

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Jéssica Motta Martins

**Determinação da Concentração Inibitória Mínima de
Aminoglicosídeos e comparação de metodologias para testes de
sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de
*Neisseria gonorrhoeae***

Florianópolis

2019

Jéssica Motta Martins

**Determinação da Concentração Inibitória Mínima de
Aminoglicosídeos e comparação de metodologias para testes de
sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de
*Neisseria gonorrhoeae***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, área de concentração Análises Clínicas: Desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e monitoramento fisiopatológico e terapêutico.

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

Florianópolis

2019

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

Martins, Jéssica Motta

Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aminoglicosídeos e comparação de metodologias para testes de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Neisseria gonorrhoeae* / Jéssica Motta Martins ; orientador, Maria Luiza Bazzo, 2019.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Neisseria gonorrhoeae*. 3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. 4. disco difusão. 5. Ágar diluição. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO
INIBITÓRIA MÍNIMA DE AMINOGLICOSÍDEOS E
COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
TESTES DE SENSIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE *Neisseria
gonorrhoeae*”**

POR


Jessica Motta Martins

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

Banca Examinadora:



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



Prof(a). Dr(a). Jussara Kasuko Palmeiro (UFSC – Membro Titular)



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

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

Florianópolis, 22 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Professora orientadora Dr^a Maria Luiza Bazzo pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e de participar do grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS). Obrigada pela confiança no meu trabalho, pela compreensão e por todos os ensinamentos.

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

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e ao Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis.

À CAPES e o CNPQ pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório Médico Santa Luzia, em especial à Diretora Técnica Cássia Maria Zoccoli, por disponibilizar o banco de amostras da Grande Florianópolis e as farmacêuticas-bioquímicas Nina e Emanuelle.

Ao Dr. Roberto José Carvalho da Silva por fornecer as amostras do banco de São Paulo incluídas na realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Marcos José Machado, por me auxiliar com a análise estatística.

À farmacêutica-bioquímica Dr^a Mara Cristina Scheffer pela disponibilidade em corrigir o trabalho e também pelo apoio técnico e científico, o qual foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradecimento os meus colegas Renata, Mirela, Felipe, Manoela, Clarice, Taiane, Alisson, Fernando, Victor e a toda a equipe do LBMMS pela ajuda, pela troca de experiências, pelos ensinamentos e pela amizade diária.

Agradecimento em especial a Lisléia, Hanalydia e Marcos por todo o ensinamento, compreensão e paciência. Obrigada por acreditarem e me auxiliar na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Géssica, Fransueli, Pedro, André e Caio por todo o apoio, amizade e por serem minha família em Florianópolis.

Às minhas amigas Mariana e Josiane que sempre estiveram comigo, obrigado por me ouvirem, por me apoiarem em todos os momentos.

Aos meus pais Antonio e Eva por serem minha base, meu apoio incondicional. Vocês nunca mediram esforços para realizar meus sonhos e me ajudar no que fosse necessário. Obrigada por todo o apoio, educação e ensinamentos, obrigada por sonharem comigo e por serem esses pais maravilhosos. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço a minha família, aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, não importa a distância, vocês sempre estão comigo.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

RESUMO

A gonorreia é uma infecção sexualmente transmissível causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae*. Estima-se incidência anual da infecção de mais de 78 milhões de casos no mundo. O gonococo tem demonstrado uma extraordinária capacidade de desenvolver resistência, como já descrito para os diversos antimicrobianos utilizados no seu tratamento, desde as sulfonamidas, penicilina, tetraciclina, azitromicina até as cefalosporinas de espectro estendido, utilizadas atualmente. Com as opções de tratamento limitadas e a transmissão descontrolada, é de extrema importância avaliar outras opções terapêuticas, bem como, viabilizar que os laboratórios de rotina tenham capacidade de realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. O padrão ouro para determinar a sensibilidade em isolados de *N. gonorrhoeae* é a metodologia de concentração inibitória mínima (MIC) por ágar diluição, no entanto, os laboratórios de rotina costumam utilizar o método de disco difusão. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos gentamicina e espectinomicina em isolados brasileiros de *N. gonorrhoeae*, e comparar os resultados dos antibiogramas obtidos por metodologia de disco difusão, com os resultados por ágar diluição. Foram avaliados 336 isolados provenientes da Grande Florianópolis e de São Paulo, coletados entre os anos de 2003 e 2016. Além de determinar as MICs para gentamicina e espectinomicina por diluição em ágar, o estudo realizou disco difusão para os antimicrobianos azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacino, espectinomicina, gentamicina, penicilina e tetraciclina. Todos os 336 isolados foram sensíveis à espectinomicina, a sensibilidade à gentamicina foi observada em 80,6% (271/336) dos isolados, sendo que 19,4% (65/336) apresentou sensibilidade intermediária. Na comparação entre as metodologias de ágar diluição e disco difusão, foram observadas discordâncias para alguns antimicrobianos, no entanto, todas estavam dentro dos limites aceitáveis pelo CLSI. O estudo mostrou que a espectinomicina e a gentamicina são opções promissoras para o tratamento da gonorreia no Brasil e que a metodologia de disco difusão pode ser utilizada pelos laboratórios de rotina para avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana em isolados de *N. gonorrhoeae*.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*. Concentração inibitória mínima. Gentamicina. Espectinomicina. Ágar diluição. Disco difusão.

ABSTRACT

Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Aminoglycosides and comparison of methodologies for antimicrobial susceptibility testing in *Neisseria gonorrhoeae* isolates

Gonorrhea is a sexually transmitted infection caused by the bacterium *Neisseria gonorrhoeae*. It is estimated annual incidence of infection in more than 78 million cases worldwide. Gonococcus has shown an extraordinary ability to develop resistance, as already described for the various antimicrobials used in its treatment, from the sulfonamides, penicillin, tetracycline, azithromycin to the extended spectrum cephalosporins currently used. With limited treatment options and uncontrolled transmission, it is extremely important to evaluate other therapeutic options, as well as to enable routine laboratories to be able to perform the antimicrobial susceptibility test. The gold standard for determining sensitivity in *N. gonorrhoeae* isolates is the methodology of minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution, however, routine laboratories usually use the disk diffusion method. The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of gentamicin and spectinomycin in Brazilian isolates of *N. gonorrhoeae* and to compare the results of the antibiograms obtained by disc diffusion methodology with the results by agar dilution. A total of 336 isolates from Greater Florianopolis and Sao Paulo were collected between 2003 and 2016. Besides the MIC determination for gentamicin and spectinomycin by agar dilution, the study performed disk diffusion for the antimicrobials azithromycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, spectinomycin, gentamicin, penicillin and tetracycline. All 336 isolates were sensitive to spectinomycin; sensitivity to gentamicin was observed in 80.6% (271/336) of the isolates, and 19.4% (65/336) presented intermediate sensitivity. In the comparison between agar dilution and disk diffusion methodologies, disagreements were observed for some antimicrobials, however, all were within the limits acceptable by CLSI. The study showed that spectinomycin and gentamicin are promising options for the treatment of gonorrhea in Brazil and the disc diffusion methodology can be used by laboratories in the routine to evaluate the profile of antimicrobial sensitivity in *N. gonorrhoeae* isolates.

Keywords: *Neisseria. gonorrhoeae*. Minimum Inhibitory Concentration. Gentamicin. Spectinomycin. Agar dilution. Disk diffusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência da infecção por <i>N. gonorrhoeae</i> em diferentes estudos realizados no Brasil.	27
Figura 2: Preparo do meio com antimicrobiano espectinomicina.....	41
Figura 3: Replicador do tipo <i>Steers</i>	42
Figura 4: Figura representativa das placas para a leitura após a incubação.	43
Figura 5: Distribuição dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para espectinomicina em Florianópolis e em São Paulo.	51
Figura 6: Distribuição dos 153 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para espectinomicina na Grande Florianópolis.	51
Figura 7: Distribuição dos 183 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para espectinomicina em São Paulo.	52
Figura 8: Distribuição dos 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para espectinomicina nos isolados do estudo.	54
Figura 9: Distribuição dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para gentamicina em Florianópolis e em São Paulo.	57
Figura 10: Distribuição dos 153 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para espectinomicina na Grande Florianópolis.	58
Figura 11: Distribuição dos 183 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para gentamicina em São Paulo.	59
Figura 12: Distribuição dos 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC para gentamicina nos isolados do estudo.	60
Figura 13: Figura representativa do halo mal definido/difuso.	63
Figura 14: Halos de inibição dos discos de gentamicina	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: MIC da tetraciclina versus diâmetros de leitura do halo de inibição externo para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	64
Quadro 2: MIC da tetraciclina versus diâmetros de leitura do halo de inibição interno para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	64
Quadro 3: MIC da azitromicina versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> utilizando os critérios de interpretação do EUCAST.	65
Quadro 4: MIC da azitromicina versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> utilizando os critérios de interpretação do CLSI.	66
Quadro 5: MIC da ceftriaxona versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	67
Quadro 6: MIC do ciprofloxacino versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	68
Quadro 7: MIC da espectinomicina versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	69
Quadro 8: MIC da gentamicina versus diâmetros de inibição utilizando os discos DME para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	70
Quadro 9: MIC da gentamicina versus diâmetros de inibição utilizando os discos da Oxoid para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	70
Quadro 10: MIC da penicilina versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	72
Quadro 11: MIC e diâmetro da zona de inibição da azitromicina no teste de reprodutibilidade utilizando os critérios de interpretação do CLSI..	74
Quadro 12: MIC e diâmetro da zona de inibição da espectinomicina no teste de reprodutibilidade	74
Quadro 13: MIC e diâmetro da zona de inibição da gentamicina no teste de reprodutibilidade utilizando os discos DME	75
Quadro 14: MIC e diâmetro da zona de inibição da gentamicina no teste de reprodutibilidade utilizando os discos Oxoid.	75
Quadro 15: MIC e diâmetro da zona de inibição da azitromicina no teste de reprodutibilidade utilizando os critérios de interpretação do EUCAST.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diluição em série da espectinomicina.....	40
Tabela 2: Diluição em série da gentamicina	41
Tabela 3: Critérios de interpretação de sensibilidade em isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	43
Tabela 4: Interpretação da leitura do diâmetro da zona de inibição.....	45
Tabela 5: Critérios de interpretação de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>	46
Tabela 6: Tipos de erro e as taxas aceitáveis de acordo com o CLSI.	47
Tabela 7: Distribuição dos isolados clínicos por ano e local.	49
Tabela 8: Tipo de amostra utilizada para isolar a bactéria e procedência do isolado.....	50
Tabela 9: Distribuição dos 153 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para espectinomicina na Grande Florianópolis.	52
Tabela 10: Distribuição dos 183 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para espectinomicina em São Paulo.	53
Tabela 11: Associação da MIC <i>borderline</i> para espectinomicina nos isolados, por procedência.....	53
Tabela 12: Distribuição dos 153 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para gentamicina na Grande Florianópolis.	58
Tabela 13: Distribuição dos 183 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> de acordo com a MIC por ano para gentamicina em São Paulo.....	59
Tabela 14: Associação da MIC com sensibilidade intermediária para gentamicina nos isolados, por procedência.....	60
Tabela 15: Concentração Inibitória mínima em µg/mL das cepas WHO ^a	91
Tabela 16: Diâmetro do halo de inibição das cepas WHO.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSAC	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
COR₂	Dióxido de carbono
DHPS	Dihidropteroato sintase, do inglês <i>dihydropteroate synthase</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</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>
Euro-GASP	Programa Europeu de Vigilância Gonocócica aos Antimicrobianos
g	Grama
IM	Intramuscular
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
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>
OMS	Organização Mundial da Saúde
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>
UFC	Unidade formadora de colônia
µg	Micrograma
VO	Via oral
XDR	Extensivamente resistente aos fármacos, do inglês <i>extensive drug resistance</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Agente etiológico	25
2.2	Manifestações clínicas	25
2.3	Epidemiologia	26
2.4	Diagnóstico Laboratorial.....	28
2.5	Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	29
2.6	Opções terapêuticas e mecanismos	30
2.7	Recomendação atual de Tratamento	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	METODOLOGIA	39
4.1	Descrição do estudo	39
4.2	Amostragem.....	39
4.3	Cultivo e isolamento	39
4.4	Determinação da concentração inibitória mínima por metodologia de ágar diluição para espectinomicina e gentamicina.....	40
4.4.1	Solução estoque dos antimicrobianos	40
4.4.2	Diluição do antimicrobiano e preparo do meio GC com o antimicrobiano	40
4.4.3	Preparo do inóculo, inoculação e leitura	41
4.5	Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pela metodologia de disco difusão	44
4.5.1	Antimicrobianos e preparo do meio de cultura	44
4.5.2	Preparo do inóculo, inoculação e leitura	44
4.6	Comparação de resultados: disco difusão e ágar diluição	45
4.7	Critérios adotados para estudo de reprodutibilidade	47
4.8	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i>	49

5.2	Determinação da concentração inibitória mínima pela metodologia de ágar diluição	50
5.2.1	Espectinomicina	50
5.2.2	Gentamicina	57
5.3	Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pela metodologia de disco difusão e comparação com ágar diluição	63
5.3.1	Leitura dos halos de inibição por disco difusão.....	63
5.3.2	Azitromicina	65
5.3.3	Ceftriaxona	67
5.3.4	Ciprofloxacino	68
5.3.5	Espectinomicina	69
5.3.6	Gentamicina	69
5.3.7	Penicilina	72
5.3.8	Tetraciclina.....	73
5.3.9	Reprodutibilidade	73
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE A – Concentração inibitória mínima das cepas WHO	91
	APÊNDICE B – Diâmetro do halo de inibição das cepas WHO	93
	APÊNDICE C – Comparação dos resultados das cepas WHO do teste de sensibilidade com os pontos de corte do EUCAST	95

1 INTRODUÇÃO

A gonorreia é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pelo agente etiológico *Neisseria gonorrhoeae*, um diplococo gram-negativo, para o qual os humanos são os únicos hospedeiros (LEWIS, 2014; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A gonorreia continua sendo uma grande preocupação global de saúde pública, pois possui incidência mundial de mais de 78 milhões de casos por ano (WHO, 2016), sendo a segunda IST bacteriana mais comumente relatada (CANADA, 2016; GRASP, 2016; CDC, 2017).

N. gonorrhoeae pode infectar a mucosa genital, anal, da orofaringe e da conjuntiva e é sempre considerada patogênica, independente do seu sítio de isolamento. A infecção é transmitida principalmente de um indivíduo infectado pelo contato direto entre as mucosas, geralmente durante a atividade sexual. A conjuntivite neonatal, pode ocorrer durante o parto vaginal. Em homens, causa uretrite, geralmente sintomática, e em mulheres cervicite assintomática em aproximadamente 50% dos casos. Os casos de infecções retais e faríngeas também são geralmente assintomáticos. As infecções urogenitais, se não tratadas, podem ascender ao trato genital superior, resultando em complicações reprodutivas graves, incluindo a infertilidade. Além disso, a infecção não tratada também pode evoluir para infecção gonocócica disseminada, gerando artrite infecciosa e endocardite (COSTA-LOURENÇO et al., 2017; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016; UNEMO; SHAFER, 2014).

Três metodologias podem ser utilizadas para determinar a sensibilidade antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*. O teste de ágar diluição é o padrão-ouro e é realizado principalmente por laboratórios de referência para determinar a concentração inibitória mínima (MIC). As fitas de gradiente de concentração também determinam a MIC, sendo uma alternativa ao método de ágar diluição. A determinação da MIC é fundamental para programas de vigilância do perfil de sensibilidade de *N. gonorrhoeae*, pois monitora diminuição dos níveis de sensibilidade, observado em alguns casos, antes do microrganismo apresentar resistência ao antimicrobiano. No entanto, o teste do disco difusão é o mais utilizado por laboratórios de microbiologia e hospitais em todo o mundo para determinar a sensibilidade antimicrobiana. Esse teste fornece uma classificação categórica do perfil de sensibilidade do antimicrobiano (sensível, sensibilidade intermediária, resistente) (BOLAN; SPARLING;

WASSERHEIT, 2012; LIU et al., 2016) *N. gonorrhoeae* tem uma capacidade extraordinária de alterar seu DNA, principalmente quando exposta à pressão seletiva. Desta forma, ela evoluiu e adquiriu diferentes mecanismos de resistência a todos os antimicrobianos utilizados para o tratamento (UNEMO; SHAFER, 2014). No cenário atual, com a descrição de *N. gonorrhoeae* XDR (*extensive drug resistant*), é de extrema importância o desenvolvimento de novos antimicrobianos bem como o monitoramento do perfil de sensibilidade dos isolados circulantes frente a antimicrobianos mais antigos como por exemplo, os aminoglicosídeos (LAGACÉ-WIENS et al., 2017; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016). Estes constituem uma classe de antimicrobianos de estrutura química complexa, possuem atividade sobre bacilos gram-negativos e em concentrações elevadas, os aminoglicosídeos espectinomicina e gentamicina são ativos contra *N. gonorrhoeae* (BOLLELA, 2018; TAVARES, 1996).

A determinação da MIC é importante para monitorar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por *N. gonorrhoeae* e assim servir como guia para subsidiar as políticas públicas que estabelecem as diretrizes e protocolos de tratamento. A Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio do Manual GLASS (*Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*) recomenda que seja avaliado o perfil de sensibilidade de *N. gonorrhoeae* para os antimicrobianos espectinomicina e gentamicina, entre outros antimicrobianos (WHO, 2015). No Brasil, observou-se que o nível de resistência à penicilina, tetraciclina e ao ciprofloxacino é alto (BAZZO et al., 2018), e atualmente pouco se sabe sobre o perfil de sensibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* à espectinomicina e a gentamicina, o que justifica os objetivos do presente trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Neisseria gonorrhoeae é o agente etiológico da gonorreia. É um diplococo gram-negativo que mede entre 0,6 e 1,5 μm , imóvel, não flagelado, aeróbicos capnofílicos (preferem concentração aumentada (3-7%) de dióxido de carbono (CO_2), e podem ou não apresentar cápsula. Pertence à família *Neisseriaceae* e ao gênero *Neisseria* que apresenta 2 espécies patogênicas para humanos, sendo elas *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* e cerca de 30 espécies não patogênicas, como por exemplo *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. subflava* e *N. mucosa*, que frequentemente habitam o trato respiratório superior como comensais. Os humanos são os únicos hospedeiros de *N. gonorrhoeae*, microrganismo capaz de infectar a mucosa genital, anal, orofaringe e conjuntiva, sendo sempre considerada patogênica, independente do seu sítio de isolamento. *N. gonorrhoeae* é um micro-organismo fastidioso e, por isso, requer meios de cultura nutricionalmente enriquecidos para seu crescimento *in vitro* (PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; UNEMO et al., 2013; LEWIS, 2014).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

N. gonorrhoeae infecta principalmente a mucosa urogenital, podendo infectar também a mucosa ocular, retal e orofaríngea. A gonorreia é transmitida de um indivíduo infectado, por contato direto entre as membranas mucosas do trato urogenital, retal ou orofaríngea, geralmente durante a atividade sexual (UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016).

Na infecção urogenital masculina, a uretrite aguda se desenvolve a partir da resposta inflamatória dirigida ao gonococo, sendo que uma das características da doença gonocócica sintomática em homens é a presença de secreção uretral purulenta, que está associada ao influxo de leucócitos polimorfonucleares. Os sintomas são dor ou sensação de queimação durante a micção, além do corrimento uretral. A infecção masculina não tratada pode evoluir para epididimite, estenose uretral e infertilidade. Uma pequena porcentagem de homens pode desenvolver uretrite gonocócica assintomática (EDWARDS; APICELLA, 2004; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016).

Nas mulheres, infecções urogenitais assintomáticas são frequentes, contudo, aquelas que desenvolvem cervicite gonocócica sintomática apresentam leve aumento no corrimento vaginal podendo ter sangramento, dor e sensação de queimação ao urinar. No sexo feminino, a infecção não tratada pode levar a complicações sérias incluindo doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e infertilidade. (COSTA-LOURENÇO et al., 2017; QUILLIN; SEIFERT, 2018; UNEMO; SHAFER, 2014; WHO, 2016).

Em adultos, a conjuntivite ocorre por transmissão direta, em gestantes com infecção gonocócica a transmissão para seu concepto ocorre durante o parto vaginal, caracterizando uma conjuntivite neonatal, que pode levar à cegueira (QUILLIN; SEIFERT, 2018; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016).

A gonorreia retal e faríngea é comumente assintomática em ambos os sexos. São infecções mais frequentes em homens que fazem sexo com homens, mas podem acometer ambos os sexos, dependendo da prática sexual. A infecção gonocócica disseminada é uma complicação incomum da infecção gonocócica e, pode causar, artrite, meningite e endocardite (UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A gonorreia é uma infecção sexualmente transmissível (IST), com incidência mundial de mais de 78 milhões de casos por ano segundo a Organização Mundial de Saúde. A maior incidência é na Região do Pacífico Ocidental (35,2 milhões de casos), seguido da Região do Sudeste da Ásia (11,4 milhões de casos) e África (11,4 milhões de casos) (WHO, 2016).

Na Europa, foram relatados mais de 71.000 casos no ano de 2015, segundo o Programa Europeu de Vigilância Gonocócica aos Antimicrobianos (Euro-GASP) (ECDC, 2015). É a segunda IST bacteriana mais comumente diagnosticada na Inglaterra, sendo que nos últimos anos, o número de novos casos de gonorreia teve um aumento de 53%, variando de 26.880 em 2012 para 41.193 casos em 2015 (GRASP, 2016). Nos Estados Unidos, também foi a segunda IST bacteriana mais relatada ao *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2016, com 468.514 casos (146 casos por 100.000 habitantes) (CDC, 2017). A incidência de gonorreia registrada no Canadá também apresentou aumento, de 21,8 por 100.000 habitantes em 2001 para 55,4 casos por

A notificação de gonorreia não é compulsória no Brasil, além disso, verifica-se falta de serviços ambulatoriais de livre demanda para atenção às pessoas com IST, assim como falta de acesso da população ao diagnóstico etiológico. Segundo Unemo e Shafer (2014), a falta de acesso a testes laboratoriais adequados para o diagnóstico e a ocorrência de sub-notificações, inclusive provenientes de erros no diagnóstico, são alguns dos problemas enfrentados por diversos países para o estabelecimento e continuidade da vigilância da infecção e da resistência antimicrobiana gonocócica.

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da gonorreia não complicada é estabelecido pela identificação de *N. gonorrhoeae* em secreções genitais, retais, faríngeas ou oculares. Pode ser realizado por cultura ou por testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs). Em homens sintomáticos, pode ser realizado por microscopia de esfregaço da secreção uretral corado, possibilitando diagnóstico rápido e de baixo custo. Nenhum dos testes oferece 100% de sensibilidade e especificidade. Em locais sem acesso a exames laboratoriais, o diagnóstico é frequentemente realizado com base à presença de sinais como aumento do corrimento vaginal e corrimento uretral purulento (BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO et al., 2013; WHO, 2016).

Por microscopia, os gonococos são caracterizados como diplococos Gram negativos intracelulares (em leucócitos polimorfonucleares: no aumento de 1.000x) e extracelulares, por meio da coloração de Gram. Esse método de coloração é rápido, barato e com alta sensibilidade (95%) para uretrite masculina sintomática. Entretanto, em pacientes assintomáticos a sensibilidade é baixa (55%), e resultados negativos não excluem a infecção. A microscopia não é recomendada para diagnóstico de infecções de faringe e endocervice, devido à presença frequente de espécies de *Neisseria* comensais nesses sítios, acarretando em baixa especificidade, além da baixa sensibilidade (BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO et al., 2013).

Por muitas décadas, a cultura foi considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico de infecção por *N. gonorrhoeae*, pois oferece alta sensibilidade e especificidade, quando as condições de coleta, transporte e armazenamento da amostra, bem como, a metodologia da cultura, são rigorosamente seguidas. Gonococos são extremamente sensíveis a fatores ambientais externos, tornando-se rapidamente inviáveis para

crescimento em cultura. Além disso, é o único método que permite a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Dessa forma, a cultura é essencial para detectar e monitorar a evolução da resistência aos antimicrobianos. Embora seja relativamente lenta, é um teste diagnóstico específico e barato, que permite a identificação da espécie bacteriana, sendo considerada apropriada para amostras endocervicais, uretrais, retais, faríngeas e conjuntivais, mas não é indicada para urina por apresentar menor sensibilidade (BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO et al., 2013; UNEMO; SHAFER, 2014)

Em muitos centros a cultura foi substituída por NAATs, devido a maior sensibilidade (96%), tanto para infecções assintomáticas quanto sintomáticas, particularmente em amostras de faringe e reto, sítios em que a microbiota intensa compete com o gonococo, dificultando o isolamento em cultura. Além disso, os NAATs permitem a detecção de *N. gonorrhoeae* não viável, possibilitando a realização do diagnóstico nos casos em que os protocolos de coleta e transporte não garantam a viabilidade da bactéria. Os NAATs são rápidos, permitem a automação do processo, além da detecção simultânea de vários outros patógenos, sendo também menos exigentes quanto as condições de transporte e armazenamento das amostras. No entanto, alguns NAATs para a detecção de *N. gonorrhoeae* têm apresentado problemas de especificidade, devido a reações cruzadas com outras espécies de *Neisseria*, em amostras urogenitais e principalmente de amostra extragenitais, resultando em baixo Valor Preditivo Positivo para populações com baixa prevalência da infecção. Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda, para uso em diagnóstico, somente testes que utilizem dois alvos para o microrganismo. A maior desvantagem dos NAATs é que, ainda não possibilita a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos (BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO et al., 2013; WHO, 2013).

2.5 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Entre os métodos utilizados para determinar a sensibilidade antimicrobiana de *N. gonorrhoeae* estão o ágar diluição e métodos de difusão como as fitas de gradiente de concentração e o disco difusão. O método de ágar diluição é considerado padrão ouro e é utilizado principalmente por laboratórios de referência para determinar quantitativamente os valores da MIC. É um teste oneroso, laborioso e demorado, por isso, sua utilização em laboratórios de rotina não é viável,

particularmente para os laboratórios que recebem pequeno volume de amostras. Na metodologia de ágar diluição, concentrações crescentes do antimicrobiano são distribuídas em diferentes placas em ágar GC suplementado, para determinar a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível (MIC) (LIU et al., 2016; UNEMO et al., 2013).

Alternativamente, a MIC pode ser determinada por metodologia de difusão, utilizando fitas de gradiente de concentração impregnadas com concentrações crescentes do antimicrobiano, denominado método epsilométrico essas fitas permitem a determinação da MIC em $\mu\text{g/mL}$. Nesse teste, a inibição do crescimento bacteriano é observada pela formação de uma zona elíptica, e a MIC é determinada na interseção da elipse com a escala da concentração do antimicrobiano marcada na fita (UNEMO et al., 2013).

O teste de disco difusão é simples, prático, amplamente realizado pela maioria dos laboratórios, além de ser um teste relativamente barato quando comparado aos anteriores. O teste utiliza discos impregnados com uma concentração fixa do antimicrobiano previamente definida. É considerado um teste “qualitativo”, pois os resultados observados, por meio do diâmetro do halo da zona de inibição, fornecem somente a categoria de sensibilidade (sensível, sensibilidade intermediária ou resistente) (JORGENSEN; FERRARO, 2009; LIU et al., 2014).

Todos os testes de sensibilidade aos antimicrobianos devem ser controlados quanto a qualidade dos insumos e dos procedimentos adotados pelo laboratório, por meio da utilização de cepas de referência, que garantem a acurácia dos resultados (JORGENSEN; FERRARO, 2009; LIU et al., 2014; UNEMO et al., 2016).

2.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS E MECANISMOS

Os antimicrobianos são classificados com base na interação fármaco-alvo, cobrindo uma ampla gama de alvos bacterianos (KOHANSKI et al., 2007). Eles se dividem em duas categoriais, de acordo com a inibição resultante da função celular, que pode ou não ser letal para as bactérias. Segundo as categorias, os antimicrobianos podem ser bactericidas, que matam as bactérias ou bacteriostáticos, que inibem o crescimento bacteriano. A maioria dos antibacterianos é melhor descrito como potencialmente bactericida e bacteriostático (PANKEY; SABATH, 2004; KOHANSKI et al., 2007).

N. gonorrhoeae tem demonstrado capacidade extraordinária de desenvolver e incorporar mecanismos de resistência a todos os antimicrobianos introduzidos para tratamento da gonorreia nos últimos 70-80 anos. Entre esses mecanismos incluem-se a destruição ou modificação antimicrobiana por meios enzimáticos, modificação ou proteção de alvo, reduzindo a afinidade pelos antimicrobianos e diminuição do influxo e aumento do efluxo de antimicrobianos. O gonococo utiliza esses mecanismos para se adaptar rapidamente e sobreviver nos ambientes frequentemente hostis em diferentes sítios do hospedeiro humano (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016)

As sulfonamidas foram os primeiros antimicrobianos utilizados para o tratamento da gonorreia em meados da década de 1930. No entanto, no final da década de 1940, os isolados já apresentavam altas taxas de resistência *in vitro* (90%). Na década de 1960, foi proposta como opção a terapia combinada com trimetoprima a fim de melhorar a eficácia da sulfonamida (sulfametoxazol) no tratamento da gonorreia não complicada (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017). As sulfonamidas têm como alvo as enzimas diidropteroato sintase bacteriana (DHPS), e atuam na inibição da síntese de ácido fólico no gonococo. A resistência pode ser mediada pela super-síntese do ácido p-aminobenzóico, que dilui o agente antimicrobiano, ou por alterações no gene *folP* (mutações pontuais ou presença de um gene mosaico contendo sequências de DNA de *Neisseria* spp. comensais), que codifica o sítio alvo do fármaco. Alterações da enzima DHPS, resultam em significativa redução na atividade das sulfonamidas e de sua ação bacteriostática (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016;).

A Penicilina é um antimicrobiano β -lactâmico, assim como as cefalosporinas, que atua por inibição das ligações cruzadas de peptidoglicano na parede celular bacteriana, por ligação do anel β -lactâmico às enzimas transpeptidase (proteínas de ligação à penicilina (PBPs)), ou seja, atuam inibindo a síntese da parede celular, induzindo a lise e a morte celular (KOHANSKI et al., 2007; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016). A penicilina, introduzida no tratamento após relatos de resistência às sulfonamidas, marcou uma nova era no tratamento da gonorreia no ano de 1943. Ultrapassando rapidamente as sulfonamidas, a penicilina tornou-se o tratamento de primeira linha para gonorreia com cura de 95% dos casos em baixas concentrações e permaneceu eficaz por

muitos anos. Com o tempo, a MIC da penicilina aumentou, devido à resistência cromossômica, levando ao aumento das doses recomendadas para o tratamento. Em 1946 foram relatados 4 isolados resistentes a altas doses de penicilina e na década de 1960 apareceram os primeiros relatos de casos de falha no tratamento com a penicilina. Em 1976 foram descritas a ocorrência e a disseminação de dois tipos de plasmídeos codificadores de β -lactamases (Asiático e Africano) em isolados gonocócicos nos EUA e no Reino Unido, que caracterizavam resistência de alto nível ao antimicrobiano. A penicilina só deixou de ser utilizada no tratamento da gonorreia uma década depois com a identificação da resistência clínica mediada por cromossomos. Atualmente, isolados de *N. gonorrhoeae* apresentando resistência à penicilina, cromossômica ou mediada por plasmídeos, são comuns em todo o mundo (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Os isolados com resistência de alto nível à penicilina mediada por plasmídeo, tradicionalmente contém plasmídeos com o gene *bla*_{TEM-1R} 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. Enquanto que 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).

A tetraciclina 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). Ela foi utilizada na década de 1950 para tratar a gonorreia em pacientes alérgicos à penicilina. A MIC da tetraciclina em isolados de *N. gonorrhoeae* aumentou ao longo do tempo. A resistência de alto nível à tetraciclina mediada por plasmídeos foi detectada em 1986, fato que justificou a exclusão da tetraciclina das diretrizes de tratamento de muitos países (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Resistência mediada por plasmídeo, com MIC >16 μ g/mL em gonococos, é devida a presença do gene *tetM*, que foi inicialmente descrito no gênero *Streptococcus*. Esse gene confere resistência de alto nível à tetraciclina, pois a ligação do gene *tetM* ao

ribossomo promove a liberação da molécula de tetraciclina, permitindo, assim, que a síntese proteica prossiga. Resistência à tetraciclina mediada por cromossomos em gonococos é devida a mutações que modificam a estrutura da proteína ribossomal (alvo), em uma interação com determinantes de resistência que aumentam o efluxo e diminuem o influxo de tetraciclina (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Os aminoglicosídeos (gentamicina e espectinomicina) são antimicrobianos com ação bactericida por promoverem alterações nas proteínas bacterianas, ao ligarem-se ao ribossomo bacteriano e bacteriostáticas ao inibirem a síntese de proteínas. A entrada desses antimicrobianos no interior da célula bacteriana é crucial para seu mecanismo de ação. Uma vez no interior da célula, os aminoglicosídeos ligam-se irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo, alterando o seu funcionamento e induzindo a formação de proteínas com estrutura defeituosa e consequente perda de função (BOLLELA, 2018; TAVARES, 1996). Após a descrição e aumento da resistência de alto nível mediada por plasmídeos à penicilina, a espectinomicina começou a ser utilizada para o tratamento da gonorreia (EASMAN et al., 1984). Na década de 1980, a espectinomicina foi utilizada como tratamento de primeira linha de *N. gonorrhoeae* na Holanda, sendo que em 1967 já havia sido relatado o primeiro isolado resistente à espectinomicina naquele país (EASMAN et al., 1984; STOLZ; ZWARTT; MICHELT, 1975). A espectinomicina foi introduzida como tratamento de primeira linha para gonorreia na Coreia do sul em 1981, e após quatro anos de uso, foi descrita uma taxa de falha clínica de 8,2% (BOSLEGO et al., 1987). Em 1983, muitos isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à espectinomicina foram relatados em Londres e no Reino Unido (ISON et al., 1983). O uso indiscriminado do antimicrobiano e a propagação de isolados resistentes levaram ao aumento da resistência à espectinomicina na década de 1980 (UNEMO, 2015). Posteriormente, a espectinomicina foi abandonada como monoterapia empírica de primeira linha para a gonorreia internacionalmente. Atualmente, em alguns países a espectinomicina está disponível para tratamento de *N. gonorrhoeae*, principalmente quando os antimicrobianos de primeira escolha já não são mais eficazes, pois a resistência a esse fármaco, atualmente, é rara em todo o mundo (CDC, 2015; UNEMO; SHAFER, 2014; WHO, 2016). A descrição de resistência de alto nível à espectinomicina (MIC >1024 µg/mL) em isolados de *N. gonorrhoeae* foi relacionada ao polimorfismo de um único

nucleotídeo (SNP), C1192U na região de ligação à espectinomicina da hélice 34 em 16S rRNA (GALIMAND; GERBAUD; COURVALIN, 2000). Mecanismos moleculares comumente descritos para resistência de baixo e alto nível à espectinomicina são alterações específicas de aminoácidos na proteína ribossomal 5S codificada em *rpsE* 5S (ILINA et al., 2013; UNEMO et al., 2013).

A gentamicina é um antimicrobiano de amplo espectro, amplamente utilizado contra bacilos gram-negativos. Desde 1993 tem sido utilizada para o tratamento de *N. gonorrhoeae* na África, especialmente em Malawi, como tratamento de primeira escolha, devido ao seu baixo custo, por ser administrada em dose única de 240 mg e ter demonstrado, em estudos anteriores, taxas de cura superiores a 95% (BROWN et al., 2010; CHISHOLM et al., 2011).

As fluoroquinolonas, particularmente o ciprofloxacino e a ofloxacina foram indicadas como tratamento de primeira linha para *N. gonorrhoeae* no final da década de 1980, inicialmente em baixas doses. Elas são consideradas bactericidas, pois alteram a replicação, transcrição e reparo do DNA bacteriano e têm como alvo a DNA girase e suas subunidades (KOHANSKI et al., 2007; UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016). Na década de 1990 os isolados resistentes emergiram no Pacífico Ocidental asiático e se espalharam rapidamente, levando ao abandono das fluoroquinolonas como tratamento empírico de primeira linha da gonorreia em alguns países asiáticos. Embora, isolados demonstrando sensibilidade reduzida tenham sido detectados em Londres antes de 1989, e muitas falhas terapêuticas relatadas durante a década de 1990, a terapia com ciprofloxacino continuou a ser usada em muitos países por mais de 25 anos. Nos anos 2000, isolados resistentes se espalharam para a Costa Oeste e depois para o resto dos EUA. Em 2007, as fluoroquinolonas foram retiradas dos regimes de tratamento recomendados pelo CDC, e atualmente a prevalência *N. gonorrhoeae* resistente às fluoroquinolonas é alta em todo o mundo. Os gonococos desenvolvem resistência ao ciprofloxacino por meio de mutações que reduzem a afinidade de ligação do ciprofloxacino à DNA girase (codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (codificada pelos genes *parC* e *parE*). O gene alvo primário é *gyrA*; entretanto, isolados com maior nível de resistência também possuem SNPs específicos na *parC* (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

A azitromicina, um antimicrobiano da classe dos macrolídeos, foi incluída como uma possível terapia para gonorreia no início da década de

1980. Em meados da década de 1990, foram relatados casos de sensibilidade diminuída e resistência à azitromicina na América Latina, onde ela foi frequentemente utilizada para o tratamento de ISTs bacterianas, incluindo a gonorreia. Posteriormente, a resistência à azitromicina surgiu em muitos países. Atualmente, o antimicrobiano não é recomendado como monoterapia empírica para gonorreia, no entanto, é utilizada em combinação com ceftriaxona ou cefixima como regime terapêutico duplo, especialmente, nos casos de manejo sindrômico do paciente, quando não há possibilidade de excluir infecção por *Chlamydia trachomatis* (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Os macrolídeos atuam impedindo 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 gonocócica à azitromicina pode resultar de alterações do alvo ribossômico (bloqueando ou reduzindo a afinidade alvo para o fármaco), seja por meio da modificação associada à rRNA metilase do 23S rRNA ou por mutações específicas no 23S rRNA e/ou, ainda, pela super expressão de bomba de efluxo (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

As cefalosporinas de espectro estendido (ESCs) mais utilizadas no tratamento da gonorreia são a ceftriaxona e a cefixima. Durante as últimas duas décadas, isolados gonocócicos exibindo diminuição de sensibilidade ou mesmo resistência às ESCs, descritos inicialmente no Japão, espalharam-se pelo mundo (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017). Os primeiros isolados de *N. gonorrhoeae* XDR, exibindo resistência de alto nível a todas as ESCs e também resistência a quase todos os outros antimicrobianos disponíveis, foram relatadas no Japão, França e Espanha. (OHNISHI et al., 2011; CÂMARA et al., 2012; UNEMO et al., 2012).

Devido à transmissão descontrolada e as limitadas opções de tratamento em diversos países, a gonorreia intratável resultará em aumentos na incidência e complicações decorrentes da infecção (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Atualmente, com o objetivo de desacelerar a disseminação e o surgimento de isolados XDR, as diretrizes de tratamento mundiais têm sugeridos a utilização de terapia dupla com ceftriaxona e azitromicina (CDC, 2015; BRASIL, 2016; WHO, 2016; COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

2.7 RECOMENDAÇÃO ATUAL DE TRATAMENTO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda como tratamento para infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto) e infecções faríngeas, a terapia dupla de ceftriaxona 250 mg intramuscular (IM) com uma dose única de azitromicina 1g por via oral (VO) ou cefixima 400mg VO com uma dose única de azitromicina 1g VO (WHO, 2016).

Nos Estados Unidos o CDC recomenda o uso de ceftriaxona 250 mg IM com azitromicina 1g VO, e como terapia alternativa cefixima 400 mg VO com azitromicina 1g VO (CDC, 2015). Na Europa o tratamento preconizado é ceftriaxona 500 mg IM com azitromicina 2 g VO (BIGNELL; UNEMO, 2013). No Canadá o tratamento indicado é ceftriaxona 250 mg IM com azitromicina 1 g VO (CANADA, 2014). Tanto na Europa quanto no Canadá, a espectinomicina 2g IM é utilizada juntamente com azitromicina no tratamento da gonorreia nos casos em que é inviável a utilização da ceftriaxona (BIGNELL; UNEMO, 2013; CANADA, 2014).

No Brasil, após um estudo multicêntrico de vigilância da resistência *in vitro* de *N. gonorrhoeae*, realizado em parceria entre o Ministério da Saúde e a Universidade Federal de Santa Catarina no ano de 2016 (BAZZO et al., 2018), houve modificação no esquema terapêutico recomendado. O tratamento que era constituído de terapia dupla com ciprofloxacino 500mg VO associado à azitromicina 1g VO foi substituído pela associação de ceftriaxona 500mg IM e azitromicina 1g VO em dose única. Nota informativa do Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais/MS alterou o esquema terapêutico recomendado em todas as regiões do país (BRASIL, 2015, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em duas séries históricas de isolados brasileiros de *N. gonorrhoeae*, oriundos de distintos modelos de atenção ao paciente com IST's e , comparar os resultado do antibiograma obtidos por metodologia de disco difusão, frequentemente utilizada nos laboratórios de rotina, com os resultados por ágar diluição, padrão ouro para testes de sensibilidade em *N. gonorrhoeae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima pelo método de ágar diluição para os antimicrobianos espectinomicina e gentamicina em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*.

- Determinar o perfil de sensibilidade pela metodologia de disco difusão em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* para os antimicrobianos azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacino, espectinomicina, gentamicina, penicilina e tetraciclina.

- Comparar os resultados de disco difusão com os resultados de ágar diluição determinados previamente por Golfetto (2018) e Santos (2018).

4 METODOLOGIA

4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

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

4.2 AMOSTRAGEM

O estudo incluiu 336 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, 153 isolados provenientes da Grande Florianópolis coletados entre 2008 a 2016 (banco de bactérias do Laboratório Médico Santa Luzia) e 183 provenientes da cidade de São Paulo coletados entre 2003 a 2016 (banco de bactérias do Centro de Referência e Treinamento DST/Aids - CRT DST/Aids da cidade de São Paulo/SP). Os microrganismos foram gentilmente cedidos pelos centros e caracterizados previamente em projetos de doutorado (Golfeto 2018) e mestrado (Santos 2018), respectivamente. A identificação, realizada previamente, observou características morfológicas em esfregaço corado pelo Gram, reação da catalase e reação da oxidase, e utilizou sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux, França) e espectrometria de massa MALDI-TOF MS (BioMérieux, França).

4.3 CULTIVO E ISOLAMENTO

Os isolados foram descongelados e subcultivados em meio Thayer-Martin (Laborclin, Brasil) e ágar chocolate (Laborclin, Brasil). A incubação foi realizada a temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufa de CO_2 , por até 72 horas. Após o cultivo, as bactérias foram repicadas em ágar chocolate e incubadas a temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufa de CO_2 , por 16 – 18 horas, antes da realização dos testes.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR METODOLOGIA DE ÁGAR DILUIÇÃO PARA ESPECTINOMICINA E GENTAMICINA

4.4.1 Solução estoque dos antimicrobianos

A solução estoque foi preparada com base no cálculo da seguinte fórmula fornecida pelo CLSI (*Clinical & Standards Institute/EUA*) (CLSI, 2015).

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

Para o cálculo foi utilizada a potência dos antimicrobianos fornecida pelo fabricante. A concentração final foi de 100.000 $\mu\text{g/mL}$ para espectinomicina (Sigma-Aldrich, China), e de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ para gentamicina (Sigma-Aldrich, China). Para ambos os antimicrobianos, água foi utilizada como solvente.

4.4.2 Diluição do antimicrobiano e preparo do meio GC com o antimicrobiano

A partir da solução estoque dos antimicrobianos foram preparadas diluições com uma concentração dez vezes maior do que as concentrações mais altas testadas para cada antimicrobiano, e posterior diluição em série (Figura 1), resultando em intervalos de concentração final entre 4 - 1024 $\mu\text{g/mL}$ para espectinomicina (Tabela 1) e entre 1 - 32 $\mu\text{g/mL}$ para a gentamicina (Tabela 2) (CLSI, 2015).

Tabela 1: Diluição em série da espectinomicina.

Tubo de diluição	Concentração Intermediária ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração final, diluição no ágar 1:10 ($\mu\text{g/mL}$)
1	10240	1024
2	5120	512
3	2560	256
4	1280	128
5	640	64
6	320	32
7	160	16
8	80	8
9	40	4

Fonte: CLSI, 2015

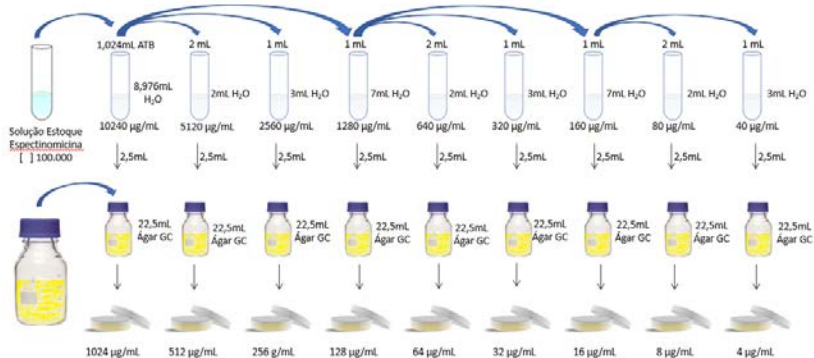
Tabela 2: Diluição em série da gentamicina

Tubo de diluição	Concentração Intermediária ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração final, diluição no ágar 1:10 ($\mu\text{g/mL}$)
1	320	32
2	160	16
3	80	8
4	40	4
5	20	2
6	10	1

Fonte: CLSI, 2015

Após a diluição dos antimicrobianos, foram preparadas as placas com meios de cultura com adição do antimicrobiano para isso, foram adicionados em frascos estéreis, 2,5mL de cada diluição do antimicrobiano e 22,5mL do meio base GC (Difco, USA), suplementado com 1% de Vitox (Oxoid, Inglaterra), à temperatura de 50° C. Após a adição a mistura foi homogeneizada e vertida em uma placa de Petri (87mm) (CLSI, 2015). A figura 2 mostra como foi realizada a diluição e preparação do meio com o antimicrobiano espectinomicina.

Figura 2: Preparo do meio com antimicrobiano espectinomicina



Fonte: Adaptado pela autora a partir de ARGENTINA, 2015.

4.4.3 Preparo do inóculo, inoculação e leitura

Para o preparo do inóculo foi realizada uma suspensão bacteriana em caldo Mueller Hinton (Difco, USA) com turvação correspondente a 0,5 na escala McFarland, conferida em densitômetro densicheck

(BioMérieux), a partir de uma cultura pura de *N. gonorrhoeae* em ágar chocolate, crescida por 16 -18 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa de CO_2 .

Após a preparação do inóculo, as suspensões bacterianas foram diluídas 10 vezes ($500\mu\text{L}$ da suspensão e $4500\mu\text{L}$ de Mueller Hinton); $250\mu\text{L}$ de cada suspensão diluída foi transferida para um poço da policubeta (34 poços) do replicador tipo *Steers* (Figura 3). Um inóculo de 10^4 UFC/ml de cada microrganismo foi aplicado na superfície do ágar contendo antimicrobiano por meio do replicador do tipo *Steers* (*Spot*).

Figura 3: Replicador do tipo *Steers*

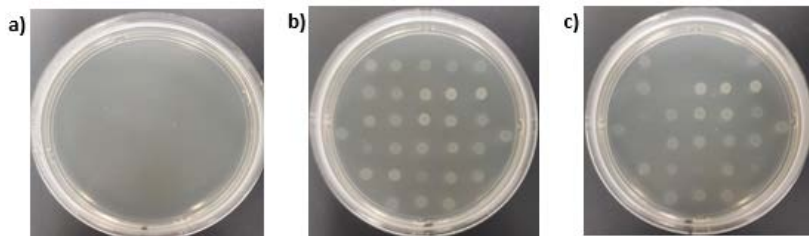


Replicador do tipo *Steers*, desenvolvido e construído pelo LBMMS. Projeto de Felipe de Rocco, rigorosamente padronizado de acordo com as especificações do modelo original

Fonte: Da autora.

Antes de cada experimento a esterilidade dos pinos do inoculador tipo *Steers* foi testada por inoculação em uma placa de meio GC sem antimicrobiano. Em seguida, os pinos do inoculador foram introduzidos nos poços com a suspensão bacteriana diluída, e as bactérias foram inoculadas em meio GC sem antimicrobiano, para controle da viabilidade dos inóculos bacterianos. As placas contendo diferentes concentrações do antimicrobiano foram inoculadas da menor para a maior concentração do fármaco, introduzindo os pinos do replicador nos poços com a suspensão bacteriana diluída entre cada inoculação. Após a inoculação na placa de maior concentração, foi utilizada uma placa sem antimicrobiano, para controlar o carreamento do antimicrobiano pelos pinos do replicador entre as placas. As placas permaneceram com a superfície do ágar voltada para cima em cabine de segurança biológica até completa secagem do inóculo. Em seguida, foram invertidas e incubadas por 20-24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa de CO_2 para posterior leitura da MIC (Figura 4).

Figura 4: Figura representativa das placas para a leitura após a incubação.



a) Placa de meio GC utilizada para testar a esterilidade dos pinos. b) Placa de meio GC sem antimicrobiano, para controle da viabilidade dos inóculos bacterianos. c) Placa de meio GC com uma determinada concentração do antimicrobiano.

Fonte: Da autora.

A MIC de cada isolado foi determinada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano visível. Os critérios de interpretação para cada antimicrobiano, foram utilizados de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Critérios de interpretação de sensibilidade em isolados de *N. gonorrhoeae*

Antimicrobiano	Padrões de interpretação de MIC (µg/mL)		
	S	I	R
Espectinomicina *	≤ 32,0	64,0	≥ 128,0
Gentamicina **	≤ 4	8 – 16	≥ 32

Abreviações: S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente.

Fonte: * CLSI, 2018; ** Brown et al., 2010

Para controle de qualidade, foram utilizadas 14 cepas controle de *N. gonorrhoeae* distribuídas pela Organização Mundial da Saúde e denominadas “Cepas WHO”¹ (WHO F, G, K, L, M, N, O, P, U, V, W, X, Y e Z). Em cada rodada de experimento, foram escolhidas de forma

¹ Distribuídas pela Organização Mundial de Saúde, essas cepas são caracterizadas, mantidas e preparadas em laboratório referência da OMS. São conhecidas no jargão laboratorial como “cepas WHO”, expressão que será mantida neste trabalho.

aleatória 3 das 14 cepas, no final todas as cepas do painel da OMS foram testadas para cada antimicrobiano. Além disso, a cepa de referência ATCC 49226 foi incluída em todas as rodadas de experimento. Assim, cada rodada foi validada com a utilização de 4 cepas controles. Foram consideradas aceitáveis variações de MIC de até uma diluição para mais ou uma para menos de cada cepa. As MICs das cepas WHO encontram-se descritas no Apêndice A. Como controle de resistência para espectinomicina foi utilizada a Cepa WHO O, que possui MIC $\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$ (UNEMO et al., 2016). A gentamicina não possui cepa resistente no painel das cepas da OMS para ser utilizada como controle de resistência.

4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELA METODOLOGIA DE DISCO DIFUSÃO

4.5.1 Antimicrobianos e preparo do meio de cultura

Os testes de sensibilidade foram realizados em meio GC suplementado com 1% de Vitox. Os antimicrobianos testados foram azitromicina $15 \mu\text{g}$ (Oxoid, Inglaterra), ceftriaxona $30 \mu\text{g}$ (Oxoid, Inglaterra), ciprofloxacino $5 \mu\text{g}$ (Oxoid, Inglaterra), gentamicina $10 \mu\text{g}$ (Oxoid, Inglaterra e DME, Brasil), espectinomicina $100 \mu\text{g}$ (Oxoid, Inglaterra), penicilina 10U (Oxoid, Inglaterra) e tetraciclina $30 \mu\text{g}$ (Oxoid, Inglaterra).

4.5.2 Preparo do inóculo, inoculação e leitura

Para o preparo do inóculo foi realizada uma suspensão bacteriana em caldo Mueller Hinton (Difco, USA) com turvação correspondente a 0,5 na escala McFarland, conferida em densitômetro densichek (BioMérieux), a partir de uma cultura pura de *N. gonorrhoeae* em ágar chocolate, crescida por 16-18 horas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa de CO_2 . Sempre que possível, em um intervalo de tempo de até 20 minutos, foi utilizado o mesmo inóculo preparado para a metodologia de ágar diluição.

Após o preparo do inóculo, foi inserido um *swab* estéril no tubo contendo a suspensão bacteriana, removido o excesso da suspensão na parede do tubo e estriado em 4 direções diferentes por toda a superfície de meio base GC suplementado com 1% de Vitox. Utilizando-se uma pinça estéril, os discos impregnados com antimicrobianos foram aplicados à superfície do ágar em até 15 minutos após a inoculação da

placa, as quais foram invertidas e incubadas por 20 a 24 horas a 35°C ± 1°C em estufa de CO₂. A cepa de referência ATCC 49226 foi testada pela metodologia de disco difusão como controle de qualidade para validar cada experimento.

Para a leitura, a placa foi posicionada contra um fundo escuro a cerca de 30 cm do olho nu e foram estimadas as bordas dos halos de inibição, utilizando-se régua específica para leitura de antibiograma (BRCAS, 2016). Foram medidos os diâmetros da zona de inibição de crescimento bacteriano visível. Os critérios de interpretação utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Interpretação da leitura do diâmetro da zona de inibição.

Antimicrobiano (Conteúdo do disco)	Diâmetro da zona de inibição (mm)			Cepa de Referência (ATCC 49226)
	S	I	R	
Azitromicina (15µg) *		-	≤ 27	^a
Ceftriaxona (30µg) **		-	-	39 – 51
Ciprofloxacino (5µg) **	≥ 41	28 – 40	≤ 27	48 – 58
Gentamicina (10µg) ***	≥ 16	13 - 15	≤ 12	18 – 22
Espectinomicina (100µg) **	≥ 18	15 – 17	≤ 14	23 – 29
Penicilina (10units) **	≥ 47	27 - 46	≤ 26	26 – 34
Tetraciclina (30µg) **	≥ 38	31 - 37	≤ 30	30 – 42

Abreviações: S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente.

^a A literatura não disponibiliza os pontos de corte para a cepa de resistência ATCC49226.

Fonte: * BSAC, 2016; ** CLSI, 2018; *** Bala et al., 2016.

4.6 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS: DISCO DIFUSÃO E ÁGAR DILUIÇÃO

Os perfis de sensibilidade de cada isolado clínico, obtidos pelas duas diferentes técnicas, disco difusão e ágar diluição, foram comparados seguindo a classificação em categorias (sensível, resistente e intermediário). Para os antimicrobianos espectinomicina e gentamicina, as duas metodologias foram realizadas no presente estudo. Para os antimicrobianos azitromicina, penicilina, tetraciclina, ceftriaxona e ciprofloxacino a metodologia de disco difusão realizada no presente estudo foi comparada com os resultados de ágar diluição previamente realizados por Golfetto (2018) e Santos (2018). A tabela 5 mostra os

critérios de interpretação do perfil de sensibilidade dos antimicrobianos para a metodologia de ágar diluição.

Tabela 5: Critérios de interpretação de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *N. gonorrhoeae*.

Antimicrobiano	Padrões de interpretação da MIC (µg/mL)		
	S	I	R
Azitromicina *	≤ 0,25	0,5	≥ 1
Ceftriaxona **	≤ 0,25	-	-
Ciprofloxacino **	≤ 0,06	0,12-0,5	≥ 1,0
Gentamicina ***	≤ 4	8 - 16	≥ 32
Espectinomomicina **	≤ 32	64	≥ 128
Penicilina **	≤ 0,06	0,12-1,0	≥ 2,0
Tetraciclina **	≤ 0,25	0,5-10	≥ 2,0

Abreviações: S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente.

Fonte: * EUCAST, 2018; ** CLSI, 2018; *** Brown et al., 2010

Para a azitromicina, os resultados encontrados pela metodologia de ágar diluição foram avaliados utilizando-se o critério de interpretação sugerido pelo EUCAST (2018) apresentado na tabela 5, e o critério sugerido pelo CLSI (2018). O CLSI (2018) considera como Tipo Selvagem, do inglês *Wild-Type* (WT) os isolados que possuem MIC ≤ 1 e como Tipo Não-selvagem, do inglês *Non-wild-type* (NWT) os isolados que possuem MIC ≥ 2.

A concordância entre a metodologia de disco difusão, muito utilizada na rotina laboratorial, e a metodologia de ágar diluição, considerada padrão ouro para teste de sensibilidade em isolados de *N. gonorrhoeae*, considerou os critérios do documento M23-A3 / CLSI (2008). O documento classifica como erro grave sempre que ocorre mudança da categoria sensível (metodologia de referência) para resistente (metodologia em comparação), representando falsa resistência; erro muito grave sempre que ocorre mudança da categoria resistente (metodologia de referência) para sensível (metodologia em comparação) representando falsa sensibilidade. São considerados erros menores sempre que ocorre mudanças da categoria intermediária para sensível ou resistente (M23-A3/ CLSI 2008).

O erro *borderline* é considerado o erro que fica uma diluição a mais ou uma a menos do ponto de corte para os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos. Segundo a diretriz CLSI M23-ED4 são aceitáveis taxas de erros *borderline* menores que 40% para erros maiores, menores que 10% para erros graves e menores que 10% para erros muito graves. Para erros não *borderline* são aceitáveis taxas menores que 5% para erros

menores, menores que 2% para erros graves e menores que 2% para erros muito graves (Tabela 6) (CLSI, 2016).

Tabela 6: Tipos de erro e as taxas aceitáveis de acordo com o CLSI.

Erro	Mudança de categoria	Borderline	Não-borderline
ERRO GRAVE	Sensível para resistente (falsa resistência)	< 10 %	< 2 %
ERRO MUITO GRAVE	Resistente para sensível (falsa sensibilidade)	< 10 %	< 2 %
ERRO MENOR	Intermediário para resistente ou sensível	< 40 %	< 5 %

Fonte: Adaptado de CLSI 2008; CLSI 2016

4.7 CRITÉRIOS ADOTADOS PARA ESTUDO DE REPRODUTIBILIDADE

Para testar a reprodutibilidade do método de disco difusão, foram selecionados os antimicrobianos azitromicina e gentamicina que não possuem pontos de corte pré-estabelecidos pelo CLSI e EUCAST e da espectinomicina, que ainda não é utilizada nos testes de disco difusão para *N. gonorrhoeae* no Brasil. Foram testadas as 14 cepas WHO do painel de referência da OMS de 2016 de *N. gonorrhoeae*. Todas as cepas foram testadas em triplicada em 3 dias diferentes (nove experimentos ao final de três dias para cada cepa) e a concordância categórica foi calculada dividindo-se o número de testes discordantes de categorias pelo número de organismos testados (CLARK et al., 2009).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de dados foi realizada utilizando-se o software Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation, Redmond, VA). O programa SPSS *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS software, versão 22.0, EUA) foi utilizado para a realização dos testes Qui-quadrado. Para a comparação dos resultados por ambas as metodologias foram plotadas tabelas com as zonas de inibição e suas respectivas MICs.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLADOS CLÍNICOS DE *N. GONORRHOEAE*.

Os 153 isolados clínicos incluídos neste estudo, pertencentes à Grande Florianópolis, foram coletados entre 2008 e 2016, sendo que os anos de 2013 e 2015 foram os que apresentaram maior número de isolados coletados. Foram incluídos no estudo 183 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* coletados entre 2003 e 2016 em São Paulo, sendo que os anos de 2003, 2005, 2006 e 2016 apresentaram a maior quantidade de isolados coletados (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos isolados clínicos por ano e local.

Ano	Florianópolis n (%)	São Paulo n (%)
2003	-	44 (24)
2004	-	8 (4,4)
2005	-	38 (20,8)
2006	-	32 (17,5)
2007	-	3 (1,6)
2008	1(0,7)	-
2009	2 (1,3)	2 (1,1)
2010	9 (5,9)	1 (0,5)
2011	16 (10,5)	3 (1,6)
2012	12 (7,8)	-
2013	39 (25,5)	10 (5,5)
2014	18 (11,8)	8 (4,4)
2015	36 (23,5)	5 (2,7)
2016	20 (13,1)	29 (15,8)
Total	153 (100)	183 (100)

Os isolados provenientes da cidade de São Paulo foram recuperados predominantemente de secreção uretral (95,7%) e somente 2,7% de secreção endocervical. Para os isolados da Grande Florianópolis, a secreção uretral representou apenas 39,2 % das amostras biológicas, sendo 37,9% de urina de primeiro jato e 20,3% de secreção endocervical. (Tabela 8).

Tabela 8: Tipo de amostra utilizada para isolar a bactéria e procedência do isolado.

Tipo de amostra	Florianópolis n (%)	São Paulo n (%)
Anorretal	1 (0,6)	-
Urina de 1º jato	58 (37,9)	3 (1,6)
Secreção Uretral	60 (39,2)	175 (95,7)
Secreção endocervical	31 (20,3)	5 (2,7)
Secreção Ocular	3 (2)	-
Total	153 (100)	183 (100)

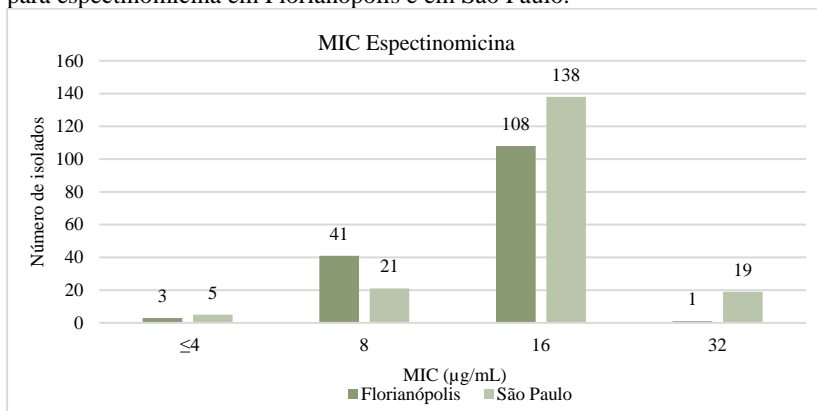
Essa diferença constatada entre os tipos de amostra biológica, deve-se principalmente aos modelos de serviços de procedência dos isolados, em São Paulo o Centro de Referência e Treinamento DST/Aids é uma clínica pública especializada em IST, e em Florianópolis o Laboratório Médico Santa Luzia, maior laboratório privado da região, atende a população em geral. Para maior conforto do paciente, o segundo modelo de serviço realizou frequentemente a pesquisa de *N. gonorrhoeae* em amostras de urina de primeiro jato, amostra que atualmente não é recomendada para diagnóstico de gonorreia por cultura (UNEMO et al., 2013; PAPP et al., 2014), somente para métodos de amplificação de ácidos nucleicos. A despeito da literatura reportar menor sensibilidade da urina de primeiro jato para recuperação de *N. gonorrhoeae*, 37,9% dos isolados de Florianópolis foram recuperados desse tipo de amostra biológica, mostrando que, se a amostra é coletada, transportada e processada em condições ideais, o primeiro jato urinário é uma amostra útil também para a metodologia de cultura.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELA METODOLOGIA DE ÁGAR DILUIÇÃO

5.2.1 Espectinomicina

Todos os 153 isolados clínicos provenientes da Grande Florianópolis apresentaram sensibilidade a espectinomicina. A MIC variou de ≤ 4 a 32 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5), com MIC₅₀ e MIC₉₀ de 16 $\mu\text{g/mL}$. Entre os isolados de São Paulo, também não foi detectada resistência à espectinomicina. No entanto, podemos observar maior quantidade de isolados com MIC de 32 $\mu\text{g/mL}$ em relação à Grande Florianópolis.

Figura 5: Distribuição dos isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para espectinomicina em Florianópolis e em São Paulo.



Ao avaliar o perfil de sensibilidade no decorrer dos anos, pode-se observar que até 2011 todos os isolados apresentaram MIC de 16µg/mL em Florianópolis, a partir de 2012 algumas amostras apresentaram MIC menores que 16µg/mL, e somente em 2016 foi observado um isolado com a MIC de 32µg/mL (Figura 6 e Tabela 9).

Figura 6: Distribuição dos 153 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para espectinomicina na Grande Florianópolis.

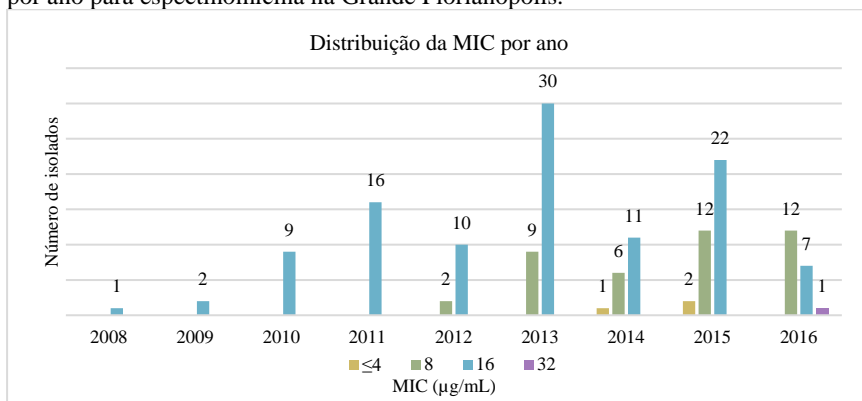


Tabela 9: Distribuição dos 153 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para espectinomicina na Grande Florianópolis.

Ano	N (%)	MIC (µg/mL)											
		≤ 4		8		16		32					
		n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total
2008	1 (0,7)						1	100	0,7				
2009	2 (1,3)						2	100	1,3				
2010	9 (5,9)						9	100	5,9				
2011	16 (10,5)						16	100	10,5				
2012	12 (7,8)				2	16,7	1,3	10	83,3	6,5			
2013	39 (25,5)				9	23,1	5,8	30	76,9	19,5			
2014	18 (11,8)	1	5,6	0,7	6	33,3	3,9	11	61,1	7,2			
2015	36 (23,5)	2	5,6	1,3	12	33,3	7,8	22	61,1	14,4			
2016	20 (13,1)				12	60	7,8	7	35	4,6	1	5	0,7

Na distribuição da MIC por ano entre os isolados de São Paulo, podemos observar que em 2003 houve diversidade de MICs, incluindo 13 isolados com 32µg/mL, MIC que só voltou a aparecer em 2010 (Figura 7 e Tabela 10).

Figura 7: Distribuição dos 183 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para espectinomicina em São Paulo.

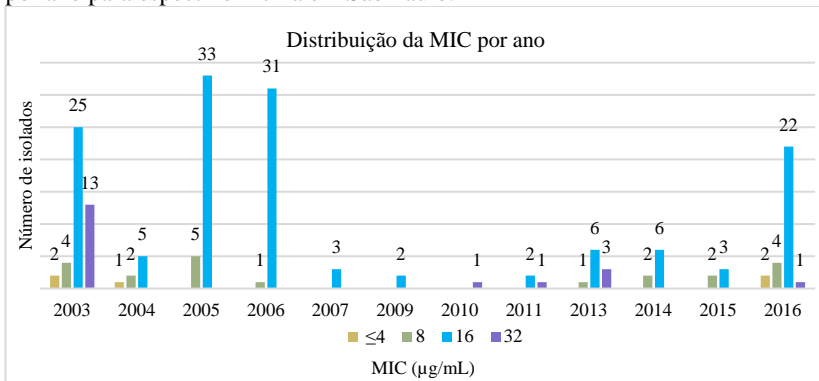


Tabela 10: Distribuição dos 183 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para espectinomicina em São Paulo.

Ano	N (%)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											
		≤ 4				8		16			32		
		n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total
2003	44 (24)	2	4,5	1,1	4	9,1	2,2	25	56,8	13,7	13	29,5	7,1
2004	8 (4,4)	1	12,5	0,5	2	25	1,1	5	62,5	2,7			
2005	38 (20,8)				5	13,2	2,7	33	86,8	18			
2006	32 (17,5)				1	3,1	0,5	31	96,9	16,9			
2007	3 (1,6)							3	100	1,6			
2009	2 (1,1)							2	100	1,1			
2010	1 (0,5)										1	100	0,5
2011	3 (1,6)							2	66,7	1,1	1	33,3	0,5
2013	10 (5,5)				1	10	0,5	6	60	3,3	3	30	1,6
2014	8 (4,4)				2	25	1,1	6	75	3,3			
2015	5 (2,7)				2	40	1,1	3	60	1,6			
2016	29 (15,8)	2	6,9	1,1	4	13,8	2,2	22	75,9	12,	1	3,4	0,5

Em São Paulo a MIC₅₀ foi 16 $\mu\text{g/mL}$ e a MIC₉₀ foi 32 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada uma porcentagem significativamente maior de isolados com MIC de 32 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) na cidade de São Paulo comparado a Grande Florianópolis durante o período estudado (Tabela 11).

Tabela 11: Associação da MIC *borderline* para espectinomicina nos isolados, por procedência.

	MIC < 32 $\mu\text{g/mL}$ * (n = 316)	MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$ ** (n = 20)	p***
São Paulo (n = 183)	89,6% (164)	10,4% (19)	
Grande Florianópolis (n = 153)	99,3% (152)	0,7% (1)	< 0,001

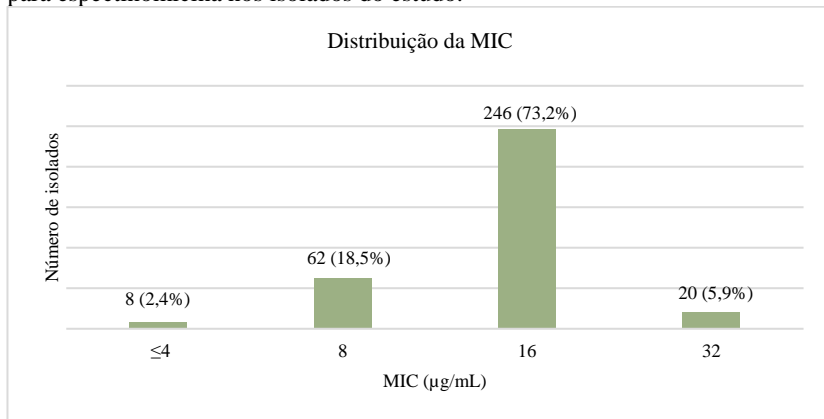
* MIC não *borderline*; ** MIC *borderline*; *** Valores de p para teste Qui-Quadrado

São Paulo é a maior cidade do país em população (BRASIL, 2017), além de ser considerada a cidade do Brasil que mais recebe eventos internacionais e turistas do mundo todo (SÃO PAULO TURISMO, 2018). Fato que pode ter impactado diretamente na maior quantidade de isolados com MIC mais elevados (32 $\mu\text{g/mL}$). Como a espectinomicina não é utilizada no país, a exposição prévia ao antimicrobiano, que poderia contribuir para o aumento das MIC, pode ser considerada um fator de menor impacto em nosso meio. Por outro lado, uma cidade cosmopolita como São Paulo, apresentando maior proporção de isolados com MIC elevadas para esse antimicrobiano, sugere a entrada e disseminação de

isolados apresentando menor sensibilidade a espectinomicina, por exposição prévia.

Quando observados todos os 336 isolados incluídos neste estudo, observamos a predominância da MIC 16 μ g/mL, sendo essa a MIC₅₀ e a MIC₉₀ (Figura 8).

Figura 8: Distribuição dos 336 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para espectinomicina nos isolados do estudo.



O presente estudo mostra que no período compreendido entre 2003 e 2016, tanto na Grande Florianópolis quanto em São Paulo todos os isolados foram sensíveis à espectinomicina, diferente do observado em um estudo realizado no Brasil, por Belda-Junior e colaboradores em 2002, que encontrou 2 (3,1%) isolados com MIC de 64 μ g/mL e todos os outros isolados sensíveis a espectinomicina (MIC <32 μ g/mL). No estudo de Belda-Junior e colaboradores (2002) foram avaliadas as MICs para espectinomicina pela metodologia de ágar diluição em 65 isolados de *N. gonorrhoeae*, coletados no período de julho de 1998 a fevereiro de 2000 na cidade de São Paulo. Um outro estudo, realizado também por Belda-Junior e colaboradores (2007), que analisou 65 isolados de *N. gonorrhoeae*, sendo esses coletados no entre novembro de 2004 e julho de 2005, encontrou 59 (91%) isolados sensíveis e 6 (9%) isolados com sensibilidade intermediária (MIC de 64 μ g/mL) à espectinomicina.

Dillon e colaboradores (2001), também avaliaram pela metodologia de ágar diluição o perfil de sensibilidade de 81 isolados de *N. gonorrhoeae*, coletados em 1998 na cidade de Manaus (AM) e todos

os isolados foram sensíveis à espectinomicina, sendo encontrada uma variação na MIC de 8 a 16 µg/mL com MIC₅₀ e MIC₉₀ de 16 µg/mL (DILLON et al., 2001). Também foi encontrado 100% de sensibilidade, com MIC₅₀ de 12 µg/mL, MIC₉₀ 16 µg/mL e variação da MIC de 4 a 24 µg/mL em 201 isolados de *N. gonorrhoeae* coletados entre 2011 e 2012, na cidade de Belo Horizonte (MG), sendo que a MIC foi determinada com tiras de gradiente de concentração (COSTA et al., 2013).

Na América, em análise retrospectiva realizada no período de 2000 a 2009, foram avaliados 7664 isolados de *N. gonorrhoeae* de países da América Latina (Argentina, Chile, Colômbia, Peru e Uruguai) por meio da metodologia de ágar diluição. Foram encontrados apenas 2 isolados com sensibilidade intermediária (MIC = 64 µg/mL) à espectinomicina na Colômbia no ano de 2009, todos os demais isolados foram sensíveis. Dos 5 países citados, apenas o Chile recomenda a utilização de espectinomicina 2g (dose única) para o tratamento da gonorreia não complicada (STARNINO et al., 2012). Em outro estudo com isolados recuperados entre os anos de 2010 e 2011, que avaliou 1502 isolados de *N. gonorrhoeae* da Argentina, Chile, Colômbia e Cuba, todos os isolados apresentaram sensibilidade à espectinomicina (THAKUR et al., 2017).

Estudo que avaliou 16.242 isolados, coletados entre 2004 e 2015 na Inglaterra e no País de Gales, encontrou 100% de sensibilidade à espectinomicina, por metodologia de ágar diluição (CLIFTON et al., 2018). Na Bielorrússia, também foi encontrado 100% de sensibilidade nos 193 isolados coletados entre 2010 a 2013, com MIC₅₀ e MIC₉₀ de 12 e 16 µg/mL, respectivamente, e MIC variando de 3 a 16 µg/mL, utilizando as tiras de gradiente de concentração (LEBEDZEU et al., 2015). Em Malawi, África, todos os 100 isolados coletados em 2007 apresentaram MIC de 16µg/mL por metodologia de ágar diluição (BROWN et al., 2010).

Kubanova e colaboradores (2008), realizaram estudo na Rússia com 1.030 isolados recuperados nos anos de 2005 (n = 509) e 2006 (n = 521), por ágar diluição. O estudo relatou um aumento nas MICs para espectinomicina durante o período analisado, no ano de 2005 observou que 1,4% dos isolados apresentaram sensibilidade intermediária, aumentando para 7,1% em 2016, sendo que no último ano também foi observada resistência ao antimicrobiano em 0,8% dos isolados. Na sequência, o mesmo grupo avaliou 1.560 isolados recuperados nos anos de 2007 (n = 660) e 2008 (n = 900), também por metodologia de ágar diluição e foram encontrados 3,6% e 1,1% de isolados com sensibilidade

intermediária nos anos de 2007 e 2008 respectivamente. Observou-se aumento da resistência à espectinomicina ao longo dos anos, sem resistência descrita em 2005, 0,8% em 2006, 0,9% em 2007, chegando a 7,2% entre os isolados de 2008 (KUBANOVA et al., 2010). Outro estudo realizado também por Kubanova e colaboradores (2014), avaliando o período de 2009, 2010, 2011 e 2012, observou porcentagem de resistência entre 1,3%, 4,4%, 11,6% e 0,9% dos isolados, respectivamente, no entanto, o número de isolados avaliados durante o estudo foi decrescendo a cada ano (1200, 407, 423 e 106, respectivamente). O aumento da resistência à espectinomicina pode ser reflexo do uso frequente deste antimicrobiano e da propagação de isolados com aumento de MIC na Rússia (KUBANOVA et al., 2010; KUBANOVA et al., 2014). Em todos esses estudos, os autores não encontraram isolados com resistência de alto nível à espectinomicina ($MIC \geq 1024 \mu\text{g/mL}$), as MICs máximas foram de 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$ (KUBANOVA et al., 2010; KUBANOVA et al., 2014). No ano de 2015, outro estudo realizado pelo mesmo grupo, avaliando 124 isolados de *N. gonorrhoeae*, descreveu 100% de sensibilidade à espectinomicina (KUBANOV et al., 2016). Na Rússia, a espectinomicina é utilizada quando a ceftriaxona (tratamento de primeira linha para gonorreia urogenital) não está disponível ou em casos de alergia aos beta-lactâmicos (KUBANOV et al., 2016).

Na Coreia, um estudo com 977 isolados, coletados no período de 2000 a 2006, utilizando metodologia de ágar diluição, observou 100% de sensibilidade à espectinomicina. A MIC_{50} e a MIC_{90} foram de 32 $\mu\text{g/mL}$ no período estudado, sendo descritas MICs entre 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$ (LEE et al., 2011). Em estudo posterior, compreendendo o período de 2011 a 2013, a espectinomicina foi avaliada em 210 isolados de *N. gonorrhoeae* por ágar diluição, todos os isolados foram sensíveis, sendo observada uma variação na MIC entre 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, com MIC_{50} e MIC_{90} de 32 $\mu\text{g/mL}$ (LEE et al., 2015). Entre os anos de 2002 e 2006 a espectinomicina foi o antimicrobiano mais utilizado para o tratamento da gonorreia na Coreia (mais de 50% dos casos), seguido das fluoroquinolonas e da ceftriaxona (LEE et al., 2011). No ano de 2009, 72,8% dos pacientes eram tratados com espectinomicina, essa taxa diminuiu para 51,7% em 2012, sendo descrito um aumento de pacientes tratados com ceftriaxona. A substituição se deve mais à recomendação de tratamento da OMS do que à detecção ou aumento de resistência dos isolados à espectinomicina. Na Coreia, o último relato de resistência à espectinomicina foi no ano de 1993 (LEE et al., 2015).

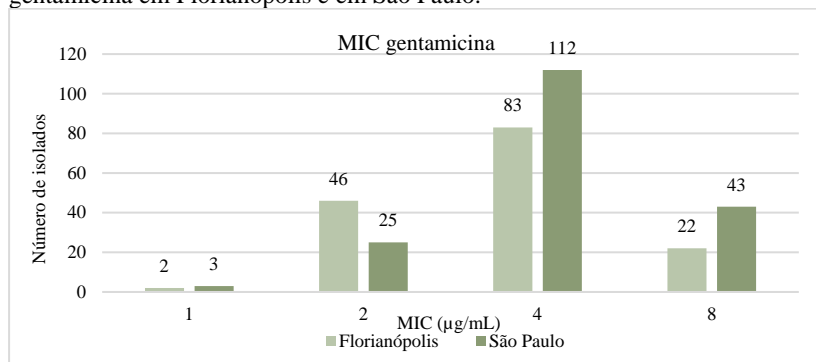
O Programa de Vigilância da Susceptibilidade Antimicrobiana Gonocócica da China (China-GASP) avaliou, por ágar diluição, um total de 1.247 isolados de *N. gonorrhoeae* coletados em 11 sítios sentinelas nos anos de 2012 e 2013. Desses isolados, apenas 3 (0,2%) mostraram-se resistentes à espectinomicina, sendo que o antimicrobiano é utilizado como uma das opções de tratamento de primeira linha para gonorreia desde o ano de 2007 naquele país (CHEN et al., 2015).

Atualmente, a resistência de alto nível à espectinomicina (MIC ≥ 1024) é rara em todo o mundo. No ano de 2010, foi descrito um caso de resistência de alto nível em um isolado de *N. gonorrhoeae* da Noruega, a resistência foi provocada por uma mutação na proteína ribossomal 5S, alterações nessa proteína têm sido geralmente associadas a resistência de baixo ou alto nível (UNEMO et al., 2013).

5.2.2 Gentamicina

Dos 153 isolados clínicos coletados na Grande Florianópolis, 131 (85,6%) foram sensíveis à gentamicina, a maioria apresentando MIC de 4 $\mu\text{g/mL}$ (63,4% - 83/131), sensibilidade intermediária foi observada em 22 isolados (14,4%) (Figura 9). Entre os isolados de São Paulo, observou-se sensibilidade em 76,5% (140/183), dos quais 80% (112/140) apresentaram MIC *borderline* para gentamicina (4 $\mu\text{g/mL}$), a porcentagem de isolados com sensibilidade intermediária (MIC de 8 $\mu\text{g/mL}$) foi de 23,5%.

Figura 9: Distribuição dos isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para gentamicina em Florianópolis e em São Paulo.



Em Florianópolis, isolados com sensibilidade intermediária à gentamicina (MIC 8 µg/mL) foram observados desde o primeiro ano do estudo (2008), destacando o ano de 2015, quando representaram 22,2% dos 36 isolados. Curiosamente, no ano 2016 todos os 20 isolados apresentaram sensibilidade à gentamicina (Figura 10 e Tabela 12).

Figura 10: Distribuição dos 153 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para espectinomicina na Grande Florianópolis.

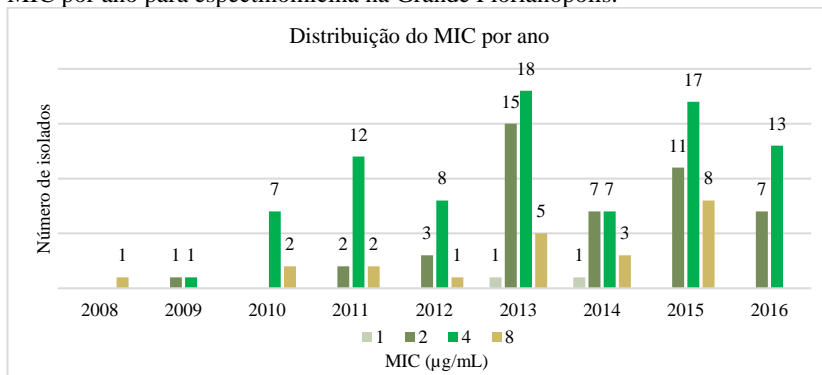


Tabela 12: Distribuição dos 153 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para gentamicina na Grande Florianópolis.

Ano	N (%)	MIC (µg/mL)												
		≤1				2			4			8		
n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total
2008	1 (0,7)													
2009	2 (1,3)				1	50	0,7	1	50,0	0,7		1	100	0,7
2010	9 (5,9)							7	77,8	4,6	2	22,2	1,3	
2011	16 (10,5)				2	12,5	1,3	12	75,0	7,8	2	12,5	1,3	
2012	12 (7,8)				3	25	2,0	8	66,7	5,2	1	8,3	0,7	
2013	39 (25,5)	1	2,6	0,7	15	38,5	9,8	18	46,2	11,8	5	12,8	3,3	
2014	18 (11,8)	1	5,6	0,7	7	38,9	4,6	7	38,9	4,6	3	16,7	2,0	
2015	36 (23,5)				11	30,6	7,2	17	47,2	11,1	8	22,2	5,2	
2016	20 (13,1)				7	35	4,6	13	65,0	8,5				

Em São Paulo, os primeiros isolados com sensibilidade intermediária à gentamicina apareceram no ano de 2005, sendo que em 2006, 59,4% (19/32) dos isolados apresentaram sensibilidade intermediária ao antimicrobiano (Figura 11). Entre os anos de 2007 e 2015, o número de isolados do estudo foi muito pequeno, fato que pode ser analisado como um importante viés para o baixo isolamento de *N. gonorrhoeae* com sensibilidade intermediária à gentamicina (Tabela 13).

Figura 11: Distribuição dos 183 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para gentamicina em São Paulo.

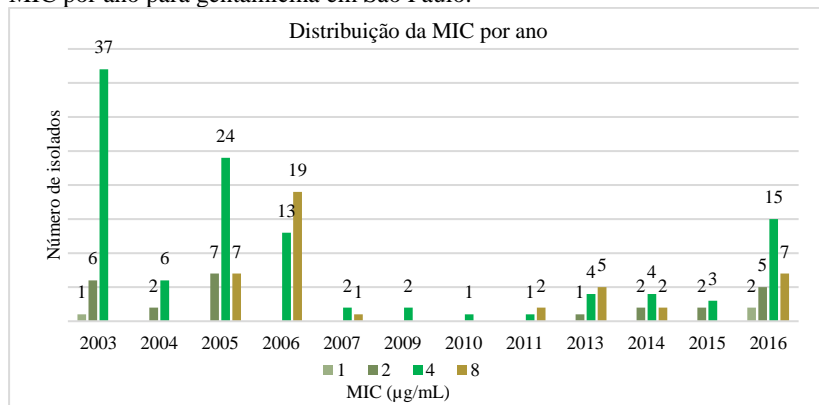


Tabela 13: Distribuição dos 183 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC por ano para gentamicina em São Paulo.

Ano	N (%)	MIC (µg/mL)											
		≤ 1			2			4			8		
		n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total	n	% ano	% total
2003	44 (24)	1	2,3	0,5	6	13,6	3,3	37	84,1	20,2			
2004	8 (4,4)				2	25	1,1	6	75	3,3			
2005	38 (20,8)				7	18,4	3,8	27	71,1	14,8	7	18,4	3,8
2006	32 (17,5)							13	40,6	7,1	9	28,1	4,9
2007	3 (1,6)							2	66,7	1,1	1	33,3	0,5
2009	2 (1,1)							2	100	1,1			
2010	1 (0,5)							1	100	0,5			
2011	3 (1,6)							1	33,3	0,5	2	66,7	1,1
2013	10 (5,5)				1	10	0,5	4	40	2,2	5	50	2,7
2014	8 (4,4)				2	25	1,1	4	50	2,2	2	25	1,1
2015	5 (2,7)				2	40	1,1	3	60	1,6			
2016	29 (15,8)	2	6,9	1,1	5	17,2	2,7	15	51,7	8,2	7	24,1	3,8

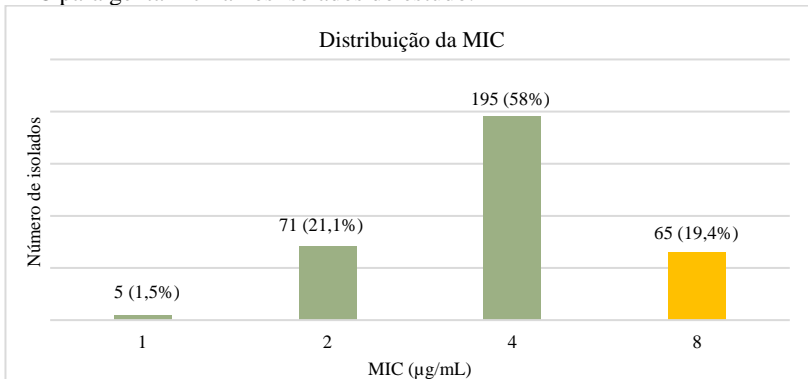
Tanto os isolados da grande Florianópolis quanto de São Paulo apresentaram os mesmos valores de MIC₅₀ e MIC₉₀, 4 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente. Foi observada uma porcentagem significativamente maior de isolados com sensibilidade intermediária (MIC = 8 µg/mL) à gentamicina entre as amostras da cidade de São Paulo quando comparado a Grande Florianópolis durante o período estudado (p=0,035) (Tabela 14)

Tabela 14: Associação da MIC com sensibilidade intermediária para gentamicina nos isolados, por procedência.

	MIC < 8 µg/mL (n = 271)	MIC = 8 µg/mL (n = 65)	P*
São Paulo (n = 183)	76,5% (140)	23,5% (43)	0,035
Grande Florianópolis (n = 153)	85,6% (131)	14,4% (22)	

Pode-se observar a predominância da MIC 4 µg/mL entre os 336 isolados do estudo, essa MIC *borderline* representou 58% (195/336) das amostras (Figura 12).

Figura 12: Distribuição dos 336 isolados de *N. gonorrhoeae* de acordo com a MIC para gentamicina nos isolados do estudo.



A sensibilidade intermediária à gentamicina, observada entre 19,4% (65/336) dos isolados do presente estudo, foi bem superior aos 9,3% encontrados por Bala e colaboradores (2016) na Índia. No estudo de Bala e colaboradores (2016), a determinação da MIC foi realizada pela metodologia utilizando as tiras de gradiente de concentração para 258 isolados coletados entre os anos de 2010 e 2015. Entretanto, outro estudo do mesmo grupo, utilizando a mesma metodologia (tiras de gradiente de concentração), que avaliou 323 isolados coletados na Índia entre os anos de 2002 e 2013 encontrou 23,5% (76/323) de isolados com sensibilidade intermediária e 0,6% (2) de isolados resistentes à gentamicina. Um estudo realizado no Brasil em 2009, utilizando tiras de gradiente de concentração encontrou 3% (4/122) de isolados resistentes à gentamicina (MIC = 32 µg/mL) (STARNINO et al., 2012), sendo estes, os únicos estudos que relataram resistência a esse antimicrobiano

Estudo multicêntrico realizado por Chisholm e colaboradores (2011), em 17 países da Europa, com 1366 isolados de *N. gonorrhoeae*, encontrou MICs de gentamicina de 1 a 16 µg/mL e no presente estudo foi encontrado MICs de gentamicina de que variaram de 1 a 8 µg/mL. Foi encontrado 82,7% (1130/1366) de isolados com sensibilidade intermediária (MIC 8 e 16 µg/mL) e 17,3% (236/1366) de isolados sensíveis à gentamicina (MIC ≤4 µg/mL). Além disso, Chisholm e colaboradores também relatam ter encontrado uma predominância da MIC de 4 µg/mL na Inglaterra, País de Gales, Alemanha, Noruega e Portugal, assemelhando aos resultados encontrados no presente estudo.

Nos Estados Unidos, estudo realizado com amostras coletadas em 2015 e 2016, que avaliou 10.403 isolados de *N. gonorrhoeae* por metodologia de ágar diluição, encontrou alta porcentagem (73%: 7.603/10.403) de isolados com sensibilidade intermediária à gentamicina (MIC de 8 e 16 µg/mL). O estudo relatou um aumento nos isolados com sensibilidade intermediária de 68% em 2015 para 78% em 2016 (MANN et al., 2018). Alta porcentagem de isolados com sensibilidade intermediária à gentamicina (69,2%: 164/237) também foram encontrados na Argentina, em estudo realizado por metodologia de ágar diluição, com amostras coletadas entre 2013 e 2015. (GIANECINI et al., 2018). Lagacé-Wiens e colaboradores (2017) avaliaram também por metodologia de ágar diluição, 112 isolados coletados no Canadá no ano de 2013, encontrando MIC entre 2 e 16 µg/mL.

Estudos que compararam a MIC por metodologia de ágar diluição e tiras de gradiente de concentração, relataram que as fitas geraram resultados de MIC, em média, uma diluição menor do que o observado por ágar diluição (DALY et al., 1997; CHISHOLM et al., 2011). Assim, o estudo de Ferreira e colaboradores (2015), que utilizou fitas de gradiente de concentração, relatando 100% de sensibilidade à gentamicina (MIC entre de 0.016 a 4 µg/mL) em 83 isolados brasileiros, pode não ter detectado isolados intermediários, incorrendo em erros menores por viés metodológico (FERREIRA et al., 2015). Da mesma forma, estudo, realizado na Groelândia com 102 isolados testados por metodologia de fitas de gradiente de concentração, com variação de MIC entre 1 e 4 µg/mL, e 100% de sensibilidade gentamicina, pode ter apresentado o mesmo tipo de erro (PEDERSEN et al., 2016). A importância da metodologia utilizada nos estudos para determinar a sensibilidade de *N. gonorrhoeae* à gentamicina, é exacerbada pelo fato da maioria dos

estudos relataram predominância de isolados com MIC *borderline* (4 µg/mL e 8 µg/mL) para esse antimicrobiano

Em Malawi, na África, a gentamicina 240 mg por via intramuscular tem sido utilizada como regime de primeira linha no tratamento de *N. gonorrhoeae* desde 1993. Esta decisão foi baseada no baixo custo e eficácia clínica deste antimicrobiano, pois foi observado uma taxa de cura clínica de 95% (DALY et al., 1997). Entre 1994 e 2004 as taxas de cura clínica variaram de 91,8% a 94,8%, sendo que a prevalência da uretrite gonocócica não aumentou ao longo do tempo (DALY et al., 1997; PRICE et al., 2003). Em um outro estudo, realizado em 2007, 14 anos após a introdução da gentamicina como tratamento de *N. gonorrhoeae* em Malawi, todos os 100 isolados, avaliados pela metodologia de ágar diluição, continuaram a ser sensíveis à gentamicina, mostrando sua eficácia no tratamento da uretrite gonocócica (BROWN et al., 2010).

Tanto a espectinomicina quanto a gentamicina são opções promissoras para o tratamento da infecção gonocócica genital, principalmente nos casos de resistência as ESCs, pois esses antimicrobianos atuam na síntese proteica, enquanto as ESCs atuam na síntese da parede celular bacteriana (BALA et al., 2016). Uma das desvantagens do tratamento com esses antimicrobianos, é que já foram descritos anteriormente, uma limitada eficácia da espectinomicina e da gentamicina para infecções faríngeas (JUDSON; EHRET; HANDSFIELD, 1985; DOWELL; KIRKCALDY, 2012; ROSS et al., 2017).

Em 2018, na Inglaterra foi descrito o primeiro caso de infecção uretral e faríngea por *N. gonorrhoeae* apresentando resistência à ceftriaxona e resistência de alto nível à azitromicina. Além disso, o isolado também apresentou resistência à tetraciclina e ao ciprofloxacino. A MIC, determinada por tiras de gradiente de concentração, tanto no isolado uretral quanto no faríngeo, para espectinomicina foi de 8 µg/mL e para gentamicina de 2 µg/mL, ambas sendo consideradas sensíveis. O paciente que inicialmente havia sido tratado com ceftriaxona e doxiciclina, recebeu o tratamento com espectinomicina 2g por via intramuscular 13 dias após o início do primeiro tratamento, devido a detecção laboratorial de resistência à ceftriaxona. Em consulta de acompanhamento, 20 dias após o tratamento com espectinomicina, o NAAT na urina foi negativo, no entanto, o *Swab* faríngeo permaneceu positivo para *N. gonorrhoeae*, caracterizando falha no tratamento com espectinomicina para a infecção de faringe. O paciente recebeu então

tratamento com ertapenem 1g por via intravenosa durante três dias, os resultados laboratoriais subsequentes dos NAATs para *N. gonorrhoeae* foram negativos (EYRE et al., 2018).

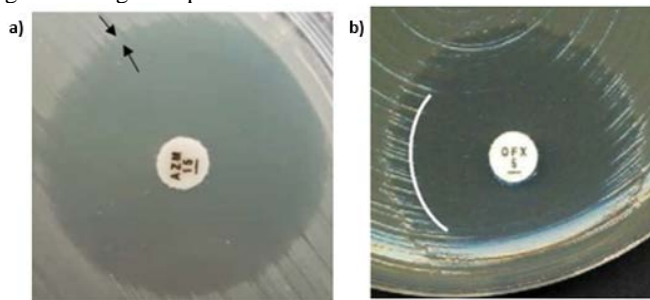
No Brasil já foram relatadas altas taxas de resistência ao ciprofloxacino, resistência à azitromicina e sensibilidade diminuída as ESCs (BAZZO et al., 2018). O presente estudo sugere que tanto a espectinomicina quanto a gentamicina podem ser opções viáveis de tratamento para *N. gonorrhoeae* no país, principalmente por não terem sido encontrados isolados resistentes no período estudado. Estudos que avaliem a taxa de cura clínica após tratamento com esses antimicrobianos, bem como, o monitoramento do perfil de sensibilidade deles ao longo dos anos, devem ser realizados.

5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELA METODOLOGIA DE DISCO DIFUSÃO E COMPARAÇÃO COM ÁGAR DILUIÇÃO

5.3.1 Leitura dos halos de inibição por disco difusão

Durante a leitura do diâmetro das zonas de inibição de crescimento bacteriano pela metodologia de disco difusão, para os discos de azitromicina, ceftriaxona, espectinomicina, penicilina, tetraciclina e raramente para a gentamicina, foram observados halos com bordas mal definidas ou difusas, assim como descrito para enterobactérias (BRCAS 2019) (Figura 13).

Figura 13: Figura representativa do halo mal definido/difuso.



a) Halo de *N. gonorrhoeae* com azitromicina; b) Halo das enterobactérias com ofloxacino

Fonte: a) da autora. b) BRCAS, 2016

Para isolados de *N. gonorrhoeae* não foi encontrada na literatura descrição da formação de halos com bordas mal definidas ou difusas. Por esse motivo, durante os experimentos ambos os halos externos e internos (completa inibição do crescimento a olho nu com luz refletida) foram registrados. O objetivo foi verificar mudanças entre categorias de sensibilidade quando comparados aos resultados de ágar diluição. O quadro 1 apresenta os resultados observados com a leitura do halo externo e o quadro 2 apresenta os resultados do halo interno para o antimicrobiano tetraciclina. Destacados em vermelho estão os isolados resistente por ambas as metodologias, em verde os isolados que são sensíveis por ambas as metodologias e em azul claro estão destacados os erros menores, e em roxo os erros muito grave.

Quadro 1: MIC da tetraciclina versus diâmetros de leitura do halo de inibição externo para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae*

MIC (µg/mL)	32	1	46	3			1											
	16		7	1						1								
	8		1					1										
	4			1	1	1	2	1	2	1								
	2			5	9	10	20	6	13	13	2	1	1		2			
	1				1	1		2	12	46	10	14			1		4	
	0,5		1				1	4	4	19	8	7	8	4	1			
	0,250									3	1	1	5	3	17			
	0,125														5			
			≤10	11-20	21-25	26-28	29	30	31	32	33-35	36	37	38	39	≥40		

Legenda: Resistente Sensibilidade intermediária Sensível Erro Menor Erro Muito Grave

Quadro 2: MIC da tetraciclina versus diâmetros de leitura do halo de inibição interno para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae*

MIC (µg/mL)	32	1	48	2														
	16		7	1						1								
	8		1						1									
	4			2	3	1	2			1								
	2			11	21	11	21	4	6	6	1	1						
	1				1	1		5	13	42	12	17						
	0,5		1				1	6	6	20	10	8	4	1				
	0,250									3		2	3	4	18			
	0,125														5			
			≤10	11-20	21-25	26-28	29	30	31	32	33-35	36	37	38	39	≥40		

Diâmetro da zona de inibição (mm)

Legenda: Resistente Sensibilidade intermediária Sensível Erro Menor

Quando comparados com os resultados do ágar diluição, a leitura do halo externo mostrou concordância de 79,5% e a leitura do halo interno mal definido/difuso de 89,3%. Para a leitura do halo externo foram observados 66 (19,6%) erros menores e 3 (0,9%) erros muito graves, já para leitura do halo interno foram observados 35 erros menores e nenhum erro grave ou muito grave. Nossos resultados mostram mudança de categoria de sensibilidade para alguns isolados conforme o tipo de leitura adotada. Devido a recomendação dos comitês de padronização para realização da leitura seguindo o halo interno mal definido para outras espécies bacterianas, e a maior concordância entre os resultados com a metodologia de ágar diluição, considerada padrão ouro para *N. gonorrhoeae*, consideramos no presente estudo somente a leitura do halo de inibição mal definido/difuso para todos os isolados avaliados.

5.3.2 Azitromicina

Para a metodologia de disco difusão, foram utilizados os pontos de corte da Sociedade Britânica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC), porque o CLSI e o EUCAST não possuem pontos de corte pré-estabelecidos para azitromicina em isolados de *N. gonorrhoeae*.

O quadro 3 compara as MIC para azitromicina, utilizando os critérios de interpretação do EUCAST, com o diâmetro da zona de inibição para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae*. Podemos observar um total de 15 (4,5%) erros menores, todos *borderline*, estando dentro dos limites estabelecidos pelo CLSI, que é de até 40% para erros menores *borderline*. A taxa de concordância foi de 95,5%.

Quadro 3: MIC da azitromicina versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae* utilizando os critérios de interpretação do EUCAST.

MIC (µg/mL)	>4	3	4																		
	2	2	2	1																	
	1		2	1	1																
	0,5					4	2	1	2	2	3									1	
	0,25					16	5	12	5	9	8	28	7	4							
	0,125					8	6	12	6	5	7	17	15	12							
	0,06					3		8	3	10	2	26	22	19							
	0,03											1	4	9	15						
		18-20	21-24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34-36	37-39	≥ 40						

Diâmetro da zona de inibição (mm)

Legenda:

Resistente

Sensível

Erro Menor

Todos os resultados discordantes observados apresentaram sensibilidade intermediária pela metodologia de ágar diluição com MIC 0,5 µg/mL e foram sensíveis por disco difusão. Os halos de inibição de crescimento por disco difusão das amostras discordantes variaram entre 28 a ≥ 40 mm.

As MIC para azitromicina pelo CLSI classificam os isolados como Tipo-selvagem e Tipo-não-selvagem, não havendo a categoria sensibilidade intermediária para este antimicrobiano

Foram encontrados 4 (1,2%) isolados discordantes (Quadro 4), todos eles *borderline*, mas considerados como erro grave (destacados em azul escuro) devido a mudança da categoria sensível para resistente. Essa taxa de erro também é considerada aceitável de acordo com o CLSI que aceita até 10% de erros grave *borderline*.

Quadro 4: MIC da azitromicina versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae* utilizando os critérios de interpretação do CLSI.

MIC (µg/mL)	>4	3	4																
	2	2	2	1		1													
	1		2	1	1														
	0,5						4	2	1		2	2	3						
	0,25						16	5	12	5	9	8	28	7	4				
	0,125						8	6	12	6	5	7	17	15	12				
	0,06						3		8	3	10	2	26	22	19				
	0,03											1	4	9	15				
		18-20	21-24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34-36	37-39	≥40				
		Diâmetro da zona de inibição (mm)																	

Legenda:

Resistente

Sensível

Erro Grave

Tanto o BSAC quanto o CLSI não apresentam sensibilidade intermediária, desta forma, qualquer erro encontrado é considerado erro grave ou erro muito grave.

O estudo realizado por Mal e colaboradores (2016) comparando a metodologia da fita de gradiente de concentração com o disco difusão e utilizando os pontos de corte do BSAC para disco difusão, encontrou 100% de concordância, destacando que a metodologia de gradiente de concentração em fita também tem como princípio a difusão do antimicrobiano no ágar.

5.3.4 Ciprofloxacino

Na comparação entre as duas metodologias para o ciprofloxacino a concordância foi de 99,7%. Para este antimicrobiano os isolados apresentaram resultados dicotômicos, sendo observado apenas 0,6% de sensibilidade intermediária. Apenas um isolado apresentou resultado discordante entre as metodologias estudadas, considerado resistente por ágar diluição (MIC 2µg/mL) e intermediário por disco difusão, sendo ele *borderline* e ficando categorizado como erro menor (0,3%) em porcentagem considerada aceitável (Quadro 6).

Quadro 6: MIC do ciprofloxacino versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae*.

MIC (µg/mL)	32	2	1																	
	16	33	4																	
	8	6	17			1														
	4	2	36	2																
	2		3	4			1													
	1		1	2	2	1														
	0,5																			
	0,250																			
	0,125							2												
	0,06																			
	0,03												1							
	0,016											2	4							
	0,008								1	1	3	19	9	5						
	0,004								4	4	15	55	42	4						
	0,002										4	23	13	4						
	0,001											2	1							
	≤10	11-20	21-25	26	27	28	35-38	40	41	42	43-45	46-50	51-54	≥55						

Diâmetro da zona de inibição (mm)

Legenda: Resistente Sensibilidade intermediária Sensível Erro Menor

Singh e colaboradores (2012) compararam a MIC por fitas de gradiente de concentração com o disco difusão, também descreveram somente erros menores (21/295), com nível de concordância de 92,9% entre as duas metodologias. No estudo de Liao e colaboradores, a concordância relatada foi de 93,3%, sendo sete erros menores, três erros graves e um erro muito grave entre os 163 isolados testados. Um outro estudo que comparou o perfil de sensibilidade utilizando tiras de gradiente de concentração com o disco difusão encontrou 10 (10%) erros menores e uma concordância de 90% para ciprofloxacino (MAL et al., 2016).

5.3.5 Espectinomicina

Assim como para a ceftriaxona, todos os isolados foram sensíveis à espectinomicina por ambas as metodologias, sendo assim, não foram observados erros e a concordância foi de 100% (Quadro 7).

Quadro 7: MIC da espectinomicina versus diâmetros de inibição para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae*.

MIC (µg/mL)	1024																			
	512																			
	256																			
	128																			
	64																			
	32						2	2	3	8	4	1								
	16						18	27	47	37	43	31	31	4	8					
	8					1		1	2	3	3	11	10	12	19					
	4								2					2						4
			≤14	15	17	18	19	20-22	23	24	25	26	27	28	29	≥30				
Diâmetro da zona de inibição (mm)																				

Legenda: Sensível

Os resultados do presente estudo são semelhantes ao reportado por Singh e colaboradores (2012) e Mal e colaboradores (2012), que também descreveram somente isolados sensíveis a espectinomicina por ambas as metodologias, resultando em 100% de concordância.

5.3.6 Gentamicina

Para a metodologia de disco difusão, foram utilizados os pontos de corte sugeridos por Bala e colaboradores (2016) porque o CLSI e o EUCAST não possuem pontos de corte pré-estabelecidos para a gentamicina.

Foram testados discos de duas marcas diferentes, uma nacional (DME, Brasil) e uma importada amplamente utilizada nos estudos de comparação de técnicas (Oxoid, Inglaterra). A concentração da gentamicina foi a mesma nos discos de ambas as marcas (10µg), e foram aplicados na mesma placa de antibiograma, garantindo as mesmas condições. Os resultados observados entre os diferentes fabricantes são apresentados nos quadros 8 e 9.

No presente estudo, comparando o perfil de sensibilidade de *N. gonorrhoeae* pela metodologia de ágar diluição e disco difusão para

gentamicina utilizando os discos DME, encontramos um total de 60 (17,9%) erros menores, sendo que destes 59 (17,5%) eram *borderline* e 1 (0,3%) *não-borderline* (Quadro 8).

Quadro 8: MIC da gentamicina versus diâmetros de inibição utilizando os discos DME para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae*

32																					
16																					
8			6	20	32	5				1	1										
4				19	31	52	31	38	15	9											
2				1	2	2	21	12	14	15	2	2									
1							1	1	3												
	≤ 11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23								

Diâmetro da zona de inibição (mm)

Legenda: Sensibilidade intermediária Sensível Erro Menor

Utilizando os discos Oxoid, encontramos um total de 46 (13,7%) erros menores, sendo 45 (13,4%) *borderline* e 1 (0,3%) *não-borderline* (Quadro 9).

Quadro 9: MIC da gentamicina versus diâmetros de inibição utilizando os discos da Oxoid para os 336 isolados de *N. gonorrhoeae*

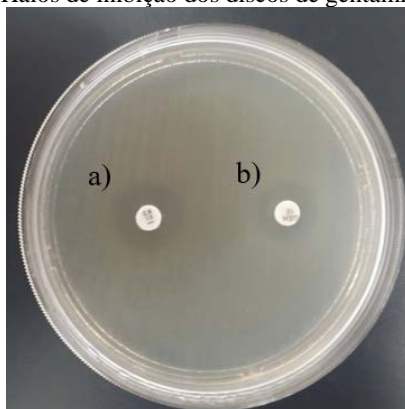
32																					
16																					
8				3	39	14	6	2	1												
4				1	19	56	48	43	14	12	1	1									
2				1	2	3	8	16	16	14	7	2	2								
1								1		4											
	≤ 11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23								

Diâmetro da zona de inibição (mm)

Legenda: Sensibilidade intermediária Sensível Erro Menor

Não foi encontrado nenhum erro grave ou muito grave e os erros menores encontrados pelo discos DME e Oxoid estavam dentro dos limites aceitáveis (<40% *borderline* e < 5% *não-borderline*). A taxa de concordância com os discos Oxoid foi de 86,3%, e de 82,1% para discos da marca DME. O estudo constatou que para os discos da marca Oxoid os halos de inibição do crescimento bacteriano foram em média, 1mm maiores do que o observado para os discos DME. Na figura 14 pode-se observar a diferença no tamanho dos halos.

Figura 14: Halos de inibição dos discos de gentamicina



a) Discos Oxoid; b) Discos DME

Fonte: Da autora

No estudo de Bala e colaboradores (2016), que propôs os pontos de corte por disco difusão para gentamicina, foram avaliados 333 isolados de *N. gonorrhoeae*, incluindo 10 cepas WHO. Comprando com o padrão ouro, ágar diluição, o referido estudo relatou 51 (15,3%) erros menores e nenhum erro grave ou muito grave, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Gianecini e colaboradores (2018) avaliaram 237 isolados de *N. gonorrhoeae* por ágar diluição, comparando com a metodologia de disco difusão utilizando discos de dois fabricantes diferentes (Oxoid e BBL). Seguindo os critérios de interpretação sugeridos por Bala e colaboradores (2016), os autores encontraram 52 (21,9%) erros menores, *borderline* para o disco Oxoid e 106 (44,7%) de erros menores, *borderline*, para os discos BBL, sendo que os discos BBL apresentaram porcentagem de erros acima do aceitável segundo o CLSI. No referido estudo, os autores sugeriram uma alteração no ponto de corte, considerando resistente $\leq 12\text{mm}$, sensibilidade intermediária de 13 a 16mm e sensível $\geq 17\text{mm}$, 1 mm a mais para o perfil de sensibilidade intermediária em relação ao proposto por Bala e colaboradores (2016). Com essa mudança proposta, a porcentagem de erros diminuiria para 24 (10,1%) com os discos Oxoid e 46 (19,1%) para os discos BBL, todos erros menores *borderline*, neste caso, ambos os fabricantes teriam resultados aceitáveis.

2012). No entanto, os estudos de Liao e colaboradores (2010) e Mal e colaboradores (2016), descreveram concordâncias bem menores entre os resultados por ágar diluição e disco difusão para penicilina, 65% e 60% respectivamente. Em ambos os estudos, foram relatados somente erros menores, não sendo reportados erros graves ou muito graves.

5.3.8 Tetraciclina

Para a tetraciclina foi encontrado uma concordância de 89,6% no presente estudo. Foram observados 35 erros menores, dos quais 33 (9,8%) *borderline* e 2 (0,6%) *não-borderline*, estando dentro dos limites aceitáveis pelo CLSI (Quadro 2).

A concordância entre as duas metodologias para tetraciclina encontrada no presente estudo (89,6%), foi menor do que os 99,3% descritos por Singh e colaboradores em 2012. No entanto, Singh e colaboradores descreveram 2 erros graves entre os testes realizados, tipo de erro não observado no presente estudo. Mal e colaboradores (2016) encontraram 1 (1%) erro grave e 37 (37%) de erros menores, com taxa de concordância bem inferior (62%).

5.3.9 Reprodutibilidade

O Apêndice B mostra a média, o mínimo e o máximo do diâmetro do halo de inibição encontrado para as cepas WHO. O EUCAST possui três categorias para o perfil de sensibilidade para a azitromicina (sensível, sensibilidade intermediária e resistente), enquanto que o BSAC sugere 2 categorias (sensível e resistente), não permitindo assim, comparar os resultados da reprodutibilidade. Essa comparação foi realizada e encontra-se disponível no Apêndice C.

Para a Azitromicina, ao utilizar os critérios de interpretação do CLSI para o ágar diluição, e da BSAC para o disco difusão, encontramos 6 testes discordantes e 120 testes concordantes, resultando em 95% de concordância (Quadro 11), estando dentro da taxa aceitável.

Quadro 11: MIC e diâmetro da zona de inibição da azitromicina no teste de reprodutibilidade utilizando os critérios de interpretação do CLSI

MIC (µg/mL)	≥ 256	9																		
	4		9	4	5															
	2																			
	1					6	2	2	3	1	3	1								
	0,5						2	3	1	1	3	5	2	4	4	4	2			
	0,25						2	4	7	3	5	8	7	5	3	1				
	0,125						1		2	1	1		2	1			1			
	0,06																			
	0,03																			
		0	20-22	23	24	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	≥37				

Legenda: Resistente Sensível Erro Grave

A espectinomicina apresentou 100% de concordância (Quadro 12). Nenhuma das cepas apresentavam resultados *borderline*, sendo essa uma das limitações do estudo de reprodutibilidade para a espectinomicina.

Quadro 12: MIC e diâmetro da zona de inibição da espectinomicina no teste de reprodutibilidade

MIC (µg/mL)	1024	9																	
	512																		
	256																		
	128																		
	64																		
	32																		
	16						4	7	20	22	17	13	17	2	6				
	8							1		1	3	1		1	2				
	4																		
	0	14	15	17	18	22	23	24	25	26	27	28	29	≥30					

Legenda: Resistente Sensível

Os discos de gentamicina da marca DME apresentaram 25 testes discordantes e 101 testes concordantes, resultando em 80% de concordância (Quadro 13). Enquanto que os discos da marca Oxoid apresentaram 9 testes discordantes e 117 testes concordantes, resultando em 93% de concordância (Quadro 14).

Quadro 13: MIC e diâmetro da zona de inibição da gentamicina no teste de reprodutibilidade utilizando os discos DME

32																				
16																				
8					10	8														
4					17	28	30	23	8	2										
2																				
1																				
	≤ 11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23							

Diâmetro da zona de inibição (mm)

Legenda: Sensibilidade intermediária Sensível Erro Menor

Quadro 14: MIC e diâmetro da zona de inibição da gentamicina no teste de reprodutibilidade utilizando os discos Oxoid.

32																				
16																				
8					10	8														
4					1	15	28	42	15	7										
2																				
1																				
	≤ 11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23							

Diâmetro da zona de inibição (mm)

Legenda: Sensibilidade intermediária Sensível Erro Menor

Apesar de que os testes não terem atingido 95% de concordância (Clark et al., 2009), podemos observar que todas as discrepâncias estão próximas ao ponto de corte. De acordo com o CLSI, (2016), quando os dados apontam para isolados próximos a um ponto de corte, pode ocorrer uma alta porcentagem de discrepâncias (CLSI, 2016).

O nível de concordância encontrado nesse estudo para ambos os discos de gentamicina é superior ao encontrado por Gianecini e colaboradores (2018) utilizando os pontos de corte sugeridos por Bala e colaboradores (2016).

6 CONCLUSÃO

O perfil de sensibilidade aos aminoglicosídeos espectinomicina e gentamicina observado para os isolados de *N. gonorrhoeae* no presente estudo, indicam esses antimicrobianos como uma boa alternativa para tratamento da gonorreia no país, principalmente nos casos de falhas terapêuticas com as cefalosporinas ou em pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos.

Apesar de não terem sido encontrados isolados resistentes, as MICs elevadas evidenciam a extrema importância da realização contínua de vigilância do perfil de sensibilidade para gentamicina e espectinomicina entre os isolados circulantes no país. Atualmente, a espectinomicina e a gentamicina são pouco utilizadas para tratamento da gonorreia no mundo, e não estão sendo utilizadas com esse fim no Brasil. O aumento da exposição a esses antimicrobianos pode resultar em aumento da MIC e consequentemente levar à resistência, de forma semelhante ao que ocorreu com a espectinomicina na década de 1980.

Todos os antimicrobianos testados apresentaram concordâncias dentro dos limites considerados aceitáveis pelo CLSI na comparação entre as metodologias. A maior parte dos erros observados foram erros menores, sendo frequentemente observados resultados *borderline*.

Uma das limitações deste estudo em relação a comparação das metodologias de disco difusão e ágar diluição, foi a ausência de isolados com perfil de sensibilidade intermediário ou resistente à espectinomicina e à ceftriaxona. Isso não permitiu avaliar o quanto fidedigna a metodologia de disco difusão é em relação à ágar diluição para esses dois antimicrobianos.

Os critérios interpretativos para o método de disco difusão descritos pelo BSAC (2016) para a azitromicina e de Bala e colaboradores (2016) para a gentamicina apresentaram concordância aceitável quando comparados com as MIC por ágar diluição, podendo ser utilizados como alternativa viável, até a padronização pelos comitês internacionais.

Os resultados concluem que a metodologia de disco difusão, é uma metodologia factível, que produz resultados comparáveis ao ágar diluição (padrão ouro) e pode ser utilizada pelos laboratórios na rotina, para vigilância epidemiológica e situações clínicas em locais com recursos limitados nos quais os métodos de determinação da MIC não estão prontamente disponíveis.

REFERÊNCIAS

ARGENTINA. **Guía Practica para el diagnostico y susceptibilidad de *Neisseria gonorrhoeae***. Argentina: 26 p. 2015.

BALA, M. et al. Gentamicin in vitro activity and tentative gentamicin interpretation criteria for the CLSI and calibrated dichotomous sensitivity disc diffusion methods for *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1856–1859, 2016.

BALA, M. et al. Gentamicin susceptibility among a sample of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates in India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7518–7521, 2016.

BAZZO, M. L. et al. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015–16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1854–1861, 2018.

BELDA JUNIOR, W. et al. Atividade in vitro de cinco drogas antimicrobianas contra *neisseria gonorrhoeae*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 6, p. 661–667, 2002.

BELDA JUNIOR, W. et al. Evaluation of the *in vitro* activity of six antimicrobiaç agentes against *Neisseria gonorrhoeae*, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 55–58, 2007.

BENZAKEN, A. S. et al. Prevalência da Infecção por Clamídia e Gonococo em Mulheres Atendidas na Clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. **Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**. v. 22, n. 3, p. 129–134, 2010.

BIGNELL, C.; UNEMO, M. European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoeae in Adults. **International Journal of STD & AIDS**, v. 24, n. 2, p. 85–92, 2013.

BOLAN, G. A.; SPARLING, F.; WASSERHEIT, J. N. The Emerging Threat of Untreatable Gonococcal Infection. **The New England Journal Of Medicine**, p. 485–487, 2012.

BOLLELA, V. Aminoglicosídeos. 2018. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3480813/mod_folder/content/0/Aminoglicosídeos.pdf?forcedownload=1>. Acesso em: 15 de novembro de 18.

BOSLEGO J W et al. Effect of spectinomycin use on the prevalence of spectinomycin-resistant and penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **New England journal of medicine**, v. 317, n. 5, p. 272–278, 1987.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis**. 120 p, 2015.

BRASIL. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. São Paulo. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/sao-paulo/panorama>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2019.

BRASIL. NOTA INFORMATIVA No 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS. Atualização da recomendação nacional do tratamento preferencial da infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto). Departamento de Vigilância, Prevenção E Controle Das Infecções Sexualmente Transmissíveis, Do Hiv/Aids E Das Hepatites Virais, v. 6, p. 1–2, 2017b.

BRCASST. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Guia de leitura: Método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos do EUCAST**. v. 4, 2016.

BROWN, L. B. et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 37, n. 3, p. 169–172, 2010.

BSAC. British Society for Antimicrobial Chemotherapy: BSAC to actively support the EUCAST Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing in preference to the current BSAC Disc Diffusion Method, 2016.

CANADA. National Surveillance of Antimicrobial Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* – Annual Summary, p. 0–29, 2014.

CANADA. Gonococcal Infections Chapter. **National Surveillance of Antimicrobial Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Canada.** Public Health Agency of Canada - Annual Summary, 2016.

CDC. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2015. 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/std/tg2015/gonorrhea.htm>>.

CDC. **Reported STDs in the United States, 2016. High Burden of STDs Threaten Millions of Americans. Atlanta, Georgia,** United States: Center for Disease Control and Prevention, p. 1-3, 2017.

CHEN, S. C. et al. First nationwide study regarding ceftriaxone resistance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 92–99, 2015.

CHISHOLM, S. A. et al. An evaluation of gentamicin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 592–595, 2011.

CLARK, R. B. et al. Cumitech 31A, Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. ASM Press, Washington, DC. 2009

CLIFTON, S. et al. Prevalence of and factors associated with MDR *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales between 2004 and 2015: analysis of annual cross-sectional surveillance surveys. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 1–10, 2018.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters**; 3th ed. CLSI Document M23-A3. CLSI, 2008.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard- 10th ed. Clinical and Laboratory Standards Intitute, M07-A10 2015.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 25th ed. Informational Supplement. M100-S25. CLSI, 2015.

CLSI. **Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters**. 4th ed. M23Ed4E. CLSI, 2016.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed CLSI Supplement M100. CLSI, 2018.

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

CODES, J. S. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na Cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 2, p. 325–334, 2006.

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

COSTA, L. M. B. et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 304–309, 2013.

DALY, C. C. et al. Development of an antimicrobial susceptibility surveillance system for *Neisseria gonorrhoeae* in Malawi: Comparison of methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2985–2988, 1997.

DILLON, J.A. R. et al. Penicillin and Tetracycline Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates from Manaus, Brazil, 1998. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 28, n. 9, p. 521–526, 2001.

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

DOWELL, D.; KIRKCALDY, R. D. Effectiveness of gentamicin for gonorrhoea treatment: systematic review and meta-analysis. **Sexually Transmitted Infections**, v. 0, n. 1, p. 1–6, 2012.

EASMAN, C. et al. Spectinomycin as initial treatment for gonorrhoea. **British Medical Journal**, v. 289, p. 1032–1034, 1984.

ECDC. **Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe**. ECDC Surveillance Report, 2015.

EDWARDS, J. L.; APICELLA, M. A. The Molecular Mechanisms Used by *Neisseria gonorrhoeae* To Initiate Infection Differ between Men and Women. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 965–981, 2004.

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

EYRE, D. W. et al. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high- level azithromycin resistance, England, February 2018. **Euro Surveill**. v.23, n. 27, p. 1–6, 2018.

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

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.

GALIMAND, M.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Spectinomycin resistance in *Neisseria* spp. due to mutations in 16S rRNA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 1365–1366, 2000.

GIANECINI, R. et al. Comparison of disk diffusion and agar dilution methods for gentamicin susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 91, n. 4, p. 299–304, 2018.

GOLFETTO, L. **Caracterização molecular e determinação do perfil de resistência de isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae* circulantes na Grande Florianópolis: série histórica 2008-2016. Tese de doutorado.** Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC: 134p. 2018

GRASP. **Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*.** Key findings from the Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme About Public Health England. 2016.

ILINA, E. N. et al. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

ISON, C. et al. Spectinomycin resistant gonococci. **British Medical Journal**, v. 287, p.1827–1829, 1983.

JALIL, E. M. et al. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30 n. 12, p. 614–619, 2008.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, 2009.

JUDSON, F. N.; EHRET, J. M.; HANDSFIELD, H. H. of Comparative Study of Ceftriaxone and Spectinomycin for Treatment Pharyngeal and Anorectal Gonorrhoea. **Journal of the American Medical Association**, v. 253, n. 10, p. 1417–1419, 1985.

KOHANSKI, M. A. et al. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, v. 130, p. 797–810, 2007.

KUBANOV, A. et al. Molecular epidemiology of drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Russia (Current Status, 2015). **BMC Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

KUBANOVA, A. et al. National surveillance of antimicrobial susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 2005 – 2006 and recommendations of first-line antimicrobial drugs for gonorrhoea treatment in Russia. *Sexually Transmitted Infections*, v.84, p. 285–290, 2008.

KUBANOVA, A. et al. The Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP) national resistance prevalence in 2007 and 2008, and trends during 2005-2008. **Surveillance and outbreak reports**, v. 15, n. 14, p. 2–6, 2010.

KUBANOVA, Anna et al. Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP) - resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during 2009-2012 and NG-MAST genotypes in 2011 and 2012. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, no 1, p. 1–7, 2014.

LAGACÉ-WIENS, P. R. S. et al. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to alternative antimicrobials with therapeutic potential. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–5, 2017.

LEBEDZEU, F. et al. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of in Belarus, Eastern Europe, 2010–2013. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.

LEE, H. et al. Trends in antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from Korean patients from 2000 to 2006. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n. 11, p. 1082–1086, 2011.

LEE, H. et al. Emergence of decreased susceptibility and resistance to extended spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 9, p. 2536–2542, 2015.

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

LIAO, C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, no 5, p. 457–460, 2010.

LIU, H. et al. Assessment of Etest as an alternative to agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1435–1440, 2014.

LIU, H. et al. Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2016.

MAL, P. B. et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Pakistan by Etest compared to Calibrated Dichotomous Sensitivity and Clinical Laboratory Standards Institute disc diffusion techniques. **BMC Microbiology**, v. 16 n. 236, p. 1–8, 2016.

MANN, L. M. et al. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to Gentamicin-Gonococcal Isolate Surveillance Project, 2015-2016. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 45, n. 2, p. 96–98, 2018.

MARTINS, T. A. et al. As doenças sexualmente transmissíveis são problemas entre gestantes no ceará? **Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 16, n. 3, p. 50–58, 2004.

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

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, 2004.

PAPP, J. R. et al. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae* - 2014. **Centers for Disease Control and Prevention**, v. 63, n. 2, 2014.

PEDERSEN, M. L. et al. Rapid spread of *Neisseria gonorrhoeae* ciprofloxacin resistance due to a newly introduced resistant strain in Nuuk, Greenland, 2012-2015: A community-based prospective cohort study. **BMJ Open**, v. 6, n. 8, p. 1–5, 2016.

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

PIXABAY. **Mapa geografia brasileira**. Disponível em: <<https://pixabay.com/pt/vectors/brasil-mapa-geografia-brasileira-305119/>>. Acessado em 15 de fevereiro de 2019.

PRICE, M. et al. Addition of Treatment for Trichomoniasis to Syndromic Management of Urethritis in Malawi:: A Randomized Clinical Trial. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 30, .6, p. 516–522, 2003.

QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 226–240, 2018.

RODRIGUES, M. M. et al. Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and Ureaplasma species in cervical samples. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 31, n. 3, p. 237–241, 2011.

ROSS, J. D. et al. The efficacy and safety of gentamicin for the treatment of genital, pharyngeal and rectal gonorrhoea: a randomised controlled trial. **Sexually Transmitted Infections**, v. 93, no Suppl 2, p. 93–94, 2017.

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.

SÃO PAULO TURISMO. **São Paulo: Dados e Fatos.** 2018. Disponível em: <www.cidadedesapaulo.com>. Acessado em: 18 fevereiro de 2019.

SINGH, V. et al. Comparative assessment of CDS , CLSI disc diffusion and Etest techniques for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* : a 6-year study. **BMJ open**, v. 2, p. 1–7, 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 ceftriax. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 39, n. 10, p. 813–821, 2012.

STOLZ, E.; ZWARTT, H.; MICHELT, M. Activity of eight antimicrobial agents in vitro against *N. Gonorrhoeae*. **The British journal of venereal diseases**, v. 51 p. 257–264, 1975.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. **ATHENEU** (Org.). 2 ed. São Paulo, 1996.

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

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. **ATHENEU** (Org.). 5 ed. São Paulo, 2008.

UNEMO, M. et al. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: Novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1273–1280, 2012.

UNEMO, M. et al. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. **World Health Organization**, p. 21–54, 2013.

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n.2, p. 1057–1061, 2013.

UNEMO, M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea - the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 2015.

UNEMO, M. et al. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: Phenotypic, genetic and reference genome characterization. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 11, p. 3096–3108, 2016.

UNEMO, M.; RIO, C. DEL; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: a major global public health problem in the 21st century. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, p. 1–32, 2016.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 587–613, 2014.

WHO. Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana. World Health Organization, p. 175-188, 2013.

WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. World Health Organization, 2015.

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

APÊNDICE A – Concentração inibitória mínima das cepas WHO

Tabela 15 – Concentração Inibitória mínima em µg/mL das cepas WHO ^a.

	AZT	CRO	CIP	GEN	SPT	PEN	TET
WHO F	0,125	<0,002	0,004	4	16	0,032	0,25
WHO G	0,25	0,008	0,1285	4	16	0,5	32
WHO K	0,25	0,064	> 32	4	16	2	2
WHO L	0,5	0,25	> 32	4	16	2	2
WHO M	0,25	0,016	2	4	16	> 32	2
WHO N	0,25	0,004	4	4	16	> 32	16
WHO O	0,25	0,032	0,008	4	> 1024	> 32	2
WHO P	4	0,004	0,004	4	8	0,25	1
WHO U	4	0,002	0,004	4	8	0,125	1
WHO V	256	0,0064	> 32	8	16	> 32	4
WHO W	0,5	0,0064	> 32	4	16	4	4
WHO X	0,5	2	> 32	4	16	4	2
WHO Y	1	1	> 32	8	16	1	4
WHO Z	1	0,5	> 32	4	16	2	4

Abreviações: AZT – Azitromicina; CRO – ceftriaxona; CIP – ciprofloxacino; GEN – Gentamicina; SPT – Espectinomicina; PEN – Penicilina; TET – Tetraciclina.

^aP As MICs aceitáveis para cada antimicrobiano é o valor da tabela ± uma diluição da MIC (UNEMO et al., 2016).

Fonte: Adaptado de UNEMO et al., 2016.

APÊNDICE B – Diâmetro do halo de inibição das cepas WHO

Tabela 16 – Diâmetro do halo de inibição das cepas WHO.

	Azitromicina (mm) Média (mín. – máx.)	Espectinomicina (mm) Média (mín. – máx.)	Gentamicina - DME (mm) Média (mín. – máx.)	Gentamicina – OXOID (mm) Média (mín. – máx.)
WHO F	32 (28 – 38)	24 (22 – 28)	17 (15* – 18)	18 (16 – 20)
WHO G	34 (31 – 37)	25 (24 – 26)	17 (15* – 18)	18 (17 – 18)
WHO K	30 (28 – 33)	25 (22 – 30)	16 (15* – 18)	17 (16 – 18)
WHO L	30 (28 – 35)	26 (24 – 30)	18 (17 – 19)	19 (18 – 20)
WHO M	32 (29 – 35)	26 (23 – 30)	16 (15* – 17)	17 (16 – 18)
WHO N	33 (30 – 36)	27 (24 – 28)	16 (15* – 17)	17 (16 – 18)
WHO O	32 (30 – 34)	0	17 (16 – 18)	18 (17 – 18)
WHO P	23 (22 – 24)	24 (22 – 26)	15 (15 – 16*)	16 (15* – 17)
WHO U	23 (20 – 24)	27 (23 – 30)	19 (17* – 20)	19 (18 – 20)
WHO V	0	27 (26 – 29)	15 (15 – 16*)	15 (15* – 17)
WHO W	35 (32 – 37)	29 (27 – 34)	18 (17* – 18)	18 (17 – 19)
WHO X	34 (31 – 37)	26 (24 – 27)	17 (16 – 18)	18 (15* – 16)
WHO Y	31 (29 – 33)	26 (23 – 30)	16 (15* – 16)	16 (17 – 18)
WHO Z	27 (27 – 29*)	25 (23 – 27)	17 (16 – 18)	18 (17 – 18)

Azitromicina: resistente ≤ 27 mm; sensível >27

Espectinomicina: resistente ≤ 14 mm; intermediário 15-17; sensível ≥ 18 mm

Gentamicina: resistente ≤ 12 mm; intermediário 13-15; sensível ≥ 16 mm

*Isolados que apresentaram mudança de categoria durante os testes de reprodutibilidade.

