

ADRIANE MEIRA MERCADANTE

AVALIAÇÃO DE ÁGAR CHOCOLATE COMO MEIO DE
CULTURA PARA REALIZAÇÃO DE E-TEST PARA
AZITROMICINA E CEFTRIAXONA EM
Neisseria gonorrhoeae



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
OUTUBRO / 2022

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Raquel Regina Bonelli e coorientação de Raphael Cavalcante de Medeiros.

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

514a Meira Mercadante, Adriane
Avaliação de ágar chocolate como meio de cultura para realização de E-test para azitromicina e ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae* / Adriane Meira Mercadante. -- Rio de Janeiro, 2022.
58 f.

Orientadora: Raquel Regina Bonelli.
Coorientador: Raphael Cavalcante de Medeiros.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. *Neisseria gonorrhoeae*. 2. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos. 3. E-test. I. Regina Bonelli, Raquel, orient. II. Cavalcante de Medeiros, Raphael, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Adriane Meira Mercadante**
 DRE: 118034365

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
 Profa. Karis Maria de Pinho Rodrigues
 Alessandra Fiuza Hoelz Alvarez
 Profa. Tatiana Castro de Abreu Pinto (Suplente)

Título da Monografia: **“Avaliação de ágar chocolate como meio de cultura
 para realização de E-test para azitromicina e ceftriaxona em *Neisseria
 gonorrhoeae*”**

Local: Sala de Seminários do Departamento de Microbiologia Médica
 Data e hora de início: **11 de outubro de 2022 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de outubro de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
<u>10</u>	Profa. Karis Maria de Pinho Rodrigues
<u>10</u>	Alessandra Fiuza Hoelz Alvarez
_____	Profa. Tatiana Castro de Abreu Pinto

Presidente da banca

 Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Aluno:

Adriane Meira Mercadante.
 Adriane Meira Mercadante

Orientador:

 Profa. Raquel Regina Bonelli / Coorientador: Dr. Raphael Cavalcante de Medeiros

Coordenador
 de TCC

 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Adriana e Sérgio. Mãe, você sempre foi e sempre será minha maior inspiração. Seu esforço e sua imensa vontade de estar constantemente crescendo na vida foi o que possibilitou chegarmos aqui, juntas. Pai, você também teve um papel importante na minha jornada. Agradeço por sempre ter me apoiado, sem você eu jamais conseguiria. Amo vocês!

Ao meu “paidrasto”, Ricardo. Meu segundo pai, era você quem frequentava as reuniões e apresentações de música da escola, quem me levava e me assistia jogar futebol quando criança. Obrigada por me acompanhar e por todo apoio durante esses 13 anos.

À Alana, minha irmã. Sempre muito esperta e curiosa com suas perguntas científicas, me desafia a estar sempre adaptando as respostas para seu mundo lúdico. Um dia a ensinei sobre o sistema imune e logo ela já estava repetindo “Nane, eu vou tomar a vacina para ensinar meus soldadinhos como ganhar das bactérias e dos vírus, assim eu não fico doente.”

À Raquel, ao Rapha e ao Sergio, meus orientadores. Raquel, aquela aula no segundo período de *supercoil* em que você usou uma corda para explicar o conteúdo me encantou! Naquele dia decidi que gostaria de tê-la como orientadora. Rapha, obrigada por toda ajuda na bancada e por todo apoio além dela (e pelos alívios cômicos quando a situação parecia estar perdida). Professor Sergio, obrigada por todos conselhos, com certeza levarei para a vida. Agradeço a cada um de vocês por todo suporte e orientação durante meus 4 anos no L IMM, vocês contribuíram muito para a construção do meu conhecimento no mundo de gono e no universo da microbiologia.

A todos que já fizeram parte do time de gono, em especial à Larissa. Você foi minha primeira professora de bancada, me ensinou desde a realização de uma simples coloração de gram até a execução de uma técnica complexa como a ágar diluição. Obrigada pela paciência, aprendi que trabalhar com gono é entender que realmente elas são (segundo suas palavras) temperamentais.

A todos do L IMM, obrigada por contribuírem de alguma forma para meu crescimento como profissional, vocês me ajudaram muito! Em especial, Carol e Matheus, muito obrigada por toda ajuda na bancada, foi uma honra compartilhar todo meu conhecimento com vocês.

A meus queridos amigos que fiz na faculdade. Amanda, Ana Victoria, Clarisse, Flavia, Glauber, João, Juliana, Laryssa, Mariana, Mariane, Millena, Stuart, Vick e Yan. O que seria de mim sem vocês? Agradeço por estarem sempre comigo, mesmo nos momentos mais difíceis da graduação. Cada um tem um lugar especial no meu coração. Obrigada por todas as brincadeiras, as festas, as conversas no BRT ao voltar pra casa, até mesmo dos puxões de orelha em algumas situações. Amo vocês!

À banca avaliadora, Sergio, Karis, Alessandra e Tati. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos, ajudando a construir este estudo, tornando-o melhor.

À professora Lucia, obrigada por ceder o espaço em seu laboratório para que pudéssemos utilizar a estufa para o crescimento das bactérias.

Ao laboratório DASA, por ceder amostras e materiais utilizados neste estudo, também pela realização de parte dos experimentos.

À FAPERJ, UFRJ e Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por toda contribuição para ciência no Brasil, permitindo que este estudo acontecesse.

RESUMO

Adriane Meira Mercadante

Avaliação de ágar chocolate como meio de cultura para realização de E-test para azitromicina e ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae*

Orientador: Raquel Regina Bonelli

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Neisseria gonorrhoeae é o agente etiológico da infecção sexualmente transmissível gonorreia. Atualmente, esta bactéria faz parte da lista da Organização Mundial da Saúde de microrganismos que devem ser priorizados quanto ao desenvolvimento de novos antimicrobianos. A recomendação atual feita pelo Ministério da Saúde para o tratamento da gonorreia consiste na terapia combinada de 500 mg de ceftriaxona e 1 g de azitromicina e, para pacientes alérgicos a betalactâmicos, 2 g de azitromicina em monoterapia. A determinação do perfil de suscetibilidade de amostras de *N. gonorrhoeae* é um desafio para a rotina de laboratórios de análises clínicas devido à ausência de meios automatizados para o diagnóstico. O protocolo do CLSI para realização de ágar diluição (AD) e disco difusão em *N. gonorrhoeae* baseia-se na utilização do ágar base GC adicionado de suplemento VX. O uso de gradiente em fita é considerado uma alternativa ao AD pela literatura. No BrCAST, atualmente não há protocolo definido para esta avaliação. Também, ágar base GC com VX não é um meio de cultura comercializado pronto para uso no mercado brasileiro. Sendo assim, apesar de AD ser considerada o melhor método para determinar o perfil de suscetibilidade de amostras de *N. gonorrhoeae*, sua aplicabilidade para diagnóstico na rotina é limitada por ser laboriosa e economicamente inviável para um número pequeno de amostras. O presente projeto visa avaliar o potencial uso de ágar chocolate para realização de teste de gradiente em fita para azitromicina e ceftriaxona em *N. gonorrhoeae* como uma alternativa mais simples e econômica para o diagnóstico de resistência deste microrganismo. Cinquenta amostras previamente caracterizadas foram submetidas a teste de gradiente em fita (E-test) em meios ágar base GC e ágar chocolate, e as CMI resultantes foram comparadas entre si em comparação às obtidas por AD em ágar GC. Esta análise foi feita a partir dos conceitos de concordância categórica (se as amostras se classificam na mesma categoria de susceptibilidade) e concordância essencial (onde são concordantes amostras em que a diferença entre as CMIs obtidas varia em apenas uma diluição). Com relação à azitromicina, houve 100% de concordância categórica e 96% de concordância essencial se comparados os dados de E-test obtidos em ambos os meios de cultura. Na análise comparativa entre a técnica de E-test em ágar base GC e a AD, 86% das amostras (n=42) apresentaram concordância categórica e 71% (n=35) concordância essencial. A mesma porcentagem de concordância categórica foi observada ao comparar o E-test em ágar chocolate à AD, e, neste caso, 79% (n=39) das amostras entraram em concordância essencial. Em relação à ceftriaxona, o resultado de CMI para todas as amostras foi menor ou igual à menor diluição testada nas duas técnicas. Assim, todas as amostras testadas apresentaram concordância categórica como sensíveis, mas uma avaliação precisa da concordância essencial não é possível. A discrepância detectada entre os resultados de E-test e AD precisaria ser avaliados com maiores coleções de amostras e repetições. Com esta ressalva, resultados apontam que não há

prejuízo quanto ao uso de ágar chocolate em relação à agar base GC para realização de E-test em *N. gonorrhoeae*.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*, Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos, E-test, Azitromicina, Ceftriaxona

ABSTRACT

Adriane Meira Mercadante

Avaliação de ágar chocolate como meio de cultura para realização de E-test para azitromicina e ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae*

Orientador: Raquel Regina Bonelli

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Neisseria gonorrhoeae is the etiologic agent of the sexually transmitted infection gonorrhea. Currently, this agent is part of the World Health Organization's list of microorganisms that should be prioritized in the development of new antimicrobials. In fact, gonorrhea runs the risk of becoming a disease that is difficult to treat, demanding greater efforts in the diagnosis of resistance and the need of using drugs that are exclusively available in medical facilities to control infections caused by them. The current recommendation of the Ministry of Health in Brazil for the treatment of gonorrhea consists of the combination therapy of 500 mg of ceftriaxone and 1 g of azithromycin; for patients who are allergic to beta-lactams, 2 g of azithromycin in monotherapy. The determination of the susceptibility of *N. gonorrhoeae* isolates is a challenge for the routine of clinical analysis laboratories due to the absence of automated tools for diagnosis. CLSI recommends agar dilution (AD) and disk diffusion, both in GC agar base plus VX supplement as protocols for *N. gonorrhoeae* susceptibility testing. The use of strips impregnated with antimicrobials, such as E-test, is considered an alternative to AD in the literature. Currently, in BrCAST there is no defined protocol for this assessment. In addition, GC agar base with VX is not a ready-to-use commercialized growth medium in the Brazilian market. Therefore, although AD is considered the best method to determine the susceptibility of *N. gonorrhoeae* isolates, its applicability for routine diagnosis is limited because it is laborious and economically unfeasible for a small number of samples. The present project aims to evaluate the potential use of chocolate agar to perform a ribbon gradient test for azithromycin and ceftriaxone in *N. gonorrhoeae* as a simpler and more economical alternative for the diagnosis of resistance. Fifty previously characterized isolates were subjected to a strip gradient test (E-test) on GC agar base and chocolate agar, and the resulting MICs were compared with each other in comparison to those obtained by AD on GC agar. This analysis was based on the concepts of categorical agreement (isolates classified in the same susceptibility category when comparing both techniques) and essential agreement (isolates are in agreement in which the difference between the MICs obtained varies by only one dilution). Regarding azithromycin, there was 100% categorical agreement and 96% essential agreement when comparing the E-test data obtained in both growth media. In the comparative analysis between the E-test technique on GC agar base and AD, 86% of the samples (n=42) showed categorical agreement and 71% (n=35) essential agreement. The same percentage of categorical agreement was observed when comparing the E-test on chocolate agar with AD, and, in this case, 79% (n=39) of the isolates were in essential agreement. Regarding ceftriaxone, the MIC results for all isolates were lower or equal to the lowest dilution tested in both techniques. Thus, all isolates tested showed categorical agreement as sensitive, but an accurate assessment of essential agreement is not possible. The discrepancy detected between the E-test and AD results

should be evaluated with larger collections of samples and repetitions. With that being said, results indicate that there is no harm in the use of chocolate agar in relation to GC base agar for carrying out the E-test in *N. gonorrhoeae*.

Key-words: *Neisseria gonorrhoeae*, Antimicrobial Susceptibility Testing, E-test, Azithromycin, Ceftriaxone

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Você sabia que no Brasil não há critérios claros quanto ao método para diagnosticar a resistência a antibióticos de *Neisseria gonorrhoeae* segundo as normas vigentes no país? Este resumo trata de uma pesquisa desenvolvida na UFRJ para avaliar um método que poderia ser incorporado às normas brasileiras, facilitando o diagnóstico da resistência neste microrganismo mesmo para laboratórios de pequeno porte

Neisseria gonorrhoeae é a causadora da infecção sexualmente transmissível gonorreia. Também conhecido como gonococos, a Organização Mundial da Saúde considera este microrganismo como uma ameaça para a saúde pública devido a sua capacidade de desenvolver resistência a diversos tipos de antibióticos, correndo risco da gonorreia se tornar uma doença intratável.

Atualmente, o tratamento da gonorreia é feito com a combinação de dois antibióticos: azitromicina e ceftriaxona. O diagnóstico da suscetibilidade da bactéria a estes antimicrobianos, contudo, precisa ser feito em função da concentração mínima inibitória do microrganismo, o que pode ser feito diretamente com a bactéria em contato com placas de meio de cultura adicionadas de antibiótico em diferentes concentrações, ou pelo uso de uma fita incorporada com diferentes concentrações de antimicrobianos em contato com a bactéria semeada em um meio de cultura que viabilize seu crescimento. Na primeira técnica, o preparo das placas com antibiótico é feito de maneira manual pela equipe técnica do laboratório de análises clínicas, não sendo compatível com a intensa rotina destes profissionais. A segunda técnica, que lança mão da fita, é mais fácil de fazer. O problema é que, segundo recomendações internacionais, ela deve ser realizada em um meio de cultura que não está disponível como pronta para uso no mercado brasileiro, cujo nome é ágar base GC, que ainda precisa de um suplemento nutricional chamado VX. O BrCAST, a agência brasileira responsável por regulamentar os testes que são utilizados para avaliar a resistência bacteriana no Brasil não disponibiliza qualquer recomendação a respeito do protocolo a ser adotado para gonococos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da fita impregnada com o antibiótico em ágar chocolate, um meio de cultura comercializado pronto para uso no país, como alternativa para realizar diagnóstico de resistência do gonococo. Nossos resultados mostraram que não houve diferença nos resultados obtidos com os dois meios (GC + VX ou ágar chocolate), o que é promissor para o ágar chocolate (que, apesar do nome sugestivo, não é feito com cacau) como uma alternativa mais fácil e econômica para o teste. No entanto, mais estudos são necessários para verificar se o uso da fita realmente substitui sem prejuízo a técnica das placas com o antibiótico incorporado. Se isso ocorrer teremos, talvez, no futuro, uma solução que possibilite o diagnóstico da resistência a antimicrobianos em gonococos em um maior número de laboratórios de análises clínicas no Brasil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição dos valores de CMI nas técnicas de ágar diluição (azul), E-test em base GC (vermelho) e E-test em ágar chocolate (amarelo).24
- Figura 2** – Correlação entre as CMIs obtidas pela metodologia do E-test nos meios ágar base GC (vermelho) e em ágar chocolate (amarelo).25
- Figura 3** – Concentração mínima inibitória para ceftriaxona das 48 amostras incluídas no estudo pelas técnicas de ágar diluição (azul), E-test em ágar chocolate (amarelo) e E-test em base GC (vermelho).27

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1 – Exemplos de provas bioquímicas que podem ser utilizadas para diferenciar espécies dentro do gênero <i>Neisseria</i> (Ng e Martin, 2005).....	3
Tabela 2 – Esquema utilizado na preparação da série de placas com azitromicina e ceftriaxona	20
Tabela 3 – Estratégia de diluição adotada para o preparo da série de placas contendo azitromicina.	20
Tabela 4 – Estratégia para o preparo da série de placas contendo ceftriaxona.....	21
Tabela 5 – Pontos de corte para concentração mínima inibitória adotados neste estudo	22
Tabela 6 – Concordância categórica e essencial para azitromicina comparados à ágar diluição (AD).....	23
Tabela 7 – Concordância categórica e essencial para azitromicina no E-test realizado em ágar base GC e ágar chocolate.....	26
Tabela 8 – Concordância categórica e essencial para determinação de CMI de ceftriaxona por E-test em ágar base GC e ágar chocolate com relação à ágar diluição. Não houve diferença entre os meios de cultura utilizados.....	26
Quadro 1 – Pontos de corte utilizados por CLSI, EUCAST e BrCAST (todos 2022) para ceftriaxona, cefixima e azitromicina para as técnicas de disco difusão (dados em mm) e determinação de CMI (dados padronizados na concentração $\mu\text{g/mL}$).....	13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	Centers of Disease Control and prevention
CEE	Cefalosporinas de Espectro Estendido
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CO ₂	Dióxido de Carbono
ECOFF	Epidemiological cut-off value
E-TEST	Epsilometer Test
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GC + VX	Ágar base GC adicionado 1% de suplemento VX
IM	Via Intramuscular
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
IV	Via Intravenosa
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight
MHC	Mueller Hinton Caldo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Penicillin Binding Protein
VO	Via Oral
WHO	World Health Organization

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
ÍNDICE.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1
1.2 A doença gonocócica e mecanismos de virulência de <i>N. gonorrhoeae</i>	2
1.3 Resistência a antimicrobianos em <i>N. gonorrhoeae</i>	5
1.3.1 Azitromicina	8
1.3.2 Ceftriaxona	10
1.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos em <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	12
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. METODOLOGIA	17
4.1 Visão geral da estratégia experimental.....	17
4.2 Concentração mínima inibitória aos antimicrobianos por E-test.....	17
4.3 Concentração mínima inibitória aos antimicrobianos por ágar diluição.....	18
4.3.1 Preparo das placas com antimicrobianos	18
4.4 Estratégia para interpretação de resultados	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Azitromicina.....	23
5.2 Ceftriaxona.....	26
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	34
ANEXOS:	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Neisseria gonorrhoeae*

O gênero *Neisseria* abriga atualmente 39 espécies (LPSN, 2021). Estas bactérias podem ser encontradas como comensais na microbiota da orofaringe de humanos e animais, em muitos casos apresentando maior prevalência em hospedeiros específicos. Ainda que algumas espécies comensais já tenham sido relatadas como causadoras de infecções oportunistas em humanos (como *Neisseria lactamica* e *Neisseria cinerea* envolvidas em quadros de endocardite, meningite e sepse, entre outras espécies e possíveis manifestações), as únicas classicamente consideradas patógenos para humanos são *Neisseria meningitidis*, causadora das doenças meningococemia e meningite, e *Neisseria gonorrhoeae*, causadora da infecção sexualmente transmissível gonorreia. *N. gonorrhoeae* diferencia-se das demais espécies do gênero por ocorrer também na mucosa urogenital e ser considerada um patógeno obrigatório. Estas espécies têm humanos como únicos hospedeiros (Liu, Tang e Exlei, 2015; Tønjum e Van Putten, 2017).

Também conhecida como gonococo, *N. gonorrhoeae* é uma bactéria gram-negativa, fastidiosa (ou seja, necessita de suplementação para seu crescimento *in vitro*), apresenta morfologia celular de diplococos, com tamanho aproximado entre 0,6 e 1 µm. O gonococo é capaz de expressar uma série de fatores de virulência que facilitam sua interação com o hospedeiro, como a presença de pili do tipo IV, o qual possui um papel fundamental na interação inicial, além de conferir motilidade e capacidade de formar biofilmes. Adicionalmente, as proteínas Opa, o lipo-oligosacarídeo (LOS) e protease IgA1 também participam na adesão e colonização do epitélio pelo gonococo. Este microrganismo não esporula e não expressa cápsula (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009; Hill *et al.*, 2016).

A identificação laboratorial clássica do gonococo é através do isolamento e cultura do microrganismo proveniente de amostras clínicas, como swab urogenital, retal e endocérvice. Tendo em vista que *N. gonorrhoeae* é bastante sensível a condições ambientais, como a baixa umidade e temperatura, e requer condições nutricionais para o cultivo complexas, faz-se necessário a adição de cistina e uma fonte de glicose no meio, além de vitaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas para atender às necessidades de cultivo do microrganismo (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2009). O gonococo apresenta um bom crescimento em meios como o ágar chocolate e Base GC, tendo como faixa ideal de temperatura entre 35° e 37 °C, além de uma

atmosfera de 5% de dióxido de carbono e umidade controlada (Ng e Martin, 2005; Unemo, 2013). Testes bioquímicos podem ser aplicáveis no diagnóstico e diferenciação de *N. gonorrhoeae* entre outras espécies do gênero, como os testes da catalase e oxidase, aos quais o gonococo apresenta resultado positivo. Todas as espécies do gênero *Neisseria* expressam oxidase na célula, todavia a expressão da catalase não é detectada em todas as demais espécies. Outro teste bioquímico que permite diferenciar o gonococo de outras espécies de *Neisseria* é a incapacidade de produzir ácido a partir da oxidação de maltose, lactose ou sacarose, somente através da glicose (Tabela 1; Ng e Martin, 2005; Ison, 2011).

1.2 A doença gonocócica e mecanismos de virulência de *N. gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae (espécie bacteriana também conhecida como gonococo) é o agente causador da infecção sexualmente transmissível (IST) gonorreia. Sua transmissão é feita pelo contato sexual, seja pela mucosa uretral, anal ou oral, quando uma pessoa infectada tem relação sexual desprotegida com outra pessoa. A transmissão também pode ser vertical, onde a gestante com gonorreia transmite o microrganismo para o neonato durante sua passagem pelo canal vaginal, causando, principalmente, conjuntivite (CDC, 2014). Além de sua ocorrência nos sítios genitais, *N. gonorrhoeae* pode ser também ser carregada na orofaringe, causando ou não manifestações clínicas como faringite e amigdalite. No entanto, uma vez que estas infecções são geralmente assintomáticas, a orofaringe pode ser considerada uma importante fonte para disseminação da gonorreia e, uma vez que este microrganismo seja isolado, o tratamento com base na antibioticoterapia é recomendado para evitar que a doença seja transmitida. Quando ultrapassa a barreira das mucosas, *N. gonorrhoeae* pode causar gonococemia e artrite (Osborne et al., 1979; Peter, 2005; Lee et al., 2015; Marangoni et al., 2020).

A sintomatologia da doença genital é diferente entre homens e mulheres. Em homens, o sítio primário da infecção é a uretra, onde há produção de corrimento purulento de cor amarela, branca ou verde entre 1 e 14 dias após a infecção na maioria dos casos da uretrite gonocócica. Devido à maioria dos casos serem sintomáticos, é comum que o paciente busque por auxílio médico e o tratamento protocolado é utilizado, levando a resolução da infecção. Na ausência de tratamento, as complicações se manifestam em forma de epididimite, prostatite, abscesso periuretral e vesiculite seminal (Winn, 2008; CDC, 2021).

Tabela 1 – Exemplos de provas bioquímicas que podem ser utilizadas para diferenciar espécies dentro do gênero *Neisseria* (Ng e Martin, 2005)

Espécies	Produção de ácido a partir de:					Redução de Nitrato	Polissacarídeo a partir da glicose
	Glicose	Maltose	Sacarose	Frutose	Lactose		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+*	-†	-	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Kingella denitrificans</i>	+	-	-	-	-	+	-
<i>Neisseria cinérea</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>subflava</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>flava</i>	+	+	-	+	-	-	-
<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>perflava</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>Neisseria sicca</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>Neisseria mucosa</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Neisseria flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-

*+ a maioria das cepas positivas

†- a maioria das cepas negativas

Com relação às infecções em mulheres, o sítio primário da infecção gonocócica é o endocérvice, podendo apresentar manifestações clínicas sintomáticas ou assintomáticas. Os sintomas podem incluir disúria, dor abdominal, sangramento anormal ou intermenstrual e secreção cervicovaginal. Uma vez que a maior parte das mulheres apresenta infecção assintomática, cerca de 10 a 20% dos casos de gonorreia não tratada pode evoluir com a ascensão do microrganismo ao trato geniturinário superior, levando a complicações como endometrite, doença inflamatória pélvica, salpingite, abscessos tubo-ovarianos, gravidez ectópica e infertilidade. Isso leva a um maior percentual de doenças disseminadas, como a sepse e infecções de pele e articulações, e complicações neste grupo de pacientes (Winn *et al.*, 2008; Unemo *et al.*, 2013; Lenz e Dillard, 2018). Em gestantes também já foi observado associação da infecção por *N. gonorrhoeae* com parto prematuro, ruptura precoce de membranas, fetos pequenos para sua idade gestacional e maior risco de morbidade e mortalidade pré-natal. O bebê pode ser contaminado pela mãe durante o parto, e desenvolver quadros como conjuntivite grave e sepse, que pode incluir artrite e meningite (Heumann *et al.*, 2017). A oftalmia em adultos causada pelo gonococo é rara e pode ocorrer pela autoinoculação do microrganismo (Ison, 2011).

N. gonorrhoeae é um patógeno humano obrigatório e sua capacidade de modular e evadir a resposta imune do hospedeiro é determinante para o curso da infecção. Inicialmente, a fase de adesão do gonococo à mucosa do epitélio é mediada por estruturas celulares como pili do tipo IV, proteínas Opa, lipo-oligossacarídeo (LOS) e porinas (PorB). O pili do tipo IV e as proteínas Opa são expressos durante a infecção em homens e mulheres, sendo essenciais para a colonização do epitélio da mucosa genital e outros sítios corporais (Edward e Apicella, 2004). O pili do tipo IV é uma estrutura extracelular que permite a formação de microcolônias na superfície das células epiteliais, o que é essencial para a adesão inicial da bactéria, além de contribuir para evasão do sistema imune através de variações antigênicas e de fases (Craig, Pique e Tainer, 2004; Higashi *et al.*, 2007; Dietrich *et al.*, 2011). As proteínas Opa também são importantes na adesão ao epitélio hospedeiro e estudos apontam que grande parte se deve através da interação com os receptores de moléculas de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário (CEACAM) (Virji *et al.*, 1996; Simms e Jerse, 2006).

Outros dois fatores de virulência importantes no curso da infecção gonocócica são as porinas (PorB) e o lipo-oligossacarídeo (LOS). As porinas são proteínas em forma de canais localizadas na membrana externa do gonococo e, através da sua interação com a proteína de ligação ao fator de complemento C4b (C4BP) e com o fator H, promove a supressão da degranulação de neutrófilos e apoptose destas células imunes (Wetzler, Blake e Gotschlich,

1992a). O LOS está presente no folheto externo da membrana externa do gonococo e sua estrutura é similar a lipopolissacarídeo (LPS) de outras bactérias; no entanto, a ausência do antígeno O diferencia ambas as estruturas bacterianas (Song *et al.*, 2000). Além do papel que o LOS desempenha na adesão do microrganismo ao epitélio hospedeiro, o ácido siálico presente na superfície da molécula contribui para a evasão do microrganismo ao sistema complemento. Ademais, a variação antigênica do lipo-oligopolissacarídeo expressa em gonococos dificulta o reconhecimento pelas células imunes (Wetzler, Blake e Gotschlich, 1992b; van Vliet *et al.*, 2009; Quillin e Seifert, 2018).

1.3 Resistência a antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *N. gonorrhoeae* é classificada como prioridade 2 (alta) em relação à pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, uma vez que este microrganismo tem desenvolvido resistência contra todos os antimicrobianos utilizados na terapêutica (WHO, 2016). Recentemente, o CDC divulgou uma lista de 18 microrganismos resistentes, classificando-os de acordo com o nível de preocupação à saúde humana. O gonococo foi incluído com base no seu histórico de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, sendo classificado como ameaça urgente (CDC, 2019). Logo, a gonorreia corre o risco de se tornar uma doença sem opções terapêuticas, demandando maiores esforços no diagnóstico do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados, ou drogas reservadas para uso em hospitais para controlar as infecções por eles causadas. Como não existe vacina para eventual imunização contra *N. gonorrhoeae*, o combate e controle destas dependem de prevenção eficaz, diagnóstico preciso e terapia antimicrobiana correta (Tomberg *et al.*, 2013).

A resistência em *N. gonorrhoeae* surgiu pouco após o início da utilização dos antimicrobianos na terapêutica. Na década de 30, o tratamento era baseado no uso das sulfonamidas e foi viável até a metade da década de 40, quando a resistência às sulfas começou a emergir. Neste contexto, o surgimento da penicilina contribuiu para que este antimicrobiano fosse a nova escolha para tratar a infecção gonocócica, uma vez que o gonococo era altamente sensível, com valores de concentração inibitória mínima em torno de 0,05 µg/mL ou até menores (Unemo e Shafer, 2014). Nos anos seguintes, houve um aumento na circulação de cepas de *N. gonorrhoeae* apresentando valores altos de concentração mínima inibitória (CMI) para penicilina, sendo reportados amostras com CMI de 4 µg/mL, o que é duas vezes mais alto

que a CMI reportada em infecções gonocócicas tratáveis apenas com doses altas de penicilina. No decorrer da década de 1970, foram isoladas amostras de *N. gonorrhoeae* com valores de CMI superiores a 128 µg/mL, culminando no fim do uso da penicilina para o tratamento da gonorreia. Em 1983 foram reportados 199 casos de resistência à penicilina na Carolina do Norte, EUA (Faruki *et al.*, 1985). Este surto foi controlado através da mudança do tratamento dos pacientes com o uso da espectinomicina (Phillips, 1976; CDC, 1983; Unemo e Shafer, 2011; Costa-Lourenço *et al.*, 2017).

Mecanismos cromossômicos e mediados por plasmídeos podem estar associados à resistência de *N. gonorrhoeae* à penicilina. Mecanismos cromossômicos estão relacionados a mudanças nas PBPs (Proteína ligadora de penicilina) e/ou na permeabilidade da membrana externa (Lewis, 2010). Mutações nos genes *ponA1* e *penA* que codificam, respectivamente, as transpeptidases PBP1 e a PBP2, levam a modificações nestas proteínas que afetam a ligação de penicilina a elas, impedindo a ação do antimicrobiano (Goire *et al.*, 2014). Outros mecanismos cromossômicos que reduzem a suscetibilidade à penicilina são alterações na porina codificada pelo gene *porB*, ou a maior expressão da bomba de efluxo MtrCDE, devido a mutações no promotor do gene que codifica seu repressor *mtrR* (Gill *et al.*, 1998; Zarantonelli *et al.*, 2001; Costa-Lourenço *et al.*, 2017). Estes mecanismos estão associados a pequenas elevações na concentração mínima inibitória (CMI) do antimicrobiano, e quando dois ou mais ocorrem simultaneamente podem levar ao fenótipo de resistência (Lewis, 2010).

Por outro lado, a partir de 1976 foram identificados genes plasmidiais de resistência a estes antimicrobianos. Tais genes codificam betalactamases do tipo TEM-1 e TEM-135, as quais são capazes de causar significativo aumento na CMI para penicilina, levando a falhas terapêuticas. Por seleção, dado o tratamento preconizado ao longo dos anos seguintes, a frequência de amostras resistentes à penicilina foi crescendo em vários continentes (Unemo e Shafer, 2014; Costa-Lourenço, *et al.* 2017).

Alterações no nível de expressão de *mtrCDE* também afetam a suscetibilidade de gonococos a tetraciclina; no entanto, assim como ocorre com penicilina, um mecanismo plasmidial pode conferir resistência a tetraciclina nestes microrganismos (Costa-Lourenço *et al.*, 2017). Dois plasmídeos conjugativos (*American* e *Dutch*) identificados em *N. gonorrhoeae* carregam o gene *tetM*, o qual codifica uma proteína responsável por bloquear o sítio de ligação da tetraciclina na subunidade 30S do ribossoma (Młynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2016). Em 1983, foi identificada a primeira amostra de *N. gonorrhoeae* resistente a altas concentrações desse antimicrobiano nos EUA e em 1985 o mesmo foi observado na Holanda. Em ambos os casos o fenômeno associado à aquisição de TetM (Chalkley *et al.*, 1997). Já em 1989 o uso da

tetraciclina para tratar gonorreia foi descontinuado por não ser mais uma terapia adequada, uma vez que amostras que carregavam estes plasmídeos já estavam amplamente disseminadas pelo mundo (Costa-Lourenço *et al.*, 2017).

Em decorrência deste cenário, o desenvolvimento das fluoroquinolonas de segunda geração, como a ciprofloxacina, ofereceu uma alternativa viável na terapêutica da doença gonocócica. Entretanto, nos meados dos anos 90 foram reportadas cepas com suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina no sudeste asiático, o que rapidamente se espalhou pelo mundo. A resistência à ciprofloxacina em *N. gonorrhoeae* ocorre por mutações nos genes que codificam as enzimas DNA girase (*gyrA*) e a topoisomerase IV (*parC*). Tais mutações têm efeito cumulativo na CMI e, por ser este um determinante cromossomal de resistência, a evolução desta resistência está mais relacionada a aspectos clonais (Wang *et al.*, 2006; Costa-Lourenço *et al.*, 2017). O alto índice de resistência a fluoroquinolonas em *N. gonorrhoeae* resultou na suspensão do uso da ciprofloxacina como tratamento em 2007 nos EUA e, tardiamente, em 2017, no Brasil (Uehara *et al.*, 2011; Unemo, 2011; CONITEC, 2018; WHO, 2022).

O cenário atual acerca da recomendação feita pelo Ministério da Saúde para o tratamento da gonorreia consiste na terapia combinada de 500 mg de ceftriaxona com 1 g de azitromicina e, especialmente para pacientes alérgicos a betalactâmicos, 2 g de azitromicina em monoterapia (Ministério da Saúde, 2017; CONITEC, 2018). Já nos Estados Unidos, no ano de 2020 houve uma mudança no protocolo do CDC para o tratamento da gonorreia. A nova recomendação passou a ser 500 mg de ceftriaxona dose única via IM e, caso haja falha terapêutica, suspeita-se de uma infecção por clamídia, logo recomenda-se o uso oral de doxiciclina 100 mg via oral por 7 dias. Ademais, em caso de pacientes alérgicos a cefalosporinas o tratamento alternativo consiste na administração intramuscular de 240 mg de gentamicina, juntamente à 2 g de azitromicina via oral. Por outro lado, a recomendação da OMS permanece sendo a terapia combinada de 250 mg de ceftriaxona IM e 1 g de azitromicina via oral; em monoterapia, recomenda-se ceftriaxona 250 mg IM, cefixima 400 mg VO ou espectinomomicina 2 g IM, todas em dose única (WHO, 2016b; CDC, 2020).

A suspensão da azitromicina como parte do tratamento de gonorreia em muitos países já é uma consequência do aumento da prevalência do fenótipo de resistência a este antimicrobiano, fenômeno já observado inclusive no Brasil (Barros dos Santos, 2016; Costa-Lourenço *et al.*, 2017; Costa-Lourenço *et al.*, 2018). Por outro lado, o uso de cefalosporinas de terceira geração (como cefixima e ceftriaxona) persiste como a base do tratamento em todo o mundo. No entanto, já foram descritas, no Japão e em outros países como Canadá e Austrália,

amostras com suscetibilidade reduzida ou resistência a estes antimicrobianos (Ohnishi *et al.*, 2011; Unemo *et al.*, 2012; Lefebvre *et al.*, 2018; Whiley *et al.*, 2018).

1.3.1 Azitromicina

A azitromicina é um antimicrobiano pertencente à classe dos macrolídeos de segunda geração, sintetizada no início dos anos 80 como uma droga semissintética derivada da eritromicina. Apesar de apresentar o mesmo mecanismo de ação de outros macrolídeos, a azitromicina é capaz de atingir maiores concentrações no sítio da infecção, uma vez que o antimicrobiano tende a acumular mais efetivamente em células fagocíticas. Usualmente, este antibiótico é utilizado na terapêutica de infecções respiratórias, dermatológicas, urogenitais, entre outras causadas por bactérias. No entanto, estudos apontam que a azitromicina também possui efeitos imunomodulatórios, apresentando resultados benéficos no tratamento de patologias inflamatórias crônicas, como a panbronquiolite difusa e rosácea (Parnham *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação da azitromicina consiste na inibição da síntese proteica bacteriana, através da ligação da droga à subunidade 50S do ribossoma, evitando a translocação do peptidil-tRNA. Desse modo, o canal de saída do peptídeo fica obstruído nas subunidades 50S pela interação da droga com o rRNA 23S, fazendo com que haja liberação de polipeptídeos incompletos, culminando em um efeito bacteriostático (Derbie *et al.*, 2020).

Apesar de *N. gonorrhoeae* apresentar uma suscetibilidade natural a azitromicina (Belkacem *et al.*, 2016), a partir da década de 1990 cepas gonocócicas resistentes a este antimicrobiano foram relatadas em diversos países da Europa e Ásia. Os mecanismos que envolvem o fenótipo de resistência à azitromicina em gonococos têm como base modificações no sítio-alvo do antimicrobiano no ribossoma, podendo ser em decorrência da ação de metilases que modificam o rRNA 23S, mutações nos alelos do gene *rrl* (que codifica o rRNA 23S) ou até mesmo pelo aumento da expressão de bombas de efluxo (Unemo e Shafer, 2014).

As bombas de efluxo atuam na excreção de moléculas hidrofóbicas e, através destas, substâncias nocivas para a célula são bombeadas para o meio extracelular, como antimicrobianos, por exemplo. O sistema *mtr* (múltipla resistência transferível) presente em *N. gonorrhoeae* é composto pelo operon *mtrCDE*, que é responsável pela expressão da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE (Lewis, 2010). A regulação da expressão desta bomba de efluxo depende do ativador do operon (MtrA) e do repressor do operon (MtrR). Sendo assim, qualquer alteração existente em algum destes mecanismos de regulação pode resultar em uma

superexpressão da bomba de efluxo *mtrCDE*, como já foi descrito em decorrência da substituição de aminoácidos (A39T ou G45D) no MtrR (Zarantonelli *et al.*, 2001; Costa-Lourenço *et al.*, 2017). Adicionalmente, Wind e colaboradores demonstraram que a exposição à azitromicina está associada com mutações do *mtrR* A39T ou G45D, indicando que o uso frequente do antimicrobiano para tratar diferentes infecções em pessoas com maior risco de contrair gonorreia induz um aumento da CMI e pode ocasionar resistência (Wind *et al.*, 2017). Além da substituição dos aminoácidos, a inserção de dinucleotídeos (TT:AA) ou deleção de um único par de bases (T:A) no promotor do gene *mtrR* também impacta a expressão destas bombas de efluxo. Também é digno de nota que uma eventual substituição de uma citosina para timina ocorrendo 120 pares de base *upstream* de *mtrC* tem como consequência a geração de um outro promotor que é inerte ao efeito repressor do MtrR (Zarantonelli *et al.*, 2001; Costa-Lourenço *et al.*, 2017). De fato, a expressão aumentada de bombas de efluxo possui impacto sobre os valores da CMI para azitromicina em gonococos, podendo aumentar para 0,5 µg/mL, o que fica próximo ao limite de suscetibilidade hoje aceito para este microrganismo ($S \leq 1 \mu\text{g/mL}$, segundo o CLSI 2022; ECOFF 1 µg/mL, segundo o EUCAST 2022). Mecanismos plasmidiais adquiridos, como o gene *mef* e a expressão aumentada da bomba de efluxo MacA-MacB também tem efeito sobre os valores da CMI (Rouquette-Loughlin, Balthazar e Shaffer, 2005; Costa-Lourenço *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que a resistência de *N. gonorrhoeae* a altas concentrações de azitromicina está associada a mutações pontuais que levam a alterações de nucleotídeos na alça da peptidiltransferase, no domínio V do rRNA 23S. Apesar da mutação em um único alelo não conferir resistência a altas concentrações de azitromicina, esta alteração no genoma do gonococo pode contribuir para a diminuição da suscetibilidade. Por outro lado, mutações presentes em 3 ou 4 alelos do *rrl* podem conferir uma CMI de até 256 µg/mL (Chisholm, Dave e Ison, 2010).

Outro mecanismo, menos frequentemente descrito, que também pode impactar os valores de CMI para azitromicina é a aquisição dos genes *ermB*, *ermC* e *ermF*. Os genes *erm* codificam enzimas capazes de metilar uma adenina presente no rRNA 23S, o que acaba impedindo a ligação da molécula do antimicrobiano ao seu alvo no ribossoma. Uma vez presentes, as enzimas codificadas pelos genes *erm* podem aumentar a CMI de *N. gonorrhoeae* para até 1-4 µg/mL (Unemo e Shafer, 2014; Belkacem *et al.*, 2016).

1.3.2 Ceftriaxona

A ceftriaxona é um antimicrobiano pertencente à classe das cefalosporinas de terceira geração. O primeiro relato de descoberta desta nova classe de antibióticos foi em 1945, quando o italiano Giuseppe Brotzu isolou diferentes componentes do fungo *Acremonium* (antes chamado *Cephalosporium*). No ano de 1955, Edward Abraham e Guy Newton purificaram e descreveram a estrutura da Cefalosporina C como um componente secundário presente no metabolismo do fungo *Acremonium*. A Cefalosporina C apresentava baixo poder antimicrobiano e era produzida em baixíssima quantidade, até o ano de 1960 quando iniciou-se a produção das cefalosporinas semissintéticas (Arumughan e Cascella, 2017).

A classe das cefalosporinas pertencem ao grupo dos betalactâmicos, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da síntese da parede celular através da ligação do anel betalactâmico às PBPs (*Penicilin Binding Protein*), impedindo a transpeptidação do peptideoglicano. Cefalosporinas de espectro estendido (CEEs) são em geral eficazes contra bactérias gram-negativas, exceto por alguns gêneros bacterianos que apresentam mecanismos de resistência intrínsecos a elas. Entre as muitas CCE desenvolvidas, duas já foram utilizadas para tratamentos de infecções por *N. gonorrhoeae*: cefixima (administrada por via oral) e ceftriaxona (administrada por via parenteral). Por não serem hidrolisadas pela penicilinase codificada nos plasmídeos que circulam em gonococos, CCEs são ativas contra amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes a penicilinas (Unemo *et al.*, 2010; Tavares, 2014).

As cefalosporinas tornaram-se a classe de antibióticos escolhida para tratar a doença gonocócica desde a descontinuidade do uso das fluoroquinolonas; o que aconteceu em momentos diferentes em diferentes pontos do mundo, num primeiro momento no Japão (Costa-Lourenço *et al.*, 2017). Historicamente, o uso oral da cefixima fez com que sua administração fosse facilitada, tendo sido extensivamente usada naquele país ainda nos anos 1990. No entanto, já em 1995 foi reportado o primeiro caso de *N. gonorrhoeae* resistente a cefixima, em Kanagawa, Japão, onde a amostra apresentava um valor de CMI = 0,25 µg/mL. Estudos posteriores caracterizaram este isolado e constatou-se modificações A501V e P551S na sequência não mosaico da PBP2. Nos anos seguintes, houve uma disseminação de amostras apresentando fenótipo de resistência ou suscetibilidade reduzida à cefixima no Japão de tal forma que, na década seguinte, em 2002, 57% dos isolados no país eram resistentes a este antimicrobiano, apresentando CMI > 0,125 µg/mL (Shimuta *et al.*, 2015). Neste contexto, em 2005 a instituição *Japanese Society of Sexually Transmitted Infection* deixou de recomendar o uso de CCEs administradas via oral para o tratamento da gonorreia (Unemo, del Rio e Shafer,

2016). Alguns anos depois, em 2012 a administração de cefixima via oral deixou de ser recomendada também pelo CDC (CDC, 2012).

Atualmente a ceftriaxona é o pilar da terapia antimicrobiana para gonorreia em todo o mundo (Ministério da Saúde, 2017; WHO, 2016; CDC, 2020). No entanto, a resistência à ceftriaxona em *N. gonorrhoeae* já foi descrita na literatura. Em 2009, Ohnishi e colaboradores reportaram uma amostra, nomeada H041, que apresentava suscetibilidade reduzida a azitromicina e com valores de CMI para ceftriaxona de 2 µg/mL (Ohnishi 2011a, 2011b). No ano seguinte, também foi relatada uma amostra resistente a ceftriaxona e cefixima na França, denominada F89, apresentando valores de CMI a estes antimicrobianos de 1 a 2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente (Unemo *et al.*, 2012). Em 2012, Cámara e colaboradores caracterizaram duas amostras de *N. gonorrhoeae* apresentando CMI para ceftriaxona de 1,5 µg/mL na região da Catalunha, Espanha (Cámara *et al.*, 2012). Entre 2017 e 2018, pesquisadores da China reportaram 5 amostras multirresistentes apresentando fenótipo de resistência à ceftriaxona, tendo os valores de CMI variando entre 0,5 e 1 µg/mL. Além disso, quatro destes isolados tinham suscetibilidade reduzida a azitromicina e uma era resistente, tendo os valores da CMI variando entre 0,5 e 2 µg/mL (Yuan *et al.*, 2019). Considerando o que foi possível apurar, até o momento, meados de 2022, não há relatos de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à ceftriaxona no Brasil.

Alterações nos genes *penB*, *mtrR* e *penC* podem ocasionar resistência às CEEs. No entanto, dentre os mecanismos de resistência ou suscetibilidade reduzida à ceftriaxona presentes em *N. gonorrhoeae*, destaca-se a influência do alelo mosaico *penA*. Este gene é responsável por codificar a PBP2 modificada com cerca de 60 a 70 aminoácidos em relação à enzima selvagem, o que diminui consideravelmente sua afinidade à ceftriaxona. A aquisição deste gene alterado pode ter origem em mutações pontuais ou através de recombinação entre espécies de *Neisseria* comensais que colonizam outros sítios corporais como a orofaringe (Costa-Lourenço *et al.*, 2017). Ainda assim, amostras de *N. gonorrhoeae* com ausência do alelo mosaico *penA* podem apresentar fenótipo de redução de suscetibilidade às CEEs. Mutações no gene *penB* impactam na suscetibilidade do gonococo a ceftriaxona, uma vez que este gene codifica a porina B (*porB1b*) mutada com alterações nos aminoácidos G101 e A102 e, conseqüentemente, há uma redução na entrada do antimicrobiano na célula. Além disso, vale ressaltar que a expressão aumentada da bomba de efluxo MtrCDE pelos mecanismos citados anteriormente auxilia na excreção da ceftriaxona. Em contraste, ainda não há evidências de que mutações nas proteínas PBP1 e PILQ, codificadas pelos genes *ponA1* e *pilQ*, respectivamente,

influenciem significativamente nas CMI de ceftriaxona e cefixima (Zhao *et al.*, 2009; Unemo *et al.*, 2012; Unemo, del Rio e Shafer, 2016).

1.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae*

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae* são padronizados por agências reguladoras como CLSI, EUCAST e BrCAST.

Segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), o meio de cultura indicado para a realização dos testes de disco difusão e ágar diluição é a base GC com 1% de suplemento para crescimento. Em relação aos pontos de corte, uma amostra de *N. gonorrhoeae* é considerada sensível à ceftriaxona apresentando um halo de inibição ≥ 35 mm na disco difusão, enquanto pelo método da ágar diluição uma amostra é considerada sensível se apresentar $CMI \leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$. No que diz respeito à azitromicina, recentemente o CLSI adotou um ponto de corte ≥ 30 mm de halo inibitório para determinar amostras sensíveis ao antimicrobiano, além do previamente estabelecido ponto de corte de sensibilidade por CMI de ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$. Também há padrões estabelecidos para realização dos testes de suscetibilidade à cefixima, sendo consideradas amostras sensíveis aquelas que apresentam um halo ≥ 31 mm e $CMI \leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2021).

Até o presente momento, o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) não possui dados de pontos de corte para disco difusão, sendo recomendado o uso de metodologias que determinam CMI para determinar o fenótipo de resistência em amostras de *N. gonorrhoeae*. No entanto, o documento não especifica a estratégia metodológica ou o meio de cultura a ser empregado. Segundo o EUCAST, uma $CMI \leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ define uma amostra sensível à ceftriaxona; qualquer valor acima deste é considerado resistente. Em relação à azitromicina, o ponto de corte para sensibilidade adotado é $CMI \leq 1$ $\mu\text{g/mL}$. No que diz respeito à cefixima, não há pontos de corte disponibilizado pelo EUCAST (EUCAST, 2021).

No Brasil, o Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) foi fundado com a finalidade de padronizar os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* no país, fornecendo parâmetros para a avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos em documentos de livre acesso e que estejam adaptados à realidade nacional. O comitê é designado conjuntamente pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, e Sociedade Brasileira de Patologia

Clínica e Medicina Laboratorial e tem, entre outros objetivos, buscar um consenso internacional e/ou harmonização com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) e o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (BrCAST, 2021a). Na prática, o BrCAST é uma versão brasileira do EUCAST, que usa parte dos documentos europeus originais traduzidos para o português, mas também desfruta da possibilidade de propor mudanças que levem a adaptações locais (BrCAST, 2021b).

Assim como no EUCAST, também não há no BrCAST pontos de corte disponibilizados para realização da disco difusão em amostras de *N. gonorrhoeae*, sendo recomendado seguir as recomendações do fabricante do sistema comercial utilizado. Por outro lado, os pontos de corte da CMI adotados pelo BrCAST são os mesmos do EUCAST para os três antimicrobianos: azitromicina $S \leq 1$ mg/L; ceftriaxona $S \leq 0,125$ mg/L; cefixima $S \leq 0,125$ mg/L.

Quadro 1 – Pontos de corte utilizados por CLSI, EUCAST e BrCAST (todos 2022) para ceftriaxona, cefixima e azitromicina para as técnicas de disco difusão (dados em mm) e determinação de CMI (dados padronizados na concentração $\mu\text{g/mL}$)

	CLSI (2022)	EUCAST (2022)	BrCAST (2022)
Ceftriaxona	$S^* \geq 35$ mm $S \leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$	$-\dagger$ $S \leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$	- $S \leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$
Cefixima	$S \geq 31$ mm $S \leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$	- $S \leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$	- $S \leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$
Azitromicina	$S \geq 30$ mm $S \leq 1$ $\mu\text{g/mL}$	- $S \leq 1$ $\mu\text{g/mL}$	- $S \leq 1$ $\mu\text{g/mL}$

*S = sensível

\dagger - não há ponto de corte definido para disco difusão

Existem relatos na literatura que correlacionam dados de CMI obtidos pelas metodologias de E-test e ágar diluição, ambos utilizando meio de cultura Base GC. Liu e colaboradores avaliaram a suscetibilidade de amostras clínicas e mutantes de *N. gonorrhoeae* a CEEs, incluindo ceftriaxona e cefixima, comparando os resultados da disco difusão com a ágar diluição, além do E-test. No mesmo meio de cultura, as amostras apresentaram concordância na categoria de susceptibilidade em que foram classificadas de 93,1% e 92,1% entre a disco difusão e ágar diluição para ceftriaxona e cefixima, respectivamente. Ademais, quando comparada a metodologia de disco difusão e E-test, E-test gerou resultados ligeiramente inferiores aos obtidos por ágar diluição, mas a concordância neste critério foi de 93% e 92,1% para ceftriaxona e cefixima, respectivamente. (Liu *et al.*, 2016)

A utilização do ágar chocolate para determinar o fenótipo de resistência em amostras de gonococos fora observada, devido ao baixo custo, em países como Taiwan. Liao e colaboradores demonstraram que, quando comparados aos resultados obtidos com a Base GC, o uso de ágar chocolate resultou em valores de CMI levemente mais altos pelo E-TEST e valores de diâmetro menores por DD. No entanto, os autores relatam que, usando disco difusão, há concordância de resultados de categorização (sensível ou não) entre os dois meios de cultura de 95,1% para ciprofloxacina e 94,5% para ceftriaxona, o que seria uma taxa superior à estabelecida como aceitável pelo CLSI vigente na ocasião (Liao *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A determinação do perfil de suscetibilidade das amostras de *N. gonorrhoeae* é um desafio para a rotina de laboratórios de análises clínicas. O problema é causado pela ausência de métodos automatizados para o diagnóstico, aliada a característica do gonococo ser um microrganismo extremamente fastidioso para o crescimento em cultura. Desde a adoção do BrCAST como documento referência em laboratórios de análises clínicas no Brasil, nem mesmo o uso da disco difusão (DD) está autorizado, uma vez que, ao contrário do que oferece o CLSI, o documento não apresenta pontos de corte para esta técnica. Assim, os testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA) em gonococos com finalidade de diagnóstico clínico no Brasil estão limitados àqueles que determinam CMI: teste de gradiente em fita (como os comerciais E-test e MICE) e ágar diluição. Cabe ainda dizer que o BrCAST não estabelece o método a ser utilizado nesta determinação.

O protocolo para realização do TSA em *N. gonorrhoeae*, recomendado pelo CLSI, consiste na utilização do ágar Base GC adicionado do suplemento nutritivo VX. No entanto, este não é um meio de cultura comercializado pronto para uso no mercado brasileiro. Sendo assim, apesar dos testes de ágar diluição serem considerados a mais robusta referência para análise do perfil de suscetibilidade de amostras de *N. gonorrhoeae*, sua aplicabilidade para diagnóstico na rotina de laboratórios de análises clínicas é limitada, uma vez que, além de laborioso, não é economicamente viável seu uso com um número de amostras reduzido, além de haver a necessidade da preparação do meio de cultura *in-house*.

Até o momento, há poucos relatos na literatura quanto a eficiência do uso de ágar chocolate para determinar a suscetibilidade de amostras de *N. gonorrhoeae* utilizando as técnicas de disco difusão e teste de gradiente em fita. Sendo assim, o presente projeto visa avaliar o potencial uso de teste de gradiente em fita utilizando como base o ágar chocolate com a finalidade de distinguir cepas sensíveis e resistentes de *N. gonorrhoeae* a ceftriaxona e azitromicina, como uma alternativa mais simples, econômica e prática para o diagnóstico de resistência de amostras de *N. gonorrhoeae* na rotina de laboratórios de análises clínicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o uso do ágar chocolate como meio de cultura base para realização de E-test para azitromicina e ceftriaxona com amostras de *Neisseria gonorrhoeae*.

3.2 Objetivos específicos

Comparar o resultado da determinação de CMI de azitromicina e ceftriaxona por E-test em meio ágar GC com o obtido em meio ágar chocolate.

Comparar o resultado da determinação de CMI de azitromicina e ceftriaxona por E-test em meio ágar GC e meio ágar chocolate com os dados de CMI obtidos por ágar diluição em meio ágar GC.

4. METODOLOGIA

4.1 Visão geral da estratégia experimental

A estratégia experimental deste estudo se baseou em utilizar amostras com perfil conhecido de suscetibilidade aos antimicrobianos azitromicina e ceftriaxona. Determinantes genéticos de resistência também foram previamente investigados em pelo menos parte destas amostras. Três diferentes técnicas foram então comparadas no diagnóstico deste perfil: ágar diluição em ágar GC, a qual pode ser considerada a mais precisa, por se tratar do contato direto do antimicrobiano com as bactérias no meio preconizado para o teste, e E-Test realizado no mesmo meio em que se faz a ágar diluição (ágar GC) e em ágar chocolate. É importante mencionar que em todos os testes quando o ágar base GC foi utilizado, foi adicionado 1% de suplemento VX. O passo a passo desta estratégia experimental está descrito a seguir:

- Selecionar, entre as amostras já caracterizadas no LIMM, 50 amostras que apresentem diferentes faixas de CMI para azitromicina e ceftriaxona e confirmar a identificação das amostras.
- Resgatar, em trabalhos anteriores realizados no laboratório, os mecanismos de resistência a cefalosporinas de espectro estendido e azitromicina já caracterizados nestas amostras para dar mais suporte à discussão dos resultados.
- Determinar a CMI destas amostras para azitromicina e ceftriaxona utilizando fitas de E-test em meio ágar GC suplementado e meio ágar chocolate comercial.
- Determinar a CMI destas amostras para azitromicina e ceftriaxona, por ágar diluição em meio Agar GC suplementado
- Comparar a CMI encontrada para azitromicina e ceftriaxona por E-test nos meios ágar GC suplementado e ágar chocolate com aqueles obtidos pela ágar diluição.

4.2 Concentração mínima inibitória aos antimicrobianos por E-test

O teste de sensibilidade aqui adotado segue as recomendações globais para testes de suscetibilidade por disco difusão do BrCAST (2022)

Para a determinação da concentração mínima inibitória através da metodologia por E-test, serão utilizadas placas de Petri descartáveis 90 x 15 mm contendo ágar chocolate comercial

suplementado (Laborclin) ou base GC (Difco) preparado *in-house* com 1% de Suplemento VX (GC + VX) (Laborclin), utilizando um volume de aproximadamente 20 ml por placa a fim de obter uma espessura de 4 mm de ágar. As amostras, previamente ativadas em ágar chocolate, serão usadas para obter uma suspensão bacteriana correspondente a escala 0,5 McFarland, utilizando o meio líquido Mueller-Hinton Caldo (Difco). Com o auxílio de um swab, as placas com cada um dos meios de cultura testados serão semeadas com o inóculo bacteriano em três direções diferentes, com ângulos de 60° entre elas.

Com o auxílio de uma pinça estéril, as fitas de E-test contendo azitromicina ou ceftriaxona (ambas cobrindo uma faixa de CMI entre 0,016 e 256 µg/mL; bioMerriex, Rio de Janeiro, Brasil) foram aplicadas nas placas de ágar chocolate e base GC inoculadas com o microrganismo, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, as placas foram incubadas a uma temperatura entre 35 a 36 °C em uma atmosfera úmida e contendo cerca de 5% de CO₂ por um período de 24 horas.

Na leitura do teste observa-se a formação de um halo em formato elíptico e foi considerada CMI a menor concentração do antimicrobiano em que não se detecta crescimento bacteriano junto à fita. Como controle, foi utilizada a cepa controle de *N. gonorrhoeae* ATCC49226 que tem CMI entre 0,25 e 1 µg/mL para azitromicina e entre 0,004 e 0,0016 µg/mL para ceftriaxona.

4.3 Concentração mínima inibitória aos antimicrobianos por ágar diluição

4.3.1 Preparo das placas com antimicrobianos

Primeiramente, foi estabelecida a faixa de concentração dos antimicrobianos adicionados nas placas para a realização do teste de suscetibilidade, de acordo com a faixa de CMIs apresentadas pelas amostras testadas, incluindo amostras sensíveis, resistentes e a cepa controle. Os pontos de corte para a estratificação inicial das amostras como suscetíveis ou resistentes foram os definidos pelo BrCAST (BrCAST, 2022).

Para a definição da CMI para ceftriaxona foi preparada uma série de placas de 0,008 a 0,25 µg/mL; e para azitromicina, de 0,25 a 64 µg/mL. A Tabela 2 compila dados relativos à ao preparo das soluções estoque de antimicrobianos e sua faixa de diluição. A estratégia para a preparação das placas contendo azitromicina e ceftriaxona, por sua vez, estão apresentadas nas

tabelas 3 e 4. Toda a metodologia para preparação de soluções e placas foi baseada nas recomendações do documento M100 do CLSI (2022).

4.3.2 Execução da técnica de ágar diluição

O presente estudo foi realizado com amostras já caracterizadas por nosso grupo de pesquisa no LIMM. No entanto, para assegurar que as amostras de *N. gonorrhoeae* não tenham sofrido alterações nos fenótipos de sensibilidade em função da estocagem, a determinação da CMI foi repetida. A metodologia da ágar diluição foi feita de acordo com a recomendação do CLSI, a fim de determinar a CMI das amostras frente aos antimicrobianos: azitromicina e ceftriaxona. Além disso, foi também submetida ao teste a cepa controle de *N. gonorrhoeae* ATCC49226, também recomendada pelo CLSI (CLSI, 2022).

Para a realização do teste de suscetibilidade, foram utilizadas placas de Petri de 90 x 15 mm descartáveis, contendo 20 ml de base GC modificada com 1% de suplemento VX (Laborclin, Brasil). Uma série de placas com concentrações decrescentes foram preparadas com cada antimicrobiano, além de duas placas controle sem adição de antibiótico.

As amostras submetidas à ágar diluição foram ativadas em meio ágar chocolate. Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas em meio Mueller Hinton Caldo (MHC) correspondentes a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) e 10 μ l desta suspensão foram diluídos em 90 μ l de MHC (obtendo-se $1,5 \times 10^7$ UFC/ml), de modo que 2 μ l da suspensão corresponda a 10^4 UFCs. Em seguida, uma alíquota de 2 μ l de cada amostra foi semeada em cada uma das placas, sendo a primeira placa da série o controle inicial sem antimicrobiano seguido pela ordem crescente da concentração dos antibióticos, sendo finalizada com o controle final. As placas foram incubadas a uma temperatura entre 35 e 36 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 18 - 24 horas (Thermo Scientific, Series II Water Jacket, CO Incobater). Na interpretação dos resultados, a menor concentração do antimicrobiano em que não se observa crescimento bacteriano foi considerada a CMI da amostra.

Tabela 2 – Esquema utilizado na preparação da série de placas com azitromicina e ceftriaxona

Antimicrobiano	PM antimicrobiano	Preparação	Composição da preparação	PM preparação	Solvente ^a	Diluyente ^a	Concentração Solução mãe (mg/mL)	Concentração Solução estoque (mg/mL)	Faixa de concentração ^b (µg/mL)
Azitromicina	749.02	Sigma PHR1088	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂ . 2H ₂ O	785.02	Álcool etílico 95%	Mueller Hinton Caldo	10	0,640	64 – 0,25
Ceftriaxona	554.57	Sigma C5793	C ₁₈ H ₁₆ N ₈ Na ₂ O ₇ S ₃ . 3.5H ₂ O	661.60	Água	Água	1	0,08	0,5 – 0,008

^aSolvente e diluyente – Especificados pelo CLSI (M100, Tabela 6A) e/ou pela Sigma -Aldrich

Tabela 3 – Estratégia de diluição adotada para o preparo da série de placas contendo azitromicina.

Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Diluyente (Mueller-Hinton Caldo)	Concentração intermediária (µg/mL)	Concentração final no ágar (µg/mL)
1	5120*	Estoque	1	7	640	64
2	640	Passo 1	2	2	320	32
3	640	Passo 1	1	3	160	16
4	640	Passo 1	1	7	80	8
5	80	Passo 4	1	7	40	4
6	80	Passo 4	2	2	20	2
7	80	Passo 4	1	3	10	1
8	10	Passo 7	1	7	5	0,5
9	10	Passo 7	2	2	2,5	0,25

* Preparada a partir de uma solução a 10 mg/mL

Tabela 4 – Estratégia para o preparo da série de placas contendo ceftriaxona.

Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Diluyente (Água destilada)	Concentração intermediária (µg/mL)	Concentração final no ágar (µg/mL)
1	10	Estoque	2	2	5	0,5
2	10	Estoque	1	3	2,5	0,25
3	10	Estoque	1	7	1,25	0,125
4	1,25	Passo 3	2	2	0,6	0,06
5	1,25	Passo 3	1	3	0,3	0,03
6	1,25	Passo 3	1	7	0,16	0,016
7	0,16	Passo 6	2	2	0,08	0,008

4.4 Estratégia para interpretação de resultados

A estratégia para interpretação dos resultados obtidos na técnica de ágar diluição foi baseada na investigação sobre a ocorrência de erros categóricos e essenciais na CMI detectada por E-test em ágar chocolate ou ágar GC, levando em consideração o resultado da ágar diluição em ágar GC como referência. Uma vez que os pontos de corte das agências CLSI e BrCAST essencialmente não divergem, é possível fazer isso sem levar em conta este parâmetro (Tabela 5).

A fim de esclarecimento, o conceito de acordo categórico diz respeito às amostras serem ou não classificadas na mesma categoria de suscetibilidade quando comparamos uma técnica de referência à outra em processo de validação. Sendo assim, quando a amostra entra em desacordo categórico, existem dois possíveis erros: erro grave (tradução do termo em inglês, *major error* (ME)); e erro muito grave (do inglês, *very major error* (VME)). O primeiro é atribuído quando uma amostra é classificada erroneamente resistente, porém, na técnica de referência o resultado é suscetível. Por outro lado, o VME é um erro muito grave por considerar uma amostra como sensível, quando, na verdade, ela é resistente de acordo com a técnica de referência.

Já o conceito de acordo essencial avalia se o valor da CMI obtido pelas diferentes técnicas diverge. Os dados são considerados concordantes quando a diferença entre as técnicas não é maior do que mais ou menos uma diluição.

Tabela 5 – Pontos de corte para concentração mínima inibitória adotados neste estudo

Agência	Azitromicina (µg/ml)			Ceftriaxona (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
CLSI 2022	≤ 1	-	-	≤ 0,25	-	-
EUCAST 2022	-	-	ECOFF ^a = 1	≤ 0,125	-	> 0,125
BrCAST 2022	-	-	ECOFF ^a = 1	≤ 0,125	-	> 0,125

^a ECOFF: Epidemiological cut off value.

5. RESULTADOS

5.1 Azitromicina

Dentre as 50 amostras selecionadas, 49 continuaram viáveis durante todas as etapas de pesquisa com relação à azitromicina, com exceção da amostra de número 6205 que não apresentou crescimento nas diversas tentativas de ativá-la. Destas, 21 amostras foram resistentes a este antimicrobiano (45%). Cerca de 96% das amostras apresentaram concordância categórica entre a técnica de E-test e a ágar diluição, tanto em ágar base GC quanto em ágar chocolate (n=47). As exceções foram as amostras 5116 e 5026, para as quais a técnica de ágar diluição reportou uma amostra resistente, enquanto no E-test os resultados indicaram amostras sensíveis

No entanto, no que diz respeito à concordância essencial, 79,5% (n=39) das amostras apresentaram até uma diluição de diferença no E-test em base GC em relação à ágar diluição. A mesma taxa de concordância essencial foi observada na comparação da ágar diluição com E-test em ágar chocolate (Tabela 6). Portanto, neste conjunto de amostras, realização de E-test em ágar chocolate apresentou CMI's tão próximas às da técnica de referência quanto a CMI por E-test em ágar base GC. Dados de todas as amostras aparecem compilados na Figura 1.

Ao confrontar os dados de CMI obtidos pela metodologia do E-test nos dois meios de cultura, todas as 49 (100%) amostras foram classificadas na mesma categoria de suscetibilidade. Por outro lado, no que diz respeito à concordância essencial, 96% das amostras apresentaram até uma diluição de diferença na CMI (n=45). Considerando que neste contexto a referência é utilização do ágar GC (recomendado pelo CLSI) é digno de nota que não houve erros graves e gravíssimos em relação ao E-test quando o ágar chocolate foi utilizado, apontando uma boa correlação com o meio de cultura já validado (Figura 2, Tabela 7).

Tabela 6 – Concordância categórica e essencial para azitromicina comparados à ágar diluição (AD).

Critério de análise	AD x E-test base GC (n=49)	AD x E-test Ágar Chocolate (n=49)
Concordância categórica	96% (n=47)	96% (n=47)
Concordância essencial	79,5% (n = 39)	79,5% (n=39)
Erros muito grave	4% (n=2)	4 % (n=2)
Erros grave	0% (n=0)	0 % (n=0)

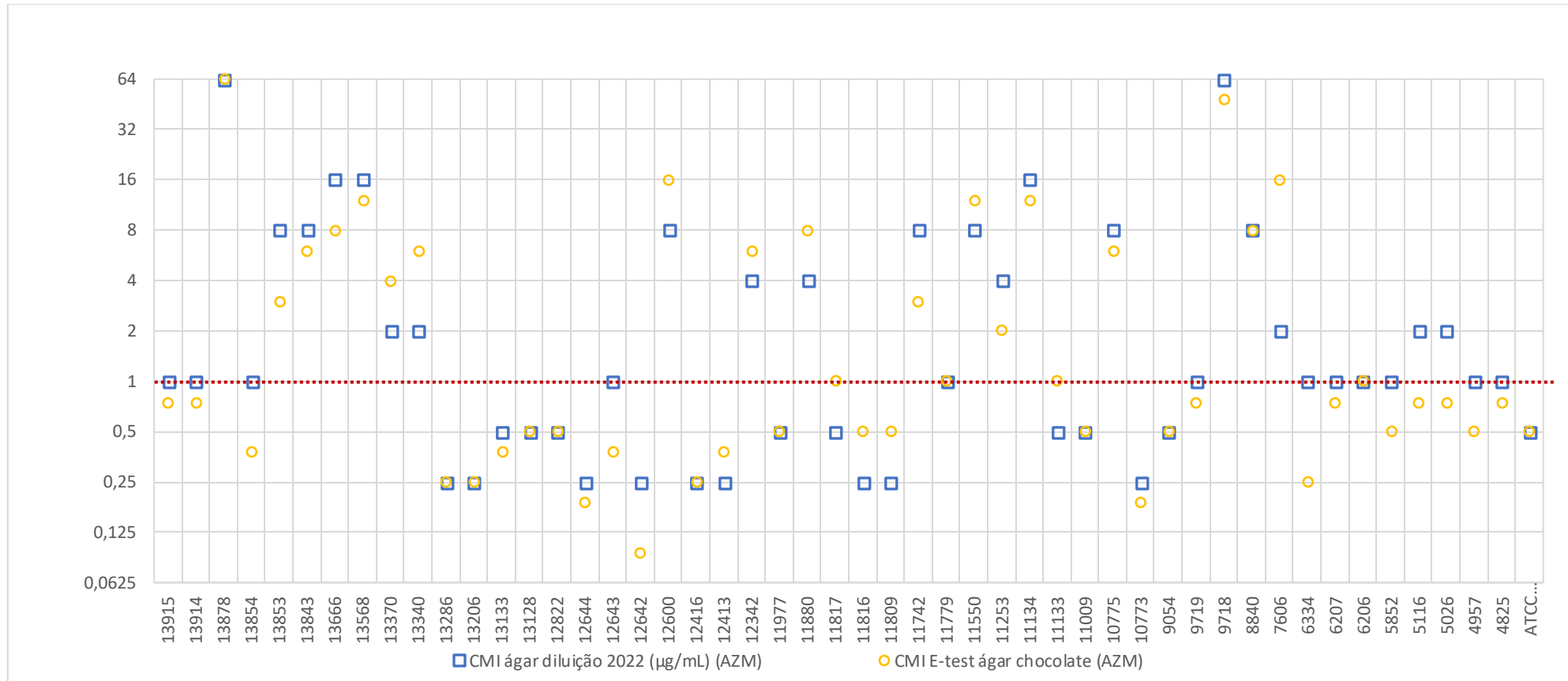


Figura 1 – Distribuição dos valores de CMI nas técnicas de ágar diluição (azul), E-test em base GC (vermelho) e E-test em ágar chocolate (amarelo). A linha tracejada em vermelho representa o ponto de corte para azitromicina ($R > 1 \mu\text{g/mL}$)

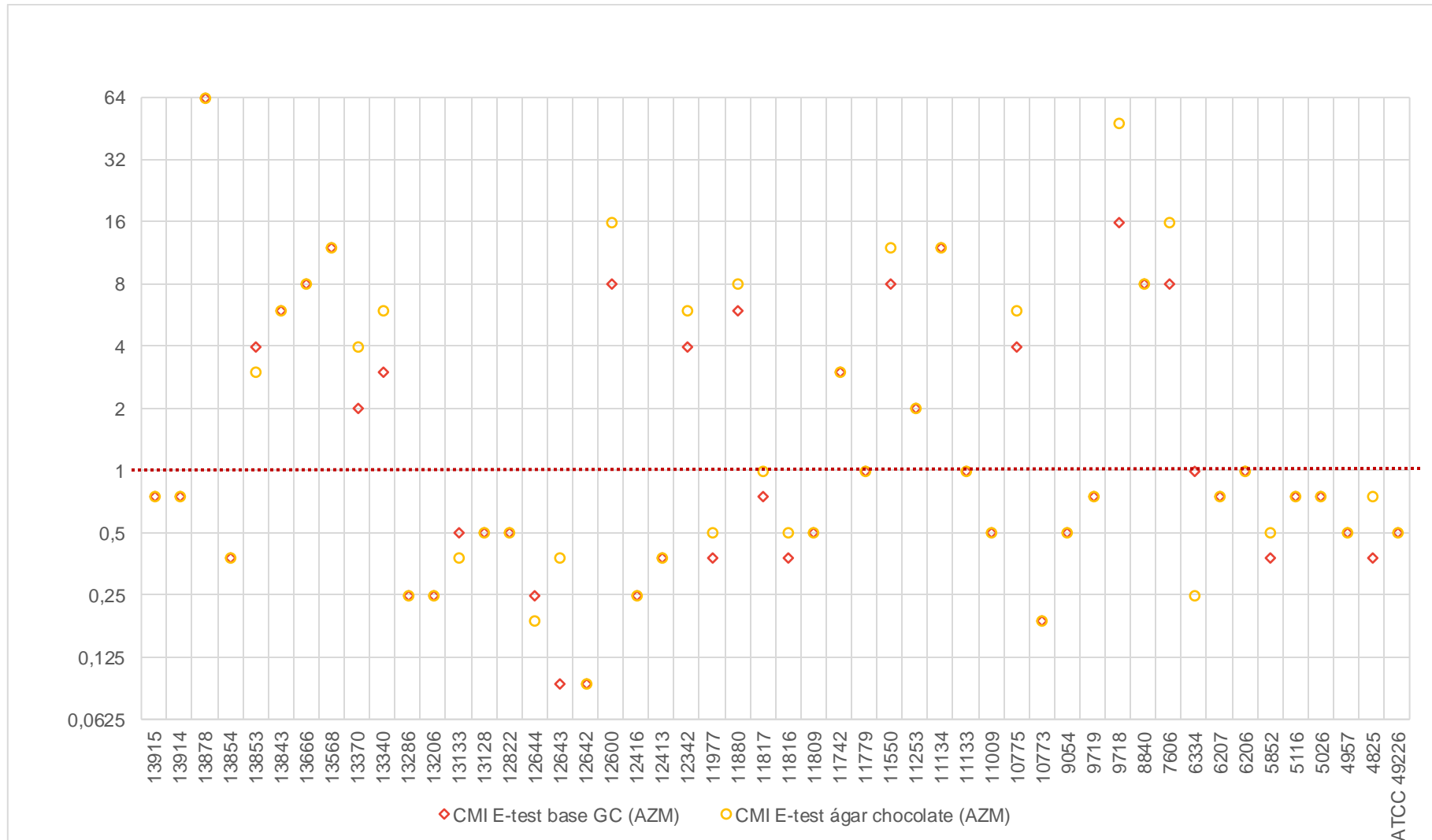


Figura 2 – Correlação entre as CMI's obtidas pela metodologia do E-test nos meios ágar base GC (vermelho) e em ágar chocolate (amarelo). A linha tracejada em vermelho representa o ponto de corte para azitromicina ($R > 1 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 7 – Concordância categórica e essencial para azitromicina no E-test realizado em ágar base GC e ágar chocolate

Critério de análise	E-test base GC x E-test ágar chocolate
Concordância categórica	100% (n=47)
Concordância essencial	96% (n= 45)
Erros muito graves	0% (n= 0)
Erros graves	0% (n= 0)

5.2 Ceftriaxona

Das 50 amostras selecionadas, 48 continuaram viáveis durante todas as etapas de pesquisa com relação à ceftriaxona, com exceção da amostra 9718 e 6205; por isso, resultados de 48 amostras estão apresentados. Entre estas, todas apresentaram suscetibilidade a ceftriaxona, refletindo o perfil de sensibilidade de nossa coleção. O resultado de CMI para todas as amostras foi $\leq 0,008 \mu\text{g/mL}$ na técnica da ágar diluição. Já no E-test, a CMI foi $\leq 0,016 \mu\text{g/mL}$ tanto no ágar base GC quanto no ágar chocolate.

Com este resultado, todas as amostras testadas apresentaram concordância categórica como sensíveis. Com relação à análise da concordância essencial, esta é um pouco comprometida pelo fato de que a CMI das amostras foi igual ou inferior ao limite de detecção da técnica. Contudo, com esta ressalva, não houve variação nos resultados obtidos com as técnicas testadas, incluindo tanto a técnica de referência (ágar diluição) quanto as técnicas sob avaliação (E-test em ágar chocolate e base GC). Sendo assim, também não houve erros graves ou muito graves (Tabela 8, Figura 3).

Tabela 8 – Concordância categórica e essencial para determinação de CMI de ceftriaxona por E-test em ágar base GC e ágar chocolate com relação à ágar diluição. Não houve diferença entre os meios de cultura utilizados.

Critério de análise	AD x E-test base GC (n=48)	AD x E-test ágar chocolate (n=48)
Concordância categórica	100% (n=48)	100% (n=48)
Concordância essencial	100% (n=48)	100% (n=48)
Erros muito graves	0% (n=0)	0% (n=0)
Erros graves	0% (n=0)	0% (n=0)

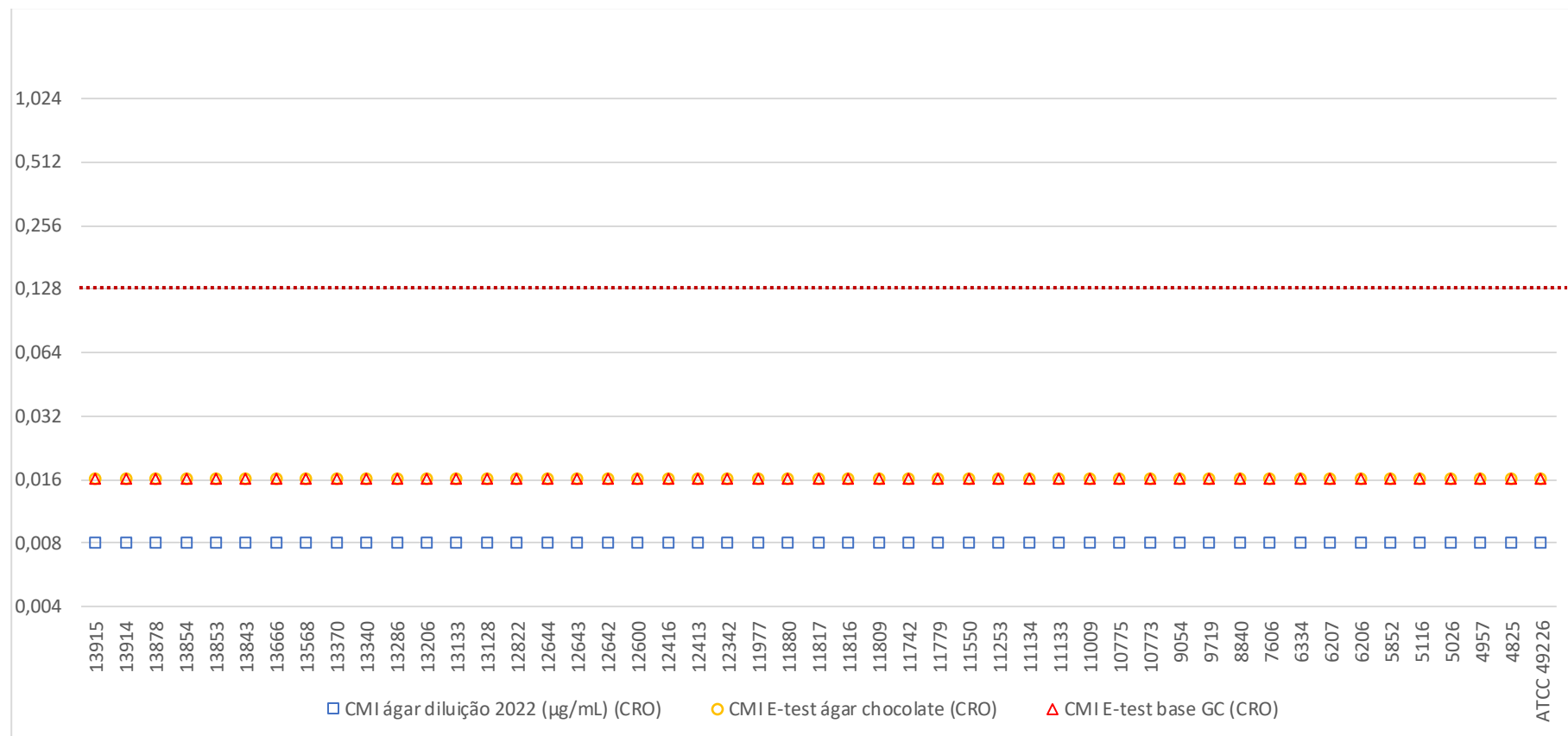


Figura 3 – Concentração mínima inibitória para ceftriaxona das 48 amostras incluídas no estudo pelas técnicas de ágar diluição (azul), E-test em ágar chocolate (amarelo) e E-test em base GC (vermelho). Nota-se uma sobreposição dos valores de CMI para o E-test em ambos os meios de cultura. A linha tracejada representa o ponto de corte para ceftriaxona ($R > 0,125 \mu\text{g/mL}$)

6. DISCUSSÃO

N.gonorrhoeae é um microrganismo que vem preocupando a comunidade científica mundial devido a sua alta capacidade de adquirir resistência frente aos diversos antimicrobianos já desenvolvidos. A gonorreia corre o risco de tornar-se intratável, visto que, ao longo do tempo, muitos tratamentos preconizados já foram abandonados por aumento nas falhas terapêuticas a eles associados. Segundo a OMS, o gonococo é um microrganismo considerado como prioridade alta quanto ao desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas para a infecção por ele causada, a gonorreia (WHO, 2016). Atualmente, a zoliflodacina vem sendo estudada como uma nova opção terapêutica em resposta aos altos índices de amostras multirresistentes. A molécula representa uma nova classe de antimicrobianos de administração oral, espiropirimidinatrionas, cujo alvo é a topoisomerase do tipo II, em uma interação diferente da realizada pelas fluoroquinolonas. O novo antimicrobiano encontra-se em estudo de fase 3 e demonstrou uma boa segurança e eficácia no tratamento de gonorreia urogenital e retal (Bradford *et al.*, 2020). Ainda assim, a ceftriaxona continua sendo a droga de escolha para tratamento de gonorreia, sendo associada à azitromicina em muitos países. Em caso de pacientes alérgicos a penicilina, o CDC recomenda uma dose intramuscular de 240 mg de gentamicina, juntamente a 2 g de azitromicina via oral (WHO, 2016; CDC, 2020).

Até o momento, não foram identificadas amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes a este antimicrobiano no Brasil. No entanto, estudos anteriores de nosso grupo reportaram que algumas amostras selecionadas para comporem a coleção deste estudo apresentaram CMI mais altas para ceftriaxona, em certos casos de até 0,062 µg/mL para ceftriaxona (anexo 2; Costa-Lourenço, 2017b). Na reativação das amostras para a realização do presente trabalho, contudo, todas apresentaram CMI menor ou igual a 0,016 µg/mL. A diferença na suscetibilidade pode ter ocorrido devido ao longo tempo que permaneceram armazenadas em nitrogênio líquido, refletindo, assim, numa maior fragilidade. É possível que no primeiro momento em que foi realizada a ágar diluição, o *fitness* das amostras estivesse mais próximo do ideal, visto que parte delas eram recém-chegadas no laboratório. Vale ressaltar que a variabilidade inata da técnica da ágar diluição também pode ter influenciado nos resultados para ceftriaxona, ainda mais por conta das concentrações baixíssimas de antimicrobiano. Assim, a não diversidade de CMIs limita as possibilidades de avaliação da técnica. Contudo, pelo fato de todas as amostras terem se apresentado no limite mínimo de sensibilidade da técnica, não houve diferenças no resultado apontado pelas diferentes abordagens metodológicas utilizadas.

É digno de nota que estudos anteriores realizados por nosso grupo reportaram, para as amostras com suscetibilidade reduzida às CEEs, uma CMI mais elevada para cefixima do que para ceftriaxona. Um dos principais mecanismos de resistência às CEEs é a modificação do gene *penA*, responsável por codificar a PBP 2. Entre 116 amostras obtidas entre 2010 e 2015, sete apresentaram suscetibilidade reduzida a CEEs, sendo que seis apresentavam o alelo *penA* XXXIV mosaico e uma o alelo *penA* XII (Costa-Lourenço, 2017b) Todas foram classificadas como pertencentes ao ST-1901, que é frequentemente associado à suscetibilidade reduzida às CEEs, sendo reportado na Ásia, Europa e América do Norte (Unemo e Nicholas, 2012b; Grad *et al.*, 2014). Essas 07 amostras foram incluídas no presente estudo (4957, 9054, 9719, 11009, 11133, 11134 e 11779). No entanto, mesmo que talvez cefixima fosse mais sensível para indicar a ocorrência de algum mecanismo de resistência, como o alvo da presente pesquisa foi o diagnóstico clínico, optamos por focar na ceftriaxona, fármaco realmente usado no tratamento.

O fenótipo de sensibilidade à ceftriaxona apresentado pelas amostras de nossa coleção nos permitiu observar que existe uma congruência entre os resultados obtidos na ágar diluição e E-test, feitos em ágar base GC, não apresentando variações detectáveis entre as CMI. É importante observar que a graduação da fita de E-test utilizada nos experimentos cobre as faixas de concentração de 0,016 a 256 µg/mL, o que para determinar a CMI das amostras de *N. gonorrhoeae* sensíveis a ceftriaxona de maneira mais precisa não é o mais adequado, visto que estas amostras apresentam CMIs bem baixas (até 0,002 µg/mL, em alguns casos). No entanto, a escolha desta fita padrão é justificada pelo fato de a maioria dos microrganismos identificados na rotina dos laboratórios de análises clínicas possuem um ponto de corte para ceftriaxona mais alto (por exemplo, $S \leq 1$ µg/mL para as *Enterobacteriales*). É importante salientar que existem fitas de E-test disponíveis no mercado tendo 0,002 µg/mL como menor concentração, todavia seu uso na rotina dos laboratórios de análises clínicas não é comum, já que o custo para a manutenção de fitas de E-test com diferentes faixas de graduação para diagnóstico exclusivo de *N. gonorrhoeae* seria considerado uma dificuldade. Ainda assim, a fita de E-test padrão (0,016 - 256 µg/mL) é capaz de identificar todas as amostras sensíveis a este antimicrobiano, pois o ponto de corte para *N. gonorrhoeae* é $S \leq 0,125$ µg/mL, segundo o BrCAST e $S \leq 0,25$ segundo o CLSI.

Em 2010, Liao e colaboradores compararam as CMIs obtidas por E-test para ceftriaxona utilizando ágar base GC e ágar chocolate com as obtidas por ágar diluição. Eles concluíram que, apesar de todas as amostras serem sensíveis ao antimicrobiano, a CMI obtidas por E-test em base GC tende a ser mais baixa que na ágar diluição; em contraste, a CMI por E-test em ágar chocolate resulta em CMIs maiores que as observadas na ágar diluição (Liao *et al.*,

2010). Devido a unanimidade dos resultados para ceftriaxona neste estudo, não foi possível observar se o mesmo ocorre com as amostras de nossa coleção, já que todas apresentaram CMI $\leq 0,008 \mu\text{g/mL}$.

O cenário atual na resistência de *N. gonorrhoeae* à azitromicina é de um aumento no número de casos relatados em diversos lugares do mundo (Młynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2020; Day *et al.*, 2022). Em 2020, a pandemia de COVID-19 gerou impactos significativos no número de casos de gonorreia registrados e também no perfil de suscetibilidade dessas amostras aos antimicrobianos, tendo destaque para azitromicina, esta que foi amplamente utilizada como tentativa de tratamento para infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (Fuernkranz, Haller e Sary, 2021; Long e Gottlieb, 2022). No entanto, um estudo feito na Áustria comparou dados de pacientes que tiveram diagnóstico positivo para gonorreia obtidos em 2019 e 2020, levando em consideração o perfil de sensibilidade das amostras frente a ceftriaxona, cefixima, azitromicina e penicilina. O número de casos de gonorreia registrados caiu de 639 para 381 entre os dois anos citados, tendo uma redução mais significativa entre os meses de março e maio de 2020 durante o primeiro *lockdown* que ocorreu no país. Não houve relatos de amostras resistentes a ceftriaxona, todavia 2,3% das amostras isoladas em mulheres apresentaram suscetibilidade reduzida ao antimicrobiano, enquanto em homens este número foi 0,4% (CMI = 0,094 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$). Curiosamente, o número de amostras resistentes a cefixima e a azitromicina diminuiu entre 2019 e 2020, tendo uma redução de 4% para 0% e 19% para 7%, respectivamente. Em contraste, a taxa de resistência a penicilina aumentou de 9% para 20% (Fuernkranz, Haller e Sary, 2021). O efeito da pandemia de COVID-19 sob amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina no Brasil ainda não foi explorado na literatura. Ainda assim, é provável que a tendência seja um aumento na taxa de amostras resistentes isoladas, como o seguimento do fenômeno observado nos últimos anos pelo nosso grupo de pesquisa (Barros dos Santos, 2016; Costa-Lourenço *et al.*, 2017; Costa-Lourenço *et al.*, 2018). Neste cenário, faz-se urgente que sejam estabelecidos métodos capazes de diagnosticar a resistência a este antimicrobiano em laboratórios que seguem o BrCAST.

No que diz respeito aos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, ficou evidente a boa correlação entre o uso do ágar base GC e ágar chocolate para a realização do E-test para determinar a categoria de suscetibilidade das amostras. Ao comparar somente os resultados obtidos por E-test nos dois meios de cultura, todas as 49 amostras apresentaram acordo categórico, portanto o ágar chocolate foi capaz de diagnosticar se uma amostra é sensível ou resistente a azitromicina, assim como o ágar base GC. Ademais, o percentual de acordo

essencial também foi alto (96%), onde 47 amostras apresentaram até uma diluição de diferença entre os dois meios de cultura.

Comparadas com a técnica de referência (a ágar diluição), a técnica de E-test realizada em ágar chocolate teve a mesma taxa de erros muito graves (4%) de quando realizada ágar base GC. Segundo critérios estabelecidos para validação de testes de suscetibilidade, este valor está acima do que seria aceitável para uma coleção de 50 amostras (ausência de erros muito graves) (Inayath *et al.*, 2021, O número real de erros muito graves, especialmente em uma faixa próxima ao ponto de corte como ocorreram com as amostras 5026 e 5116, pode sofrer uma influência de variáveis intrínsecas à técnica como inóculo, preparação das diluições do antimicrobiano entre outras, mesmo considerando que variações de até uma diluição sejam consideradas normais. Assim, é importante que um maior número de amostras seja testado, e também que sejam realizadas repetições por grupos de trabalho independentes, a fim de investigar até que ponto o uso de gradiente em fita compromete a correta identificação da suscetibilidade tendo os dados de ágar diluição como referência. Contudo, considerando que a ágar diluição não faz parte da rotina dos laboratórios de análises clínicas e a utilização do E-test é uma possibilidade, os dados comparativos entre ambos os meios de cultura mostram que não haveria prejuízos em utilizar o ágar chocolate na avaliação da resistência à azitromicina em comparação com o que é obtido por E-test em ágar GC.

Assim como observado por Liao e colaboradores em 2010 para ceftriaxona, o presente estudo mostrou que a ágar diluição tende a apresentar valores mais altos de CMI quando comparada ao E-test realizado em ágar base GC para azitromicina (Liao *et al.*, 2010). Cerca de 45% das amostras apresentaram CMI maior na ágar diluição (n=22), 16% menor (n=8) e 39% tiveram o mesmo resultado (n=19). Já em relação ao ágar chocolate, 49% das amostras apresentaram valores maiores de CMI na ágar diluição (n=24), 26% menor (n=13) e 26% (n=13) tiveram o mesmo resultado. Em relação às amostras que não estavam em concordância categórica ao comparar o E-test com a diluição em ágar para azitromicina (5116 e 5026), a CMI obtida era muito próxima ao ponto de corte, sendo 2 µg/mL ($R > 1$ µg/mL).

É importante reforçar que, apesar de promissores, estes resultados devem ser encarados como sugestivos para estudos complementares dedicados a consolidar (ou não) o uso do ágar chocolate como meio de cultura para realização de E-test. De fato, este estudo demonstrou que o uso do ágar chocolate na rotina dos laboratórios de análises clínicas para determinar o fenótipo de resistência em amostras de *N. gonorrhoeae* é um caminho possível. No entanto, para se tornar realidade são necessários estudos adicionais e complementares, utilizando um número maior de amostras com CMIs diversas e meios de cultura de diferentes

fornecedores e lotes. Também, é importante que outros grupos de pesquisa participem da realização dos testes de suscetibilidade, a fim de avaliar se o fator humano pode influenciar nos resultados. Com isso, futuramente, poderemos, talvez, encontrar uma alternativa mais simples, econômica e prática para o diagnóstico de resistência deste microrganismo.

De fato, seria importante para o Brasil ter o diagnóstico viável em pequenos laboratórios em todos os pontos do país. A coleta e o envio da amostra para centros de referência, dada a fragilidade do microrganismo, não é uma realidade facilmente exequível. Neste contexto, exceto pelo que se consegue obter através de estudos acadêmicos, muito pouco se sabe sobre a suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* no Brasil. O atual documento com os pontos de corte para bactérias disponível no site do BrCAST não estabelece os critérios para a determinação de suscetibilidade em gonococos, como por exemplo técnica ou meio de cultura a ser utilizado. Dado que não mais é autorizado o uso do CLSI como referência para laboratórios de análises clínicas no país, é, portanto, premente, que o BrCAST se debruce sobre este tema.

7. CONCLUSÃO

O uso do ágar chocolate para determinar a suscetibilidade das amostras de *N. gonorrhoeae* a azitromicina e ceftriaxona através da técnica do E-test se mostrou promissor. A realização do E-test em base Agar GC na clínica é historicamente aceita, com base na literatura. Neste trabalho, tanto para azitromicina quanto para ceftriaxona, ao comparar os resultados desta metodologia já consolidada em ágar base GC com seu uso em ágar chocolate, todas as amostras foram classificadas na mesma categoria de suscetibilidade, e a grande maioria teve CMI's iguais ou com apenas uma diluição de diferença. Contudo, ainda não é possível avaliar se o ágar chocolate terá o mesmo desempenho em faixas mais altas de CMI para ceftriaxona, onde se posiciona seu ponto de corte para resistência, uma vez que ainda não há nenhuma com este perfil em nossa coleção.

Comparadas com a ágar diluição, o teste de suscetibilidade por E-test com azitromicina em ambos os meios levou a erro muito grave em 4% das amostras, as quais seriam erroneamente classificadas como sensíveis. Todas estas amostras apresentavam CMI's próximas ao ponto de corte. Este é um resultado que merece atenção e precisaria ser investigado considerando mais repetições e com coleções maiores de amostras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Barros dos Santos, K.T. (2016) Estudo da resistência à azitromicina em amostras de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas na cidade do Rio de Janeiro entre 2006 e 2015. Monografia (Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Belkacem, A., Jacquier, H., Goubard, A., Mougari, F., La Ruche, G., Patey, O., Micaëlo, M., Semaille, C., Cambau, E., e Bercot, B. (2016) Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of a zithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013-14. *J Antimicrob Chemother.* 71, 2471–2478.
- Bradford PA, Miller AA, O'Donnell J, Mueller JP. (2020): Zoliflodacin: An Oral Spiropyrimidinetrione Antibiotic for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*, Including Multi-Drug-Resistant Isolates. *ACS Infect Dis.* 2020; 6, 1332-1345.
- BrCAST (2021a): Obtido de: <http://brcast.org.br/missao-e-objetivo/>
- BrCAST (2021b) Obtido de: <http://brcast.org.br/documentos/>
- BrCAST (2022): Guia de leitura disco difusão. Obtido de: <http://brcast.org.br/documentos/>
- Cámara, J., Serra, J., Ayats, J., Bastida, T., Carnicer-Pont, D., Andreu, A., e Ardanuy, C. (2012) Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 67, 1858–1860.
- CDC (1983): Penicillin-resistant gonorrhea--North Carolina. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 3, 273-5.
- CDC (2012): Update to CDC's *Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010*: Oral Cephalosporins No Longer a Recommended Treatment for Gonococcal Infections. Obtido em 07 de setembro de 2021, de: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6131a3.htm>
- CDC (2014) Gonorrhea - CDC Fact Sheet. Obtido em 02 de agosto de 2021, de <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/stdfact-gonorrhea.htm>
- CDC (2018): Disk Diffusion Testing - Gonorrhea - STD Information from CDC - disponível em <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/diskdiff.htm>
- CDC (2019): Biggest Threats and Data. Obtido em 04 de agosto de 2021, de <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- CDC (2020): Update to CDC's Treatment Guidelines for Gonococcal Infection. Obtido em 03 de setembro de 2021, de <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6950a6.htm>
- CDC (2021): Gonorrhea – CDC Fact Sheet (Detailed Version). Obtido em 05 de agosto de 2021, de <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/stdfact-gonorrhea-detailed.htm>
- Chalkley, L.J., Janse van Rensburg, M.N., Matthee, P.C., Ison, C.A., e Botha, P.L. (1997) Plasmid analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates and dissemination of *tetM* genes in southern Africa 1993-1995. *J Antimicrob Chemother.* 40, 817–822.
- Chisholm SA, Dave J, Ison CA. (2010): High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 3812-6.
- CLSI (2021): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing
- CONITEC (2018) Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis (IST). Obtido de http://conitec.gov.br/imagens/Consultas/2018/Relatorio_PCDT_IST_CP34_2018.pdf
- Costa-Lourenço, A.P.R., Santos, K.T.B., Fracalanza, S.E.L., Moreira, B.M., e Bonelli, R.R. (2017) Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. *Braz J Microbiol.* 48, 617-628.
- Costa-Lourenço, A. P. R., Abrams, J. A., Barros dos Santos, K. T., Coelho-Souza, T., Moreira, B. M., Fracalanza, S. E. L., Bonelli, R. R. (2017b). Reduced susceptibility to cefixime but not ceftriaxone: an uncertain perspective for the treatment of gonorrhoea in Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49, 515–516.

- Costa-Lourenço, A.P.R., Abrams, A. J., Barros dos Santos, K.T., Argentino, I.C.V., Coelho-Souza, T., Caniné, M.C.A., Ferreira, A.L.P., Moreira, B.M., Fracalanza, S.E. L., Trees, D. L., e Bonelli, R.R. (2018) Phylogeny and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol.* 58, 157–163.
- Craig L, Pique ME, Tainer JA. (2004): Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 5, 363-78.
- Day MJ, Jacobsson S, Spiteri G, Kulishev C, Sajedi N, Woodford N, Blumel B, van der Werf MJ, Amato-Gauci AJ, Unemo M, Cole MJ; Euro-GASP network. (2022): Significant increase in azithromycin "resistance" and susceptibility to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in 26 European countries, 2019. *BMC Infect Dis.* 22, 1-524.
- Derbie, A., Mekonnen, D., Woldeamanuel, Y. *et al.* Azithromycin resistant gonococci: a literature review. (2020) *Antimicrob Resist Infect Control* 9, 138.
- Dietrich M, Bartfeld S, Munke R, Lange C, Ogilvie LA, Friedrich A, Meyer TF. (2011): Activation of NF- κ B by *Neisseria gonorrhoeae* is associated with microcolony formation and type IV pilus retraction. *Cell Microbiol.* 11:68-82.
- Edwards JL, Apicella MA. (2004): The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. *Clin Microbiol Rev.* 9:65-81, table of contents.
- EUCAST (2021): Clinical breakpoints - breakpoints and guidance. Obtido de: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Faruki H, Kohmescher RN, McKinney WP, Sparling PF. (1985): A community-based outbreak of infection with penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase (chromosomally mediated resistance). *N Engl J Med.* 607-11.
- Fuernkranz U, Haller M, Stary (2021): Influence of the COVID-19 pandemic on the epidemiology and resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Austria. *Sexually Transmitted Infections* 97, 151-152.
- Gill, M.J., Simjee, S., Al-Hattawi, K., Robertson, B.D., Easmon, C.S., e Ison, C.A. (1998) Gonococcal resistance to beta-lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB* locus. *Antimicrob agents Chemother.* 42, 2799-803.
- Grad YH, Kirkcaldy RD, Trees D, Dordel J, Harris SR, Goldstein E, Weinstock H, Parkhill J, Hana ge WP, Bentley S, Lipsitch M. (2014): Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime in the USA: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 14, 3; 220-6.
- Heumann, C. L., Quilter, L. A. S., Eastment, M. C., Heffron, R., e Hawes, S. E. (2017) Adverse Birth Outcomes and Maternal *Neisseria gonorrhoeae* Infection: a Population-Based Cohort Study in Washington State. *Sexually transmitted diseases*, 44(5), 266–271.
- Higashi DL, Lee SW, Snyder A, Weyand NJ, Bakke A, So M. (2007) Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment: microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection. *Infect Immun.* 75, 4743-53.
- Hill SA, Masters TL, Wachter J. Gonorrhea - an evolving disease of the new millennium. *Microb Cell.* 3, 371-389.
- Inayath, S. B., Broor, S., Gupta, R., Agarwal, P., Majumder, S., Anveshi, A. K., & Gaiind, R. (2021): Validation of Pefloxacin for detection of fluoroquinolone (FQ) resistance among *Salmonella* Typhi with special reference to GyrB mutations. *Journal of medical microbiology*, 70, 8
- Lee MH, Byun J, Jung M, Yang JJ, Park KH, Moon SY, Lee HJ, Lee MS. (2015): Disseminated Gonococcal Infection Presenting as Bacteremia and Liver Abscesses in a Healthy Adult. *Infect Chemother.* 47, 60-63.
- Lefebvre, B., Martin, I., Demczuk, W., Deshaies, L., Michaud, S., Labbé, A...Longtin, J. (2018). Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017. *Emerging Infectious Diseases.* 24, 381-383.
- Lenz Jonathan D., Dillard Joseph P. Pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* and the Host Defense in Ascending Infections of Human Fallopian Tube (2018) *Frontiers in Immunology*
- Lewis, D.A. (2010) The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sex Transm Infect.* 86, 415–421

- Liao CH, Lai CC, Hsu MS, Chu FY, Wu MY, Huang YT, Hsueh PR. (2010): 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. *Int J Antimicrob Agents*. 35, 5; 457-60.
- Liu G, Tang CM, Exley RM. (2015): Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology (Reading)* 161, 1297-1312.
- Liu H, Taylor TH Jr, Pettus K, Johnson S, Papp JR, Trees D. (2016): Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Resist Infect Control* 24, 5-46.
- Long B, Gottlieb M. (2022): Azithromycin for Treatment of COVID-19. *Am Fam Physician*. 1, 105 (3)
- LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <
<https://lpsn.dsmz.de/search?word=Neisseria> < Acesso em: 02 ago 2021
- Marangoni A, Ceccarani C, Camboni T, Consolandi C, Foschi C, Salvo M, Gaspari V, D'Antuono A, Belletti M, Re MC, Severgnini M. (2020): Pharyngeal microbiome alterations during *Neisseria gonorrhoeae* infection. *PLoS One*,
- Młynarczyk-Bonikowska, B., Kujawa, M., Malejczyk, M., Młynarczyk, G., e Majewski, S. (2016) Plasmid-mediated resistance to tetracyclines among *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Poland between 2012 and 2013. *Postepy Dermatol Alergol*. 33, 475–479.
- Michael J. Pamham, Vesna Erakovic Haber, Evangelos J. Giamarellos-Bourboulis, Gianpaolo Perletti, Geert M. Verleden, Robin Vos (2014) - Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 143, Issue 2, pp. 225-245.
- Ministério da Saúde (2017): Estudo revela resistência da bactéria que causa gonorreia. Obtido em 04/08/2021, disponível em: <https://aps.saude.gov.br/noticia/2455>
- Młynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. (2020): Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. *Med Microbiol Immunol* 209, 2. 95-108.
- Murray, P. R. Rosenthal, K. S., e Pfaller, M. A. (2009) *Microbiologia Médica*. In: *Neisseria e Bactérias relacionadas*. 6 ed. (Mosby Elsevier), pp. 289–298.
- Ng, L.K., e Martin, I.E. (2005) The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 16, 15–25.
- Ohnishi, M., Golparian, D., Shimuta, K., Saika, T., Hoshina, S., Iwasaku, K., Nakayama, S., Kitawaki, J., e Unemo, M. (2011a) Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 55, 3538–3545.
- Ohnishi, M., Saika, T., Hoshina, S., Iwasaku, K., Nakayama, S., Watanabe, H., e Kitawaki, J. (2011b): Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. *Emerg Infect Dis*. 17, 148–149.
- Osborne NG, Grubin L. (1979) Colonization of the pharynx with *Neisseria gonorrhoeae*: experience in a clinic for sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis*.;6, 253-6.
- Palmer, H. M., Mallinson, H., Wood, R. L., e Herring, A. J. (2003) Evaluation of the Specificities of Five DNA Amplification Methods for the Detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 835–837.
- Phillips I. (1976): Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *Lancet*. 25, 2 656-7.
- Quillin, S., Seifert, H. (2018): *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 16, 226–240
- Peter A. Rice (2005): Gonococcal Arthritis (Disseminated Gonococcal Infection), *Infectious Disease Clinics of North America*, Volume 19, Issue 4, 853-861.
- Shimuta, K., Watanabe, Y., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Kuroki, T., Unemo, M., e Ohnishi, M. (2015) Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. *BMC infect dis*. 15, 378.
- Simms AN, Jerse AE. (2006): In vivo selection for *Neisseria gonorrhoeae* opacity protein expression in the absence of human carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules. *Infect Immun*. 74, 2965-74.

- Song W, Ma L, Chen R, Stein DC. (2000): Role of lipooligosaccharide in Opa -independent invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *J Exp Med.*191, 949-60.
- Tomberg, J., Unemo, M., Ohnishi, M., Davies, C., & Nicholas, R. A. (2013). Identification of amino acids conferring high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins in the *penA* gene from *Neisseria gonorrhoeae* strain H041. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 3029–3036.
- Tavares, W. (2014) Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 3 ed. (Atheneu, São Paulo).
- Tone Tønjum, Jos van Putten, 179 - *Neisseria*, Editor(s): Jonathan Cohen, William G. Powderly, Steven. Opal, Infectious Diseases (Fourth Edition), Elsevier, 1553-1564.
- Uehara AA, Amorin EL, Ferreira Mde F, Andrade CF, Clementino MB, de Filippis I, Neves FP, Pinto T de C, Teixeira LM, Giambiagi-Demarval M, Fracalanza SE. (2011): Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4208-12.
- Unemo, M., Golparian, D., Syversen, G., Vestrheim, D.F., e Moi, H. (2010) Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Euro Surveill.* 15.
- Unemo M, Shafer WM. (2011): Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci.* 1230, 19-28.
- Unemo, Magnus, Golparian, D., Nicholas, R., Ohnishi, M., Gallay, A., e Sednaoui, P. (2012) High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 56, 1273–1280.
- Unemo M, Nicholas RA. (2012b) Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol.* 12, 1401-22.
- Unemo, Magnus. (2013) Laboratory diagnostic of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus.
- Unemo M. & Ison, C. Gonorrhoea. In *Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus* (2013), p 21–54. Geneva, World Health Organization (WHO), Switzerland.
- Unemo, Magnus, e Shafer, W.M. (2014) Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.* 27, 587–613.
- Unemo, Magnus, del Rio, C., e Shafer, W.M. (2016) Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: a major global public health problem in the 21st century. *Microbiol spectr.* 4. van Vliet SJ, Steeghs L, Bruijns SC, Vaezrad MM, Snijders Blok C, Arenas Busto JA, Deken M, van Putten JP, van Kooyk Y. (2009): Variation of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide directs dendritic cell-induced T helper responses. *PLoS Pathog.*, e1000625
- Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Watt SM. (1996): Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. *Mol Microbiol.* 941-50.
- Wang, B., Xu, J., Wang, C., Mi, Z., Pu, Y., Hui, M., Ling, T.K.W., e Chan, C.Y. (2006) Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Jiangsu Province, China, with a focus on fluoroquinolone resistance. *J Med Microbiol.* 55, 1251–1255.
- Wetzler LM, Blake MS, Barry K, Gotschlich EC. (1992a): Gonococcal porin vaccine evaluation: comparison of Por proteosomes, liposomes, and blebs isolated from *rmp* deletion mutants. *J Infect Dis.* 551-5.
- Wetzler LM, Barry K, Blake MS, Gotschlich EC. (1992b): Gonococcal lipooligosaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera. *Infect Immun.* 60, 39-43.
- Whiley DM, Jennison A, Pearson J, Lahra MM. (2018): Genetic characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to both ceftriaxone and azithromycin. *Lancet Infect Dis.* 717-718.
- WHO (2016) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Obtido de <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
- WHO (2016b): WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. Obtido de <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/gonorrhoea-treatment-guidelines/en/>
- WHO (2022): Multi-drug resistant gonorrhoea, disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/multi-drug-resistant-gonorrhoea> . Acesso em 04/10/2022

Wind CM, de Vries E, Schim van der Loeff MF, van Rooijen MS, van Dam AP, Demczuk WHB, Martin I, de Vries HJC. (2017): Decreased Azithromycin Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Patients Recently Treated with Azithromycin. *Clin Infect Dis.* 65, 37-45

Winn, W.Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., e Woods, G. (2008) Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. In: *Espécies de Neisseria e Moraxella catarrhalis*. 6 ed. (Guanabara Koogan), pp. 561–616.

Yuan Q, Li Y, Xiu L, Zhang C, Fu Y, Jiang C, Tang L, Peng J. (2019): Identification of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with combined resistance to both ceftriaxone and azithromycin, China, 2017-2018. *Emerg Microbes Infect.* 8, 1546-1549.

Zarantonelli, L., Borthagaray, G., Lee, E.H., Veal, W., e Shafer, W.M. (2001) Decreased susceptibility to azithromycin and erythromycin mediated by a novel mtr(R) promoter mutation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* 47, 651–654.

Zhao, S., Duncan, M., Tomberg, J., Davies, C., Unemo, M., e Nicholas, R.A. (2009) Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 3744–3751.

ANEXOS:

Anexo 1 – Perfil das amostras incluídas neste estudo. Traços indicam que determinadas amostras requerem sequenciamento para elucidar os mecanismos de resistência presentes ou ausentes.

Amostra	Ano	<i>penA</i>	23S rRNA	<i>mtrR</i>
4825	2006	XII	WT	Del A
4957	2006	XII	WT	Del A
5026	2006	V	WT	Del A
5116	2006	V	WT	WT
5852	2007	XII	WT	Del A
6206	2008	V	WT	Del A
6207	2008	VI	WT	Del A
6334	2008	XII	WT	Del A
7606	2009	V	C6211T - 4 Alelos	Del A
8840	2010	LXXIX	C6211T - 4 Alelos	G45D
9054	2010	XII	WT	Del A
9719	2011	XXXIV Mosaico	WT	Del A
10773	2013	LXII Mosaico	C6211T - 3 Alelos	WT
10775	2013	LXIII Mosaico	C6211T - 4 Alelos	WT
11009	2013	XXXIV Mosaico	WT	Del A
11133	2013	XIV	WT	Del A
11134	2013	XXXIV Mosaico	C6211T - 3 Alelos	Del A
11253	2014	V	WT	Del A
11550	2014	V	WT	Del A
11742	2015	XIV	C6211T - 4 Alelos	Não Identificado
11779	2015	XXXIV Mosaico	WT	Del A
11809	2015	II	WT	WT
11816	2015	II	WT	WT
11817	2015	II	WT	A39T
11880	2015	-	-	-
11977	2015	-	-	-
12342	2016	-	-	-
12413	2016	-	-	-
12416	2016	-	-	-
12600	2017	V	C2611T - 4	Del A
12642	2017	-	-	-
12643	2017	-	-	-
12644	2017	-	-	-
12822	2017	-	-	-
13128	2017	-	-	-
13133	2018	-	-	-
13206	2018	-	-	-
13286	2018	-	-	-
13340	2018	-	-	-
13370	2018	-	-	-

Amostra	Ano	<i>penA</i>	23S rRNA	<i>mtrR</i>
13568	2018	-	-	-
13666	2018	-	-	-
13843	2019	-	-	-
13853	2019	V	WT	Del A
13854	2019	-	-	-
13878	2019	-	-	-
13914	2019	-	-	-
13915	2019	-	-	-

Anexo 2 – Valores de CMI obtidos em estudos anteriores para ceftriaxona e azitromicina

Amostra	CMI ágar diluição anterior ($\mu\text{g/mL}$) (CRO)	CMI ágar diluição anterior ($\mu\text{g/mL}$) (AZM)
13915	$\leq 0,015$	0,5
13914	$\leq 0,015$	0,5
13878	$\leq 0,015$	>32
13854	$\leq 0,015$	0,5
13853	0,031	8
13843	$\leq 0,015$	8
13666	$\leq 0,015$	16
13568	0,031	16
13370	$\leq 0,015$	4
13340	0,031	8
13286	$\leq 0,015$	$\leq 0,061$
13206	$\leq 0,015$	0,125
13133	$\leq 0,015$	0,25
13128	$\leq 0,015$	0,5
12822	$\leq 0,015$	0,5
12644	0,031	0,25
12643	$\leq 0,015$	1
12642	$\leq 0,015$	0,125
12600	$\leq 0,015$	32
12416	$\leq 0,015$	0,5
12413	$\leq 0,015$	0,125
12342	$\leq 0,015$	8
11977	$\leq 0,015$	0,75
11880	$\leq 0,015$	8
11817	0,031	0,5
11816	$\leq 0,015$	0,125
11809	$\leq 0,015$	0,25
11742	0,008	4
11779	0,063	1
11550	0,008	8
11253	0,008	2
11134	0,063	16
11133	0,063	0,5
11009	0,063	0,5

Amostra	CMI ágar diluição anterior ($\mu\text{g/mL}$) (CRO)	CMI ágar diluição anterior ($\mu\text{g/mL}$) (AZM)
10775	0,002	8
10773	0,002	8
9054	0,032	0,5
9719	0,063	1
8840	0,004	4
7606	0,032	16
6334	0,032	2
6207	0,032	2
6206	0,064	4
5852	0,032	2
5116	0,015	2
5026	0,032	2
4957	0,032	2
4825	0,032	2