{TEM-135} e *bla*_{TEM-1} e de acordo com Gianecini et al. (2015) para o alelo *bla*_{TEM-220}.

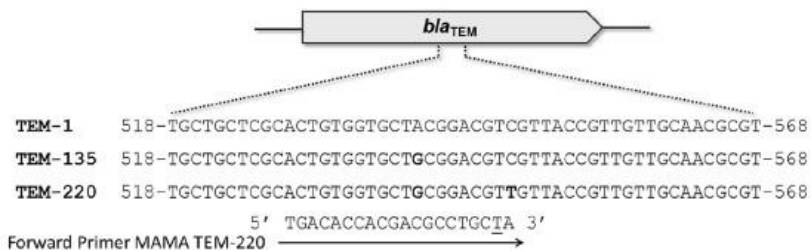
Foi realizada a *Mismatch Amplification Mutation Assay* (MAMA) PCR (detecta somente o *bla*_{TEM-135}) juntamente com a PCR-TEM que detecta ambos (*bla*_{TEM-135} e *bla*_{TEM-1}) para diferenciação entre os alelos *bla*_{TEM-135} e *bla*_{TEM-1} de isolados PPNG (β -lactamase positiva). O alelo *bla*_{TEM-135} difere do *bla*_{TEM-1} pela presença de um SNP na posição 539 (Figura 4). O conjunto de iniciadores MAMA-F (5'-GCATCTTACGGATGGCATGAC-3') e MAMA-R (5'-TGTTGCCATTGCTGCAGGGG-3') foi utilizado para a detecção do alelo *bla*_{TEM-135}. A PCR-TEM foi realizada com o conjunto de iniciadores sense TEM-F (5'-GTCGCCCTTATTCCTTTTTT-3') e anti-sense TEM-R (5'-TAGTGTATGCGGCGACCGAG-3') que

¹¹ Muitas expressões utilizadas em análise de sequências ainda não têm consenso em português e serão apresentadas em inglês.

agarose 1,0% (200V/10 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Ludwig).

A MAMA-PCR TEM-220 foi realizada para a detecção do alelo *bla*_{TEM-220} que difere do alelo *bla*_{TEM-135} por um único SNP na posição 547. O conjunto de iniciadores sense T220-F (5'-TGACACCACGACGCCTGCTA-3'), que hibridiza ao alelo específico *bla*_{TEM-220} e o anti-sense T220-R (5'-ATGATACCGCGAGACCCACG-3') foram utilizados (Figura 5). A reação foi realizada em um volume final de 25µL contendo 1,0mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP,dTTP, (Invitrogen Life Technologies), 0,5 µM de cada iniciador; tampão GoTaq[®] Hot Start 1X, 0,75U da GoTaq[®] Hot Start Polymerase (Promega, USA) e 100ng do DNA molde. A reação ocorreu no termociclador Applied 5130 sob as seguintes condições: 96°C/2min (desnaturação inicial), 96°C/10s (desnaturação), 62°C/10s (pareamento dos iniciadores), 72°C/30s (extensão) em 25 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 2min. Os amplicons foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (200V/10 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Ludwig).

Figura 5 - Sequências para identificação dos alelos *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-135} e *bla*_{TEM-220}, com destaque para o iniciador da PCR que detecta o alelo *bla*_{TEM-220}.



Alinhamento com a diferença da sequência de DNA entre os alelos *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-135} e *bla*_{TEM-220}. A substituição de nucleotídeo encontrada nos diferentes alelos está destacada em negrito. A letra sublinhada no iniciador MAMA TEM-220 indica a alteração de nucleotídeo próximo à extremidade 3' para aumentar o efeito *mismatch*. Fonte: (GIANECINI et al., 2015a).

Como controles positivos das reações foram utilizados as cepas WHO M, N ou O para a TEM-PCR, cepa PCNR 4524 para MAMA-PCR TEM-135 e cepa PCNR 4520 para MAMA PCR TEM-220. Os DNAs das cepas PCNR foram gentilmente doados pelo *Programa Latino Americano de Control de Calidad em Identificación y Sensibilidad Antimicrobiana para Neisseria gonorrhoeae*.

5.10.2 Pesquisa do tipo de plasmídeo carreador do gene *bla*_{TEM} em isolados PPNG

Foi realizada também por PCR multiplex a pesquisa dos tipos de plasmídeos carreadores do gene *bla*_{TEM} de acordo com o protocolo descrito por Palmer, Leeming e Turner (2000) em isolados PPNG.

O conjunto de iniciadores senso: BL1 (5'-TACTCAATCGGTAATTGGCT-3') e BL2 (5'-CACCTATAAATCTCGCAAGC -3') e anti-senso: BL3 (5'-CCATAGTGTTGAGTATTGCGAA- 3') e BL4 (5'-TCATTCGTGCGTTCTAGGA- 3') foram utilizados na reação (Tabela 4). Os fragmentos com 1191 pb correspondem ao plasmídeo Africano, os com 958 pb correspondem ao plasmídeo Asiático e os fragmentos com 650 pb ao plasmídeo Toronto/Rio (PALMER; LEEMING; TURNER, 2000).

A reação foi realizada em um volume final de 50µL contendo 1,5mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen Life Technologies), 0,5 µM de cada iniciador; tampão GoTaq[®] Hot Start 1X, 1,25U da GoTaq[®] Hot Start Polymerase (Promega, USA) e 100ng do DNA molde. A reação ocorreu no termociclador Applied 5130 sob as seguintes condições: 94°C/3min (desnaturação inicial), 94°C/15s (desnaturação), 64°C/15s (pareamento dos iniciadores), 72°C/1min (extensão) em 35 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 10min. Os *amplicons* foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (200V/10 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA *ladder* 100pb Ludwig). Como controle positivo das reações foram utilizadas as cepas WHO M ou O que possuem o plasmídeo Africano, cepa WHO N que possui o plasmídeo Asiático e um dos isolados clínicos que possui o plasmídeo Toronto/Rio, confirmado por sequenciamento.

Tabela 4 - Relação dos iniciadores utilizados da PCR multiplex e o tipo de plasmídeo gerado.

Tipo de plasmídeo	Iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
Africano	BL1 + BL3	1191
Toronto/Rio	BL2 + BL4	650
Asiático	BL2 + BL3	958

Fonte: (PALMER; LEEMING; TURNER, 2000).

5.10.3 Investigação molecular do gene *tetM* em isolados TRNG

Isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* com o fenótipo de resistência TRNG (β -lactamase (-), MIC tetraciclina $\geq 16.0 \mu\text{g/mL}$) foram submetidos à investigação molecular das variantes do gene *tetM*.

O conjunto de iniciadores sense: UF (5'-CTCGAACAAGAGGAAAGC-3') os anti-sense: AR (5'-GCATTCCACTTCCCAAC-3') e DR (5'-TGCAGCAGAGGGAGG-3') foram utilizados na reação (Tabela 5). Os fragmentos com 778pb pares de base corresponderam a variante Americana, os com 443pb corresponderam a variante Holandesa Holandês. A PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Turner, Gough, Leeming (1999).

Tabela 5 - Relação dos iniciadores utilizados na PCR para detecção dos tipos de gene *tetM*.

Tipo de gene <i>tetM</i>	Iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
Americano	UF + AR	778
Holandês	UF + DR	443

Fonte: (TURNER; GOUGH; LEEMING, 1999).

A reação foi realizada em um volume final de 50 μL contendo 1,5mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen Life Technologies), 0,1 μM de cada iniciador; tampão GoTaq[®] Hot Start 1X, 0,5U da GoTaq[®] Hot Start Polymerase (Promega, USA) e 100ng do DNA molde. A reação ocorreu no termociclador Applied 5130 sob as seguintes condições: 94°C/3min (desnaturação inicial), 94°C/20s (desnaturação), 55°C/1min (pareamento dos iniciadores), 72°C/30s (extensão) em 30 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 10min. Os *amplicons* foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (200V/10 minutos), corados pelo brometo de etídio e

visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA *ladder* 100pb Ludwig). Como controle positivo das reações foram utilizadas as cepas WHO G ou N que possuem o tipo Holandês do gene *tetM* e um isolado clínico que possui tipo Americano do gene *tetM*, confirmado por sequenciamento.

5.10.4 Investigação molecular da resistência ao ciprofloxacino

Isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* que apresentaram resistência ao ciprofloxacino ($MIC \geq 1,0 \mu\text{g/mL}$) foram submetidos à investigação de mutações nos genes *gyrA* e *parC* segundo o protocolo descrito por Tanaka et al. (2000).

Para investigação do gene *gyrA* foi realizada reação de PCR com os iniciadores senso *gyrA_F* (5'-CGGCGCGTACTGTACGCGATGCA-3') e anti-senso *gyrA_R* (5'-AATGTCTGCCAGCATTTTCATGTGAGA - 3') que amplificam um segmento de 279 pb da subunidade A da DNA girase. A sequência foi amplificada entre os nucleotídeos 160 e 438 do gene, correspondente à sequência de aminoácidos entre 54 e 146 da proteína GyrA. Esse segmento contém a região (QRDR) que determina resistência às quinolonas (aminoácido 55 ao 110 da proteína gonocócica) (TANAKA et al., 2000).

Para investigação no gene *parC* foi realizada reação de PCR com os iniciadores senso *parC_F* e anti-senso *parC_R* que amplificam um segmento de 255pb da subunidade *parC* da DNA girase. A sequência foi amplificada entre os nucleotídeos 166 e 420 do gene, correspondente à sequência de aminoácidos entre 56 e 140 da proteína gonocócica ParC. Esse segmento contém a região (QRDR) que determina resistência às quinolonas na proteína *parC* (aminoácido 66 ao 119 da proteína gonocócica) (TANAKA et al., 2000).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 μL contendo 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen Life Technologies), 0,25 μM de cada iniciador; tampão Pfu DNA Polymerase com MgSO₄ 1X, 1,5U da Pfu DNA Polymerase (Promega, USA,) e 100ng do DNA molde. A reação foi realizada em termociclador Applied 5130 sob as seguintes condições: 94°C/3min (desnaturação inicial), 94°C/30s (desnaturação), 52°C/30s (pareamento dos iniciadores) para *gyrA* e *parC*, 72°C/1min (extensão) em 35 ciclos e um ciclo final de 72°C (extensão final) por 10min. Os amplicons foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (200V/10 minutos),

corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Ludwig).

5.10.4.1 Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR *gyrA* e *parC*

A purificação dos produtos de PCR *gyrA* e *parC* foi realizada com o PureLink[®] PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram submetidos ao sequenciamento de Sanger no equipamento AB3500 Genetic Analyzer na empresa ACTGene Ludwig.

5.10.4.2 Análise do sequenciamento

Phred quality score foi utilizada para a avaliação da qualidade do sequenciamento dos nucleotídeos no programa FastQC High Throughput Sequence Quality Control Report versão 0.11.5. Foram aceitas leituras com qualidade igual ou superior ao score 30. Um score de qualidade de Phred é uma medida da qualidade de identificação das bases geradas por sequenciamento. Um score de Phred de 30 para uma base significa que as chances dessa base ser incorreta é uma em 1000 (EWING; GREEN, 1998).

A análise e identificação das mutações nucleotídicas nos produtos de PCR dos genes *gyrA* e *parC* foi realizada no programa BioEdit versão 7.1.3.0 por meio do alinhamento das sequências dos isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes ao ciprofloxacino com as sequências selvagens dos genes *gyrA* e *parC* obtidas no banco de dados do Genbank sob nº U08817 para *gyrA* e U08907 para *parC*.

Em todas as reações de sequenciamento e PCR foram utilizadas uma das cepas de referência, WHO K ou WHO L, que possuem resistência ao ciprofloxacino e apresentam mutações nos genes *gyrA* e *parC*.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre as variáveis nominais e os dados de resistência antimicrobiana foi realizada pelo teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Foi utilizada a análise de Regressão Logística Binária para verificar a correlação entre as variáveis nominais e os dados de resistência antimicrobiana. Para avaliar possíveis alterações na sensibilidade

antimicrobiana nos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* ao longo do tempo, os dados foram agrupados e analisados em dois períodos diferentes: 2008-2012 versus 2013-2016, assim como ano a ano. Utilizou-se o programa SPSS *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS software, versão 17.0, EUA) para a realização dos testes Qui-quadrado, Exato de Fisher e Regressão Logística Binária. O programa *GraphPad Prism*, versão 6.01, EUA, foi utilizado para realização do teste Qui-quadrado tendência, realizado para determinar as tendências da resistência antimicrobiana no período estudado. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Um total de 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* foram identificados em espécie seguida da determinação da MIC. Dentre eles, um (0,7%) foi coletado em 2008, dois (1,3%) em 2009, nove (5,9%) em 2010, 16 (10,4%) em 2011, 12 (7,8%) em 2012, 39 (25,5%) em 2013, 18 (11,8%) em 2014, 36 (23,5%) em 2015 e 20 (13,1%) em 2016.

Em relação ao tipo de amostra, 37,9% (58/153) foi urina de primeiro jato, 40,5% (62/153) secreção uretral, 20,2% (31/153) conteúdo vaginal, 0,7% (1/153) secreção da conjuntiva de recém-nascido e 0,7% (1/153) secreção anorretal. Quando estratificado por gênero, 79,0% (121/153) foram homens e 29,0% (32/153) mulheres.

A sensibilidade antimicrobiana de todos os isolados ($n=153$) está resumida na Tabela 6. Utilizando os pontos de corte do CLSI, foi observada alta porcentagem de isolados resistentes e com sensibilidade intermediária à penicilina (94,1%), à tetraciclina (89,5%) e ao ciprofloxacino (53,0%). Utilizando o ponto de corte do EUCAST, a porcentagem de isolados resistentes e com sensibilidade intermediária à azitromicina foi de 14,4%. Contudo, quando aplicado o ponto de corte epidemiológico (ECV, do inglês, *Epidemiological cutoff value* (ECV) recomendado pelo CLSI) a porcentagem de isolados classificados como *non-wild-type* ($MIC \geq 2,0 \mu\text{g/mL}$) foi bem menor (2,0%), e 98,0% foram classificados como *wild-type* ($MIC < 1,0 \mu\text{g/mL}$). Todos os isolados foram sensíveis à ceftriaxona e à cefixima utilizando os pontos de corte do CLSI e do EUCAST. No entanto, 8,5% ($n=13$) apresentaram $MIC=0,125\mu\text{g/mL}$ para cefixima, um log abaixo do ponto de corte de resistência ($MIC= 0,25 \mu\text{g/mL}$) estabelecido pelo EUCAST. Os cinco primeiros isolados com redução da sensibilidade à cefixima foram observados em 2013. Além disso, 53,8% ($n=7$) desses 13 isolados apresentaram resistência concomitante à penicilina, à tetraciclina e ao

ciprofloxacino. Entre todos os isolados, 15% (23/153) foram resistentes concomitantemente à penicilina, à tetraciclina e ao ciprofloxacino e 2% (3/153) foram resistentes ao ciprofloxacino e à azitromicina. Somente cinco isolados (3,3%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos.

Utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI, não foram observadas diferenças na sensibilidade antimicrobiana entre isolados de *N. gonorrhoeae* de homens e mulheres (Tabelas 7 e 8). Altos níveis de resistência ao ciprofloxacino ($MIC \geq 16,0 \mu\text{g/mL}$) foram observados em 46,4% (71/153) dos isolados enquanto 6,5% (10/153) expressaram altos níveis de resistência à tetraciclina ($MIC = 32,0 \mu\text{g/mL}$). Produção da enzima β -lactamase (PPNG) foi detectada em 12,4% (19/153) e a maior parte deles (17/19) apresentou altos níveis de resistência à penicilina ($MIC \geq 8,0 \mu\text{g/mL}$). Resistência cromossômica à penicilina (CMPR) foi detectada em 2,0% (3/153) dos isolados (um em 2011 e outro em 2013); resistência plasmidial à tetraciclina (TRNG) em 3,9% (6/153) (um em 2013, três em 2015 e dois em 2016); resistência cromossômica à tetraciclina (CMTR) em 22,2% (34/153) e resistência cromossômica à penicilina e à tetraciclina em 10,5% (16/153) (MIC para penicilina $\geq 2,0 \mu\text{g/mL}$, MIC para tetraciclina 2,0–8,0 $\mu\text{g/mL}$). Não foram encontrados isolados PP-TRNG.

Tabela 6 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, no período de 2008-2016 (n=153).

AM	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			% de isolados (CLSI)			% de isolados (EUCAST)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Intervalo	S	I	R	S	I	R
PEN	0,5	8	0,016-32,0	5,9	68,0	26,1	5,9	68,0	26,1
TET	1,0	4	0,125-32,0	10,5	48,3	41,2	26,1	32,7	41,2
CIP	0,008	16	0,002-32,0	47,0	0,7	52,3	47,0	0,6	52,3
CRO	0,008	0,03	0,001-0,06	100,0	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0	0,0	0,0
CFX	0,008	0,06	0,0005-0,125	100,0	0,0 ^a	0,0 ^a	100,0	0,0	0,0
AZT	0,125	0,5	0,03-4,0	ND	ND	ND	85,6	9,2	5,2

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*; EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; AM: antimicrobiano; PEN: penicilina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; CRO: ceftriaxona; CFX: cefixima; AZT: azitromicina; MIC: Concentração inibitória mínima; MIC₅₀: Concentração inibitória mínima de um antibiótico capaz de inibir 50% dos isolados; MIC₉₀: Concentração inibitória mínima de um antibiótico capaz de inibir 90% dos isolados; S: Sensível, I: Intermediário, R: Resistente.^a Sensibilidade intermediária e resistência à cefixima e ceftriaxona não definidos. ND: valores de MIC não determinados. Nesse caso, foi utilizado *Epidemiological cutoff value* (ECV) para classificação dos isolados: 98,0% foram wild-type (WT) e 2,0% no-wild-type (NWT). Fonte: (CLSI, 2018; EUCAST, 2018).

6.1 Comparação do perfil de sensibilidade antimicrobiana entre os períodos de 2008-2012 versus 2013-2016

Dados da MIC e perfil de sensibilidade das duas subpopulações de isolados foram analisados anualmente e divididos em dois períodos diferentes: 2008-2012 (40 isolados) 2013-2016 (113 isolados). Aplicando os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI e EUCAST, foi observada diferença significativa entre o perfil de sensibilidade à penicilina nos dois períodos ($p=0,016$). No período que compreendeu 2013-2016 a porcentagem de isolados resistentes foi quase 2,5 vezes maior que no período de 2008-2012 (Tabela 7). Não foram observadas mudanças significativas no perfil de sensibilidade para os demais antimicrobianos avaliados (tetraciclina, ciprofloxacino e azitromicina) entre os dois períodos analisados (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Associação das variáveis estudadas com perfil de sensibilidade antimicrobiana à penicilina e à tetraciclina.

Variáveis	PEN (S/I)	PEN (R)	p*	TET (S/I)	TET (R)	p*
Período (153)	113	40		90	63	
2008-2012 (n=40)	87,5% (35)	12,5% (5)	0,016	60,0% (24)	40,0% (16)	0,507
2013-2016 (n=113)	69,0% (78)	31,0% (35)		58,4% (66)	41,6% (47)	

PEN: penicilina; TET: tetraciclina; S: sensível; I/R: intermediário ou resistente.

*Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer.

Tabela 8 - Associação das variáveis estudadas com perfil de sensibilidade antimicrobiana ao ciprofloxacino e à azitromicina.

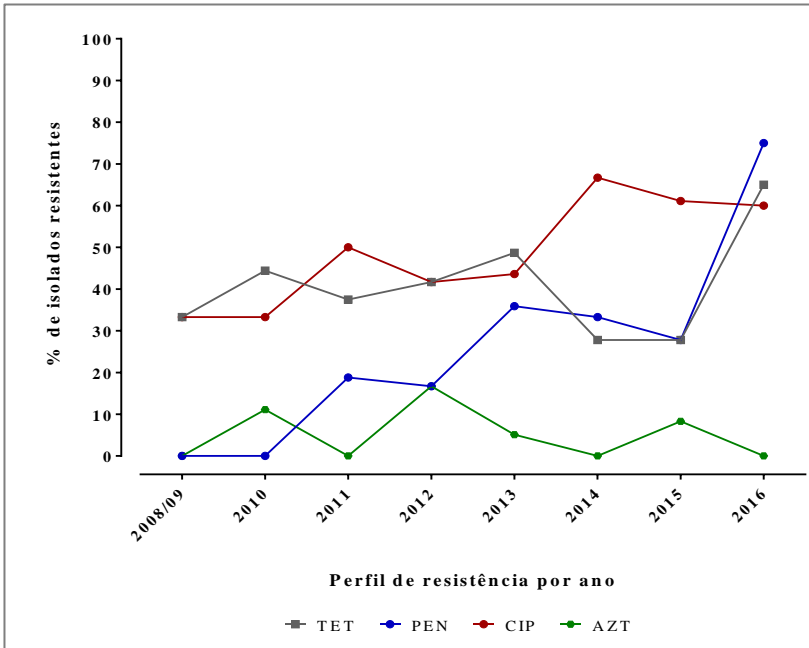
Variáveis	CIP (S/I)	CIP (R)	p*	AZT (S/I)	AZT (R)	p*
Período (153)	73	80		145	8	
2008-2012 (n=40)	57,5% (23)	42,5% (17)	0,104	92,5% (37)	7,5% (3)	0,431
2013-2016 (n=113)	44,2% (50)	55,8% (63)		95,6% (108)	4,4% (5)	

CIP: ciprofloxacino; AZT: azitromicina; S: sensível; I/R: intermediário ou resistente. *Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer.

Uma análise mais detalhada do perfil de sensibilidade antimicrobiana no decorrer dos nove anos revelou mudanças no perfil AMR dos gonococos (Figura 6). A sensibilidade à penicilina diminuiu ao longo dos anos (22,2% em 2010 para 5,0% em 2016), enquanto a resistência inicialmente detectada em 2011 aumentou de aproximadamente 18,0% em 2011-2012 para 75,0% em 2016, demonstrando um aumento significativo na resistência ao longo dos anos

($p < 0,001$). Já o perfil intermediário manteve-se acima dos 59,0% em todos os anos, exceto para 2016 que foi nulo, sinalizando um aumento gradativo nas MICs no decorrer dos anos. Isolados PPNG foram observados pela primeira vez em 2011 6,25% (1/16) e aumentaram gradativamente ao longo dos anos, 20,0% (4/20) em 2016 (Figura 7). Para a tetraciclina, a sensibilidade variou de 11,1% em 2010 a 0% em 2016, sendo que nos anos de 2008/09 e 2012 ela foi inexistente. A resistência à tetraciclina foi alta em todo o período estudado (mínimo 27,8% nos anos de 2014 e 2015 e máximo 65% em 2016) observando-se uma oscilação entre a porcentagem de isolados resistentes e intermediários ao longo dos anos ($p=0,07$). Isolados TRNG foram observados pela primeira vez em 2013 5,2% (2/39) e seguindo o mesmo perfil dos PPNG, aumentaram ao longo dos anos, 20,0% (4/20) em 2016. Ao contrário, isolados CMTR foram encontrados pela primeira vez em 2008 (1/1) e posteriormente em 2010 44,4% (4/9) e diminuíram até 2014 5,5% (1/18) e aumentaram gradativamente até 2016 40,0% (8/20) (Figura 8). A resistência ao ciprofloxacino foi elevada desde o primeiro ano do estudo (33,3%), e aumentou significativamente ao longo do período estudado ($p < 0,001$), sendo que sua maior prevalência foi no ano de 2014 (66,7%). Importante ressaltar que apenas um isolado com sensibilidade intermediária ao ciprofloxacino foi detectado durante o estudo, no ano de 2014 (Figura 9). A sensibilidade à azitromicina foi predominantemente alta ao longo do período estudado ($\geq 85\%$), as menores taxas foram observadas em 2010 e 2012 (66,7%). Os primeiros isolados resistentes foram detectados em 2010 (11,1%), sendo a maior prevalência em 2012 (16,7%). Curiosamente, não foi encontrada resistência nos anos de 2011/14 e 2016 ($p=0,372$). A sensibilidade intermediária variou entre os anos, mas sem nenhuma tendência aparente (Figura 10).

Figura 6 - Evolução da resistência antimicrobiana dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* entre 2008-2016.



TET: tetraciclina; PEN: penicilina; CIP: ciprofloxacino e AZT: azitromicina.

Figura 7 - Perfil de sensibilidade à penicilina dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* no período de 2008 a 2016.

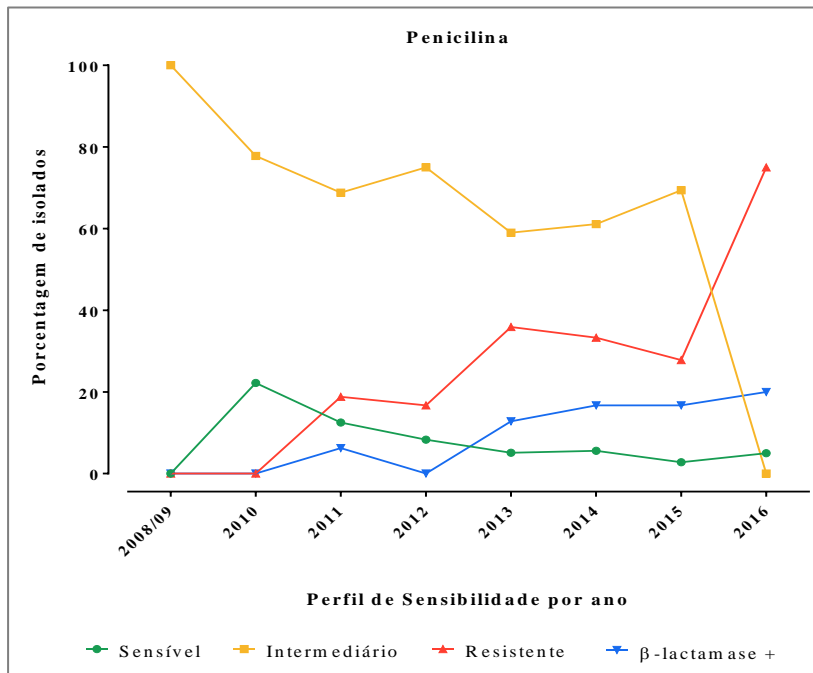
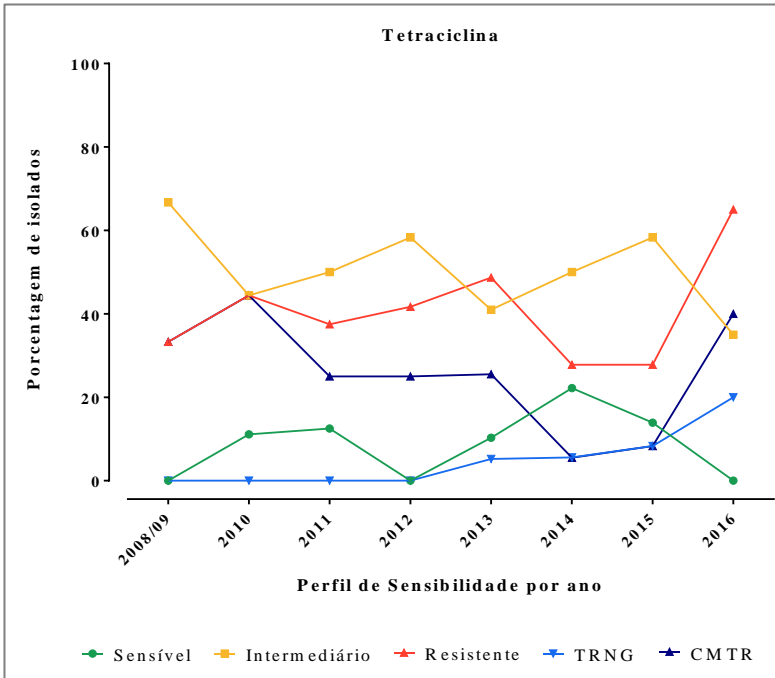


Figura 8 - Perfil de sensibilidade à tetraciclina dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* no período de 2008 a 2016.



TRNG- *N. gonorrhoeae* com resistência plasmidial à tetraciclina.

CMTR: *N. gonorrhoeae* com resistência cromossômica à tetraciclina.

Figura 9 - Perfil de sensibilidade ao ciprofloxacino dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* no período de 2008 a 2016.

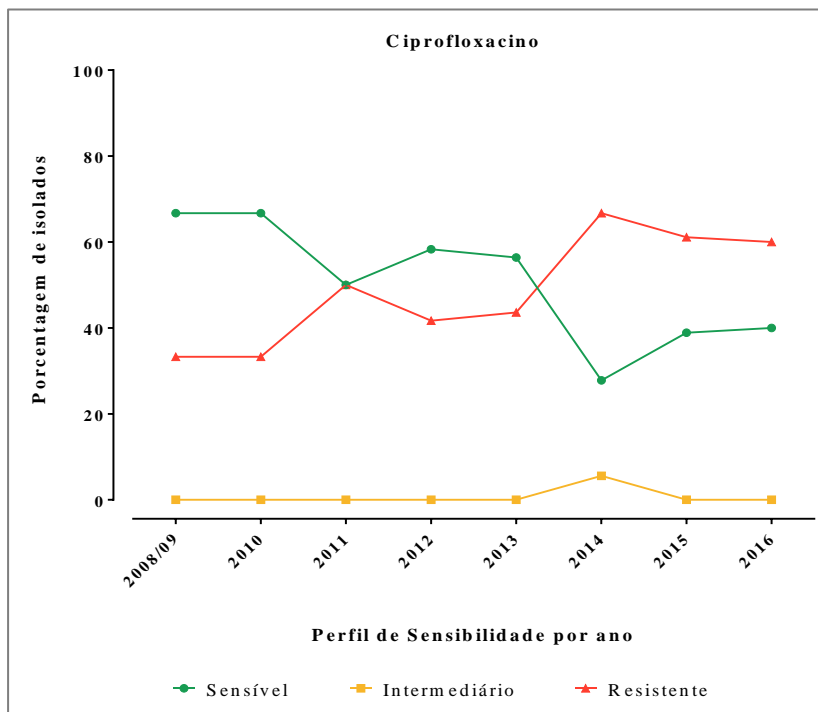
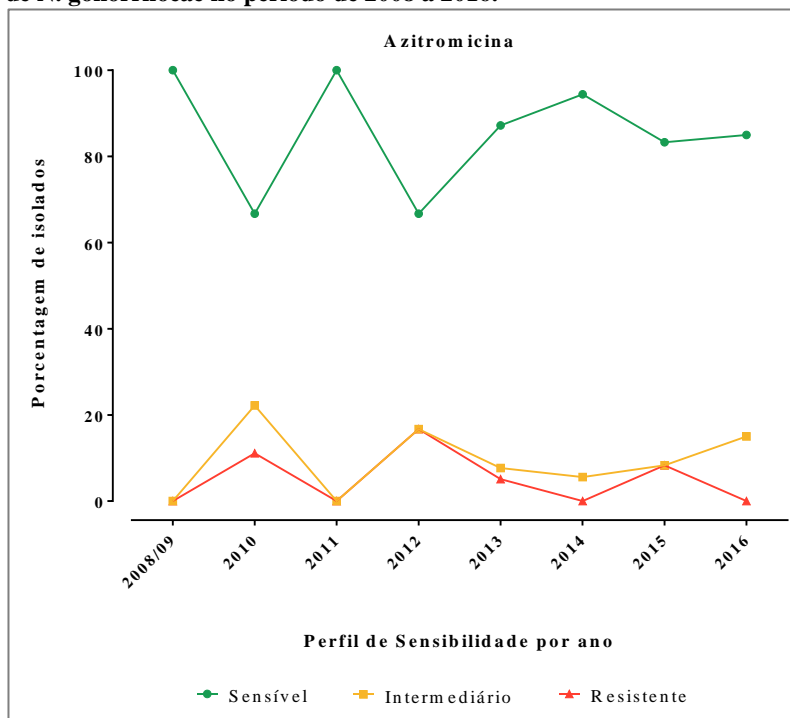


Figura 10 - Perfil de sensibilidade à azitromicina dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* no período de 2008 a 2016.



Ao avaliar a distribuição das MICs, separando os isolados em dois períodos (2008-2012 versus 2013-2016), observou-se uma maior porcentagem de isolados apresentando MIC mais elevadas para penicilina, tetraciclina, ciprofloxacino e cefixima no segundo período. Em relação à penicilina, no segundo período pode ser observado aumento na porcentagem de isolados apresentando MIC superiores a 1,0 µg/mL (resistentes). Percebe-se um deslocamento da curva de Gaus para a direita, demonstrando um aumento nas MIC no segundo período (Figura 11). A tetraciclina apresentou uma oscilação na frequência de isolados resistentes ao longo dos anos, conforme visualizado na figura 12, no entanto, isolados com MICs $\geq 4,0$ µg/mL foram observados somente no segundo período. Um padrão singular foi observado para a distribuição das MICs do ciprofloxacino, revelando dois grupos distintos, um grupo de isolados sensíveis expressando MICs $\leq 0,016$ µg/mL e outro grupo formado por isolados resistentes apresentando

MICs $\geq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$. Sensibilidade intermediária (MIC= $0,125$ $\mu\text{g/mL}$) foi observada em um único isolado (Figura 13). Para a azitromicina, a porcentagem de isolados resistentes foi baixa nos dois períodos, destacando-se o surgimento de isolados resistentes apresentando MIC= $4,0$ $\mu\text{g/mL}$ no segundo período. Não foi observada diferença entre os dois períodos no número de isolados com sensibilidade intermediária ($0,25$ - $0,5$ $\mu\text{g/mL}$) a esse antimicrobiano (Figura 14). Em relação às ESCs, uma maior porcentagem de isolados apresentando MICs entre $0,06$ e $0,125$ $\mu\text{g/mL}$ foi observado para cefixima no segundo período (Figura 15), enquanto as MICs para ceftriaxona permaneceram baixas ($\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$) durante os dois períodos (Figura 16).

Figura 11 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para a penicilina no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).

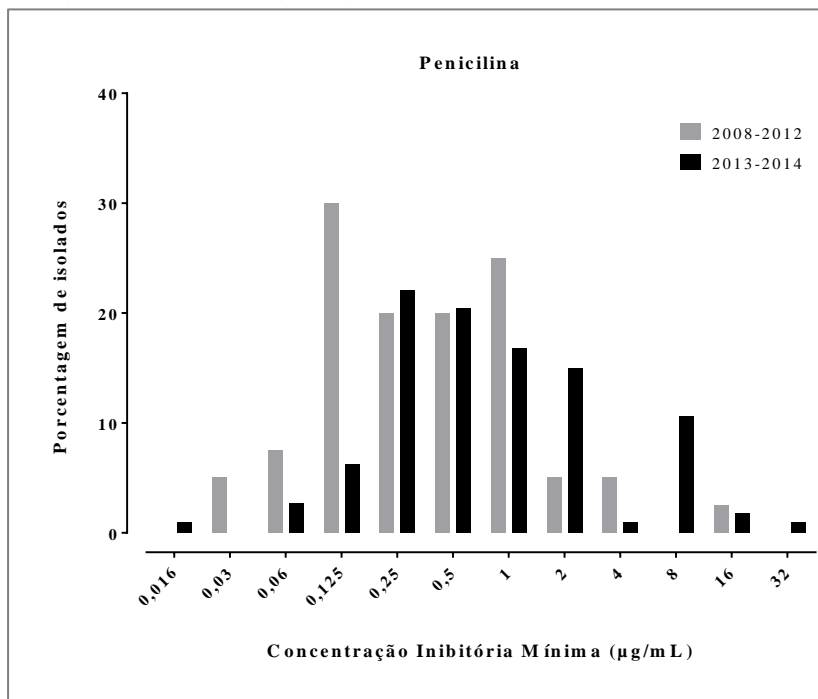


Figura 12 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para a tetraciclina no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).

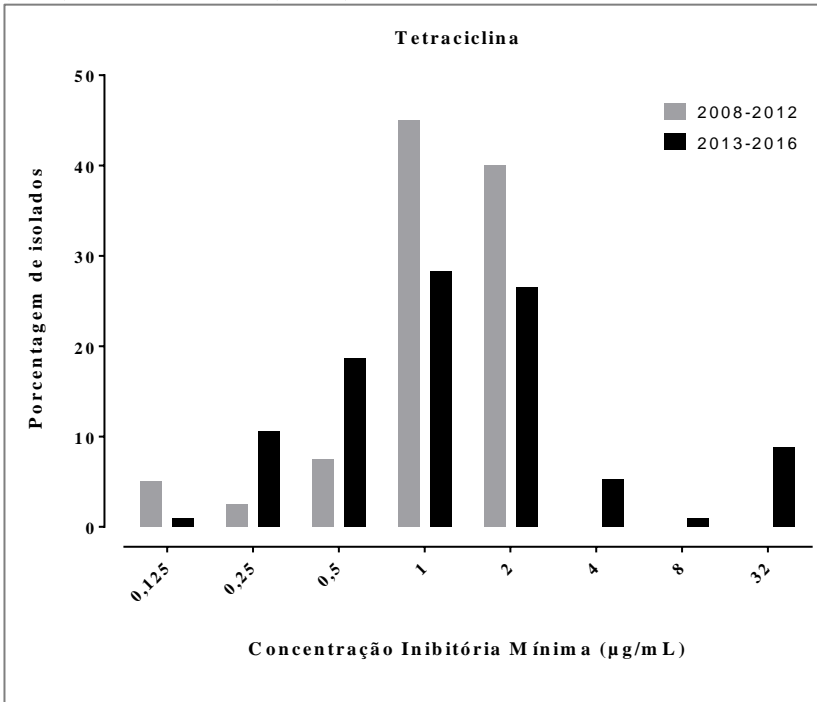


Figura 13 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para o ciprofloxacino no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).

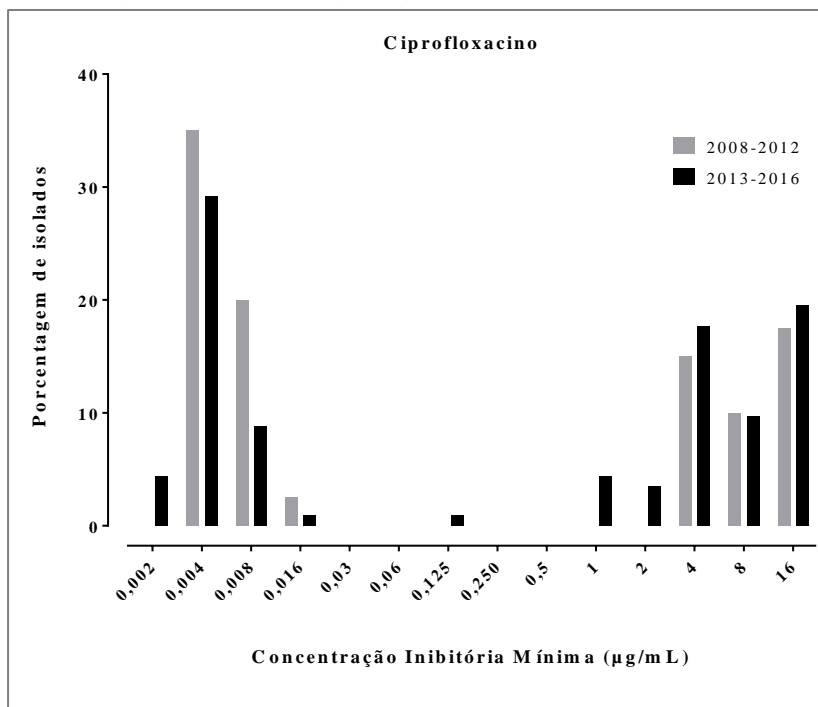


Figura 14 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para a azitromicina no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).

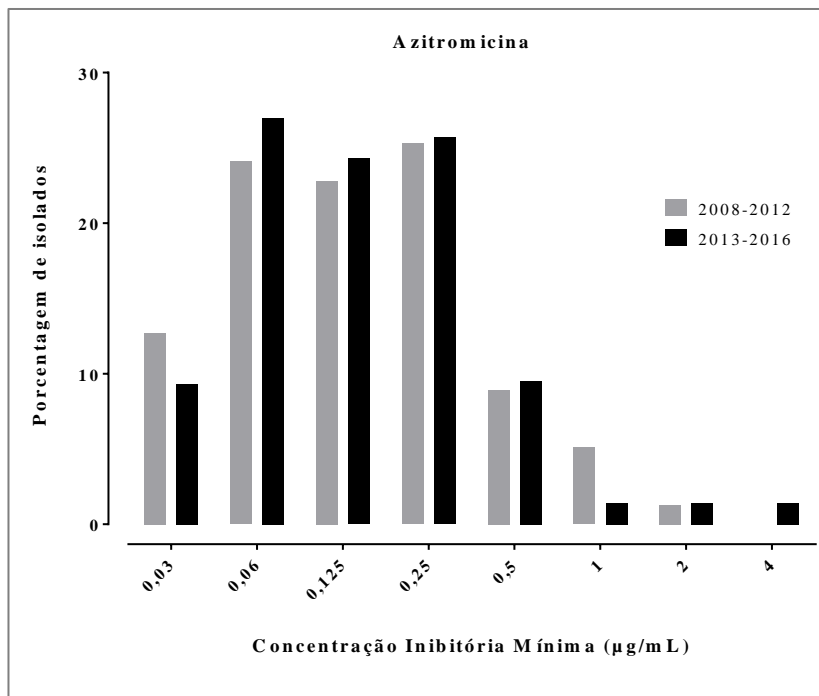


Figura 15 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para a cefixima no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).

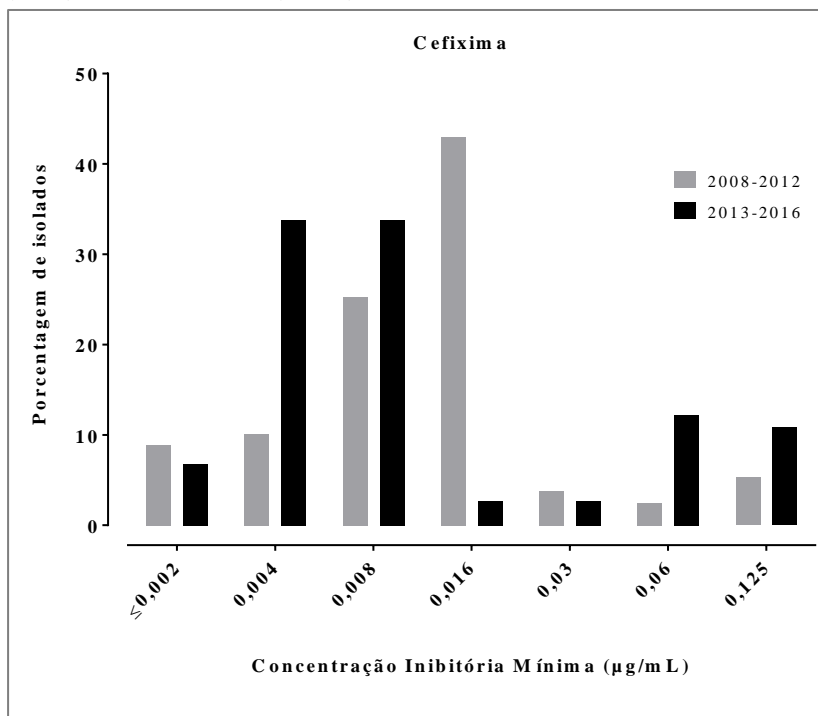
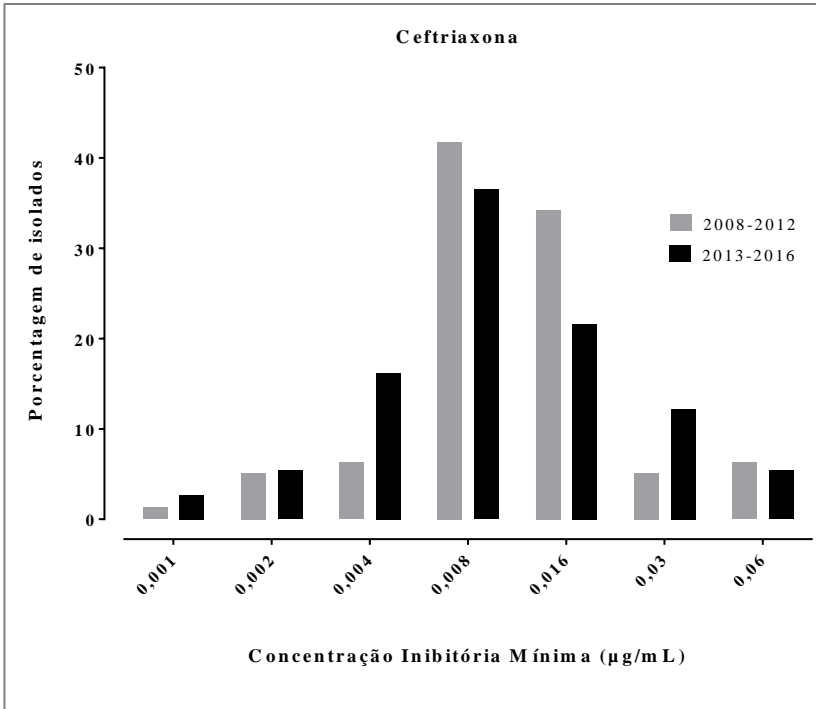


Figura 16 - Distribuição dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para à ceftriaxona no período de 2008-2012 (n=40) versus 2013-2016 (n=113).



6.2 Determinantes genéticos da resistência antimicrobiana em *N. gonorrhoeae*

Isolados PPNG foram submetidos à pesquisa da variante do gene *bla*_{TEM} e do tipo de plasmídeo que o abrigava. Dentre os 19 isolados PPNG, 18 tinham o *bla*_{TEM-1} e um tinha o *bla*_{TEM-135}. Em relação ao tipo de plasmídeo, 73,7% (n=15) abrigavam o tipo Africano, 15,8% (n=3) o Asiático, e 5,25% (n=1). A *N. gonorrhoeae* que apresentou a maior MIC para penicilina (MIC= 32µg/mL) carrega o gene *bla*_{TEM-135} no plasmídeo Toronto/Rio. O gene *bla*_{TEM-1} foi carregado pelos plasmídeos Africano e Asiático, com MICs variando de 2-16 µg/mL. Resultado semelhante foi observado para isolados TRNG, que apresentaram a maior MIC para tetraciclina (MIC= 32 µg/mL), seis deles abrigavam o gene *tetM* Americano e quatro o Holandês.

Mutações na região QRDR de *gyrA* e *parC* foram investigadas em todos os isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes ao ciprofloxacino. Foram detectadas as mutações S91F¹², D95G¹³ e D95N¹⁴ em *gyrA* e S87N¹⁵, S87R¹⁶, D86N¹⁷ e E91Q¹⁸ em *parC*. Oitenta isolados foram resistentes ao ciprofloxacino, destes 53,75% (43/80) apresentaram as mutações S91F e D95G em *gyrA* e 35,0% (28/80) as mutações S91F e D95N em *gyrA*. Nove amostras não apresentaram mutação em *gyrA*. Em relação às mutações encontradas no gene *parC*, 57,5% (46/80) tiveram a mutação S78R, 23,75% (19/80) a mutação S78N, 2,5% (2/80) as mutações S78N e E91Q. As mutações D86N, E91G¹⁹ e E91Q foram encontradas somente em um isolado. Dez isolados não possuíam mutação em *parC*.

6.3 NG-MAST e sua relação com a resistência antimicrobiana em isolados de *N. gonorrhoeae*

Entre os 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* foi possível identificar 64 STs, representados por 62 alelos de *porB* e 29 alelos de *tbpB*. Foram observados cinco *clusters* (≥ 7 isolados) e 19 novos STs foram definidos. Os tipos mais prevalentes foram: ST225 (n=11), ST2992 (n=11) ST1582 (n=10), ST338 (n=7), ST1407 (n=4), ST2202 (n=4) e ST6827 (n=4). Dentre eles, o ST1407 e ST6827 compartilham o alelo *tbpB* 110 e o ST229 e ST2202 compartilham o alelo *tbpB* 4. Trinta e três isolados tiveram STs desconhecidos. De todos os 62 alelos de *porB*, o 4 (n=11) e 1808 (n=11) foram os mais prevalentes, seguidos pelos 90 (n=8) e 9008 (n=5, enquanto que o alelo 29 (n=30) foi o mais prevalente dentre os 29 alelos de *tbpB*, seguindo pelos 4 (n=22), 110 (n=18) e 137 (n=17).

Dentre os STs mais prevalentes, o ST225 circulou entre 2010 (n=1) e 2013 (n=4) e o ST2992 entre 2010 (n=1) e 2015 (n=3). O ST 1582 foi observado pela primeira vez em 2011 (n=1) e continuou sendo detectado em 2016, apresentando o maior número de isolados em 2013 (n=5). Por outro lado, o ST338 e o ST1407, identificados pela primeira

¹² **S91F**: Troca do aminoácido Serina por uma Fenilalanina no códon 91.

¹³ **D95G**: Troca do aminoácido Ácido aspártico por uma Glicina no códon 95.

¹⁴ **D95N**: Troca do aminoácido Ácido aspártico por uma Asparagina no códon 95.

¹⁵ **S87N**: Troca do aminoácido Serina por uma Asparagina no códon 87.

¹⁶ **S87R**: Troca do aminoácido Serina por uma Arginina no códon 87.

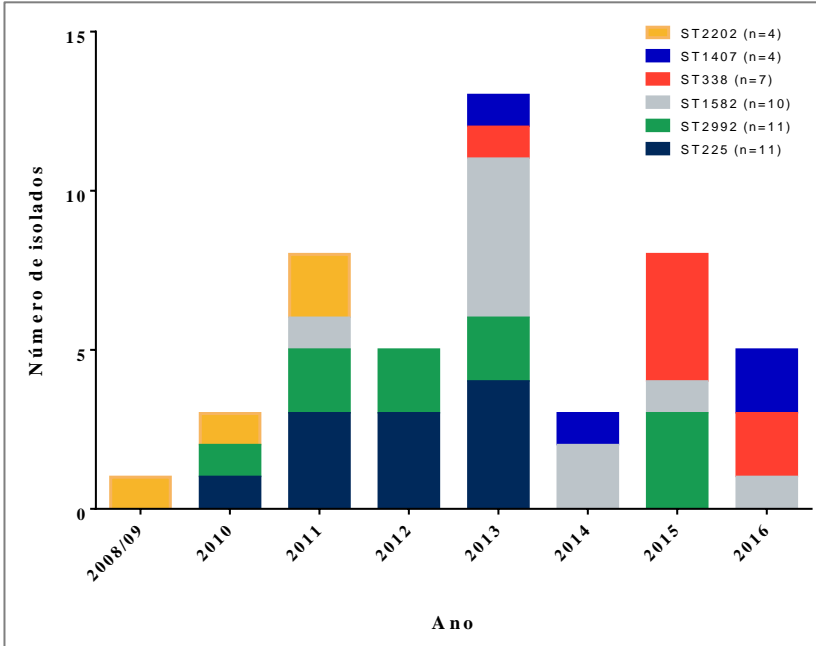
¹⁷ **D86N**: Troca do aminoácido Ácido aspártico por uma Asparagina no códon 86.

¹⁸ **E91Q**: Troca do aminoácido Ácido Glutâmico por uma Glutamina no códon 91.

¹⁹ **E91G**: Troca do aminoácido Ácido Glutâmico por uma Glicina no códon 91.

vez em 2013 (n=1 para ambos), continuaram sendo detectados em 2016 (n=2 e n=1 respectivamente), enquanto ST 6827 foi observado somente nos dois últimos anos (2015-2016) (Figura 17).

Figura 17 - Distribuição dos Sequence type (ST) por ano no período de 2008-2016.

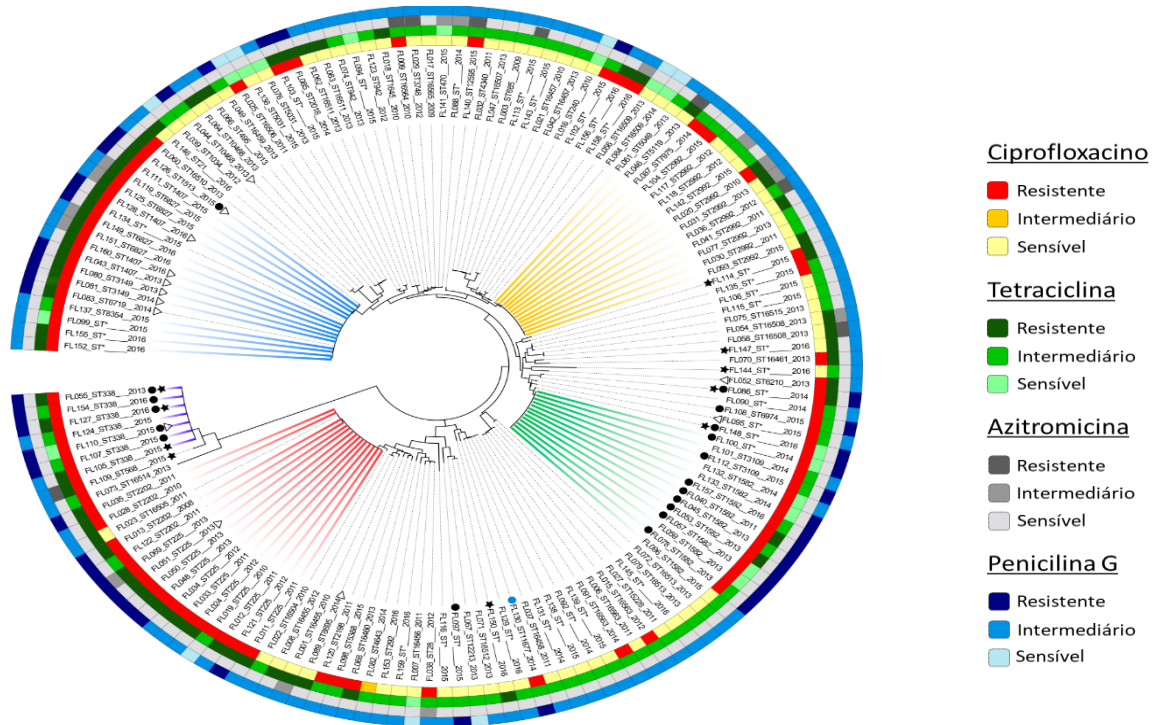


A análise adicional dos alelos *porB* e *tbpB* dos principais STs mostrou outros STs altamente relacionados dentro de um mesmo grupo, compartilhando um alelo *tbpB* idêntico e diferindo $\leq 1\%$ no alelo *porB*. Dois genótipos, G1407 e G225, foram formados. O genótipo G1407 (n=16), *tbpB* 110, incluiu oito diferentes STs: ST1407 (n=4), ST6827 (n=4), ST3149 (n=2), ST desconhecido (n=2), ST16510 (n=1), ST1513 (n=1), ST83504 (n=1) e ST8695 (n=1) e o genótipo G225 (n=15), *tbpB* 4, compreendeu dois diferentes STs: ST225 (n=11) e o ST2202 (n=4).

Uma árvore filogenética foi construída com as sequências dos alelos *porB* e *tbpB* concatenados (Figura 18). Linhas azuis representam um *cluster* de isolados (n=16) pertencentes ao genótipo G1407 (2013-2016). Todos os isolados pertencentes a esse genótipo foram

resistentes ao ciprofloxacino (MIC = 4,0- 16,0 µg/mL) apresentando as mutações S91F, D95G e D95N em *gyrA* e as mutações S78R e S78N em *parC*; 87,5% (n=14) foram resistentes à tetraciclina (MIC = 2,0 -4,0 µg/mL) e 37,5% (n=6) resistentes à penicilina (MIC = 2,0 µg/mL). Além disso, 53,8% (n=7) dos isolados que tinham MIC= 0,125 µg/mL para a cefixima, um log abaixo do ponto de corte de resistência a esse antimicrobiano determinado pelo EUCAST, pertenciam ao genogrupo G1407. Linhas roxas mostram um *cluster* de isolados compartilhando o mesmo ST338 (n=7), todos resistentes ao ciprofloxacino (MIC = 4,0 µg/mL), apresentando as mutações S91F e D95N em *gyrA* e as mutações S78R, S78N e E91Q em *parC*; além de resistência plasmidial à penicilina (*bla*_{TEM-1}, plasmídeo Africano e Asiático) e à tetraciclina (*tetM* tipo Americano) (2013-2016). Isolados pertencentes ao genogrupo G225 estão indicados em linhas vermelhas (2008-2013), 93,3% (n= 14) deles foram resistentes ao ciprofloxacino (MIC = 4,0-16,0 µg/mL), apresentando as mutações S91F, D95G em *gyrA* e as mutações S78R em *parC*; 86,7% (n=13) foram resistentes também à tetraciclina (MIC = 2,0 µg/mL) e 37,5% (n=6) resistentes à penicilina (MIC = 2,0-4,0 µg/mL). Isolados compartilhando o mesmo alelo *tbpB* 137 (n= 13) estão exibidos em linhas verdes (2011-2016). Esses isolados foram resistentes ao ciprofloxacino (MIC= 1-8 µg/mL) apresentando as mutações S91F e D95N em *gyrA* e S78N em *parC*, além de resistência plasmidial à penicilina (MIC= 2-8 µg/mL), sendo que a maior parte deles (8/13) carregava o alelo *bla*_{TEM-1} desde 2011. Linhas amarelas indicam um *cluster* de isolados que possuem o mesmo alelo *tbpB* 29, com predomínio do ST2992 (11/14). Nesse *cluster* houve predomínio de isolados com sensibilidade ao ciprofloxacino e sensibilidade intermediária à tetraciclina e à penicilina; dois isolados apresentaram resistência à azitromicina. A maioria das *N. gonorrhoeae* resistentes à azitromicina pertenciam a diferentes STs (Figura 18).

Figura 18 - Árvore filogenética realizada pelo método de aproximação dos vizinhos (do inglês, Neighbor Joining) e bootstrap (MEGA software) com alelos de *porB* e *thpB* concatenados dos 153 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, 2008- 2016.



Isolados carregando o alelo *bla*_{TEM-1} estão indicados com círculos pretos e o isolado carregando o alelo *bla*_{TEM-135}, está indicado com círculo azul. Estrelas pretas referem-se a isolados que contêm o gene *tetM* e triângulos pretos representam isolados com MIC=0,125 µg/mL para cefixima. Os genogrupos G1407 e o G225 estão indicados com linhas azuis e vermelhas, respectivamente. Isolados carregando o mesmo alelo *thpB* 137 estão indicados com linhas verdes, isolados compartilhando o mesmo ST338 estão representados com linhas roxas e isolados compartilhando o mesmo alelo *thpB* 29 estão indicados com linhas amarelas.

O genogrupo G225 foi significativamente associado à resistência ao ciprofloxacino ($p < 0,001$) (Tabela 9), RC: 20,16 (IC 95%: 2,57-158,3; $p = 0,004$); à penicilina ($p = 0,016$) (Tabela 10), RC: 4,22 (IC 95%: 1,40- 12,71 $p = 0,011$); e à tetraciclina ($p < 0,001$) (Tabela 10), RC: 15,53 (IC 95%: 3,33- 72,22; $p < 0,001$). O genogrupo G1407 foi significativamente associado com MIC= 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para cefixima ($p = 0,001$) (Tabela 9), RC: 11,60 (IC 95%: 3,15- 42,70; $p < 0,001$) e resistência ao ciprofloxacino ($p < 0,001$) (Tabela 9), penicilina ($p = 0,016$) e tetraciclina ($p < 0,001$) (Tabela 10), RC: 16,72 (IC 95%: 3,61- 77,36; $p < 0,001$). Não foi observada associação significativa entre ambos os genogrupos e a resistência à azitromicina (Tabela 11).

Tabela 9 - Associação dos genogrupos com o perfil de sensibilidade antimicrobiana ao ciprofloxacino e à MIC de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para cefixima.

Genogrupo	CIP (S/I)	CIP (R)	p*	CFX MIC < 0,125 $\mu\text{g/mL}$	CFX MIC = 0,125 $\mu\text{g/mL}$	p*
Isolados (153)	73	80		140	13	
Sem g.** (n= 122)	59,0% (72)	41,0% (50)	<0,001	95,1% (116)	4,9% (6)	0,001
G225 (n=15)	6,7% (1)	93,3% (14)		93,3% (14)	6,7% (1)	
G1407 (n=16)	0,0% (0)	100% (16)		56,3% (10)	43,7% (7)	

CIP: ciprofloxacino; CFX: cefixima; S: sensível; I/R: intermediário ou resistente.
*Valores de p para teste Qui-Quadrado. **Sem genogrupo

Tabela 10 - Associação dos genogrupos com o perfil de sensibilidade antimicrobiana à penicilina e à tetraciclina.

Genogrupo	PEN (S/I)	PEN (R)	p*	TET (S/I)	TET (R)	p*
Isolados (153)	113	40		90	63	
Sem g.** (n= 122)	78,7% (96)	21,3% (26)	0,016	70,5% (86)	29,5% (36)	<0,001
G225 (n=15)	46,7% (7)	53,3% (8)		13,3% (2)	86,7% (13)	
G1407 (n=16)	62,5% (10)	37,5% (6)		12,5% (2)	87,5% (14)	

PEN: penicilina; TET: tetraciclina; S: sensível; I/R: intermediário ou resistente.
*Valores de p para teste Qui-Quadrado. **Sem genogrupo.

Dentre os 13 isolados com MIC= 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para cefixima, sete compartilhavam o mesmo alelo *tbpB* 110 (comum ao ST 1407, ST3149 e ST1513). Dez eram resistentes ao ciprofloxacino (oito com MIC > 16,0 $\mu\text{g/mL}$) e destes, sete eram resistentes concomitantemente à penicilina (MIC=2,0 $\mu\text{g/mL}$), à tetraciclina (MIC = 2,0 – 4,0 $\mu\text{g/mL}$) e apresentavam MIC para ceftriaxona de 0,03 – 0,06 $\mu\text{g/mL}$ e MIC para azitromicina de 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Seis deles apresentaram resistência

cromossômica concomitante à penicilina e à tetraciclina (CMRNG) (Tabela 12).

Tabela 11 - Associação dos genogrupos com o perfil de sensibilidade antimicrobiana à azitromicina.

Genogrupo	AZT (S/I)	AZT (R)	p*
Isolados (153)	145	8	0,342
Sem genogrupo (n= 122)	93,4% (114)	6,6% (8)	
G225 (n=15)	100,0% (15)	0,0% (0)	
G1407 (n=16)	100,0% (16)	0,0% (0)	

AZT: azitromicina; S/I: sensível ou intermediário. R: resistente. *Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fisher.

Isolados que compartilharam o mesmo alelo *tbpB29* foram significativamente associados com resistência à azitromicina ($p=0,008$) (Tabela 13), RC: 8,0 (IC 95%: 1,78- 35,6, $p=0,006$) e resistência à penicilina ($p=0,035$) (Tabela 13), razão de chance 0,26 (IC 95%: 0,074- 0,905; $p=0,034$). O ST338 foi associado com resistência plasmidial à penicilina (gene *bla_{TEM-1}*) ($p<0,001$) (Tabela 14), razão de chance 27,9 (IC 95%: 4,9- 159,6, $p<0,000$); e à tetraciclina (*tetM*) ($p=0,006$) (Tabela 16), razão chance 14,9 (IC 95%: 2,8- 79,8, $p=0,002$). Além disso, dos cinco isolados PPNG que compuseram esse *cluster*, quatro abrigavam o plasmídeo Africano; Por outro lado, o *cluster* que compartilhava o mesmo alelo *tbpB 137*, foi associado à resistência plasmidial à penicilina (RC: 23,3; IC 95%: 6,3- 85,9, $p<0,001$), predominantemente composto por isolados com ST1582 que abrigavam o plasmídeo Africano.

Tabela 12 - Descrição dos 13 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* aparentando MIC=0,125 µg/mL e sua relação com as MICs para PEN, TET, CIP, AZT e CRO com o NG-MAST.

Isolado	B-lactamase	MIC PEN	MIC TET	MIC CIP	MIC AZT	MIC CRO	Fenótipo R	<i>porB</i>	<i>tbpB</i>	ST
FL43	(-)	2 (R)	4 (R)	16 (R)	0,25 (S)	0,06 (S)	CMRNG	908	110	1407
FL 44	(-)	2 (R)	1 (I)	0,008 (S)	0,125 (S)	0,06 (S)	CMRNG	6121	33	10468
FL 51	(-)	2 (R)	4 (R)	16 (R)	0,25 (S)	0,06 (S)	CMRNG	4	4	225
FL 52	(-)	1 (I)	4 (R)	16 (R)	0,25 (S)	0,03 (S)	CMTR	1914	1262	6210
FL 80	(-)	2 (R)	4 (R)	16 (R)	0,25 (S)	0,06 (S)	CMRNG	1903	110	3149
FL 81	(-)	2 (R)	4 (R)	16 (R)	0,25 (S)	0,06 (S)	CMRNG	1903	110	3149
FL 83	(-)	2 (R)	4 (R)	16 (R)	0,25 (S)	0,03 (S)	CMRNG	4009	110	6719
FL 89	(-)	1 (I)	2 (R)	0,004 (S)	0,125 (S)	0,03 (S)	CMTR	1388	135	8695
FL 95	(-)	1 (I)	1 (I)	0,004 (S)	0,25 (S)	0,03 (S)	Sensível	sim. 99% alelo 4025	914	Desconhecido
FL 110	(+)	8 (R)	0,25 (S)	4 (R)	0,125 (S)	0,008 (S)	PPNG	90	121	338
FL 126	(+)	2 (R)	2 (R)	16 (R)	0,25 (S)	0,03 (S)	PPNG	971	110	1513
FL 128	(-)	2 (R)	16 (R)	0,25 (S)	CMRNG	0,03 (S)	CMRNG	110	1407	1407
FL 160	(-)	2 (R)	8 (R)	0,125 (S)	CMTR	0,03 (S)	CMTR	110	1407	1407

FL: Florianópolis, PEN: penicilina, TET: tetraciclina, CIP: ciprofloxacino, AZT: azitromicina, CRO: ceftriaxona, MIC: concentração inibitória mínima, S: sensível, I: intermediário, R: resistente. CMRNG: *N. gonorrhoeae* com resistência cromossômica à penicilina e à tetraciclina, CMRNG: *N. gonorrhoeae* com resistência cromossômica à tetraciclina.

Tabela 13 - Associação entre *tbpB* 29 com o perfil de sensibilidade antimicrobiana à azitromicina e tetraciclina.

<i>tbpB</i> 29	AZT (S/I)	AZT (R)	p*	PEN (S/I)	PEN (R)	p*
Isolados (153)	145	8		113	40	
N.P** (n= 123)	97,6% (120)	2,4% (3)	0,008	69,9% (86)	30,1% (37)	0,035
Pertence (n=30)	83,3% (25)	16,7% (5)		90,0% (27)	10,0% (3)	

AZT: azitromicina; TET: tetraciclina; S: sensível; I/R: intermediário ou resistente. *Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer. **Não pertence.

Tabela 14 - Associação entre ST338 com determinantes genéticos de resistência plasmidial à penicilina e à tetraciclina.

ST338	Não PPNG	PPNG (<i>bla</i> -TEM-1)	p*	Não TRNG	TRNG (<i>tetM</i>)	p*
Isolados (153)	136	17		143	10	
N.P** (n= 146)	91,8% (134)	8,9% (13)	<0,001	95,2% (139)	4,8% (7)	0,006
Pertence (n=7)	28,6% (2)	71,4% (5)		57,1% (4)	42,9% (3)	

PPNG: *N. gonorrhoeae* produtora de penicilina; TRNG: *N. gonorrhoeae* com resistência plasmidial à tetraciclina. *Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer. **Não pertence

Tabela 15 - Associação entre *tbpB* 137 com determinantes genéticos de resistência plasmidial à penicilina.

<i>tbpB</i> 137	Não PPNG	PPNG (<i>bla</i> -TEM-1)	p*
Isolados (153)	136	17	
N.P** (n= 137)	93,6% (131)	6,4% (9)	<0,001
Pertence (n=16)	38,5% (5)	61,5% (8)	

PPNG: *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilina; *Valores de p para teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer. **Não Pertence

Na Tabela 16 está descrita a associação das MICs dos isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à penicilina e/ou à tetraciclina com os respectivos determinantes genéticos da resistência plasmidial e sua relação com o NG-MAST. A Tabela 17 mostra a correlação entre as MICs dos 80 gonococos resistentes ao ciprofloxacino, mutações nos genes *gyrA* e *parC* e sua relação com o NG-MAST.

Tabela 16 - Associação das MICs dos isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à penicilina e/ou a tetraciclina com determinantes da resistência plasmidial a esses antimicrobianos e NG-MAST.

MIC PEN (µg/mL)	Nº isolados R PEN	Nº isolados R TET	MIC TET (µg/mL)	β-lactamase	<i>bla</i> _{TEM}	Plasmídeo	<i>tetM</i>	ST
32,0	1	0	1,0	Positiva (n=1)	<i>bla</i> _{TEM-135}	Toronto/Rio	-	ST11677
16,0	3	1	2,0	Positiva (n=3)	<i>bla</i> _{TEM-1} (n=3)	Africano (n=2) Asiático (n=1)	-	ST1582 (n=1), ST desconhecido (n=1); ST6974 (n=1)
8,0	12	5	2,0 (n=1) 32,0 (n=4)	Positiva (n=12)	<i>bla</i> _{TEM-1} (n=12)	Africano (n=11) Asiático (n=1)	Americano (n=4)	ST338 (n=5), ST1582 (n=3), ST3109 (n=1), ST desconhecido (n=4); todos possuem alelo <i>ibpB137</i>
4,0	1	3	2,0 (n=3) 1,0 (n=1) 0,5 (n=1)	Positiva (n=1)	<i>bla</i> _{TEM-1} (n=1)	Africano (n=1)	-	ST1582
2,0	2	1	2,0	Positiva (n=3)	<i>bla</i> _{TEM-1} (n=2)	Africano (n=2) Asiático (n=1)	-	ST1582 (n=2), ST1582 (n=1)
2,0	17	13	2,0 (n=8,0) 4,0 (n=5,0)	Negativa (n=17)	-	-	-	ST225 (n=5), ST1407 (n=2), ST11513 (n=1), ST2018 (n=1), ST2202 (n=1), ST3149 (n=2), ST6719 (n=1), ST10468 (n=1), ST16459 (n=1), ST desconhecido (n=2)
1,0 (n=2) 0,5 (n=2) 0,25 (n=1) 0,125 (n=2)	0	6	32,0	Negativa (n=6)	-	-	Americano (n=2) Holandês (n=4)	ST338 (n=1), ST568 (n=1), ST16461 (n=1), ST desconhecido (n=4)

1,0	0	1	8,0	Negativa (n=1)	-	-	-	ST desconhecido
1,0	0	1	4,0	Negativa (n=10)	-	-	-	ST6210 (n=1)
1,0 (n=19) 0,5 (n=10) 0,25 (n=3) 0,125 (n=2)	0	32,0	2,0	Negativa (n=32)	-	-	-	ST21 (n=1), ST225 (n=4), ST495 (n=1), ST1407 (n=1), ST1645 (n=1), ST2202 (n=2), ST2992 (n=3), ST5119 (n=1), ST6827 (n=4), ST8695 (n=1), ST10468 (n=1), ST16455 (n=2), ST16460 (n=1), ST16505 (n=1), ST16508 (n=2), ST16510 (n=1), ST16511 (n=2), ST desconhecido (n=3)

Nº: número, R: Resistente; MIC: Concentração inibitória mínima, PEN: penicilina; TET, tetraciclina. -: ausência do alelo ou do plasmídeo.

Tabela 17 - Associação das MICs dos 80 isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes ao ciprofloxacino com determinantes da resistência em *gyrA*, *parC* e NG-MAST.

MIC CIP (µg/mL)	Nº de isolados R	Isolados c/ mutações	Mutações em <i>gyrA</i>	Mutações em <i>parC</i>	Sequence type (ST)
4,0- 16,0	42	42	S91F, D95G	S78R	ST28 (n= 1), ST225 (n= 10), ST1407 (n= 4), ST1513 (n= 1), ST2018 (n= 1), ST9198 (n= 1), ST2202 (n= 4), ST3149 (n= 2), ST3149 (n=2), ST6210 (n=1), ST6719 (n=1); ST6827 (n=4), ST8354 (n=1), ST12595 (n=1), ST16470 (n=1), ST16510 (n=1), ST desconhecido (n=8): 4 possuem alelo <i>tbpB</i> 29 e 4 alelo <i>tbpB</i> 110
2,0	1	1	S91F, D95G	E91G	ST11677 (n=1)
1,0- 32,0	18	18	S91F, D95N	S87N	ST1582 (n= 10), ST3109 (n=2), ST 5388 (n=1), ST6974 (n=1), ST desconhecido (n=4): todos possuem alelo <i>tbpB</i> 137
4,0- 8,0	4	4	S91F, D95N	S87R	ST338 (n=3), ST33 (n=1)
4,0	3	3	S91F, D95N	S87N, E91Q	ST338 (n=2), ST desconhecido (n=1)
4,0	1	1	S91F, D95N	E91Q	ST338 (n=1)
4,0	1	1	S91F, D95N	D86N	ST desconhecido (n=1)
1,0	1	1	S91F, D95N	WT	ST16514 (n=1)
2,0- 16,0	10	0	WT	WT	ST338 (n=1), ST16564 (n=1), ST16563 (n=2), ST2992 (n=2), ST16506 (n=1), ST16461 (n=1), ST7975 (n=1), ST16563 (n=1)

R: Resistente; MIC: Concentração inibitória mínima, CIP: Ciprofloxacino.

7 DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento desempenha papel fundamental no controle das infecções gonocócicas. Várias iniciativas têm sido direcionadas como medidas-chave para promover e manter a vigilância nacional e internacional da AMR do gonococo (TAPSALL et al., 2009; STARNINO et al., 2012; UNEMO; ISON; et al., 2013; CDC, 2016; HOOK; KIRKCALDY, 2018). O presente estudo é a primeira análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana, filogenia e determinantes genéticos da resistência em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* circulantes na grande Florianópolis, compreendendo uma série histórica do período de 2008 a 2016.

Altos índices de resistência à penicilina (26,1%) foram observados no presente estudo, enquanto as taxas de sensibilidade foram baixas ao longo dos nove anos avaliados (diminuiu de 22,2% em 2010 para 5,0% em 2016) (Figuras 6 e 7). Curiosamente, em 2008/09 e 2010 não circularam isolados resistentes à penicilina na Grande Florianópolis. Entretanto, resistência a esse antimicrobiano foi reportada já em 1998 (13,6%) na cidade de Manaus (DILLON et al., 2001), em 2002-2003 (8,7%) no Rio de Janeiro (BARRETO et al., 2004) e 2004-2005 (23,1%) em São Paulo (BELDA JUNIOR et al., 2007a). Contrariamente ao observado neste estudo, em 2010 na cidade de Manaus, 20,5% (17/83) dos isolados eram resistentes à penicilina (FERREIRA et al., 2011).

No presente estudo, a resistência à penicilina inicialmente detectada em 2011 aumentou de aproximadamente 18,0% em 2011-2012 para 75,0% em 2016, demonstrando um aumento significativo ao longo dos anos ($p < 0,001$) (Figuras 6 e 7). Resultados semelhantes de resistência a esse antimicrobiano (22,4%) foram reportados por Costa et al. (2013) entre 2011-2012 na cidade de Belo Horizonte. Além do mais, a prevalência de isolados resistentes circulando no segundo período do presente estudo (2013-2016) foi quase 2,5 vezes maior do que no primeiro (2008-2012) ($p < 0,001$).

Perfil análogo também foi relatado no Rio de Janeiro, a prevalência da resistência à penicilina foi de 23,1% entre os anos de 2004 e 2005 para usuários de clínicas de ISTs, enquanto que nos anos subsequentes (2006-2015), a resistência foi superior a 40,0% (em todos os anos) entre usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) e de laboratórios particulares. (BARRETO et al., 2004; COSTA-LOURENCO et al., 2018).

De maneira oposta ao descrito no presente estudo, em São Paulo não foi observada diferença nas taxas de resistência à penicilina entre os

anos de 2003 a 2010 quando comparado com os anos de 2011 a 2016 (SANTOS, 2018). Resultados equivalentes ao encontrado em São Paulo também foram observados numa série histórica (2004-2015), na Alemanha, que comparou o período entre os anos de 2004 e 2009 em relação ao período que compreendeu os seis anos seguintes (2010-2016) (REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016).

O estudo nacional de vigilância da resistência do gonococo (2015-2016) revelou uma taxa global de resistência à penicilina de 37,1%, das quais, as menores taxas foram descritas na região Sul (23,1%) e as maiores no Nordeste (49,0%) (BAZZO et al., 2018). No presente estudo a porcentagem de resistência a esse antimicrobiano nos dois últimos anos foi de 51,4%, sendo 27,8% correspondentes a 2015 e 75,0% a 2016 (Figuras 6 e 7). Nota-se que em 2016 a taxa de resistência à penicilina foi quase três vezes maior do que o observado nacionalmente.

Altas porcentagens de resistência à penicilina têm sido relatadas mundialmente há décadas (TAPSALL et al., 2010a; STARNINO et al., 2012; DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013; LEWIS, 2014; UNEMO, 2015; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; COLE et al., 2017; WI et al., 2017). A porcentagem de isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência à penicilina em países e/ou regiões do Pacífico ocidental em 2010 variou entre 18,1% na Nova Zelândia a 96,7% na Tailândia (LAHRA, 2012). O Euro-GASP demonstrou uma taxa global de 21,0% de resistência à penicilina entre 2006- 2008 (COLE et al., 2017). Nos Estados Unidos, em 2007, o *Gonococcal Isolate Surveillance Program* (GISP) relatou índice de resistência à penicilina superior a 22,0% (CDC, 2009). Na América do Sul, a resistência à penicilina apresenta proporções variadas e permaneceu acima dos 24,0% entre 1990 e 2011 (DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013; THAKUR et al., 2017). Em oposição, outros autores reportaram que na América Latina foi observada uma diminuição da resistência de 46,0% em 2000 para 17,0% em 2009 (STARNINO et al., 2012).

Elevadas taxas de sensibilidade intermediária à penicilina também foram observadas no presente estudo, permanecendo superiores a 59,0% em todos os anos (exceto 2016) (Figura 7). Porcentagens concordantes têm sido descritas ao longo dos anos no Brasil (BELDA JUNIOR et al., 2007a; COSTA et al., 2013; FERREIRA et al., 2015; BAZZO et al., 2018; COSTA-LOURENCO et al., 2018).

Altas taxas de resistência à tetraciclina (26,1%) também foram observadas neste estudo. A resistência a esse antimicrobiano permaneceu alta em todo o período estudado (mínima de 27,8% entre

2014 e 2015 e máxima de 65,0% em 2016), enquanto a sensibilidade permaneceu baixa (11,1% em 2010 a 0% em 2016), ocorrendo uma oscilação entre a porcentagem de isolados resistentes e intermediários ao longo dos anos (Figuras 6 e 8). No Brasil, altas proporções de isolados resistentes a esse fármaco são descritos em estudos regionais desde 1998 (84,0% em Manaus) (DILLON et al., 2001). Nos anos seguintes, foram observadas taxas menores a 84,0%, mas os resultados demonstram alta porcentagem de isolados resistentes circulando no país: 33,9% no Rio de Janeiro, 2002-2003 (BARRETO et al., 2004); 43,1% em 2004 e 2005 e 50,5% nos anos de 2003 a 2016 em São Paulo (BELDA JUNIOR et al., 2007a; SANTOS, 2018); 54,2% em Manaus no ano de 2010 (FERREIRA et al., 2015); 32,3% em Belo Horizonte entre 2011 e 2012 (COSTA et al., 2013) e superior a 40% no Rio de Janeiro, entre 2006 e 2015 (COSTA-LOURENCO et al., 2018).

No presente estudo, ocorreu uma diminuição da resistência à penicilina de 48,7% em 2013 para 27,8% nos anos de 2014-2015, mas voltou a aumentar em 2016 (65,0%) (Figuras 6 e 7). Costa-Lourenço et al. (2018) também observaram essa tendência entre os anos de 2013 a 2014- 2015. Aumento da resistência à penicilina (Argentina, Chile, Colômbia e Cuba) e à tetraciclina (Argentina, Bolívia, Uruguai e Venezuela) também foi reportado em países da América do Sul e Central. Contrastando com os dados de diminuição da resistência à penicilina reportada pelo Uruguai e diminuição da resistência à tetraciclina encontradas no Chile, Colômbia e Cuba (THAKUR et al., 2017).

Desde as primeiras descrições de estirpes de *N. gonorrhoeae* produtoras de β -lactamase TEM (BERGSTRÖM S et al., 1978; DILLON JR; DUCK P; THOMAS DY, 1981), estudos moleculares de vigilância da resistência antimicrobiana demonstram que a frequência de isolados PPNG pode variar de acordo com a região, país ou continente estudado. Na América do Sul, a prevalência de PPNG variou de 6,35% no Uruguai a 39,3% na Bolívia (STARNINO et al., 2012; DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013; GIANECINI et al., 2015a). No Brasil, a resistência plasmidial à penicilina foi de 29,1% no primeiro estudo brasileiro de vigilância da resistência de *N. gonorrhoeae* (BAZZO et al., 2018), em Belo Horizonte de 14,5% (COSTA et al., 2013) e em Manaus de 16,7% (FERREIRA et al., 2015).

Em isolados PPNG, do presente estudo, o plasmídeo Africano foi o mais prevalente (n=15), seguido pelo Asiático (n=3) e Toronto/Rio (n=1). Resultados similares foram encontrados na Argentina (GIANECINI et al., 2015a; GIANECINI et al., 2015b) na Itália

(STEFANELLI et al., 2018) e no Japão (OHNISHI et al., 2010). Contudo, na Inglaterra o plasmídeo Asiático foi o mais prevalente seguido pelo Toronto/Rio (COLE et al., 2015), enquanto no Rio de Janeiro o plasmídeo Toronto/Rio foi predominante (COSTA-LOURENCO et al., 2018).

No presente estudo o alelo *bla*_{TEM-1} foi encontrado em isolados PPNG carreando tanto o plasmídeo Africano como o Asiático, enquanto o alelo *bla*_{TEM-135} foi encontrado em um único isolado que carregava o plasmídeo Toronto/Rio. Outros tipos de plasmídeos codificadores de β -lactamase já foram descritos em gonococos como o Nimes, Nova Zelândia, Australiano e Joanesburgo (PAGOTTO et al., 2000; PALMER; LEEMING; TURNER, 2000; MULLER; FAYEMIWO; LEWIS, 2011), entretanto eles não foram pesquisados no presente estudo. Diversos estudos já demonstraram a associação do alelo *bla*_{TEM-135} com o plasmídeo Toronto/Rio (NAKAYAMA et al., 2012; MUHAMMAD et al., 2014; WHILEY et al., 2014; GIANECINI et al., 2015a).

A circulação de isolados PPNG no presente estudo foi superior aos com resistência cromossômica à penicilina (Figura 7). Resultado semelhante foi descrito na América Latina e Caribe, em um estudo que demonstrou uma maior circulação de isolados apresentando resistência plasmidial do que cromossômica à penicilina (DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013).

No presente estudo, isolados com resistência plasmidial à tetraciclina (TRNG) corresponderam a 3,9% (6/153) enquanto 22,2% (16/153) apresentaram resistência cromossômica à tetraciclina (CMTR) (Figura 8). O número de isolados PPNG e TRNG aumentou ao longo do presente estudo, enquanto isolados apresentando resistência cromossômica à tetraciclina diminuíram até 2014, voltando a aumentar entre 2015 e 2016 (Figuras 7 e 8). Entre os isolados TRNG, seis carregavam o gene *tetM* Americano e quatro o Holandês. Um estudo desenvolvido no Rio de Janeiro (COSTA-LOURENCO et al., 2018), também detectou ambos os genes *tetM* (Americano e Holandês) em isolados TRNG, entretanto o número de isolados TRNG apresentando o gene *tetM* Americano foi três vezes maior do que o Holandês. Em contraste, no Brasil (Manaus) (DILLON et al., 2001) e na Argentina foram detectados apenas gene *tetM* do tipo Holandês (FERNANDEZ COBO et al., 1999).

A análise filogenética dos isolados PPNG carreando o gene *bla*_{TEM-1} dividiu os gonococos em dois *clusters*, representados pelo ST338 (RC: 27,9; IC 95%: 4,9- 159,6, $p < 0,000$) e pelo alelo *tbpB* 137

(RC: 23,3; IC 95%: 6,3- 85,9, $p < 0,001$), predominantemente composto por isolados com ST1582 que abrigavam o plasmídeo Africano. Também foi encontrada associação de isolados TRNG carreando o gene *tetM* Americano com o *cluster* de isolados ST338 ($p=0,006$), sugerindo uma disseminação clonal da resistência plasmidial à tetraciclina e penicilina. Horn et al. (2014), na Alemanha, também observou associação entre o genótipo G1582 (OR: 202.58; CI: 24.41–1681.14; $p < 0.01$) com a detecção da enzima β -lactamase, entretanto não encontrou associação com isolados TRNG (Figura 18).

Isolados PPNG carreando o gene *bla*_{TEM-135} já foram encontrados no Japão, China, Austrália, Coréia, França, Argentina, entre outros países (OHNISHI et al., 2010; CHEN et al., 2013; WHILEY et al., 2014; GIANECINI et al., 2015a; MICAELLO et al., 2017; RIM et al., 2018) e recentemente no Brasil (COSTA-LOURENCO et al., 2018). O gene *bla*_{TEM-135}, que codifica o TEM-135, é predominante e originalmente associado ao plasmídeo Toronto/Rio, enquanto o *bla*_{TEM-1} é frequentemente encontrado em PPNG carreando os plasmídeos Africano e Asiático. Ambos (*bla*_{TEM-1} e *bla*_{TEM-135}) são prevalentes entre as estirpes gonocócicas produtoras de β - lactamase que circulam mundialmente (OHNISHI et al., 2010; RIM et al., 2018). Entretanto, o significado clínico do gene *bla*_{TEM-135} permanece incerto, já que não foram observadas grandes diferenças nas MICs da penicilina e das ESCs. Contudo, o surgimento a emergência do TEM-135 poderia significar a introdução de outras β -lactamases TEM com um espectro hidrolítico β - lactâmico estendido relacionados à mutações ou aquisições de plasmídeos sob alta pressão seletiva pelo uso das cefalosporinas (RIM et al., 2018).

O gene *bla*_{TEM-1}, que codifica a β -lactamase TEM-1, necessita apenas da substituição de um único nucleotídeo específico (M182T²⁰) para evoluir para um gene que codifica uma β -lactamase de espectro estendido (ESBL), que poderia degradar todas as ESCs, incluindo a ceftriaxona (OHNISHI et al., 2010; MUHAMMAD et al., 2014). A disseminação, na população gonocócica, de uma potente ESBL com capacidade de degradar a ceftriaxona pode rapidamente resultar em falhas no tratamento e a gonorreia tornar-se intratável (MUHAMMAD et al., 2014). Acredita-se que o gene *bla*_{TEM-1} gonocócico evoluiu para o *bla*_{TEM-135} (originalmente identificado em *Salmonella entérica*) (PASQUALI et al., 2005) e este pode ser um precursor na evolução

²⁰ **M182T**: substituição do aminoácido metionina por uma treonina no códon 182.

para um gene ESBL (OHNISHI et al., 2010; NAKAYAMA et al., 2012; CHEN et al., 2013; RIM et al., 2018).

Embora à penicilina e à tetraciclina já não integrem os protocolos de tratamento recomendados no Brasil há muito tempo, estudar o perfil de resistência aos dois antimicrobianos na série histórica é importante para compreender a circulação de plasmídeos, suas interações com a resistência e as clonalidades relacionadas, uma vez, que mesmo sem pressão seletiva a resistência a esses antimicrobianos não diminuiu.

Altas taxas de resistência ao ciprofloxacino (53,0%) também foram encontradas no presente estudo. A resistência ao ciprofloxacino foi elevada desde 2008 (33,3%), e permaneceu aumentando (33,3% em 2008/09 para 60,0% em 2016) ($p < 0,001$), sendo que sua maior prevalência ocorreu no ano de 2014 (66,7%) (Figura 9). Ferreira et al. (2015) descreveu baixas porcentagens de resistência ao ciprofloxacino em 2010, entretanto, Costa Ligia et al. (2013), relatou nos anos de 2011-2012 taxa de resistência ao ciprofloxacino de 21,4%. Costa-Lourenço et al., (2018) observou a presença de isolados resistentes ao ciprofloxacino circulantes no Rio de Janeiro desde 2006. Entre 20015 e 2016, a taxa global de resistência ao ciprofloxacino no Brasil foi de 55,6%, sendo que foram observadas altas taxas de resistência em todas as regiões (variando de 42,2% na região Sul a 77,9% no Nordeste) (BAZZO et al., 2018). No presente estudo, a divisão em dois períodos (2008-2012 versus 2013-2016) possibilita observar aumento do percentual de isolados apresentando MICs mais elevadas no segundo período (Figura 13), reforçando a hipótese de que a resistência ao ciprofloxacino parece ter aumentado na Grande Florianópolis (BAZZO et al., 2018).

Adicionalmente, o motivo da circulação de somente um isolado, nos nove anos do estudo, com sensibilidade intermediária ao ciprofloxacino é desconhecida. Contudo esse mesmo perfil já foi observado no Brasil (COSTA et al., 2013; BAZZO et al., 2018; COSTA-LOURENCO et al., 2018) e na Alemanha (REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016).

Em outros países já foi demonstrada a ineficácia do ciprofloxacino para tratar infecções gonocócicas (CDC, 2004; DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013; NDOWA et al., 2013; BALA et al., 2015; KIRKCALDY et al., 2015; ROLSKOV et al., 2015; REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016) e a OMS, desde 2003, não recomenda seu uso para o tratamento da gonorreia (WHO, 2016). Em 2004, o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC/EUA) recomendou a suspensão do uso do ciprofloxacino no tratamento de infecções gonocócicas em homens que fazem sexo com homens (HSH),

principalmente pelo risco de não tratar corretamente infecções anais e de orofaringe (CDC, 2004).

No Brasil, os resultados do primeiro estudo nacional de vigilância AMR em *N. gonorrhoeae* (BAZZO et al., 2018) demonstrando a ineficácia do ciprofloxacino frente a isolados de *N. gonorrhoeae* culminou na extensão para todo o país das diretrizes de tratamento já recomendadas, pelo Ministério da Saúde, para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Nesses estados, estudos locais já demonstravam falha da ação do ciprofloxacino no tratamento da gonorreia. Desta forma, a ceftriaxona juntamente com a azitromicina constitui a primeira opção de tratamento para infecção gonocócica anogenital não complicada em todo território nacional (BRASIL, 2017). A terapia dupla de ceftriaxona com azitromicina é uma recomendação adotada pela OMS (WHO, 2016), países da Europa (BIGNELL; UNEMO, 2013), Estados Unidos (CDC, 2015b) e desde 2017 no Brasil (BRASIL, 2017).

Os resultados do presente estudo indicam que isolados resistentes ao ciprofloxacino, já circulavam na Grande Florianópolis, pelo menos, desde 2008 e que provavelmente a recomendação de associação com azitromicina (praticamente sem isolados resistentes à época) possibilitou a cura dos casos sem percepção clínica de resistência. Além disso, os aumentos da resistência à penicilina e a persistência das altas taxas de resistência à tetraciclina evidenciam que esses antimicrobianos dificilmente voltarão a ser utilizados na clínica para o tratamento da gonorreia, como está acontecendo com a espectinomomicina em alguns países.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de elucidar os padrões moleculares da resistência às quinolonas em *N. gonorrhoeae*. Mutações nos genes *gyrA* e *parC* que codificam respectivamente a DNA girase e topoisomerase IV, têm sido descritos e associados ao desenvolvimento de resistência às quinolonas (BELLAND et al., 1994; DEGUCCI et al., 1995; TANAKA et al., 2000). A análise das sequências dos 80 isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes ao ciprofloxacino mostrou mutações nos códons 91 e 95 em *gyrA* e mutações nos códons 78, 86, 87 e 91 de *parC*. Foram observados em 52,5% (n= 40) dos isolados as mutações S91F²¹ e D95G²² em *gyrA* e S78R²³ em *parC*, concomitantemente, apresentando MICs variando de

²¹ S91F: substituição do aminoácido Serina por uma Fenilalanina no códon 91.

²² D95G: substituição do aminoácido Ácido aspártico por uma Glicina no códon 95.

²³ S78R substituição do aminoácido Serina por uma Arginina no códon 78.

4,0-16,0 µg/mL; 36,2% (n=29) dos isolados apresentaram ao mesmo tempo as mutações S91F e D95N²⁴ em *gyrA* e S78R em *parC* com MICs variando de 4,0- 32,0 µg/mL.

No Rio de Janeiro (2000-2010) foi observada, em 40,0% dos isolados resistentes ao ciprofloxacino com MIC entre 4,0-32,0 µg/mL, a mutação S87R em *parC* juntamente com S91F e D91F em *gyrA* (UEHARA et al., 2011). Em Manaus, Ferreira e colaboradores (2015) descreveram as mutações S91F e D95G em *gyrA* e S87R *parC* em dois isolados apresentando MIC > 32,0µg/mL. No presente estudo as mutações S87R e S87N²⁵ foram encontradas em 83,8% (n= 67) dos isolados resistentes e destes 60,0% (n=40) apresentavam altos níveis de resistência ao ciprofloxacino (MIC> 16,0µg/mL) sugerindo que as mutações no códon 87 de *parC* têm relação com aumento da MIC e o desenvolvimento de altos níveis de resistência a esse fármaco.

Pesquisadores do Japão demonstraram que mutações SNP isoladas em *gyrA* promovem níveis de resistência baixos a intermediários (MIC< 8µg/mL) (TANAKA et al., 2000), enquanto altos níveis de resistência (MIC≥ 16,0µg/mL) são determinados por diferentes mutações específicas concomitantes em *parC*, principalmente no códon 88 (S88P²⁶) e 91 (E91K²⁷) (BELLAND et al., 1994; TREES et al., 1999; LINDBACK et al., 2002; ALCALA et al., 2003). No presente estudo, foram observadas mutações em *parC* na posição 91 em 6,2% (n=5) dos isolados. Apesar disso, elas foram diferentes da mutação E91K e estavam relacionadas a isolados apresentando valores de MIC mais baixos (2 a 4,0µg/mL).

Belland et al. (1994) descreveu que a mutação *missense* no códon 91 em *gyrA* (S91F²⁸) de *E. coli* confere aumento de 100 vezes na resistência ao ciprofloxacino enquanto a mutação no códon 95 (D95N²⁹) duplica a resistência. Entretanto, no presente estudo foram encontradas MIC variando de 1-4 µg/mL em 71,4% (20/29) dos isolados apresentando essas mutações, sugerindo que MICs elevadas presentes em isolados exibindo essas mutações sejam em virtude de alterações adicionais em outros genes. Adicionalmente, não foram encontradas

²⁴ D95N: substituição do aminoácido Ácido aspártico por uma Asparagina no códon 95

²⁵ S78N substituição do aminoácido uma Serina por uma Asparagina no códon 78

²⁶ S88P: substituição do aminoácido Serina por uma Prolina no códon 88

²⁷ E91K: substituição do aminoácido glutâmico por uma Lisina no códon 91

²⁸ S91F: Troca do aminoácido Serina por uma Fenilalanina no códon 91.

²⁹ D95N: Troca do aminoácido Ácido aspártico por uma Asparagina no códon 95.

mutações nos genes *gyrA* e *parC* em 12,5% (n=10) dos isolados resistentes ao ciprofloxacino (12,5%) apresentando MICs de 2,0-16,0µg/mL.

A superexpressão de bombas de efluxo, envolvidas na expulsão do fármaco da célula, e a proteção do sítio do alvo por uma proteína Qnr mediada por plasmídeo, são mecanismos envolvidos na resistência às quinolonas (HARRISON et al., 2016). A Qnr pertence à família de proteínas com pentapeptídeos repetidos e atua como um homólogo ao DNA, que compete pelo sítio de ligação do DNA na DNA girase e topoisomerase IV (COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Pensa-se que essa redução na interação entre DNA e DNA girase, diminui as oportunidades das moléculas de quinolona formarem e estabilizarem o complexo girase-clivagem DNA-quinolona, o qual é letal para a célula. A presença de Qnr confere baixo nível de resistência às quinolonas, no entanto, genes que codificam Qnr parecem promover o surgimento de isolados altamente resistentes, facilitando a seleção de mutantes com pontos de mutação nos genes que codificam DNA girase e/ou topoisomerase IV (MUNITA; ARIAS, 2016).

Casos de resistência à azitromicina em gonococo foram descritos na América Latina já nos anos 90 em Cuba (10,0%), em 2001 ocorreu o primeiro relato de gonococo exibindo alto nível de resistência na Argentina (MIC >2048 mg/L), caracterizando como pertencente ao ST696 e presença de mutações no gene *mtrR* e presença do gene *mef* (GALARZA et al., 2009; DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013) e difundiram-se mundialmente (PALMER; YOUNG; WINTER; et al., 2008; STARNINO; STEFANELLI, 2009; CHISHOLM; DAVE; ISON, 2010; GALARZA et al., 2010; KATZ et al., 2012; UNEMO; GOLPARIAN; HELLMARK, 2014). Na América Latina, entre os anos de 2000 e 2009 a resistência à azitromicina aumentou de 6,0% para 20,0% (STARNINO et al., 2012).

No Brasil, a taxa de resistência à azitromicina em 2016 foi de 6,9% (variando de 4,1% na região Sul a 9,9% no Sudeste (BAZZO et al., 2018). No presente estudo foi encontrada resistência à azitromicina de 5,2% e nenhum isolado apresentou altos níveis de resistência (MIC \geq 256 µg/mL). Resultados equivalentes foram encontrados em Belo Horizonte (4,5%) (COSTA et al., 2013) e na Alemanha (5,5% e 6,0%) (HORN et al., 2014; REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016). A resistência à azitromicina relatada no presente estudo diminuiu nos anos de 2011, 2014 e 2016 em comparação com o ano anterior (Figura 10). Perfil que também foi observado em países da América Latina e Caribe nos anos 2010 e 2011 (THAKUR et al., 2017). Todavia, 9,2% (14/153)

dos isolados do presente estudo apresentaram MIC= 0,5 µg/mL, um log abaixo do ponto de corte de resistência preconizado pelo EUCAST (MIC=1,0 µg/mL) e nos anos de 2013-2016 surgiram os primeiros isolados apresentando MIC=4,0 µg/mL (Figura 8).

A súbita mudança no perfil de sensibilidade à azitromicina requer monitoramento constante da sensibilidade gonocócica, uma vez que, relatos de gonococos exibindo resistência a esse antimicrobiano foram encontrados na Europa e a resistência tem se difundido em países da Europa (JACOBSSON et al., 2016; COLE et al., 2017), Canadá (MARTIN et al., 2016), e outros países (WI et al., 2017). Atualmente a azitromicina é recomendada como um dos antimicrobianos para o tratamento de primeira linha da gonorreia em vários países, incluindo o Brasil, e seu uso pode estimular o aumento da circulação de gonococos resistentes (BIGNELL; UNEMO, 2013; CDC, 2015b; WHO, 2016; BRASIL, 2017). Relatos de resistência a azitromicina no Brasil foram observados desde 2006 no Rio de Janeiro, entretanto ainda não foram observados isolados com altos índices de resistência a esse antimicrobiano no Brasil (FERREIRA et al., 2007; COSTA et al., 2013; FERREIRA et al., 2015; BAZZO et al., 2018; COSTA-LOURENCO et al., 2018).

Para evitar o aumento da resistência a esse valioso fármaco, pesquisadores defendem restringir o uso da azitromicina para aqueles pacientes com alergia às cefalosporinas ou com infecção simultânea por clamídia (caso em que a azitromicina deve ser administrada juntamente com uma cefalosporina) (REGNATH; MERTES; IGNATIUS, 2016).

Falhas no tratamento e redução da sensibilidade às ESCs têm sido descritas no mundo inteiro (NDOWA; LUSTI-NARASIMHAN; UNEMO, 2012; UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012; UNEMO; ISON; et al., 2013; BALA et al., 2015; LEE et al., 2015; SHIMUTA et al., 2015; CDC, 2016). Na América do Sul e Caribe isolados com redução da sensibilidade à ceftriaxona (0,125 -250 µg/mL) foram reportados entre 2007 e 2011, na Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e Cuba (DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013). Na Argentina em 2014, foi relatado um isolado resistente à ceftriaxona e à cefixima (MIC = 0,250 µg/mL). Em 2007 foi descrito em Manaus o primeiro isolado com diminuição da sensibilidade à ceftriaxona no Brasil (0,125 -250 µg/mL) (DILLON; TRECKER; THAKUR, 2013; THAKUR et al., 2017).

Adotando os critérios estabelecidos pelo CLSI, todos os isolados de *N. gonorrhoeae* do presente estudo foram sensíveis (MIC ≤ 0,125 µg/mL) à cefixima e à ceftriaxona. No entanto, adotando-se os pontos de

corde do EUCAST (o BRCAS³⁰ adota na maioria das vezes os critérios do EUCAST), 8,5% (n=13) deles apresentaram diminuição da sensibilidade à cefixima (MIC = 0,125µg/mL) (Figura 15), um log abaixo do ponto de corte de resistência (MIC= 0,25 µg/mL) com concomitante resistência à penicilina, à tetraciclina e ao ciprofloxacino em 53,8% (n=7). Aumento sutil nas MICs foi observado para ceftriaxona (Figura 16), mas principalmente para cefixima (Figura 16) no segundo período do estudo (2013-2016). Embora no Brasil ainda não tenham sido relatadas estirpes de *N. gonorrhoeae* apresentando resistência à ceftriaxona, o estudo nacional de vigilância da resistência do gonococo em isolados de 2016, descreveu a primeira *N. gonorrhoeae* com resistência à cefixima, isolada em Brasília; adicionalmente foram relatados nas cinco regiões do país, isolados com MIC= 0,125 µg/mL para cefixima, com destaque para as cidades de Florianópolis (oito isolados) (BAZZO et al., 2018) e Rio de Janeiro (sete isolados) (COSTA-LOURENCO et al., 2017). O encontro de isolados com MICs-altas (0,125µg/mL) para cefixima pode ser atribuído à globalização que ampliou enormemente o fluxo de pessoas entre países e favoreceu também a circulação de isolados que se disseminaram nacionalmente. Todavia, não pode ser excluída a hipótese de uma emergência interna e/ou seleção de isolados com sensibilidade diminuída à cefixima pelo uso de outras cefalosporinas no Brasil. Os resultados do presente estudo corroboram a indicação do uso da ceftriaxona, juntamente com a azitromicina, para o tratamento empírico de infecções gonocócicas na Grande Florianópolis. Contudo, como a cefixima e outras ESCs orais menos potentes não foram amplamente utilizadas no tratamento da gonorreia no Brasil (cefixima não tem registro na ANVISA), é provável que haja uma baixa pressão seletiva para a emergência e disseminação da resistência as ESCs no país (BAZZO et al., 2018). Além disso, quando os isolados foram coletados, não se tratava infecções gonocócicas com ceftriaxona na Grande Florianópolis.

Alguns autores têm relatado que a exposição de *Neisseria* spp comensais aos antimicrobianos favorece a seleção de mecanismos de resistência nessas bactérias, que posteriormente compartilham mecanismos de resistência com *N. gonorrhoeae* (SAIKA et al., 2001;

³⁰ *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* é um comitê da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas em conjunto com a Sociedade Brasileira de Infectologia, de Microbiologia e de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. O desenvolvimento, padronização e determinação dos pontos de corte de testes de sensibilidade antimicrobiana no Brasil são alguns dos objetivos desse comitê.

TANAKA et al., 2006; FURUYA et al., 2007; TAPSALL et al., 2009; UNEMO; SHAFER, 2011; UNEMO; NICHOLAS, 2012; UNEMO; SHAFER, 2014).

Conhecer os padrões locais de sensibilidade antimicrobiana combinado com a incidência da variabilidade molecular entre estirpes de *N. gonorrhoeae* é essencial para estabelecer a melhor diretriz de tratamento regional. Entre as metodologias disponíveis que têm como princípio o sequenciamento, o NG-MAST é uma ferramenta vantajosa, pois gera um número (ST) por meio da combinação dos alelos identificados dos genes *porB* e *tbpB*. Adicionalmente, disponibiliza *online* o acesso da base de dados permitindo a comparação mundial de estirpes de *N. gonorrhoeae* (CHISHOLM et al., 2011).

A tipagem molecular dos 153 isolados gonocócicos determinou 64 STs, cinco *clusters* (≥ 7 isolados) e 19 novos STs que não haviam sido descritos em nenhum outro lugar do mundo. Além disso, 21 novos alelos de *porB* e dois de *tbpB* foram determinados. Contudo, 33 isolados permaneceram com STs desconhecidos, pois não foi possível enviar em tempo hábil todas as sequências de STs desconhecidos à plataforma de dados do NG-MAST. Os tipos mais prevalentes foram: ST225 e ST2992 (n=11 cada), ST1582 (n=10), ST338 (n=7), ST1407 (n=4), ST2202 (n=4) e ST6827 (n=4) (Figura 17). Corroborando os dados do presente estudo, na Hungria em 2013 os STs mais frequentes foram ST2992 (19%) seguido pelo ST1407 e ST4995 (17% cada) (NEMES-NIKODEM et al., 2014). Assim como o presente estudo Chisholm et al. (2013) descreveram pela primeira vez na Europa o ST2992 como um dos mais prevalentes. Ele foi detectado particularmente na Irlanda e na Noruega. Os autores também sugerem um possível surto entre HSH, uma vez que, eles encontraram associação entre o ST2292 e HSH. O ST2992 parece estar circulando mundialmente, uma vez que, um recente estudo publicado na Indonésia, relatou esse ST como um dos mais prevalentes entre usuários de clínicas de IST no ano de 2014 (HANANTA et al., 2018). Contudo, no presente estudo, o ST2992 assim como ST225 circularam entre os anos de 2010 e 2015.

Estudos disponíveis de isolados gonocócicos anteriores a 2005 não demonstraram predominância do ST1407 ou tipos relacionados na Rússia (UNEMO et al., 2007) e países da Europa como a Itália (STARNINO et al., 2008), Portugal (FLORINDO et al., 2010), Suécia (OLSEN et al., 2008) e Inglaterra (RISLEY et al., 2007). Em contraste ST1407 foi documentado em pesquisas mais recentes em Portugal (FLORINDO et al., 2010), na Noruega, (HJELMEVOLL et al., 2012) e na Escócia (descrito pela primeira vez em 2007) (EASTICK, 2010). No

presente estudo, ST1407, foi identificado pela primeira vez em 2013 e continuou sendo detectado em 2016. O ST1407 e STs relacionados são conhecidos globalmente e documentados em estudos que investigam especificamente a sensibilidade diminuída e resistência às ESCs (UNEMO et al., 2011), Noruega (UNEMO et al., 2010), Inglaterra (CHISHOLM et al., 2011), Suécia (GOLPARIAN et al., 2010), Itália (CARANNANTE et al., 2012), Estados Unidos (PANDORI et al., 2009), Canadá (MARTIN et al., 2012), Austrália (TAPSALL; RAY; LIMNIOS, 2010b), China (LO; HO; LO, 2012), na Áustria Japão (TANAKA et al., 2011). Chisholm et al. (2013) forneceram mais evidências de que a ampla disseminação do ST1407 na União Europeia provavelmente ocorrerá num futuro próximo. Além disso, ST1407 foi responsável pela maioria das falhas de tratamento com ESCs na Europa (UNEMO et al., 2010; ISON et al., 2011; UNEMO; GOLPARIAN; HESTNER, 2011; UNEMO; GOLPARIAN; NICHOLAS; et al., 2012; UNEMO; GOLPARIAN; POTOCNIK; et al., 2012).

Dois genogrupos de STs estreitamente relacionados (compartilhando um alelo *tbpB* idêntico e diferindo $\leq 1\%$ no alelo *porB*) foram formados G1407 e G225 (Figura 18). O genogrupo G1407 foi significativamente associado com MIC= 0,125 $\mu\text{g/ml}$ para cefixima ($p=0,001$), RC: 11,60 (IC 95%: 3,15- 42,70; $p < 0,001$) e resistência ao ciprofloxacino ($p < 0,001$), penicilina ($p=0,016$) e tetraciclina ($p < 0,001$), RC: 16,72 (IC 95%: 3,61- 77,36; $p < 0,001$). Não foi observada associação significativa entre ambos os genogrupos e a resistência à azitromicina. Resultados similares foram observados na Europa onde o G1407 foi associado com sensibilidade à azitromicina (CHISHOLM et al., 2013). Além disso, dos 13 isolados com MIC=0,125 $\mu\text{g/mL}$ para cefixima, sete compartilhavam o mesmo alelo *tbpB* 110 (comum ao ST 1407, ST3149 e ST1513). Dez eram resistentes ao ciprofloxacino (oito com MIC > 16,0 $\mu\text{g/mL}$) e destes oito, sete eram resistentes concomitantemente à penicilina e à tetraciclina e apresentaram MIC=0,03- 0,06 $\mu\text{g/mL}$ para ceftriaxona e MIC=0,125 $\mu\text{g/mL}$ para azitromicina. Entre 2010 e 2012 o G1407 foi o genogrupo frequentemente detectado no Canadá (MARTIN et al., 2013) e no Japão (SHIMUTA et al., 2013), na Europa, 23,0% dos isolados pertenciam ao G1407, 10% ao G225 e 8% ao G2992 (ECDC, 2012). O uso excessivo de antimicrobianos também leva à pressão seletiva positiva para disseminação mundial de clones *Multidrug-resistant* (MDR) tais como G1407. Isolados circulantes na Europa pertencentes ao G1407 são resistentes ao ciprofloxacino, e fortemente associados com diminuição

da sensibilidade ou resistência a cefixima e mostram MICs elevadas para ceftriaxona e azitromicina (CHISHOLM et al., 2013).

O genogrupo G225 foi significativamente associado à resistência ao ciprofloxacino ($p < 0,001$), RC: 20,16 (IC 95%: 2,57- 158,3; $p = 0,004$); à penicilina ($p = 0,016$), RC: 4,22 (IC 95%: 1,40- 12,71 $p = 0,011$); e à tetraciclina ($p < 0,001$) (Tabela 10), RC: 15,53 (IC 95%: 3,33- 72,22; $p < 0,001$). O genogrupo G225 foi o genogrupo mais prevalente após o G1407 em um estudo desenvolvido na Europa (CHISHOLM et al., 2013). O ST225 foi relatado como uma estirpe altamente prevalente em países da União Europeia (RISLEY et al., 2007; OLSEN et al., 2008; PALMER; YOUNG; GRAHAM; et al., 2008; FLORINDO et al., 2010), com uma associação confirmada com resistência ao ciprofloxacino (OLSEN et al., 2008; PALMER; YOUNG; GRAHAM; et al., 2008; FLORINDO et al., 2010). Dado que a maioria dos estudos começou a amostrar entre 2003 e 2005, a persistência do G225 até 2010 indica que é um clone NG-MAST estável e altamente bem-sucedido. Curiosamente, um recente estudo canadense de isolados mostrando diminuição da sensibilidade à cefixima e/ou ceftriaxona mostraram que 19% dos isolados eram ST225 (MARTIN et al., 2012). Embora todos os isolados do presente estudo pertencentes ao genogrupo G225 foram sensíveis à cefixima e à ceftriaxona, um apresentou MIC=0,125 μ g/mL para cefixima (Figura 18). O potencial para esta estirpe mostrar uma sensibilidade diminuída é motivo de preocupação, dado o seu potencial para predominar e persistir.

A resistência ao ciprofloxacino foi associada aos *clusters* G1407 ($p < 0,001$), G225 ($p < 0,001$) (RC: 20,16; IC 95%: 2,57- 158,3; $p = 0,004$) e ST338 ($p < 0,001$). Os isolados resistentes ao ciprofloxacino que não pertenciam a nenhum *cluster* foram distribuídos em diferentes STs. Desta forma, a resistência ao ciprofloxacino foi menos prevalente em isolados dispersos ao longo da árvore filogenética do que nos isolados pertencentes a *clusters* associados à resistência a esse antimicrobiano (Figura 18). Esses resultados sugerem uma evolução clonal da resistência ao ciprofloxacino nos gonococos circulantes na Grande Florianópolis.

A análise filogenética dos 153 isolados de *N. gonorrhoeae* (Figura 18) revelou que gonococos compartilharam o mesmo alelo *tbpB* 29 foram associados com resistência à azitromicina ($p = 0,008$) razão de chance 8,0 (IC 95%: 1,78-35,6, $p = 0,006$). Entretanto, não foi observada associação entre clones de STs e resistência à azitromicina em países da União Europeia (CHISHOLM et al., 2013).

Somente cinco isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos e destes, dois apresentaram o ST16509, descrito pela primeira vez nesse estudo, e três apresentaram STs conhecidos (ST16456, ST240 e ST5031) e não compartilhavam entre si alelos idênticos de *porB* e *tbpB*. Nemes-Nikodém e colaboradores, em 2014, encontraram apenas dois isolados sensíveis aos mesmos seis antimicrobianos avaliados no presente estudo, no entanto os STs (ST387 e ST9901) foram diferentes dos descritos no presente estudo.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo descreveu a primeira análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana, filogenia e determinantes genéticos da resistência em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* circulantes na Grande Florianópolis. Embora a penicilina e a tetraciclina já não integrem os protocolos de tratamento recomendados no Brasil há muito tempo, estudar o perfil de resistência aos dois antimicrobianos na série histórica é importante para compreender a circulação de plasmídeos, suas interações com a resistência e as clonalidades ligadas a resistência plasmidial. As altas taxas de resistência ao ciprofloxacino salientam a ineficácia desse antimicrobiano no tratamento empírico da gonorreia na Grande Florianópolis. Embora no Brasil, sejam raros os relatos de estirpes de *N. gonorrhoeae* apresentando resistência as ESCs, esse estudo descreveu 13 isolados de *N. gonorrhoeae* com MIC=0,125µg/mL para cefixima, um log abaixo do ponto de corte de resistência determinado pelo EUCAST. Esses achados reforçam a importância do estabelecimento de programas de vigilância da AMR em todo o território nacional, principalmente para o monitoramento do perfil de sensibilidade à ESCs e à azitromicina, atualmente utilizada juntamente com a ceftriaxona no tratamento de infecções gonocócicas não complicadas.

Além disso, estudar uma série histórica com métodos moleculares permite conhecer os mecanismos envolvidos na determinação da resistência antimicrobiana e as clonalidades relacionadas à resistência plasmidial e cromossômica.

O presente estudo ocorreu em paralelo ao estudo nacional de vigilância da AMR em *N. gonorrhoeae*, que foi um estudo transversal. Portanto, estudar uma série histórica permitiu o embasamento da sequência de resistência dos isolados, fato que coloca o estado de Santa Catarina entre os fornecedores de dados sobre infecção por *N. gonorrhoeae*, dados esses tão raros no cenário Latino Americano.

9 PERSPECTIVAS

- Promover a indução da resistência nos 13 isolados de *N. gonorrhoeae* com MIC=0,125µg/mL para cefixima e posterior sequenciamento do genoma total, como o objetivo de elucidar os mecanismos de resistência as ESCs.
- Realizar o sequenciamento do genoma total em isolados resistentes à azitromicina e isolados com resistência cromossômica à penicilina e tetraciclina;
- Estudar os determinantes genéticos da resistência à azitromicina em isolados de *N. gonorrhoeae* com sensibilidade intermediária e resistente à azitromicina.

Investigar os mecanismos da resistência nos nove isolados resistentes ao ciprofloxacino, que não apresentaram mutações em *gyrA* e *parC*.

REFERÊNCIAS

ABUSARAH, E. A. et al. Molecular detection of potential sexually transmitted pathogens in semen and urine specimens of infertile and fertile males. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, n. 4, p. 283-6, 2013.

ALA, M. et al. Trends of resistance to antimicrobials recommended currently and in the past for management of gonorrhea in the Apex STD center in India and comparison of antimicrobial resistance profile between 2002-2006 and 2007-2012. **Sex Transm Dis**, v. 42, n. 4, p. 218-22, 2015.

ALCALA, B. et al. Molecular characterization of ciprofloxacin resistance of gonococcal strains in Spain. **Sex Transm Dis**, v. 30, n. 5, p. 395-8, 2003.

ALLEN, V. G. et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 2, p. 703-12, 2011.

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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 12, p. 3744-9, 2002.

APARI, P.; DE SOUSA, J. D.; MULLER, V. Why sexually transmitted infections tend to cause infertility: an evolutionary hypothesis. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 8, p. e1004111, 2014.

ASHFORD, W. A.; GOLASH, R. G.; HEMMING, V. G. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Lancet**, v. 2, n. 7987, p. 657-8, 1976.

BALA, M. et al. Trends of resistance to antimicrobials recommended currently and in the past for management of gonorrhea in the Apex STD center in India and comparison of antimicrobial resistance profile between 2002-2006 and 2007-2012. **Sex Transm Dis**, v. 42, n. 4, p. 218-22, 2015.

BARBOSA, M. J. et al. Prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection in men attending STD clinics in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 500-3, 2010.

BARRETO, N. A. et al. Caracterização Fenotípica e molecular de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002-2003. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 16, n. 3, p. 32-42, 2004.

BARRETO, N. A. et al. Caracterização Fenotípica e molecular de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002-2003. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 16, n. 3, p. 32-42, 2004.

BAZZO, M. L. et al. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015-16. **J Antimicrob Chemother**, 2018.

BELDA JUNIOR, W. et al. **Brief Communication: Evaluation of the in vitro activity of six antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo. 49: 4 p. 2007a.

BELDA JUNIOR, W. et al. **Brief Communication: Evaluation of the in vitro activity of six antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo. 49: 4 p. 2007a.

BELLAND, R. J. et al. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. **Mol Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 371-80, 1994.

BENZAKEN, A. S. et al. **Prevalência da Infecção por *Clanídia e Gonococo* em mulheres atendidas na clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas**. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 22: 129-134 p. 2010.

BERGSTRÖM S et al. Contribution of a TEM-1-like beta-lactamase to penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 13, p. 618-23, 1978.

BIGNELL, C.; UNEMO, M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **Int J STD AIDS**, v. 24, n. 2, p. 85-92, 2013.

BIGNELL, C.; UNEMO, M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **Int J STD AIDS**, v. 24, n. 2, p. 85-92, 2013.

BIOMÉRIEUX. VITEK MS. Fluxo de Trabalho: Manual do utilizador, utilização clínica. França 2012.

BOLAN, G. A.; SPARLING, P. F.; WASSERHEIT, J. N. The emerging threat of untreatable gonococcal infection. **N Engl J Med**, v. 366, n. 6, p. 485-7, 2012.

BOWLER, L. D. et al. Interspecies recombination between the penA genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. **J Bacteriol**, v. 176, n. 2, p. 333-7, 1994.

BRANNIGAN, J. A. et al. Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Mol Microbiol**, v. 4, n. 6, p. 913-9, 1990.

BRASIL. Atualização da recomendação nacional do tratamento preferencial da infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto). 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/.DIAHV/SVS/MS, N. I. N. Brasília 2017.

BRASIL. IBGE: Brasil, Santa Catarina: população. Brasil 2010.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para a atenção integral às pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis. DE DST, A. E. H. V. Brasília: 122 p. 2015.

BROOK, G. The performance of non-NAAT point-of-care (POC) tests and rapid NAAT tests for chlamydia and gonorrhoea infections. An assessment of currently available assays. **Sex Transm Infect**, v. 91, n. 8, p. 539-44, 2015.

BRUNHAM, R. C.; GOTTLIEB, S. L.; PAAVONEN, J. Pelvic inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 372, n. 21, p. 2039-48, 2015.

BUNKER, D.; KERR, L. D. Acute Myopericarditis Likely Secondary to Disseminated Gonococcal Infection. **Case Rep Infect Dis**, v. 2015, p. 385126, 2015.

BURDETT, V. Purification and characterization of Tet(M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 266, n^o 5, p. 2872–2877, 1991.

BURDETT, V. Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. **J Bacteriol**, v. 165, n. 2, p. 564-9, 1986.

CAMARA, J. et al. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 8, p. 1858-60, 2012.

CARANNANTE, A. et al. Cefixime and ceftriaxone susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Italy from 2006 to 2010. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 6, p. 558-64, 2012.

CDC. Increases in Fluoroquinolone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Among Men Who Have Sex with Men --- United States, 2003, and Revised Recommendations for Gonorrhea Treatment, 2004. **MMWR**, v. 56, n. 16, p. 335-338, 2004.

CDC. Increases in Fluoroquinolone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Among Men Who Have Sex with Men --- United States, 2003, and Revised Recommendations for Gonorrhea Treatment, 2004. **MMWR**, v. 56, n. 16, p. 335-338, 2004.

CDC. **Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014: Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP) Supplement & Profiles**. SERVICES, U. S. D. O. H. A. H. Atlanta, Georgia, United States: Center for Disease Control and Prevention, Division of STD Prevention 2016.

CDC. **Sexually transmitted disease surveillance supplement. Gonococcal Isolate Surveillance Program (GISP). Annual report**

2007. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, C. F. D. C. A. P. USA 2009.

CDC. **Sexually transmitted disease surveillance supplement. Gonococcal Isolate Surveillance Program (GISP). Annual report 2007.** US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, C. F. D. C. A. P. USA 2009.

CDC. **Sexually Transmitted Diseases Surveillance.** PREVENTION, C. F. D. C. A. Atlanta, Georgia, United States: Center for Disease Control and Prevention, Division of STD Prevention 2015a.

CDC. **Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015.** MMWR. SERVICES, D. O. H. A. H. Georgia, USA. 64: 136 p. 2015b.

CDC. **Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015.** MMWR. SERVICES, D. O. H. A. H. Georgia, USA. 64: 136 p. 2015.

CHALKLEY, L. J. et al. Plasmid analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates and dissemination of *tetM* genes in southern Africa 1993-1995. **J Antimicrob Chemother**, v. 40, n. 6, p. 817-22, 1997.

CHEN, S. C. et al. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. **Sex Transm Dis**, v. 40, n. 11, p. 872-6, 2013.

CHEN, S. C. et al. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. **Sex Transm Dis**, v. 40, n. 11, p. 872-6, 2013.

CHICO, R. M. et al. Prevalence of malaria and sexually transmitted and reproductive tract infections in pregnancy in sub-Saharan Africa: a systematic review. **JAMA**, v. 307, n. 19, p. 2079-86, 2012.

CHISHOLM, S. A. et al. Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* clone showing decreased susceptibility to cefixime in England and Wales. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 11, p. 2509-12, 2011.

CHISHOLM, S. A. et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance

Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. **Euro Surveill**, v. 18, n. 3, 2013.

CHISHOLM, S. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 9, p. 3812-6, 2010.

CHISHOLM, S. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 9, p. 3812-6, 2010.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, n. 2, p. 232-60 ; second page, table of contents, 2001.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Tenth Edition. Clinical and Laboratory Standards Intitute, M07-A10** 2015.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Clinial and Laboratory Standarsds Intitute, document M100-S28.** USA. 38 2018.

CODES, J. S. et al. **Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.** Caderno de Saúde Pública. 22: 325-334 p. 2006.

COLE, M. J. et al. Genetic diversity of blaTEM alleles, antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological characteristics of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from England and Wales. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 12, p. 3238-43, 2015.

COLE, M. J. et al. Genetic diversity of blaTEM alleles, antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological characteristics of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from England and Wales. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 12, p. 3238-43, 2015.

COLE, M. J. et al. Overall Low Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance but high Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in 24 European Countries, 2015. **BMC Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 617, 2017.

COLE, M. J. et al. Overall Low Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance but high Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in 24 European Countries, 2015. **BMC Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 617, 2017.

COSTA, L. M. B. et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 304-309, 2013.

COSTA, L. M. B. et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 304-309, 2013.

COSTA-LOURENCO, A. et al. Phylogeny and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 58, p. 157-163, 2018.

COSTA-LOURENCO, A. et al. Phylogeny and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 58, p. 157-163, 2018.

COSTA-LOURENCO, A. P. R. et al. Reduced susceptibility to cefixime but not ceftriaxone: an uncertain perspective for the treatment of gonorrhoea in Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 49, n. 4, p. 515-516, 2017.

COSTA-LOURENCO, A. P. R. et al. Reduced susceptibility to cefixime but not ceftriaxone: an uncertain perspective for the treatment of gonorrhoea in Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 49, n. 4, p. 515-516, 2017.

COUSIN, S. L., JR.; WHITTINGTON, W. L.; ROBERTS, M. C. Acquired macrolide resistance genes and the 1 bp deletion in the *mtrR* promoter in *Neisseria gonorrhoeae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, n. 1, p. 131-3, 2003.

COUTANCEAU, B.; BOUJENAH, J.; PONCELET, C. Gonococcal Chorioamnionitis with Antepartum Fetal Death In Utero. **Case Rep Obstet Gynecol**, v. 2015, p. 451247, 2015.

CRAIB, K. J. et al. Rectal gonorrhoea as an independent risk factor for HIV infection in a cohort of homosexual men. **Genitourin Med**, v. 71, n. 3, p. 150-4, 1995.

DAN, M. The use of fluoroquinolones in gonorrhoea: the increasing problem of resistance. **Expert Opin Pharmacother**, v. 5, n. 4, p. 829-54, 2004.

DANBY, C. S. et al. Patterns of Extragenital Chlamydia and Gonorrhoea in Women and Men Who Have Sex With Men Reporting a History of Receptive Anal Intercourse. **Sex Transm Dis**, v. 43, n. 2, p. 105-9, 2016.

DAVIES, C. et al. Ribosomal proteins S5 and L6: high-resolution crystal structures and roles in protein synthesis and antibiotic resistance. **J Mol Biol**, v. 279, n. 4, p. 873-88, 1998.

DE VRIES, H. J. et al. 2013 European Guideline on the management of proctitis, proctocolitis and enteritis caused by sexually transmissible pathogens. **Int J STD AIDS**, v. 25, n. 7, p. 465-74, 2014.

DEGUCHI, T. et al. DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 2, p. 561-3, 1995.

DEL RIO, C. et al. Comparison of isolates of *Neisseria gonorrhoeae* causing meningitis and report of gonococcal meningitis in a patient with C8 deficiency. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 5, p. 1045-9, 1989.

DETELS, R. et al. The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*

infections in selected populations in five countries. **Sex Transm Dis**, v. 38, n. 6, p. 503-9, 2011.

DILLON JR; DUCK P; THOMAS DY. Molecular and Phenotypic Characterization of PenicillinaseProducing Neisseria gonorrhoeae from Canadian Sources. **Agents Chemother**, v. 19, p. 952-7, 1981.

DILLON JR; DUCK P; THOMAS DY. Molecular and Phenotypic Characterization of PenicillinaseProducing Neisseria gonorrhoeae from Canadian Sources. **Agents Chemother**, v. 19, p. 952-7, 1981.

DILLON, J. A. et al. Reduced susceptibility to azithromycin and high percentages of penicillin and tetracycline resistance in Neisseria gonorrhoeae isolates from Manaus, Brazil, 1998. **Sex Transm Dis**, v. 28, n. 9, p. 521-6, 2001.

DILLON, J. A. et al. Reduced susceptibility to azithromycin and high percentages of penicillin and tetracycline resistance in Neisseria gonorrhoeae isolates from Manaus, Brazil, 1998. **Sex Transm Dis**, v. 28, n. 9, p. 521-6, 2001.

DILLON, J. A.; TRECKER, M. A.; THAKUR, S. D. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. **Sex Transm Infect**, v. 89 Suppl 4, p. iv36-41, 2013.

DILLON, J. A.; TRECKER, M. A.; THAKUR, S. D. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. **Sex Transm Infect**, v. 89 Suppl 4, p. iv36-41, 2013.

DILLON, J. R.; PAUZE, M.; YEUNG, K. H. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to Neisseria meningitidis. **Lancet**, v. 1, n. 8328, p. 779-81, 1983.

DOHLE, G. R. Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. **Andrologia**, v. 35, n. 5, p. 321-4, 2003.

DOUTHWAITE, S.; CHAMPNEY, W. S. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. **J Antimicrob Chemother**, v. 48 Suppl T1, p. 1-8, 2001.

EASTICK, K. Gonococcal antibiotic surveillance in Scotland (GASS): prevalence, patterns and trends in 2009. **Health Protection Scotland Weekly Report.**, v. 44, n. 34, 2010.

EBERGSTRÖM S et al. Contribution of a TEM-1-like beta-lactamase to penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 13, p. 618–23, 1978.

ECDC. **Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* . Results from a pilot study 2010–2011.** . (ECDC), E. C. F. D. P. A. C. Stockholm 2012.

EDWARDS, J. L.; APICELLA, M. A. The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 965-81, table of contents, 2004.

EDWARDS, J. L.; BUTLER, E. K. The Pathobiology of *Neisseria gonorrhoeae* Lower Female Genital Tract Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 102, 2011.

ENGLAND, P. H. **UK case of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin and resistance to ceftriaxone acquired abroad.** REPORT, H. P. Inglaterra. 12 2018.

EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0.** 2018.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v. 8, n. 3, p. 186-94, 1998.

FERMER, C. et al. Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* as defined by site-directed mutagenesis could have its origin in other species. **J Bacteriol**, v. 177, n. 16, p. 4669-75, 1995.

FERNANDES, A. M. S. F. et al. **Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres atendidas em serviço de planejamento familiar.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 31: 235-240 p. 2009.

FERNANDEZ COBO, M. et al. Characterization of an outbreak of tetM-containing *Neisseria gonorrhoeae* in Argentina. **Int J STD AIDS**, v. 10, n. 3, p. 169-73, 1999.

FERNANDEZ COBO, M. et al. Characterization of an outbreak of tetM-containing *Neisseria gonorrhoeae* in Argentina. **Int J STD AIDS**, v. 10, n. 3, p. 169-73, 1999.

FERREIRA, W. A. et al. Genotyping of two *Neisseria gonorrhoeae* fluorquinolone-resistant strains in the Brazilian Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 3, 2011.

FERREIRA, W. A. et al. Genotyping of two *Neisseria gonorrhoeae* fluorquinolone-resistant strains in the Brazilian Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 3, 2011.

FERREIRA, W. A. et al. Molecular epidemiology of beta-lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Manaus, AM, Brazil. **Sex Transm Dis**, v. 40, n. 6, p. 469-72, 2013.

FERREIRA, W. A. et al. Resistência da *Neisseria gonorrhoeae* a antimicrobianos em Manaus: período 2005-2006. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 19, n. 2, p. 5, 2007.

FERREIRA, W. A. et al. Suscetibility of *Neisseria gonorrhoeae* to gentamicin, chloranphenicol and other antibiotics in Manaus, Amazon, Brazil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 27, n. 1-2, p. 3, 2015.

FERREIRA, W. A. et al. Suscetibility of *Neisseria gonorrhoeae* to gentamicin, chloranphenicol and other antibiotics in Manaus, Amazon, Brazil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 27, n. 1-2, p. 3, 2015.

FISHER, L. D.; FLETCHER, K. E.; BLAKE, D. R. Can the diagnosis of pelvic inflammatory disease be excluded without a bimanual examination? **Clin Pediatr (Phila)**, v. 43, n. 2, p. 153-8, 2004.

FLETT, F.; HUMPHREYS, G. O.; SAUNDERS, J. R. Intraspecific and intergeneric mobilization of non-conjugative resistance plasmids by a

24.5 megadalton conjugative plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Gen Microbiol**, v. 125, n. 1, p. 123-9, 1981.

FLORINDO, C. et al. Genotypes and antimicrobial-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Portugal (2004-2009). **Sex Transm Infect**, v. 86, n. 6, p. 449-53, 2010.

FOLSTER, J. P. et al. MtrR modulates rpoH expression and levels of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **J Bacteriol**, v. 191, n. 1, p. 287-97, 2009.

FURUYA, R. et al. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population. **J Infect Chemother**, v. 13, n. 5, p. 302-4, 2007.

FURUYA, R. et al. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population. **J Infect Chemother**, v. 13, n. 5, p. 302-4, 2007.

GALARZA, P. G. et al. Emergence of high level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain isolated in Argentina. **Sex Transm Dis**, v. 36, n. 12, p. 787-8, 2009.

GALARZA, P. G. et al. Emergence of high level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain isolated in Argentina. **Sex Transm Dis**, v. 36, n. 12, p. 787-8, 2009.

GALARZA, P. G. et al. New mutation in 23S rRNA gene associated with high level of azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 4, p. 1652-3, 2010.

GALARZA, P. G. et al. New mutation in 23S rRNA gene associated with high level of azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 4, p. 1652-3, 2010.

GALARZA, P.; GIANECINI, R. **Manual de Procedimiento: Diagnóstico y Susceptibilidad Antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae***. BACTERIOLOGÍA, L. N. D. R. E. E. S. E. D. T. S. D. D. Argentina: 40 p. 2015.

GALIMAND, M.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Spectinomycin resistance in *Neisseria* spp. due to mutations in 16S rRNA. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 5, p. 1365-6, 2000.

GASCOYNE-BINZI, D. M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P. M. Nucleotide sequences of the tet(M) genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 32, n. 5, p. 667-76, 1993.

GAUDET, R. G. et al. INNATE IMMUNITY. Cytosolic detection of the bacterial metabolite HBP activates TIFA-dependent innate immunity. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1251-5, 2015.

GAYDOS, C.; HARDICK, J. Point of care diagnostics for sexually transmitted infections: perspectives and advances. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 12, n. 6, p. 657-72, 2014.

GIANECINI, R. et al. Identification of TEM-135 beta-lactamase in *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying African and Toronto plasmids in Argentina. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 1, p. 717-20, 2015a.

GIANECINI, R. et al. Prevalence of bla TEM-220 gene in Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying Toronto/Rio plasmid in Argentina, 2002 - 2011. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 571, 2015b.

GIANECINI, R. et al. Prevalence of bla TEM-220 gene in Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying Toronto/Rio plasmid in Argentina, 2002 - 2011. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 571, 2015b.

GIMENES, F. et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. **Nat Rev Urol**, v. 11, n. 12, p. 672-87, 2014.

GOIRE, N. et al. Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 3, p. 223-9, 2014.

GOLPARIAN, D. et al. Emergence, spread and characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with in vitro decreased susceptibility and

resistance to extended-spectrum cephalosporins in Sweden. **Sex Transm Infect**, v. 86, n. 6, p. 454-60, 2010.

GOODMAN, S. D.; SCOCCA, J. J. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 18, p. 6982-6, 1988.

HAMILTON, H. L.; DILLARD, J. P. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. **Mol Microbiol**, v. 59, n. 2, p. 376-85, 2006.

HANANTA, I. P. Y. et al. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* strains circulating in Indonesia using multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing (NG-MAST) techniques. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 7, 2018.

HARVEY, H. A. et al. Gonococcal lipooligosaccharide is a ligand for the asialoglycoprotein receptor on human sperm. **Mol Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 1059-70, 2000.

HAUCK, C. R.; MEYER, T. F. 'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 43-9, 2003.

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*. **J Bacteriol**, v. 189, n. 8, p. 3198-207, 2007.

HIGASHI, D. L. et al. Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment: microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 4743-53, 2007.

HJELMEVOLL, S. O. et al. Phenotypic and genotypic properties of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Norway in 2009: antimicrobial resistance warrants an immediate change in national management guidelines. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 6, p. 1181-6, 2012.

HOOK, E. W., 3RD; KIRKCALDY, R. D. A Brief History of Evolving Diagnostics and Therapy for Gonorrhea: Lessons Learned. **Clin Infect Dis**, 2018.

HOOK, E. W., 3RD; KIRKCALDY, R. D. A Brief History of Evolving Diagnostics and Therapy for Gonorrhea: Lessons Learned. **Clin Infect Dis**, 2018.

HORN, N. N. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 5-6, p. 586-91, 2014.

HORN, N. N. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 5-6, p. 586-91, 2014.

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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4327-34, 2005.

IKEDA, F. et al. Conjugal transfer of beta-lactamase-producing plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* to *Neisseria meningitidis*. **Microbiol Immunol**, v. 30, n. 8, p. 737-42, 1986.

ILINA, E. N. et al. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Front Microbiol**, v. 4, p. 186, 2013.

ISON, C. A. et al. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. **Euro Surveill**, v. 16, n. 14, 2011.

ITO, M. et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 1, p. 137-43, 2005.

ITO, M. et al. Remarkable increase in central Japan in 2001-2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to

penicillin, tetracycline, oral cephalosporins, and fluoroquinolones. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3185-7, 2004.

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

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

JAVANBAKHT, M. et al. Prevalence and correlates of rectal Chlamydia and gonorrhea among female clients at sexually transmitted disease clinics. **Sex Transm Dis**, v. 39, n. 12, p. 917-22, 2012.

KALLSTROM, H. et al. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. **Mol Microbiol**, v. 25, n. 4, p. 639-47, 1997.

KAPARAKIS, M. et al. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 3, p. 372-85, 2010.

KASPER, D. L. et al. **Medicina Interna de Harrison**. 2017.

KATZ, A. R. et al. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: case report of the first isolate identified in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 841-3, 2012.

KATZ, A. R. et al. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: case report of the first isolate identified in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 841-3, 2012.

KENT, C. K. et al. Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal chlamydia and gonorrhea detected in 2 clinical settings among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 1, p. 67-74, 2005.

KIRKCALDY, R. D. et al. Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* azithromycin susceptibility in the United States by the Gonococcal

Isolate Surveillance Project, 2005 to 2013. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 2, p. 998-1003, 2015.

KIRKCALDY, R. D. et al. Analysis of *Neisseria gonorrhoeae* azithromycin susceptibility in the United States by the Gonococcal Isolate Surveillance Project, 2005 to 2013. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 2, p. 998-1003, 2015.

KNAPP, J. S. et al. High-level tetracycline resistance resulting from TetM in strains of *Neisseria* spp., *Kingella denitrificans*, and *Eikenella corrodens*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 32, n. 5, p. 765-7, 1988.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**

KORENROMP, E. L. et al. What proportion of episodes of gonorrhoea and chlamydia becomes symptomatic? **Int J STD AIDS**, v. 13, n. 2, p. 91-101, 2002.

KRIEG, N. et al. **Bergey's Manual of Systems Bacteriology**. Second Edition. USA: 2010. 976

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v. 33, n. 7, p. 1870-4, 2016.

KUNZ, A. N. et al. Impact of fluoroquinolone resistance mutations on gonococcal fitness and in vivo selection for compensatory mutations. **J Infect Dis**, v. 205, n. 12, p. 1821-9, 2012.

LAHRA, M. M. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian Regions, 2010. **Commun Dis Intell Q Rep**, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2012.

LAHRA, M. M. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian Regions, 2010. **Commun Dis Intell Q Rep**, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2012.

LEE, H. et al. Emergence of decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 9, p. 2536-42, 2015.

LEE, H. et al. Emergence of decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 9, p. 2536-42, 2015.

LEWIS, D. A. Global resistance of *Neisseria gonorrhoeae*: when theory becomes reality. **Current opinion in infectious diseases**, United States, v. 27, n^o 1, p. 62–67, 2014.

LEWIS, D. A. Global resistance of *Neisseria gonorrhoeae*: when theory becomes reality. **Curr Opin Infect Dis**, v. 27, n. 1, p. 62-7, 2014.

LEWIS, D. A. The Gonococcus fights back: is this time a knock out? **Sex Transm Infect**, v. 86, n. 6, p. 415-21, 2010.

LEWIS, D. A.; LUKEHART, S. A. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*: evolution, therapeutic challenges and the need to strengthen global surveillance. **Sex Transm Infect**, v. 87 Suppl 2, p. ii39-43, 2011.

LINDBACK, E. et al. Mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in quinolone-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **APMIS**, v. 110, n. 9, p. 651-7, 2002.

LINDBERG, R. et al. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 6, p. 2117-22, 2007.

LIU, B. et al. Chlamydia and gonorrhoea infections and the risk of adverse obstetric outcomes: a retrospective cohort study. **Sex Transm Infect**, v. 89, n. 8, p. 672-8, 2013.

LIU, Y.; LIU, W.; RUSSELL, M. W. Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin 10 and type 1 regulatory T cells. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 1, p. 165-76, 2014.

LO, J. Y.; HO, K. M.; LO, A. C. Surveillance of gonococcal antimicrobial susceptibility resulting in early detection of emerging resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 6, p. 1422-6, 2012.

- LUDWIG, M. Diagnosis and therapy of acute prostatitis, epididymitis and orchitis. **Andrologia**, v. 40, n. 2, p. 76-80, 2008.
- MAK, D. B. et al. A large outbreak of conjunctivitis caused by a single genotype of *Neisseria gonorrhoeae* distinct from those causing genital tract infections. **Epidemiol Infect**, v. 126, n. 3, p. 373-8, 2001.
- MARQUEZ, C. M. et al. Detection of a novel Tet M determinant in tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* from Uruguay, 1996-1999. **Sex Transm Dis**, v. 29, n. 12, p. 792-7, 2002.
- MARTIN, I. et al. Antimicrobial susceptibilities and distribution of sequence types of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Canada: 2010. **Can J Microbiol**, v. 59, n. 10, p. 671-8, 2013.
- MARTIN, I. et al. Decline in Decreased Cephalosporin Susceptibility and Increase in Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 1, p. 65-7, 2016.
- MARTIN, I. et al. Decline in Decreased Cephalosporin Susceptibility and Increase in Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 1, p. 65-7, 2016.
- MARTIN, I. et al. Emergence and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and cefixime in Canada: 2001-2010. **Sex Transm Dis**, v. 39, n. 4, p. 316-23, 2012.
- MARTIN, I. M. et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. **J Infect Dis**, v. 189, n. 8, p. 1497-505, 2004.
- MARTINS, J. M. **Relatório de Qualificação de Mestrado: Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aminoglicosídeos e comparação de metodologias para testes de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Neisseria gonorrhoeae* na grande Florianópolis**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina 2018.

MAVROGIORGOS, N. et al. Activation of NOD receptors by *Neisseria gonorrhoeae* modulates the innate immune response. **Innate Immun**, v. 20, n. 4, p. 377-89, 2014.

MAYOR, M. T.; ROETT, M. A.; UDUHIRI, K. A. Diagnosis and management of gonococcal infections. **Am Fam Physician**, v. 86, n. 10, p. 931-8, 2012.

MICAELO, M. et al. Molecular epidemiology of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in France. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 12, p. 968-973, 2017.

MICAELO, M. et al. Molecular epidemiology of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in France. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 12, p. 968-973, 2017.

MITCHELL, C.; PRABHU, M. Pelvic inflammatory disease: current concepts in pathogenesis, diagnosis and treatment. **Infect Dis Clin North Am**, v. 27, n. 4, p. 793-809, 2013.

MORAN, J. S.; TIETZ, A.; MIETZNER, T. A. *Neisseria gonorrhoeae*: Epidemiology. 2017. Disponível em: <<http://www.antimicrobe.org/b105.asp>>.

MORGAN, M. K.; DECKER, C. F. Gonorrhea. **Dis Mon**, v. 62, n. 8, p. 260-8, 2016.

MORSE, S. A. et al. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 30, n. 5, p. 664-70, 1986.

MUHAMMAD, I. et al. Characterisation of bla(TEM) genes and types of β -lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* – the prevalent and conserved bla(TEM-135) has not recently evolved and existed in the Toronto plasmid from the origin. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 454, 2014.

MUHAMMAD, I. et al. Characterisation of bla(TEM) genes and types of β -lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* – the prevalent and conserved bla(TEM-135) has not recently evolved and existed in the

Toronto plasmid from the origin. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 454, 2014.

MULLER, E. E.; FAYEMIWO, S. A.; LEWIS, D. A. Characterization of a novel beta-lactamase-producing plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*: sequence analysis and molecular typing of host gonococci. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 7, p. 1514-7, 2011.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 2, 2016.

NAGAEV, I. et al. Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 433-9, 2001.

NAKAYAMA, S. et al. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 916-20, 2012.

NDOWA, F. J. et al. Gonococcal antimicrobial resistance: perspectives from the African region. **Sex Transm Infect**, v. 89 Suppl 4, p. iv11-5, 2013.

NDOWA, F. J. et al. Gonococcal antimicrobial resistance: perspectives from the African region. **Sex Transm Infect**, v. 89 Suppl 4, p. iv11-5, 2013.

NDOWA, F.; LUSTI-NARASIMHAN, M.; UNEMO, M. The serious threat of multidrug-resistant and untreatable gonorrhoea: the pressing need for global action to control the spread of antimicrobial resistance, and mitigate the impact on sexual and reproductive health. **Sex Transm Infect**, v. 88, n. 5, p. 317-8, 2012.

NDOWA, F.; LUSTI-NARASIMHAN, M.; UNEMO, M. The serious threat of multidrug-resistant and untreatable gonorrhoea: the pressing need for global action to control the spread of antimicrobial resistance, and mitigate the impact on sexual and reproductive health. **Sex Transm Infect**, v. 88, n. 5, p. 317-8, 2012.

NEMES-NIKODEM, E. et al. Antimicrobial susceptibility and genotyping analysis of Hungarian *Neisseria gonorrhoeae* strains in 2013. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 61, n. 4, p. 435-45, 2014.

NG, L. K. et al. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 9, p. 3020-5, 2002.

OCHIAI, S. et al. Decreased affinity of mosaic-structure recombinant penicillin-binding protein 2 for oral cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 1, p. 54-60, 2007.

OCHSENDORF, F. R. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. **Andrologia**, v. 40, n. 2, p. 72-5, 2008.

of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 6, p. 1142-51, 2009.

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**, v. 2, n. 5, 2011.

OHNISHI, M. et al. Identification of TEM-135 beta-lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 7, p. 3021-3, 2010.

OHNISHI, M. et al. Identification of TEM-135 beta-lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 7, p. 3021-3, 2010.

OHNISHI, M. et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 7, p. 3538-45, 2011.

OLESKY, M. et al. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. **J Bacteriol**, v. 188, n. 7, p. 2300-8, 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*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 9, p. 2811-20, 2002.

OLIVEIRA, A. M. F. et al. Arquivos de Ciências a Saúde Unipar. Umuarama. 8: 39-44 p. 2004.

OLSEN, B. et al. The *Neisseria gonorrhoeae* population in Sweden during 2005-phenotypes, genotypes and antibiotic resistance. **Apmis**, v. 116, n. 3, p. 181-9, 2008.

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. **J Infect Chemother**, v. 14, n. 3, p. 195-203, 2008.

OSEGBE, D. N. Testicular function after unilateral bacterial epididymo-orchitis. **Eur Urol**, v. 19, n. 3, p. 204-8, 1991.

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

PALMER, H. M. et al. Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 3, p. 490-4, 2008.

PALMER, H. M. et al. Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 3, p. 490-4, 2008.

PALMER, H. M. et al. Prediction of antibiotic resistance using *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing. **Sex Transm Infect**, v. 84, n. 4, p. 280-4, 2008.

PALMER, H. M.; LEEMING, J. P.; TURNER, A. A multiplex polymerase chain reaction to differentiate beta-lactamase plasmids of *neisseria gonorrhoeae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 45, n. 6, p. 777-82, 2000.

PANDORI, M. et al. Mosaic penicillin-binding protein 2 in *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in 2008 in San Francisco, California. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 9, p. 4032-4, 2009.

PASQUALI, F. et al. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 4, p. 562-5, 2005.

PASQUALI, F. et al. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 4, p. 562-5, 2005.

PEARCE, W. A.; BUCHANAN, T. M. Attachment role of gonococcal pili. Optimum conditions and quantitation of adherence of isolated pili to human cells in vitro. **J Clin Invest**, v. 61, n. 4, p. 931-43, 1978.

PELLATI, D. et al. Genital tract infections and infertility. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 140, n. 1, p. 3-11, 2008.

PHILLIPS, I. Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. **Lancet**, v. 2, n. 7987, p. 656-7, 1976.

PIAZZETTA, R. C. et al. [Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoea infections in sexual actives young women at a southern Brazilian city]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 11, p. 328-33, 2011.

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. **J Biol Chem**, v. 284, n. 2, p. 1202-12, 2009.

QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 226-240, 2018.

RAMAKRISHNAN, V.; WHITE, S. W. The structure of ribosomal protein S5 reveals sites of interaction with 16S rRNA. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 768-71, 1992.

RAMBAUT, A. Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology: FigTree United Kingdom, 2007. Disponível em: < <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> >. Acesso em: 8 de julho de 2018.

REGNATH, T.; MERTES, T.; IGNATIUS, R. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in south-west Germany, 2004 to 2015:

increasing minimal inhibitory concentrations of tetracycline but no resistance to third-generation cephalosporins. **Euro Surveill**, v. 21, n. 36, 2016.

REGNATH, T.; MERTES, T.; IGNATIUS, R. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in south-west Germany, 2004 to 2015: increasing minimal inhibitory concentrations of tetracycline but no resistance to third-generation cephalosporins. **Euro Surveill**, v. 21, n. 36, 2016.

RICE, P. A. Gonococcal arthritis (disseminated gonococcal infection). **Infect Dis Clin North Am**, v. 19, n. 4, p. 853-61, 2005.

RIM, J. H. et al. Recent Increase in the Incidence of TEM-135 β -Lactamase-harboring *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 38, n. 4, p. 324-330, 2018.

RIM, J. H. et al. Recent Increase in the Incidence of TEM-135 β -Lactamase-harboring *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 38, n. 4, p. 324-330, 2018.

Rio de Janeiro: 2008.

RISLEY, C. L. et al. Geographical and demographic clustering of gonorrhoea in London. **Sex Transm Infect**, v. 83, n. 6, p. 481-7, 2007.

ROBERTS, M. C. et al. Erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral commensal *Neisseria* spp. carry known rRNA methylase genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 6, p. 1367-72, 1999.

ROBERTS, M. C.; KNAPP, J. S. Host range of the conjugative 25.2-megadalton tetracycline resistance plasmid from *Neisseria gonorrhoeae* and related species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 32, n. 4, p. 488-91, 1988.

ROLSKOV, A. S. et al. Rapid change in the ciprofloxacin resistance pattern among *Neisseria gonorrhoeae* strains in Nuuk, Greenland: time to reconsider preventive and treatment strategies. **Int J Circumpolar Health**, v. 74, p. 26916, 2015.

ROLSKOV, A. S. et al. Rapid change in the ciprofloxacin resistance pattern among *Neisseria gonorrhoeae* strains in Nuuk, Greenland: time

to reconsider preventive and treatment strategies. **Int J Circumpolar Health**, v. 74, p. 26916, 2015.

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*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 3, p. 769-77, 2002.

ROZEN, D. E. et al. Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 2, p. 412-6, 2007.

SAIKA, T. et al. Comparison of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from the genital tract and pharynx of two gonorrhea patients. **J Infect Chemother**, v. 7, n. 3, p. 175-9, 2001.

SAIKA, T. et al. Comparison of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from the genital tract and pharynx of two gonorrhea patients. **J Infect Chemother**, v. 7, n. 3, p. 175-9, 2001.

SANTOS, T. **Avaliação da resistência de *Neisseria gonorrhoeae* aos antimicrobianos em uma série histórica de isolados da cidade de São Paulo. Dissertação de mestrado.** Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina -UFSC: 106 p. 2018.

SANTOS, T. **Avaliação da resistência de *Neisseria gonorrhoeae* aos antimicrobianos em uma série histórica de isolados da cidade de São Paulo. Dissertação de mestrado.** Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina -UFSC: 106 p. 2018.

SHIMUTA, K. et al. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 11, p. 5225-32, 2013.

SHIMUTA, K. et al. Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 378, 2015.

SHIMUTA, K. et al. Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 378, 2015.

SINGLETON, T. E.; MASSARI, P.; WETZLER, L. M. Neisserial porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3545-50, 2005.

SLEHA, R. et al. [Bacterial infection as a cause of infertility in humans]. **Epidemiol Mikrobiol Imunol**, v. 62, n. 1, p. 26-32, 2013.

SMITH, D. W.; TAPSALL, J. W.; LUM, G. Guidelines for the use and interpretation of nucleic acid detection tests for *Neisseria gonorrhoeae* in Australia: a position paper on behalf of the Public Health Laboratory Network. **Commun Dis Intell Q Rep**, v. 29, n. 4, p. 358-65, 2005.

SOX, T. E.; MOHAMMED, W.; SPARLING, P. F. Transformation-derived *Neisseria gonorrhoeae* plasmids with altered structure and function. **J Bacteriol**, v. 138, n. 2, p. 510-8, 1979.

SPARLING, P. F.; SARUBBI, F. A., JR.; BLACKMAN, E. Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. **J Bacteriol**, v. 124, n. 2, p. 740-9, 1975.

STARNINO, S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* in parts of Italy: detection of a multiresistant cluster circulating in a heterosexual network. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 10, p. 949-54, 2008.

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. **Sex Transm Dis**, v. 39, n. 10, p. 813-21, 2012.

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. **Sex Transm Dis**, v. 39, n. 10, p. 813-21, 2012.

STARNINO, S.; STEFANELLI, P. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 6, p. 1200-4, 2009.

STARNINO, S.; STEFANELLI, P. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 6, p. 1200-4, 2009.

STEFANELLI, P. et al. Molecular Characterization of Penicillinase-Producing *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Two Time Periods, 2003-2004 and 2014-2015, in Italy. **Microb Drug Resist**, v. 24, n. 5, p. 621-626, 2018.

STEFANELLI, P. et al. Molecular Characterization of Penicillinase-Producing *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Two Time Periods, 2003-2004 and 2014-2015, in Italy. **Microb Drug Resist**, v. 24, n. 5, p. 621-626, 2018.

STEICHEN, C. T. et al. The *Neisseria gonorrhoeae* biofilm matrix contains DNA, and an endogenous nuclease controls its incorporation. **Infect Immun**, v. 79, n. 4, p. 1504-11, 2011.

SWEDBERG, G.; FERMER, C.; SKOLD, O. Point mutations in the dihydropteroate synthase gene causing sulfonamide resistance. **Adv Exp Med Biol**, v. 338, p. 555-8, 1993.

TAKAHATA, S. et al. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3638-45, 2006.

TANAKA, M. et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 1, p. 20-6, 2006.

TANAKA, M. et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 1, p. 20-6, 2006.

TANAKA, M. et al. Antibiotic-resistant phenotypes and genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan: identification of strain clusters with multidrug-resistant phenotypes. **Sex Transm Dis**, v. 38, n. 9, p. 871-5, 2011.

TANAKA, M. et al. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 521-5, 2000.

TAPSALL, J. W. et al. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, n. 7, p. 821-34, 2009.

TAPSALL, J. W. et al. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian regions, 2007-2008. **Commun Dis Intell Q Rep**, v. 34, n. 1, p. 1-7, 2010a.

TAPSALL, J. W. et al. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian regions, 2007-2008. **Commun Dis Intell Q Rep**, v. 34, n. 1, p. 1-7, 2010a.

TAPSALL, J. W.; RAY, S.; LIMNIOS, A. Characteristics and population dynamics of mosaic *penA* allele-containing *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in Sydney, Australia, in 2007-2008. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 1, p. 554-6, 2010b.

TAYLOR, S. N. Epididymitis. **Clin Infect Dis**, v. 61 Suppl 8, p. S770-3, 2015.

THAKUR, S. D. et al. Resistance to Ceftriaxone and Azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates From 7 Countries of South America and the Caribbean: 2010-2011. **Sex Transm Dis**, v. 44, n. 3, p. 157-160, 2017.

THAKUR, S. D. et al. Resistance to Ceftriaxone and Azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates From 7 Countries of South America and the Caribbean: 2010-2011. **Sex Transm Dis**, v. 44, n. 3, p. 157-160, 2017.

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. **Biochemistry**, v. 49, n. 37, p. 8062-70, 2010.

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. **Int J Antimicrob Agents**, v. 12, n. 4, p. 325-32, 1999.

TRZCINSKI, K. et al. Incremental increase in fitness cost with increased beta -lactam resistance in pneumococci evaluated by competition in an infant rat nasal colonization model. **J Infect Dis**, v. 193, n. 9, p. 1296-303, 2006.

TURNER, A.; GOUGH, K. R.; LEEMING, J. P. Molecular epidemiology of tetM genes in *Neisseria gonorrhoeae*. **Sex Transm Infect**, v. 75, n. 1, p. 60-6, 1999.

UEHARA, A. A. et al. Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 12, p. 4208-12, 2011.

UNEMO M et al. **Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus.** . ORGANIZATION, W. H. Geneva, Switzerland: 228 p. 2013.

UNEMO, M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea - the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 364, 2015.

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

UNEMO, M. et al. Gonorrhoea and gonococcal antimicrobial resistance surveillance networks in the WHO European Region, including the independent countries of the former Soviet Union. **Sex Transm Infect**, v. 89 Suppl 4, p. iv42-6, 2013.

UNEMO, M. et al. Gonorrhoea and gonococcal antimicrobial resistance surveillance networks in the WHO European Region, including the

independent countries of the former Soviet Union. **Sex Transm Infect**, v. 89 Suppl 4, p. iv42-6, 2013.

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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 3, p. 1273-80, 2012.

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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 3, p. 1273-80, 2012.

UNEMO, M. et al. *Neisseria gonorrhoeae* population in Arkhangelsk, Russia: phenotypic and genotypic heterogeneity. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, n. 9, p. 873-8, 2007.

UNEMO, M. et al. *Neisseria gonorrhoeae* strain with high-level resistance to spectinomycin due to a novel resistance mechanism (mutated ribosomal protein S5) verified in Norway. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 2, p. 1057-61, 2013.

UNEMO, M. et al. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control

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. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 11, p. 3096-3108, 2016.

UNEMO, M. et al. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. **Euro Surveill**, v. 17, n. 25, 2012.

UNEMO, M. et al. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. **Euro Surveill**, v. 15, n. 47, 2010.

UNEMO, M.; DEL RIO, C.; SHAFER, W. M. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 3, 2016.

UNEMO, M.; 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? **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 1, p. 624-5, 2014.

UNEMO, M.; 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? **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 1, p. 624-5, 2014.

UNEMO, M.; GOLPARIAN, D.; HESTNER, A. Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden, July 2010. **Euro Surveill**, v. 16, n. 6, 2011.

UNEMO, M.; NICHOLAS, R. A. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. **Future Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 1401-22, 2012.

UNEMO, M.; NICHOLAS, R. A. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. **Future Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 1401-22, 2012.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1230, p. E19-28, 2011.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1230, p. E19-28, 2011.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. **Clinical microbiology reviews**, United States, v. 27, n^o 3, p. 587–613, 2014.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 3, p. 587-613, 2014.

VAN DER WOUDE, M. W.; BAUMLER, A. J. Phase and antigenic variation in bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 3, p. 581-611, table of contents, 2004.

VAN VLIET, S. J. et al. Variation of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide directs dendritic cell-induced T helper responses. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000625, 2009.

VIRJI, M. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 274-86, 2009.

WARNER, D. M.; SHAFER, W. M.; JERSE, A. E. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. **Mol Microbiol**, v. 70, n. 2, p. 462-78, 2008.

WATCHIRS SMITH, L. A. et al. Point-of-care tests for the diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection: a systematic review of operational and performance characteristics. **Sex Transm Infect**, v. 89, n. 4, p. 320-6, 2013.

WHILEY, D. et al. Penicillinase-producing plasmid types in *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates from Australia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 12, p. 7576-8, 2014.

WHILEY, D. et al. Penicillinase-producing plasmid types in *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates from Australia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 12, p. 7576-8, 2014.

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. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 12, p. 2543-7, 2010.

WHILEY, D. M. et al. Reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* is associated with mutations G542S, P551S and P551L in

the gonococcal penicillin-binding protein 2. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 8, p. 1615-8, 2010.

WHILEY, D. M. et al. The ticking time bomb: escalating antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is a public health disaster in waiting. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 9, p. 2059-61, 2012.

WHILEY, D. M.; TAPSALL, J. W.; SLOOTS, T. P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: an ongoing challenge. **J Mol Diagn**, v. 8, n. 1, p. 3-15, 2006.

WHO. **Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae***. RESEARCH, D. O. R. H. A. Geneva, Switzerland: 36 p. 2012.

WHO. **Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae***. RESEARCH, D. O. R. H. A. Geneva, Switzerland: 50 p. 2016.

WHO; CDC. Sexually Transmitted Pathogen for which there are Increasing Antimicrobial Resistance Concerns. In: (Ed.). **Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World**, 2003. cap. VI. *Neisseria gonorrhoeae*, p.62.

WHO; CDC. Sexually Transmitted Pathogen for which there are Increasing Antimicrobial Resistance Concerns. In: (Ed.). **Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World**, 2003. cap. VI. *Neisseria gonorrhoeae*, p.62.

WI, T. et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. v. 14, n. 7, p. e1002344, 2017.

WI, T. et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. v. 14, n. 7, p. e1002344, 2017.

ZHAO, S. et al. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 9, p. 3744-51, 2009.

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. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 1238-51, 2005.

ZHOU, X. et al. Hexa-acylated lipid A is required for host inflammatory response to *Neisseria gonorrhoeae* in experimental gonorrhea. **Infect Immun**, v. 82, n. 1, p. 184-92, 2014.

ZHU, W. et al. *Neisseria gonorrhoeae* suppresses dendritic cell-induced, antigen-dependent CD4 T cell proliferation. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41260, 2012.

APÊNDICE 1 - DILUIÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS PARA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)

Azitromicina (0,03-4 µg/mL)

Solução estoque: 1.000 µg/mL

Tubo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Água destilada (mL)	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração final, diluição no ágar 1:10(µg/mL)
1	1.000	Estoque	0,4	9,6	40	4
2	40	Tubo 1	2	2	20	2
3	40	Tubo 1	1	3	10	1
4	40	Tubo 1	1	7	5	0,5
5	5	Tubo 4	2	2	2,5	0,25
6	5	Tubo 4	1	3	1,25	0,125
7	5	Tubo 4	1	7	0,6	0,06
8	0,6	Tubo 7	2	2	2	0,03

Adaptado de (CLSI, 2018).

Cefixima (0,0005- 1,0 µg/mL)**Solução estoque: 1.000 µg/mL**

Tubo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Água destilada (mL)	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração final, diluição no ágar 1:10 (µg/mL)
1	1.000	Estoque	0,1	9,9	10	1
2	10	Tubo 1	2	2	5	0,5
3	10	Tubo 1	1	3	2,5	0,25
4	10	Tubo 1	1	7	1,25	0,125
5	1,25	Tubo 4	2	2	0,6	0,06
6	1,25	Tubo 4	1	3	0,3	0,03
7	1,25	Tubo 4	1	7	0,16	0,016
8	0,16	Tubo 7	2	2	0,08	0,008
9	0,16	Tubo 7	1	3	0,04	0,004
10	0,16	Tubo 7	1	7	0,02	0,002
11	0,02	Tubo 10	2	2	0,01	0,001
12	0,02	Tubo 10	1	3	0,005	0,0005

Adaptado de (CLSI, 2018).

Ceftriaxona (0,0005- 1,0 µg/mL)**Solução estoque: 1.000 µg/mL**

Tubo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Água destilada (mL)	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração final, diluição no ágar 1:10 (µg/mL)
1	1.000	Estoque	0,1	9,9	10	1
2	10	Tubo 1	2	2	5	0,5
3	10	Tubo 1	1	3	2,5	0,25
4	10	Tubo 1	1	7	1,25	0,125
5	1,25	Tubo 4	2	2	0,6	0,06
6	1,25	Tubo 4	1	3	0,3	0,03
7	1,25	Tubo 4	1	7	0,16	0,016
8	0,16	Tubo 7	2	2	0,08	0,008
9	0,16	Tubo 7	1	3	0,04	0,004
10	0,16	Tubo 7	1	7	0,02	0,002
11	0,02	Tubo 10	2	2	0,01	0,001
12	0,02	Tubo 10	1	3	0,005	0,0005

Adaptado de (CLSI, 2018).

Ciprofloxacina (0,001-32 µg/mL)**Solução estoque: 1.000 µg/mL**

Tubo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Água destilada (mL)	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração final, diluição no ágar 1:10(µg/mL)
1	1.000	Estoque	3,2	6,8	320	32
2	320	Tubo 1	2	2	160	16
3	320	Tubo 1	1	3	80	8
4	320	Tubo 1	1	7	40	4
5	40	Tubo 4	2	2	20	2
6	40	Tubo 4	1	3	10	1
7	40	Tubo 4	1	7	5	0,5
8	5	Tubo 7	2	2	2,5	0,25
9	5	Tubo 7	1	3	1,25	0,125
10	5	Tubo 7	1	7	0,6	0,06
11	0,6	Tubo 10	2	2	0,3	0,03
12	0,6	Tubo 10	1	3	0,16	0,016
13	0,6	Tubo 10	1	7	0,08	0,008
14	0,08	Tubo 13	2	2	0,04	0,004
15	0,08	Tubo 13	1	3	0,02	0,002
16	0,08	Tubo 13	1	7	0,01	0,001

Adaptado de (CLSI, 2018).

Penicilina (0,016-128 µg/mL)**Solução estoque: 10.000 µg/mL**

Tubo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Água destilada (mL)	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração final, diluição no ágar 1:10 (µg/mL)
1	10.000	Estoque	1,28	8,72	1280	128
2	1280	Tubo 1	2	2	640	64
3	1280	Tubo 1	1	3	320	32
4	1280	Tubo 1	1	7	160	16
5	160	Tubo 4	2	2	80	8
6	160	Tubo 4	1	3	40	4
7	160	Tubo 4	1	7	20	2
8	20	Tubo 7	2	2	10	1
9	20	Tubo 7	1	3	5	0,5
10	20	Tubo 7	1	7	2,5	0,25
11	2,5	Tubo 10	2	2	1,25	0,125
12	2,5	Tubo 10	1	3	0,6	0,06
13	2,5	Tubo 10	1	7	0,3	0,03
14	0,3	Tubo 13	2	2	0,16	0,016

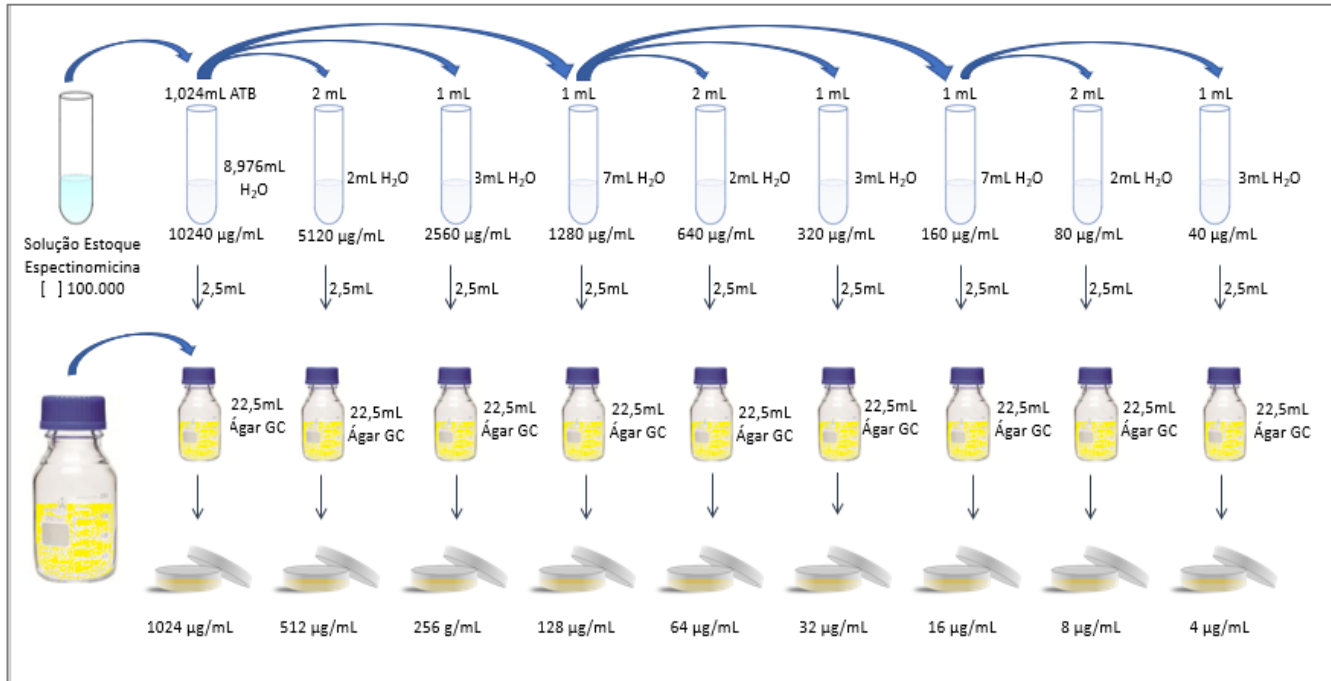
Adaptado de (CLSI, 2018).

Tetraciclina (0,06-32 µg/mL)**Solução estoque: 1.000 µg/mL**

Tubo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Água destilada (mL)	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração final, diluição no ágar 1:10 (µg/mL)
1	1000	Estoque	3,2	6,8	320	32
2	320	Tubo 1	2	2	160	16
3	320	Tubo 1	1	3	80	8
4	320	Tubo 1	1	7	40	4
5	40	Tubo 4	2	2	20	2
6	40	Tubo 4	1	3	10	1
7	40	Tubo 4	1	7	5	0,5
8	5	Tubo 7	2	2	2,5	0,25
9	5	Tubo 7	1	3	1,25	0,125
10	5	Tubo 7	1	7	0,06	0,06

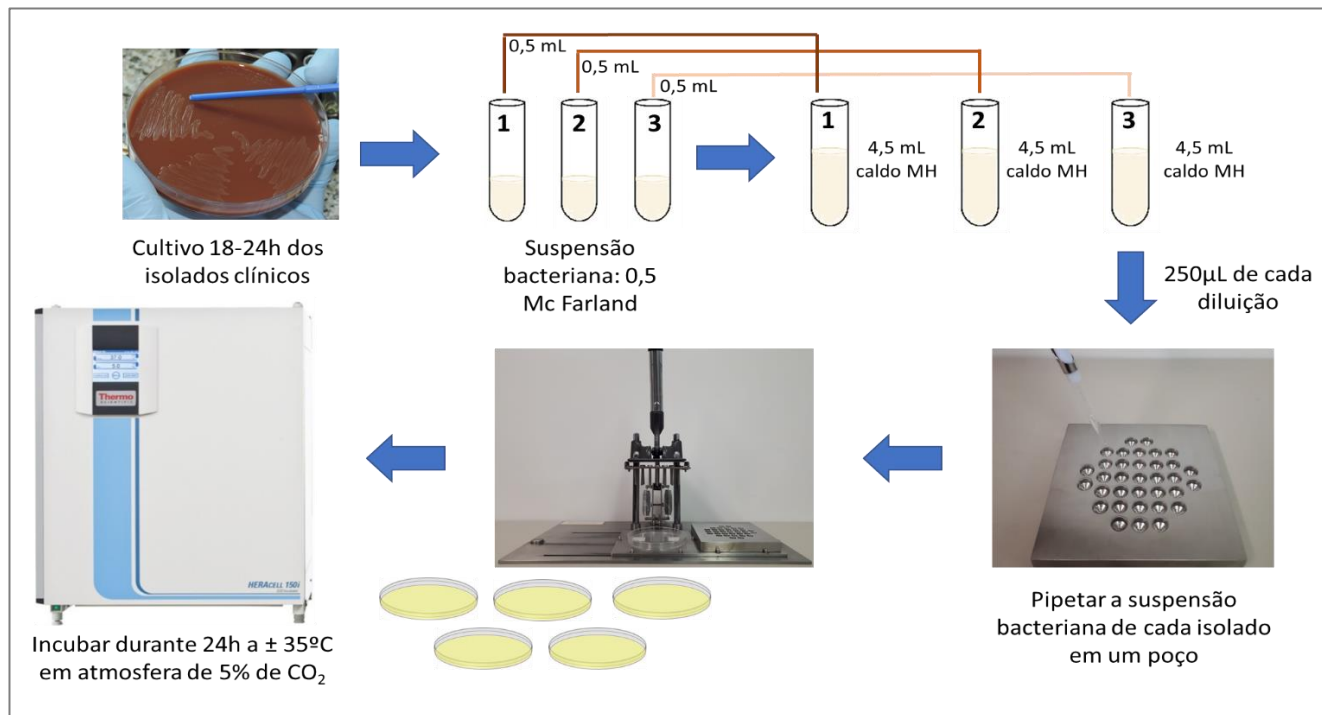
Adaptado de (CLSI, 2018).

APÊNDICE 2 - PREPARO DO MEIO COM ANTIMICROBIANO



Fonte: (MARTINS, 2018)

APÊNDICE 3: PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA E INOCULAÇÃO NAS PLACAS COM ANTIMICROBIANO



Fonte: (MARTINS, 2018)

APÊNDICE 4: CONTROLE DE QUALIDADE

Tabela 18: Intervalo de MIC aceitáveis e categorização sensibilidade das cepas referencia WHO recomendadas para o controle de qualidade da MIC.

AM (mg/L)	Cepas Referencia WHO ^a								ATCC
	WHO F	WHO G	WHO K	WHO L	WHO M	WHO N	WHO O	WHO P	49226 ^b
PEN	0,032 (S)	0,5 (I)	2,0 (R) CMRNG	2,0 (R) CMRNG	≥32,0(R) PPNG ^a	> 32,0 (R) PPNG ^a	>32 (R) PPNG ^a	0,25 (I)	0,25-1,0
CFX	<0,016 (S)	<0,016 (S)	0,25 (LLR)	0,125 (S)	<0,016 (S)	<0,016 (S)	0,016 (S)	<0,016 (S)	0,004-0,03
CRO	<0,002 (S)	0,008(S)	0,064 (S)	0,25 (LLR)	0,016 (S)	0,004 (S)	0,032 (S)	0,004 (S)	0,004-0,016
AZT	0,125(S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,5 (I)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	4,0 (R)	0,25-1,0
CIP	0,004 (S)	0,125 (LLR)	>32 (HLR)	>32 (HLR)	2,0 (R)	4,0 (R)	0,008 (S)	0,004 (S)	0,001-0,008
TET^c	0,25 (S)	32 (R) TRNG	2,0 (R)	2,0 (R)	2,0 (R)	16 (R) TRNG	2,0 (R)	1,0 (I)	0,25-1,0
β-lactamase	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não

AM: Antimicrobiano; PEN: Penicilina G, CFX: Cefixina; CRO: ceftriaxona, AZT: Azitromicina; CIP: Ciprofloxacino; TET: Tetraciclina; S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; LLR: *low-level resistant*; HLR: *high-level resistant*. ^a: As MICs aceitáveis para cada antimicrobiano é o valor da tabela ± uma diluição da MIC (UNEMO et al., 2016). ^b: Intervalo de MIC recomendados pelo CLSI (CLSI, 2018). ^c: Sempre é considerado PPNG pela produção da enzima β-lactamase, independente do valor da MIC (UNEMO et al., 2016).

