

Larissa Brasil Skaf

**Susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de
Neisseria gonorrhoeae isoladas no Rio de Janeiro entre
2014 e 2018**



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
DEZEMBRO 2019**

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 do professor Sergio Eduardo Longo Fracalanza.

Ficha Catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

S626s Skaf, Larissa Brasil
Susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018 / Larissa Brasil Skaf. -- Rio de Janeiro, 2019.
75 f.

Orientadora: Raquel Regina Bonelli.
Coorientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. *Neisseria gonorrhoeae*. 2. resistência. 3. azitromicina. 4. ceftriaxona. I. Bonelli, Raquel Regina, orient. II. Fracalanza, Sergio Eduardo Longo, 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.

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: **Larissa Brasil Skaf**
 DRE: 116028025

BANCA EXAMINADORA: Profa. Beatriz Meurer Moreira (Presidente)
 Profa. Raiane Cardoso Chamon
 MSc. Debora da Costa Morato Nery
 Profa. Márcia Giambiagi de Marval (Suplente)

Título da Monografia: **"Susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018"**

Local: Anfiteatro do Instituto de Microbiologia / CCS / UFRJ
 Data e hora de início: 04 de dezembro de 2019 às 09:00h

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 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 4 de dezembro de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>9,5</u>	<u>Beatriz Meurer Moreira</u> Profa. Beatriz Meurer Moreira
<u>10,0</u>	<u>Raiane Cardoso Chamon</u> Profa. Raiane Cardoso Chamon
<u>9,5</u>	<u>Debora da Costa Morato Nery</u> MSc. Debora da Costa Morato Nery
<u>10</u>	<u>Márcia Giambiagi de Marval</u> Profa. Márcia Giambiagi de Marval
Aluno:	<u>Larissa Brasil Skaf</u> Larissa Brasil Skaf
Orientador:	<u>Raquel Beatriz Pinelli</u> Profa. Raquel Beatriz Pinelli
Coorientador:	<u>Sérgio Eduardo Longo Fracalanzani</u> Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanzani
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Alcileia e Sergio, vocês são tudo para mim, sem o amor e o apoio incondicional de vocês eu não seria metade de quem eu sou hoje. Muito obrigada por todos os ensinamentos e puxões de orelha. Vocês são minha inspiração. Amo vocês!

A minha irmã maravilhosa, Yasmin, você sempre foi meu exemplo e eu não poderia ter alguém melhor para me espelhar. Você é incrível em diversos sentidos e cumpre bem seu papel de irmã mais velha, sempre me ensinando muito (menos matemática), me dando bronca, me fazendo rir e me ensinando a amar alguém tão diferente de mim.

À Raquel e Sergio, meus orientadores, vocês me ensinaram tanto nesses três anos que fiquei no LImm, me ajudaram a evoluir como profissional e como pessoa, a ver o mundo da microbiologia por diferentes ângulos e a amar o que eu faço. Observar vocês ensinando aquilo que sabem tão bem me inspira e espero um dia ser como vocês. Muito obrigada por me darem a oportunidade de poder compartilhar dos seus conhecimentos.

À Késia, minha coorientadora/professora na bancada/Rainha das gonos, tudo que eu sei hoje sobre trabalho de bancada foi você que me ensinou. Obrigada pela paciência e por me fazer gostar tanto das goninhos, apesar delas serem tão temperamentais. Aprender com você foi incrível, ver todo o cuidado que você tem ao fazer os experimentos me ensinou muito. E seu pão de mel é maravilhoso, não podia faltar essa informação aqui.

Ao Marquinho, uma pessoa única no LImm, foi o primeiro a me apresentar o laboratório, já me fazendo diversas perguntas e me ensinando muito. Seu bom humor e suas histórias são ótimas para suavizar a rotina no laboratório, por vezes um pouco estressante. Sem você esse projeto não teria acontecido afinal você é quem busca as gonos e quem sempre me ajuda quando algo dá errado nos experimentos. Já dizia Marquinho: “Tá no nome, é experimento. Vai dar errado”. Muito obrigada por tudo e por ser essa pessoa incrível.

Ao atual *team* gono, Rapha, Ingrid (uma vez no *team* gono vai ser pra sempre) e Adriane, vocês me ajudaram muito! Seja na bancada ou me ensinando coisas novas, ou até mesmo me ensinando a ensinar. Vocês são demais! Muito obrigada por tudo. Esse TCC também é de vocês.

A todos do LImm, cada um de vocês contribuiu de alguma forma para esse projeto, sempre me ensinando e me ajudando. Vocês são incríveis, sempre deixando o ambiente descontraído e tornando a rotina mais fácil. Obrigada a todos!

Aos melhores amigos que essa faculdade incrível poderia me dar: Bia, Ju, Lê, Mari, Matheus e Vitinho (coloquei em ordem alfabética pra não ter briga). Com certeza a faculdade seria muito diferente sem cada um de vocês. Parece até que o destino juntou a gente de propósito só para contar cada história maravilhosa que a gente tem (TCII, qualquer aula prática, as saídas pra jogar RPG e comer churrasco, as apresentações em grupo, as partidas de UNO ou qualquer outro jogo). Muito obrigada por compartilharem esses quatro anos comigo. Foi incrível! Amo vocês, chaperonas.

À minha prima Vanessa, você com certeza é uma inspiração para mim. Obrigada pelas dicas sobre a vida, por ter cuidado sempre de mim e por ser desse jeitinho que você é. Você sempre me ensina muito. Te amo!

À Bárbara e Juliana, minhas melhores amigas. Muito obrigada por sempre estarem presentes, sempre estando lá quando eu preciso. Vocês tornaram esses quatro anos de faculdade mais agradáveis. Vocês sempre me ensinam muito sobre a vida. Quero vocês sempre por perto. Amo vocês.

À banca avaliadora deste projeto, Bia, Raiane, Debora e Marcia, muito obrigada por reservarem um tempo para este estudo e por compartilharem seus conhecimentos para torná-lo melhor.

Ao laboratório DASA, por ceder as amostras incluídas neste estudo.

À FAPERJ, CAPES, UFRJ e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, três instituições importantíssimas para a ciência brasileira e, sem as quais, este projeto não existiria.

RESUMO

Larissa Brasil Skaf

Susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018

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 gonorreia, uma infecção sexualmente transmissível. Este microrganismo é um problema de saúde global devido à sua habilidade de adquirir e desenvolver mecanismos de resistência e pela sua disseminação mundial devido a falhas no sistema de saúde, sendo a segunda IST bacteriana mais comum no mundo segundo a OMS. A ceftriaxona e azitromicina são, atualmente, as últimas drogas validadas para tratamento sintomático de gonorreia. Apesar de outras classes de antimicrobianos, como carbapenemas e aminoglicosídeos terem sido utilizadas com sucesso para tratar esta infecção, elas ainda não foram validadas para o tratamento sintomático. Desde setembro de 2017 o Brasil recomenda a prescrição de ceftriaxona (500 mg) combinado com azitromicina (1 g), ou azitromicina (2 g, para indivíduos alérgicos à betalactâmicos) para o tratamento de gonorreia. De fato, um estudo feito com 93 amostras obtidas de laboratórios clínicos entre março de 2014 e outubro de 2017 no Rio de Janeiro mostrou 98%, 78% e 72% de amostras não-susceptíveis a penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina, respectivamente; 25% (n = 23) dos isolados não foram susceptíveis a azitromicina (CMI ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$) com uma tendência no aumento deste percentual ao longo dos últimos quatro anos de estudo. O objetivo deste estudo foi realizar uma vigilância epidemiológica sobre o perfil de susceptibilidade de amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas em laboratórios clínicos no Rio de Janeiro e comparar os resultados com estudos anteriores. As 117 amostras de *N. gonorrhoeae* recebidas pelo nosso grupo de pesquisa entre 2014 e 2018 foram submetidas a duas metodologias diferentes. O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi feita com discos contendo azitromicina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacina, espectinomicina, gentamicina, penicilina e tetraciclina. As CMIs foram determinadas por ágar diluição para azitromicina, cefixime, ceftriaxona, espectinomicina e gentamicina. Como resultado, altos percentuais de resistência a ciprofloxacina, penicilina e tetraciclina foram observadas ao longo do período estudado, todas acima de 75%. Do mesmo modo, a resistência a azitromicina foi observada em 24% (n = 29) da coleção, mantendo-se alta. Todas as amostras foram susceptíveis a ceftriaxona, cefixima e espectinomicina. Uma amostra foi resistente a cefixima, segundo o ponto de corte do EUCAST (R > 0,125 $\mu\text{g/mL}$). Uma vez que CLSI, EUCAST e BrCAST não possuem ponto de corte para gentamicina, o ponto de corte utilizado por Brown (2010) foi considerado, sugerindo muitas amostras (76%; n = 89) com resistência intermediária (CMI 8-16 $\mu\text{g/mL}$) a este antimicrobiano. Este trabalho contribui para a compreensão do perfil contemporâneo de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *N. gonorrhoeae* circulantes no Rio de Janeiro e estabelece uma referência para avaliação da evolução desta característica nos próximos anos.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*, resistência, azitromicina, ceftriaxona.

ABSTRACT

Larissa Brasil Skaf

Susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018

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 etiological agent of gonorrhea, a sexually transmitted infection. This microorganism is a global health concern because of its ability to acquire and develop antimicrobial resistance mechanisms and its worldwide spread due to health system failures, being the second most common bacterial STI in the world according to WHO. Ceftriaxone and azithromycin are considered the last validated drugs for the treatment of gonorrhea. Although other classes of antimicrobial agents, such as carbapenems and aminoglycosides, have been successfully used to treat this disease, they have not been validated for syndromic treatment yet. Since September 2017, Brazil recommends the prescription of ceftriaxone (500 mg) combined with azithromycin (1 g), or azithromycin (2 g, to beta-lactams allergic individuals) to gonorrhea treatment. Indeed, a study performed with 93 isolates obtained between March 2014 and October 2017 from clinical laboratories in Rio de Janeiro showed 98%, 78%, and 72% non-susceptibility to penicillin, tetracycline, and ciprofloxacin, respectively. Regarding azithromycin, 25% of the isolates were non-susceptible (MIC ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$), with a tendency of rising rates along the four years of the study. The aim of this work was to perform a susceptibility surveillance in isolates of *N. gonorrhoeae* obtained from clinical laboratories in Rio de Janeiro and compare the results with previous studies. The 117 *N. gonorrhoeae* isolates received by our research laboratory between 2014 and 2018 were submitted to two different methodologies. Antimicrobial susceptibility testing was performed with discs containing azithromycin, cefixime, ceftriaxone, ciprofloxacin, spectinomycin, gentamicin, penicillin and tetracycline. Azithromycin, cefixime, ceftriaxone, spectinomycin and gentamicin minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined by agar dilution. High resistance rates to ciprofloxacin, penicillin and tetracycline were observed throughout the study period, with resistance rates over 75%. Likewise, resistance to azithromycin was detected in 24% (n = 29) of the collection, keeping at high rates. All isolates were susceptible to ceftriaxone, cefixime and spectinomycin. One isolate was resistant to cefixime, according to the EUCAST breakpoint (R > 0,125 $\mu\text{g/mL}$). Since CLSI, EUCAST and BrCAST do not have a breakpoint for gentamicin, Brown's (2010) breakpoint was used, suggesting a big number of isolates (76%; n = 89) with intermediary resistance phenotype (CMI 8-16 $\mu\text{g/mL}$) to this antimicrobial agent. This work has contributed to the comprehension about the contemporaneous susceptibility profile of *N. gonorrhoeae* isolates obtained in Rio de Janeiro and set a reference for the evaluation of the evolution of this characteristic over the next years.

Key-words: *Neisseria gonorrhoeae*, resistance, azithromycin, ceftriaxone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da resistência a antimicrobianos em <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5
Figura 2 – Diagrama de dispersão da concentração mínima inibitória (CMI) e diâmetro de halo de 117 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> em relação à azitromicina.	38
Figura 3 – Diagrama de dispersão da concentração mínima inibitória (CMI) e diâmetro de halo de 117 isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> em relação à gentamicina.....	39
Figura 4 – Distribuição das CMIs de gentamicina de 2.767 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> de diferentes fontes de isolamento, regiões geográficas e período de tempo disponíveis no EUCAST (A) e de CMIs de gentamicina das 117 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018 (B) (EUCAST, 2019c).....	40
Figura 5 – Distribuição das CMIs de azitromicina de 3.727 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> de diferentes fontes de isolamento, regiões geográficas e período de tempo disponíveis no EUCAST (A) e de CMIs de azitromicina das 117 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018 (B) (EUCAST, 2019c).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontos de corte para disco difusão adotados neste estudo.....	33
Tabela 2 – Especificações para a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por ágar diluição	33
Tabela 3 – Pontos de corte para concentração mínima inibitória adotados neste estudo	33
Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade das 117 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> por disco difusão segundo critérios do CLSI 2019	35
Tabela 5 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> determinados por ágar diluição em relação à azitromicina	37
Tabela 6 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> determinados por ágar diluição em relação à ceftriaxona	41
Tabela 7 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> determinados por ágar diluição em relação à cefixima	42
Tabela 8 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> determinados por ágar diluição em relação à espectinomicina	42
Tabela 9 – Descrição das amostras de <i>N. gonorrhoeae</i> resistentes a algum dos antimicrobianos possivelmente utilizados para o tratamento de gonorreia utilizando como referências pontos de corte do BrCAST, EUCAST e CLSI (2019)	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	<i>Centers for Disease Control and prevention</i>
CEE	Cefalosporina de Espectro Estendido
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CO ₂	Dióxido de carbono
DHFR	Dihidrifolato Redutase
DHPS	Dihidropteriatase Sintetase
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GISP	<i>Gonococcal Isolate Surveillance Project</i>
GRASP	<i>Gonococcal Resistance to Antimicrobials Programme</i>
IGD	Infecção Gonocócica Disseminada
IM	Via Intramuscular
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
IV	Via Intravenosa
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight</i>
MHC	Mueller Hinton Caldo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
PM	Peso Molecular
PPNG	<i>Penicillinase-Producing Neisseria gonorrhoeae</i>
QRDR	<i>Quinolone Resistance-Determining Region</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
TRNG	<i>Tetracycline-Resistant Neisseria gonorrhoeae</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
VO	Via Oral

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
ÍNDICE.....	xi
1. Introdução	1
1.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1
1.2 Doença gonocócica	2
1.3 Resistência a antimicrobianos em <i>N. gonorrhoeae</i>	3
1.3.1 Sulfonamidas	5
1.3.2 Penicilina	6
1.3.3 Tetraciclina	9
1.3.4 Ciprofloxacina	10
1.4 Fronteiras no tratamento de gonorreia	12
1.4.1 Azitromicina	12
1.4.2 Ceftriaxona.....	15
1.5 Alternativas para o tratamento	17
1.5.1 Espectinomicina.....	18
1.5.2 Gentamicina.....	20
1.5.3 Cefixima.....	22
1.6 Características gerais das agências CLSI, EUCAST e BrCAST	24
1.6.1 CLSI.....	24
1.6.2 EUCAST.....	24
1.6.3 BrCAST	25
2. Justificativa	26
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. Metodologia	28
4.1 Identificação e estoque das amostras	28
4.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por disco difusão.....	29
4.3 Determinação da concentração mínima inibitória a antimicrobianos.....	30
4.3.1 Preparo das placas com antimicrobianos	34
5. Resultados.....	35
6. Discussão	45

7. Conclusão.....	52
8. Referências Bibliográficas.....	53
9. Anexos	61

1. Introdução

1.1 *Neisseria gonorrhoeae*

O gênero *Neisseria*, que pertence à família *Neisseriaceae*, abriga 32 espécies. A maioria não é patogênica ao ser humano e algumas podem apresentar-se como comensais no trato respiratório superior, colonizando mucosas da orofaringe e nasofaringe, e eventualmente a mucosa anogenital sem causar danos. As espécies *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* são destaques por serem patogênicas causando gonorreia e meningite, respectivamente (Meyer, 1999; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009; Unemo, 2013; Euzéby, 2019).

N. gonorrhoeae, também chamada gonococo, é uma bactéria gram-negativa, em forma de cocos usualmente dispostos em pares (diplococos) medindo entre 0,6 e 10 µm de diâmetro, não esporula e não possui flagelos, apresentando motilidade devido à presença de pili (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009).

Diferente das outras espécies de *Neisseria*, que possuem o metabolismo exclusivamente aeróbio, o gonococo também consegue se desenvolver em anaerobiose. Isso se dá devido à produção constitutiva da enzima nitrito redutase pela célula, que utiliza o nitrito como aceptor final de elétrons para realizar a respiração anaeróbia quando não há oxigênio no meio (Knapp e Clark, 1984). Na análise bioquímica, testes de catalase e oxidase são utilizados na diferenciação do gênero *Neisseria*, sendo todas as espécies do gênero produtoras de oxidase e a maioria de catalase. O gonococo é positivo para ambos os testes. A produção de ácido a partir da oxidação da glicose, mas não de lactose, maltose ou sacarose, é uma característica utilizada na diferenciação do gonococo frente a outras espécies de *Neisseria*. *N. gonorrhoeae* é um microrganismo fastidioso que exige para seu crescimento meios complexos como ágar chocolate, sendo essencial a presença do aminoácido cisteína e de uma fonte de energia como glicose, piruvato ou lactato, além de uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e controle sobre a umidade. Gonococos são sensíveis a baixa umidade e sua temperatura ideal de crescimento é de 35°C a 37°C (Ng e Martin, 2005; Unemo, 2013).

O ser humano é o único hospedeiro natural para *N. gonorrhoeae* (Ohnishi *et al.*, 2010). Este microrganismo infecta células epiteliais presentes nas mucosas, principalmente a do trato

urogenital, e, através delas, alcança o espaço subepitelial estabelecendo a infecção. O lipooligossacarídeo presente na membrana externa dessa bactéria auxilia não somente na adesão e invasão do epitélio, mas também estimula a liberação do fator de necrose tumoral – α , citocina pró-inflamatória responsável pelos sintomas relacionados à infecção pelo gonococo. Sua habilidade de se desenvolver em anaerobiose permite a colonização em sítio onde não há a presença de oxigênio, como endocérvice, reto, faringe e trato genital (Winn *et al.*, 2008; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009; Edwards e Butler, 2011; Mubaiwa *et al.*, 2017).

1.2 Doença gonocócica

N. gonorrhoeae é o agente etiológico da infecção sexualmente transmissível (IST) conhecida como gonorreia (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009). Sua transmissão é feita pela via sexual, seja pela mucosa uretral, anal ou oral, quando uma pessoa infectada tem relação sexual desprotegida com outra pessoa. A transmissão também pode ser feita de forma vertical, onde a gestante com gonorreia transmite o microrganismo para o neonato durante sua passagem pelo canal vaginal (CDC, 2014).

A infecção em homens e mulheres se manifesta de formas diferentes; aproximadamente 50% dos casos de gonorreia em mulheres são assintomáticos, enquanto em homens esse percentual diminui para 10%. A infecção não tratada pode levar à infecção gonocócica disseminada (IGD), assim como a complicações específicas em cada gênero. A IGD é considerada rara, uma vez que afeta de 0,5 a 3% dos indivíduos infectados. Este quadro ocorre quando o gonococo ganha a corrente sanguínea e é caracterizado por febre baixa, lesões cutâneas hemorrágicas e poliartralgia, podendo culminar em endocardite e artrite infecciosa (Winn *et al.*, 2008; Unemo, del Rio e Shafer, 2016).

O sítio primário da infecção gonocócica em mulheres é o endocérvice (colo uterino) o que leva à cervicite onde os sintomas, quando presentes, incluem disúria, dor abdominal, sangramento anormal ou intermenstrual e secreção cervicovaginal. Caso a infecção não seja tratada o microrganismo pode ascender ao trato geniturinário superior levando a complicações como doença inflamatória pélvica, salpingite (infecção das tubas uterinas/Trompas de Falópio), abscessos tubovarianos, gravidez ectópica e infertilidade. Uma vez que a maior parte das mulheres apresenta infecção assintomática é natural que estas não sejam tratadas. Isso leva a um maior percentual de doenças disseminadas, como a sepse e infecções de pele e articulações, e complicações neste grupo de pacientes. Os sintomas da gonorreia não

complicada em mulheres frequentemente são semelhantes a quadros clínicos de cistite e infecções vaginais por *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*, o que dificulta o diagnóstico. Em gestantes a doença gonocócica está associada a complicações como parto prematuro, abortamento espontâneo e morte do neonato (Winn *et al.*, 2008; Unemo, 2013; Unemo, del Rio e Shafer, 2016).

Em homens o sítio primário da infecção é a uretra, onde após o período de incubação da bactéria (2 a 5 dias) há a produção de corrimento purulento, manifestação clínica presente na maioria dos casos de uretrite causada por *N. gonorrhoeae*. Além disso, a disúria é um sintoma presente no quadro de infecção gonocócica. Complicações em homens são mais difíceis de ocorrer, mas quando presentes se manifestam na forma de epididimite, prostatite, abscesso periuretral, vesiculite seminal (Winn *et al.*, 2008; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009; Unemo, 2013).

Os sítios extragenitais onde pode haver infecção gonocócica incluem a conjuntiva, o reto e a faringe. A infecção gonocócica na faringe, em geral, é assintomática e transmitida via sexual, porém, também pode estar presente em neonatos sendo a transmissão da bactéria feita durante o parto. A infecção da conjuntiva é comumente observada em neonatos que passaram pelo canal vaginal infectado sendo estabelecida a oftalmia neonatal. A infecção neste sítio também pode ser estabelecida por contato com secreções genitais e pela autoinoculação por laboratoristas que não tomem os devidos cuidados durante a manipulação de amostras de *N. gonorrhoeae*. Os sintomas nesses casos incluem celulite periorbitária, secreção purulenta e eritema e edema das pálpebras, podendo resultar em cegueira caso não seja tratada (Winn *et al.*, 2008). A infecção no reto normalmente está presente em homens que fazem sexo com homens em um quadro assintomático, mas pode estar presente nos dois gêneros (Unemo e Shafer, 2014).

1.3 Resistência a antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*

A gonorreia é uma das ISTs mais frequentes em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve *N. gonorrhoeae* como um microrganismo que necessita de ação imediata para controle da disseminação da infecção, em parte por causa do risco da gonorreia tornar-se intratável, visto que essa bactéria tem desenvolvido resistência contra todos os antimicrobianos utilizados na terapêutica, mas também pelo risco de coinfeção com outras ISTs, tal como a causada por *Chlamydia trachomatis* (WHO, 2016a). Além disso,

N. gonorrhoeae é classificada como um microrganismo de prioridade 2 (alta) em relação a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, uma vez que já foram identificadas cepas resistentes à cefalosporinas de terceira geração e às fluoroquinolonas (WHO, 2016b). Ainda, no que diz respeito ao nível de preocupação com a saúde humana, *N. gonorrhoeae* é classificada pelo CDC como uma ameaça urgente em relação à resistência a antimicrobianos nos Estados Unidos da América (CDC, 2019b).

Até o presente momento não há vacinas contra *N. gonorrhoeae*. Os principais motivos estão relacionados ao fato de a infecção gonocócica não conferir imunidade protetora, sendo difícil a determinação de um estado de imunidade; à alta variabilidade antigênica de moléculas de superfície do gonococo, que ocorre não somente entre diferentes cepas, mas também na mesma cepa ao longo do tempo; e ao fato de este microrganismo possuir o ser humano como único hospedeiro, o que prejudica o desenvolvimento de um modelo animal que reproduza exatamente a infecção que ocorre em humanos. Entretanto, nas duas últimas décadas tem sido utilizado um modelo de infecção gonocócica uretral em camundongo fêmea tratada com estradiol, que replicam a infecção vaginal e tem ajudado a entender a infecção gonocócica do ponto de vista imunológico (Russel, Jerse e Gray-Owen, 2019). Na ausência de uma vacina contra o gonococo a única forma de combater a infecção causada por esse microrganismo é a antibioticoterapia, que idealmente deve ser eficaz e acessível. O tratamento da gonorreia em geral é realizado empiricamente, sem a realização de cultura, isolamento do microrganismo e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Neste caso, a terapia é prescrita com base em recomendações dadas por órgão oficiais que definem diretrizes guiadas por evidências epidemiológicas (Unemo, 2015). No caso do Brasil esta recomendação é feita pelo Ministério da Saúde (Costa-Lourenço *et al.*, 2017b; CONITEC, 2018).

Historicamente, vários antimicrobianos já foram preconizados para o tratamento da gonorreia e deixaram de ser utilizados devido ao aparecimento de amostras resistentes a eles. Na figura 1 estão descritos, em uma perspectiva histórica, cada um dos antimicrobianos, os mecanismos de resistência detectados em *N. gonorrhoeae* para a respectiva droga e o momento em que começaram e deixaram de ser utilizados para o tratamento da gonorreia. Em seguida será abordado detalhadamente cada um destes antimicrobianos, sendo feita a seguinte divisão em relação aos antimicrobianos: aqueles que já foram em algum momento utilizados para tratar a gonorreia mas que não são mais preconizados (sulfonamidas, penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina); os que fazem parte da atual recomendação de tratamento no Brasil e em diversos países do mundo (azitromicina e ceftriaxona); e aqueles que já foram utilizados para este fim ao redor do mundo, mas nunca foram amplamente

utilizados no Brasil e que podem vir a fazer parte de futuras recomendações de tratamento (espectinomicina, gentamicina e cefixima).

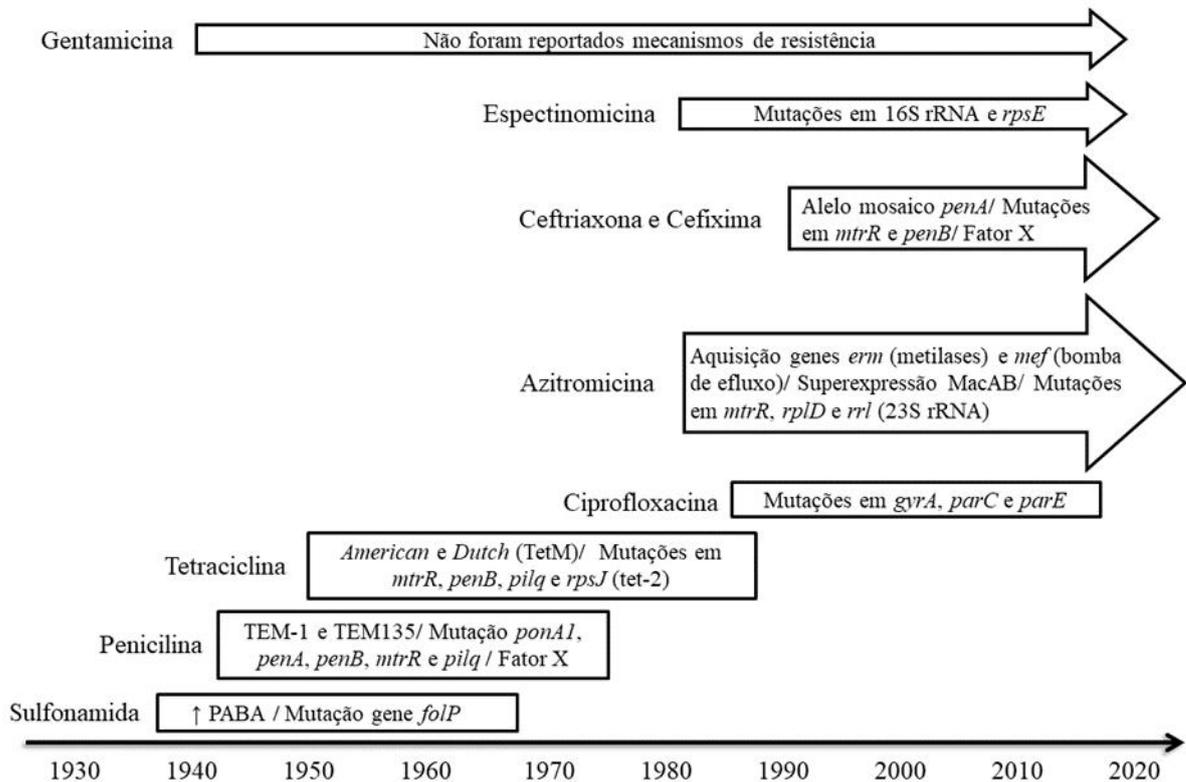


Figura 1 – Evolução da resistência a antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae*. Os quadrados e setas representam por quanto tempo cada antimicrobiano foi ou ainda está sendo utilizado. Estes marcam o ano de introdução para o tratamento de gonorreia e o ano em que deixaram de ser recomendados para tal. Dentro de cada uma das formas estão especificados os mecanismos de resistência associados a cada antimicrobiano.

1.3.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas atuam por interferir na via de síntese de ácidos nucleicos. Através da metabolização de derivados do ácido fólico por diferentes sintetases e redutases é gerado o ácido tetraidrofólico, cofator essencial na síntese de bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas). As sulfonamidas são análogas de um dos substratos dessa via, o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), impedindo que ele se transforme em ácido dihidrofólico por competir pelo sítio ativo da enzima dihidropteriatase sintetase (DHPS). A ação das sulfas é potencializada pela combinação com o trimetoprim, uma vez que ele atua na mesma via. O trimetoprim é um análogo do ácido dihidrofólico; assim, competindo pelo sítio ativo da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), ele inibe a conversão do ácido dihidrofólico em ácido tetraidrofólico. A ação desses antimicrobianos é primariamente bacterioestática, porém, sem a produção de bases nitrogenadas não há a multiplicação da célula nem síntese de proteínas,

tendo por fim um efeito bactericida (Tavares, 2014; Wüthrich *et al.*, 2019). Ainda, a DHFR de *N. gonorrhoeae* não possui uma boa afinidade pelo trimetoprim, o que significa dizer que o gonococo não é particularmente sensível a esse antimicrobiano. Entretanto, o sinergismo observado entre sulfametoxazol, uma sulfonamida, com o trimetoprim deve-se ao fato de que o sulfametoxazol diminui a concentração do ácido dihidrofólico, o que torna o trimetoprim um melhor competidor pelo sítio ativo da DHFR (Johnson e Morse, 1988).

A classe das sulfonamidas foi a primeira a ser utilizada contra *N. gonorrhoeae*. A descoberta feita por Gerhard Domagk em 1935 possibilitou o tratamento da gonorreia já em 1937 (Kampmeier, 1983). Entretanto, por volta de 1944 já eram observadas amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes a esse antimicrobiano, e, até o final da mesma década, 90% dos isolados testados apresentavam resistência clínica a sulfas. Na década de 60 foi proposto o uso combinado de sulfametoxazol com trimetoprim para tratamento de gonorreia não complicada, tendo a desvantagem para o paciente de ser administrada múltiplas doses de altas concentrações. Contudo, esse tratamento foi utilizado com sucesso até a década de 70 (Lewis, 2010; Costa-Lourenço *et al.*, 2017a).

A resistência a sulfas no gonococo pode ocorrer por dois mecanismos distintos. Um deles se dá por meio do aumento da síntese do PABA, o que resulta na atenuação da ação do antimicrobiano, uma vez que há uma maior concentração de ácido *p*-aminobenzóico para competir pelo sítio ativo da DHPS. O outro mecanismo se dá por mutações que ocorrem no gene *folP*, que codifica a DHPS, diminuindo sua afinidade pelas sulfonamidas (Lewis, 2010; Unemo, del Rio e Shafer, 2016; Costa-Lourenço *et al.*, 2017b).

1.3.2 Penicilina

A penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928, pertence à classe dos betalactâmicos e atua inibindo a reação final da síntese de peptideoglicano, maior responsável pela rigidez da parede celular bacteriana, atuando na transpeptidação. A penicilina liga-se a proteínas que ligam a penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin Binding Proteins*), as quais possuem atividade como transpeptidases e transglicosidases, tendo fundamental participação na síntese e incorporação de peptideoglicano na parede celular. Ao se ligar com as PBPs a penicilina inibe sua ação e o peptideoglicano formado apresenta falhas, o que leva a célula à lise osmótica (Tavares, 2014).

A penicilina foi utilizada contra o gonococo pela primeira vez em 1930 para tratar uma oftalmia gonocócica neonatal (Wainwright e Swan, 1986) e em 1943 para tratar uretrite

gonocócica (Van Slyke, Arnold e Buchholtz, 1943). Inicialmente esse antimicrobiano era a terapia recomendada apenas em casos de falha terapêutica com sulfonamidas, porém, conforme a susceptibilidade a sulfonamidas foi diminuindo, a penicilina tornou-se o tratamento de escolha para infecções gonocócicas (Lewis, 2010).

Assim como ocorreu com as sulfonamidas, a penicilina mostrou-se eficiente contra o gonococo quando começou a ser utilizada e pouco tempo depois cepas com susceptibilidade reduzida começaram a ser identificadas. Em 1944 eram utilizadas para tratar infecções gonocócicas 100.000 unidades de penicilina G, ao passo que em 1972 eram necessárias 4.800.000 unidades. No primeiro caso 95% dos isolados apresentavam concentração mínima inibitória (CMI) $\leq 0,015 \mu\text{g/mL}$, enquanto no segundo, 95% possuíam CMI $\leq 0,9 \mu\text{g/mL}$ (Johnson e Morse, 1988). Em 1975, essa diminuição gradual da susceptibilidade foi associada ao efeito aditivo de mutações em diferentes genes, como o *penA* e *penB*, responsáveis por codificar, respectivamente, a PBP2 e a porina B (Sparling, Sarubbi e Blackman, 1975). Em 1976 foram reportadas falhas terapêuticas nos Estados Unidos (EUA) e outros países quando utilizada penicilina para tratar gonorreia não complicada (Unemo e Shafer, 2014).

Hoje sabe-se que mecanismos moleculares envolvendo a resistência à penicilina são tanto cromossomais quanto mediados por plasmídeos. *N. gonorrhoeae* que apresentam mecanismos de resistência mediados por plasmídeo são denominadas *N. gonorrhoeae* produtora de penicilinasas (PPNG, do inglês *penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae*). Essas amostras possuem plasmídeos que carregam os genes *bla_{TEM-1}* ou *bla_{TEM-135}*, que codificam as enzimas β -lactamases do tipo TEM-1 e TEM-135, respectivamente. Ambas as enzimas hidrolisam o anel betalactâmico tornando a penicilina inativa (Unemo, del Rio e Shafer, 2016). Os plasmídeos carreadores desses genes são nomeados de acordo com sua origem epidemiológica; tratam-se de plasmídeos geneticamente relacionados que possuem sítios de inserção e deleção diferentes, além dos tamanhos serem distintos. Os plasmídeos carreadores de penicilinasas mais frequentemente descritos em *N. gonorrhoeae* são conhecidos como: Ásia, África e Rio/Toronto; no entanto outros plasmídeos (Nimes, New Zealand, Johannesburg, e Australian) já foram descritos no gonococo carregando β -lactamases TEM (Costa-Lourenço, 2017).

Já os mecanismos de resistência cromossomais estão relacionados a mudanças nas PBPs e/ou na permeabilidade da membrana externa (Lewis, 2010). Mutações nos genes *ponA1* e *penA* que codificam, respectivamente, a PBP1 e PBP2, levam a modificações nas proteínas que afetam a ligação de betalactâmicos, tal como a penicilina, impedindo a ação do antimicrobiano (Goire *et al.*, 2014). No gene *ponA1* pode ocorrer uma mutação pontual

denominada *ponA1*, a qual resulta em uma substituição de T para C no par de base 126 levando à substituição do aminoácido leucina por prolina na posição 421 (Leu421Pro) na proteína, o que eleva a CMI de quatro a oito vezes (Ropp *et al.*, 2002; Lewis, 2010). Já no gene *penA* pode haver a inserção de um aspartato após a posição 345, além de substituições na porção c-terminal da PBP2 que alteram sua estrutura e, conseqüentemente, afetam a ligação do antimicrobiano (Fedarovich *et al.*, 2014).

Muitos antimicrobianos entram na célula bacteriana por meio da porina B, localizada na membrana externa (Goire *et al.*, 2014). Essa proteína, conhecida como porB1b, é codificada pelo gene *porB* e mutações nesse gene são conhecidas como *penB* (mutação no hipotético loop 3 da porina B) (Gill *et al.*, 1998; Olesky, Hobbs e Nicholas, 2002). Essas mutações levam a uma substituição de glicina por lisina ou ácido aspártico na posição 120 (Gli120Lis ou Gli120LAsp), e a substituição de alanina por ácido aspártico na posição 121 (Ala121Asp) da porina B1 (Lewis, 2010). Apenas quando associada à expressão aumentada da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE, codificada pelo operon *mtrCDE*, a *penB* afeta a CMI de penicilina no gonococo, podendo sofrer um aumento de até quatro vezes. Acredita-se que seja por um possível efeito sinérgico entre os dois mecanismos (Gill *et al.*, 1998; Costa-Lourenço *et al.*, 2017b). Além disso, a combinação das mutações nos genes *penA*, *penB* e *mtr* podem acarretar um aumento de 120 vezes na CMI de penicilina em *N. gonorrhoeae* (Lewis, 2010).

N. gonorrhoeae possui o sistema *mtr* (múltipla resistência transferível), composto por um operon, o *mtrCDE*, que codifica a bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE. (Lewis, 2010; Barros dos Santos, 2016). Essa bomba de efluxo é responsável por exportar moléculas hidrofóbicas da célula, como os antimicrobianos penicilina, tetraciclina e macrolídeos, o que impacta na susceptibilidade do gonococo frente a essas substâncias. A expressão da bomba de efluxo *mtrCDE* é controlada por dois reguladores transcricionais: MtrA (ativador do operon) e MtrR (repressor do operon). Diferentes mecanismos, tais como, a substituição de aminoácidos (A39T ou G45D) na estrutura do MtrR, inserção de dinucleotídeos (TT:AA) ou a deleção de um único par de bases (T:A) no promotor do gene *MtrR* podem afetar a expressão da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE. Além disso, a substituição de citosina para timina a 120 (C120T) pares de bases *upstream* de *mtrC* gera um outro promotor que é insensível ao efeito repressor do *mtrR* (Zarantonelli *et al.*, 2001; Costa-Lourenço *et al.*, 2017b).

PilQ, codificado pelo gene *pilq*, juntamente com o pili do tipo IV atuam como poros na membrana plasmática externa, onde antimicrobianos e pequenas moléculas são transportados. A mutação que ocorre nesse gene é denominada *penC* ou *pilq2*, e leva a uma

substituição de ácido glutâmico por lisina na posição 666 (Glu666Lis), o que desestabiliza o poro formado por PilQ diminuindo o influxo de penicilina (Zhao *et al.*, 2005; Costa-Lourenço *et al.*, 2017b).

Para uma amostra susceptível de *N. gonorrhoeae* se tornar resistente a altas concentrações de penicilina sem a aquisição de uma penicilinase ela deve adquirir mecanismos de resistência associados a cinco genes, sendo eles, *penA*, *penB*, *pilq*, *ponA1* e *mtr* (Ropp *et al.*, 2002). Além disso, há o chamado fator X, um determinante da resistência a penicilina e cefalosporinas que permanece desconhecido. Este determinante pode elevar a CMI da penicilina no gonococo de 3 a 6 vezes, mas por não ser transformável torna difícil seu estudo com as metodologias clássicas (Unemo e Shafer, 2014). A proteômica pode vir a ser uma ferramenta útil na determinação do mecanismo por trás do fator X (Baarda e Sikora, 2015).

1.3.3 Tetraciclina

A tetraciclina atua ligando-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano e impedindo a síntese proteica. Ao estabelecer essa ligação o antimicrobiano impede que RNA-transportadores, responsáveis por carrear os aminoácidos que irão compor a proteína, se acoplem ao ribossoma e, assim, bloqueia a síntese de novas proteínas. Em altas concentrações a tetraciclina torna-se tóxica para as células de mamíferos, tanto pela sua ação quelante, principalmente sobre o magnésio, quanto pela inibição da síntese proteica (Tavares, 2014).

Amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas na era pré-penicilina apresentavam CMI para tetraciclina variando de 0,02 a 0,2 µg/mL, sendo consideradas susceptíveis. Após a introdução desse antimicrobiano como parte do tratamento de infecções gonocócicas, nos anos 50, houve um aumento nas CMI de cepas isoladas durante esse período, variando de 0,5 a 4 µg/mL. Essa diminuição da susceptibilidade é associada à aquisição de mecanismos de resistência cromossômicos (Morse *et al.*, 1986; Costa-Lourenço *et al.*, 2017b). Além disso, Morse e colaboradores identificaram em 1986 a presença de um mecanismo de resistência mediado por plasmídeo em amostras de *N. gonorrhoeae* (Morse *et al.*, 1986).

Mutações nos genes *mtrR*, *penB* e *pilq*, que afetam a susceptibilidade a penicilina, também têm impacto sobre a efetividade de tetraciclina, e normalmente seu efeito cumulativo pode elevar a CMI para 2 – 4 µg/mL (Młynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2016). Outro mecanismo cromossômico que pode ter o mesmo efeito sobre a CMI está relacionado a uma mutação pontual no gene *rpsJ* (*tet-2*), que codifica a proteína ribossomal 10S, componente da

subunidade 30S do ribossoma procariótico, onde há a mudança do aminoácido valina para metionina na posição 57 (Val57Met). Essa mudança diminui a afinidade da tetraciclina pelo seu sítio de ligação no ribossoma bacteriano, podendo assim, aumentar de três a quatro vezes a CMI, independente da bactéria possuir outros mecanismos de resistência cromossomais (Hu *et al.*, 2005; Młynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2016).

Cepas de *N. gonorrhoeae* também podem apresentar mecanismos plasmidiais de resistência a tetraciclina, os quais podem elevar a CMI para $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. Essas amostras são conhecidas como *N. gonorrhoeae* resistentes a tetraciclina (TRNG, do inglês, *Tetracycline Rresistant Neisseria gonorrhoeae*). Dois plasmídeos conjugativos identificados em *N. gonorrhoeae* carregam o gene *tetM*, que codifica a proteína TetM, responsável por bloquear o sítio de ligação da tetraciclina na subunidade 30S do ribossoma. A proteína TetM tem uma estrutura semelhante ao fator de alongação da tradução EF-G, porém com uma maior afinidade pelo ribossoma. Assim, TetM compete pelo mesmo sítio que o EF-G e a tetraciclina (Chopra e Roberts, 2001; Młynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2016). Apesar dos dois plasmídeos carreadores do gene *tetM* apresentarem peso molecular de 25.2 MDa, foram identificadas diferenças entre os genes carreados por eles, inclusive os genes *tetM* que possuem 96,8% de identidade (Gascoyne-Binzi *et al.*, 1993; Lewis, 2010). O nome atribuído aos plasmídeos, *American* e *Dutch*, reflete a origem das amostras em que esses plasmídeos foram identificados (Chalkley *et al.*, 1997).

Na década de 50 a tetraciclina era o tratamento alternativo para pacientes com gonorreia que apresentavam alergia a penicilina (Costa-Lourenço *et al.*, 2017b). Em 1983 foi identificada a primeira amostra de *N. gonorrhoeae* resistente a altas concentrações desse antimicrobiano no EUA e em 1985 o mesmo foi observado na Holanda (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 TRNGs já estavam amplamente disseminadas pelo mundo, permanecendo a tetraciclina como parte do tratamento apenas em casos de coinfeção com *C. trachomatis* (Costa-Lourenço *et al.*, 2017b). A tetraciclina foi então substituída por uma fluoroquinolona, a ciprofloxacina, na recomendação de tratamento feita pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (CDC, 1989; Lewis, 2010).

1.3.4 Ciprofloxacina

Quinolonas sintéticas foram descobertas na década de 60, sendo o ácido nalidíxico o primeiro antimicrobiano dessa classe a ser utilizado para tratamento de infecção urinária. A

partir do ácido nalidíxico foram desenvolvidos outras quinolonas com espectro de ação mais amplo, sendo conhecidas como fluoroquinolonas (Unemo e Shafer, 2014).

A ciprofloxacina é uma fluoroquinolona, seu mecanismo de ação é bactericida e atua sobre a síntese de DNA, onde há a inibição das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV (Unemo e Shafer, 2014). Ambas enzimas atuam quebrando e reunindo dupla fita de DNA na replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA. A DNA girase é composta pelas subunidades GyrA e GyrB, sendo codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Já a Topoisomerase IV é formada pelas subunidades ParC e ParE, codificadas por *parC* e *parE* (Unemo e Shafer, 2014). A ciprofloxacina bloqueia a ação dessas enzimas ligando-se a elas e formando um complexo antimicrobiano-enzima-DNA. Este complexo estável bloqueia a movimentação da forquilha de replicação e, sua toxicidade se deve, provavelmente, à ligação deste complexo se tornar irreversível e à geração de uma quebra na dupla fita causada pela desnaturação da enzima (Hooper, 2001). O exato mecanismo deletério do complexo estável formado ainda não foi, no entanto, plenamente esclarecido (Fàbrega *et al.*, 2009).

A resistência a ciprofloxacina em amostras de *N. gonorrhoeae* (CMI ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI 2019*) geralmente está associada a dupla mutação no gene *gyrA* ou a combinação de mutações nos genes *gyrA* e *parC* (Giles *et al.*, 2004; CLSI, 2019). Essas mutações geralmente ocorrem nas posições 91, 95 e/ou 120 em *gyrA*, 87 e 91 em *parC* e 439 em *parE*, que são parte da chamada Região Determinante de Resistência à Quinolonas (QRDR, do inglês, *Quinolone Resistance-Determining Region*) dos respectivos genes. Nas QRDR mutações levam a um efeito aditivo na redução da susceptibilidade. A combinação de três ou mais mutações em *gyrA*, *parC* e/ou *parE* podem elevar a CMI para ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ (Wang *et al.*, 2006; Costa-Lourenço *et al.*, 2017b).

A ciprofloxacina começou a ser utilizada para tratar gonorreia na metade da década de 80, mas já no final dos anos 90 seu uso foi abandonado em países da Ásia e Pacífico, sendo seguidos por EUA, Europa e algumas regiões da África devido à rápida disseminação de cepas de gonococo resistentes a ciprofloxacina (Lewis, 2010). Diversos países Asiáticos e Europeus abandonaram o uso da ciprofloxacina como primeira escolha para o tratamento de gonorreia no início dos anos 2000 (Unemo e Shafer, 2014). Em 2006, a recomendação de tratamento do CDC descontinuou o uso da ciprofloxacina para tratar gonorreia devido a altas taxas de resistências observadas em território americano pelo *Gonococcal Isolate Surveillance Project* (GISP). A ciprofloxacina foi então substituída pela ceftriaxona ou cefixima, no guia de tratamento para doenças sexualmente transmissíveis (atualmente denominadas infecções sexualmente transmissíveis). No caso de pacientes alérgicos a betalactâmicos, a

recomendação era espectinomicina ou azitromicina, sendo aconselhado que esta última não fosse amplamente utilizada devido à preocupação da rápida emergência de resistência, já documentada no final dos anos 90. Este guia também aponta que não havia disponibilidade de cefixima, nem de espectinomicina no EUA naquela época (CDC, 2007; Unemo e Shafer, 2014). No Brasil a ciprofloxacina fazia parte da recomendação de tratamento até setembro de 2017, quando seu uso foi descontinuado devido a taxas de resistência maiores que 50% no território nacional, sendo então substituída pela ceftriaxona na terapia combinada com azitromicina (Ministério da Saúde, 2017).

1.4 Fronteiras no tratamento de gonorreia

N. gonorrhoeae demonstrou, ao longo do tempo, uma notável capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados na terapêutica da gonorreia. A evolução da resistência passou pelas sulfonamidas, penicilina, tetraciclina e, mais recentemente, pela ciprofloxacina. Esse cenário chama atenção pela rapidez com que evoluiu e pela necessidade de estudos epidemiológicos voltados para os antimicrobianos que fazem ou podem fazer parte da recomendação de tratamento. Atualmente o uso de sulfonamidas, penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina não é indicado para a terapêutica da gonorreia, sendo utilizada pela maioria dos países a combinação de ceftriaxona ou cefixima com azitromicina (IUSTI/WHO, 2012; WHO, 2016c; CDC, 2018). No Brasil, a partir de setembro de 2017, a recomendação do Ministério da Saúde passou a ser ceftriaxona com azitromicina (Ministério da Saúde, 2017).

1.4.1 Azitromicina

A azitromicina foi desenvolvida em 1980, sendo um derivado da eritromicina, o primeiro macrolídeo a ser descoberto, e demonstrou ter alta eficiência contra o gonococo. A azitromicina atua inibindo a síntese proteica, uma vez que se liga ao RNA ribossomal 23S (23S rRNA) localizado na subunidade 50S do ribossoma bacteriano impedindo a translocação do RNA transportador e, conseqüentemente, a formação da cadeia polipeptídica. Este antimicrobiano possui baixa toxicidade para células de mamíferos, já que não possui afinidade pela subunidade 60S do ribossoma eucarioto (Chisholm, Dave e Ison, 2010; Tavares, 2014; Unemo e Shafer, 2014). *N. gonorrhoeae* é naturalmente susceptível a azitromicina (Belkacem *et al.*, 2016), mas já no final dos anos 90 foram reportados isolados resistentes a esse

antimicrobiano na América Latina, onde era utilizado em monoterapia para tratar infecções sexualmente transmissíveis bacterianas, incluindo gonorreia (Unemo e Shafer, 2014). Em 2001, na Argentina, foi reportada a primeira amostra de *N. gonorrhoeae* resistente a altas concentrações de azitromicina com CMI > 2048 µg/mL (Galarza *et al.*, 2009). Em seguida, amostras com esse fenótipo foram identificadas na Escócia em 2004, e em 2007, na Inglaterra, País de Gales e Itália (Palmer *et al.*, 2008; Chisholm *et al.*, 2009; Starnino, Stefanelli e *Neisseria gonorrhoeae* Italian study group, 2009). Em 2011 foram identificadas três amostras resistentes a altas concentrações de azitromicina (CMI ≥ 256 µg/mL) na Suécia (Unemo, Golparian e Hellmark, 2014).

A resistência a azitromicina foi primeiramente observada no Rio de Janeiro em 2006 e, com exceção de 2012, em todos os anos subsequentes, até 2015, foi isolada pelo menos uma amostra de *N. gonorrhoeae* resistente a azitromicina. Esses dados apontam para uma emergência da resistência a azitromicina no gonococo no Rio de Janeiro. Além disso, foi observada que a disseminação da resistência não estava relacionada a um clone específico (Costa-Lourenço *et al.*, 2018). Mais recentemente, após 2016, foi demonstrado que a disseminação dessa resistência está, pelo menos em parte, ligada a um clone relacionado ao ST1901 (ST, do inglês *Sequence Type*), um tipo de sequência reconhecido internacionalmente por ser bem sucedido na aquisição de mecanismos de resistência a antimicrobianos (Barros dos Santos *et al.*, 2019). Amostras pertencentes a este ST demonstraram possuir a habilidade de desenvolver resistência a altas concentrações de cefixima e ceftriaxona, além de serem disseminadas mundialmente (Unemo *et al.*, 2012; Unemo e Nicholas, 2012). Amostras abrigoando o alelo mosaico *penA* XXXIV (abordado no próximo tópico) comumente pertencem a este ST, além dele estar ligado à falhas terapêuticas envolvendo o uso de CEE (ceftriaxona e cefixima) identificadas em lugares como Japão, França e Espanha (Unemo e Nicholas, 2012).

Os mecanismos de resistência a azitromicina presentes no gonococo estão relacionados a modificações no sítio alvo desse antimicrobiano no ribossoma, seja por mutações nos alelos do gene que codifica o 23S rRNA; por modificações no 23S rRNA em virtude da ação de metilases; ou pela expressão aumentada de bombas efluxo (Unemo e Shafer, 2014).

A CMI de azitromicina sobre gonococos pode aumentar para 0,5 µg/mL, sendo esta CMI considerada como susceptibilidade reduzida ($S \leq 1$ µg/mL, pelo CLSI). Isso se dá em decorrência da expressão aumentada da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE, através dos mesmos mecanismos moleculares já citados para penicilina no tópico 1.3.2. A alteração da

CMI também pode se dar pela expressão aumentada da bomba de efluxo MacA-MacB ou pela aquisição do gene *mef*, que codifica uma bomba de efluxo, sendo este gene codificado por plasmídeo (Rouquette-Loughlin, Balthazar e Shafer, 2005; Costa-Lourenço *et al.*, 2017b).

A resistência a azitromicina também pode ser mediada por genes *erm*, adquiridos por transposons conjugativos. Os genes *erm* (*ermB*, *ermC* e *ermF*) codificam enzimas que induzem a metilação de uma adenina presente no 23S rRNA, bloqueando a ligação do macrolídeo ao seu alvo ribossomal. A CMI do gonococo pode aumentar para 1 – 4 µg/mL quando há a presença dessas enzimas (Unemo e Shafer, 2014; Belkacem *et al.*, 2016)

Mutações nos alelos do gene *rrl*, que codificam o 23S rRNA, tem impacto na CMI de azitromicina quando ocorrem no domínio V da peptidiltransferase, podendo ser uma substituição de timina por citosina na posição 2599 (C2599T) ou de guanosina por adenina na posição 2143 (A2143G, correspondente a A2059G na numeração de *E. coli*) (Belkacem *et al.*, 2016). Esse mecanismo de resistência tem grande impacto sobre a CMI do gonococo, podendo atingir 256 µg/mL quando há de três a quatro alelos *rrl* mutados (Chisholm, Dave e Ison, 2010). Isolados de *N. gonorrhoeae* que apresentavam as mutações C2599T e A2143G nos quatro alelos *rrl* demonstraram possuir resistência a altas concentrações de azitromicina, sendo as CMI 96 µg/mL e ≥ 256 µg/mL, para as respectivas mutações (Costa-Lourenço *et al.*, 2017b).

Outro mecanismo de resistência presente no gonococo é a mutação no gene *rplD* que codifica a proteína ribossomal L4. Essa mutação leva a uma mudança de aminoácido, G70D (Gli70Asp), que pode indiretamente alterar a conformação do 23S rRNA, uma vez que essa proteína é localizada próxima ao domínio V da peptidiltransferase (Belkacem *et al.*, 2016).

Atualmente, no Brasil, a azitromicina faz parte da recomendação de tratamento para gonorreia, que preconiza seu uso em terapia combinada com a ceftriaxona e em monoterapia para pessoas alérgicas à betalactâmicos (Ministério da Saúde, 2017; CONITEC, 2018). A estratégia de tratamento combinando esses dois antimicrobianos tem o objetivo de tentar reduzir o desenvolvimento e/ou disseminação da resistência a ambas as drogas pelo seu efeito aditivo (Day *et al.*, 2018). Entretanto, já foram identificadas amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes a azitromicina no Brasil. Em um estudo feito por Bazzo e colaboradores, que analisaram 550 amostras isoladas entre 2015 e 2016 em capitais de sete estados brasileiros, foi visto que 6,9% (n = 38) dessas amostras eram resistentes à azitromicina. Com exceção da região sul do país, todas as outras regiões apresentaram taxas de resistência para azitromicina $\geq 5\%$. Esses dados chamam atenção para uma necessidade de monitoramento da resistência a azitromicina em nível nacional (Bazzo *et al.*, 2018).

1.4.2 Ceftriaxona

A classe das cefalosporinas pertence ao grupo dos betalactâmicos e se divide em gerações, sendo elas relacionadas com seu espectro de ação (Gallagher e MacDougall, 2017). A ceftriaxona é uma cefalosporinas de terceira geração, assim como a cefixima. Ambas são denominadas cefalosporinas de espectro estendido (CEE), que se caracterizam por possuírem elevada potência contra bactérias gram-negativas. O mecanismo de ação de todos os betalactâmicos se dá através da inibição da síntese da parede celular, levando à lise osmótica. A ceftriaxona somente é absorvida pela via parental e já demonstrou ter boa atividade contra *N. gonorrhoeae*, incluindo as amostras produtoras de penicilinas (Unemo *et al.*, 2010; Tavares, 2014).

Durante os últimos anos, em diversas regiões do mundo, tem sido recomendada para o tratamento empírico de gonorreia a terapia combinada de cefixima e azitromicina, ambas administradas pela via oral (VO) (Canadá); ou ceftriaxona [via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV)] e azitromicina (VO) (EUA, Canadá, Austrália e Europa) (Unemo, del Rio e Shafer, 2016). A dupla terapia foi estabelecida com o objetivo de preservar a susceptibilidade às CEEs evitando a eventual disseminação clonal de amostras com susceptibilidade reduzida a esta classe de antimicrobianos (Abrams *et al.*, 2017). O Brasil passou a adotar a combinação de ceftriaxona e azitromicina em 2017 (Ministério da Saúde, 2017). No entanto, já há relatos de amostras com susceptibilidade reduzida ou resistência a altas concentrações de ceftriaxona, especialmente no Japão, onde se acredita terem surgido as primeiras amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes à CEE, tanto à cefixima quanto à ceftriaxona (Ohnishi *et al.*, 2011a). Posteriormente, amostras com susceptibilidade reduzida ou resistência a CEEs também foram detectadas em outros lugares do mundo, como por exemplo na França, EUA e Espanha (Cámara *et al.*, 2012; Unemo *et al.*, 2012; Unemo, del Rio e Shafer, 2016; Abrams *et al.*, 2017).

A primeira amostra de *N. gonorrhoeae* resistente a ceftriaxona, nomeada H041, foi identificada em 2009, tendo CMI = 2 µg/mL para esse antimicrobiano. A H041 demonstrou ser resistente a penicilina G, cefixima e levofloxacina, porém, apresentava susceptibilidade a espectinomicina e susceptibilidade reduzida a azitromicina (Ohnishi *et al.*, 2011a, 2011b). Em 2010 foi isolada na França uma amostra de *N. gonorrhoeae*, nomeada F89, apresentando CMI = 1 µg/mL para ceftriaxona e CMI = 4 µg/mL para cefixima quando realizada a ágar diluição, pelo E-test estas CMIs foram 2 e 3 µg/mL, respectivamente (Unemo *et al.*, 2012). No EUA, entre 1987 e 2015, foram reportados pelo GISP cinco amostras de *N. gonorrhoeae*

apresentando susceptibilidade reduzida a ceftriaxona (CMI = 0,5 µg/mL) (Abrams *et al.*, 2017). Em 2012 foram caracterizados dois gonococos isolados em 2011 na Catalunha, Espanha, com CMI para ceftriaxona de 1,5 µg/mL (Cámara *et al.*, 2012).

Contudo, em um estudo conduzido no Brasil por Bazzo e colaboradores, onde foi realizada uma vigilância epidemiológica incluindo 550 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas de 2015 a 2016 em sete locais do país, foi constatada plena susceptibilidade à ceftriaxona e a cefixima. De fato até o presente momento nenhum isolado de *N. gonorrhoeae* apresentando resistência a ceftriaxona e a cefixima foi descrito no país (Bazzo *et al.*, 2018).

O mecanismo mais comum associado à susceptibilidade reduzida a ceftriaxona em *N. gonorrhoeae* está relacionado ao denominado alelo mosaico *penA*, gene que codifica a PBP2 com 60 a 70 mudanças em aminoácidos com relação ao que seria a PBP2 selvagem, como A311V, I312M, V316T, V316P, T483S, A501P, A501V, N512Y e G545S. Acredita-se que o mosaico *penA* tenha sido adquirido pelo gonococo *in vivo* através de transferência horizontal durante infecções gonocócicas na orofaringe, por meio de recombinação de DNA de espécies de *Neisseria* comensais, tais como *Neisseria perflava*, *Neisseria flavescens* e *Neisseria sicca* (Unemo e Shafer, 2014; Unemo, del Rio e Shafer, 2016). Diferentes alterações na sequência de aminoácidos da PBP2 já foram descritas para o alelo mosaico *penA*. Tanto a F89 quanto as amostras isoladas na Espanha demonstraram possuir o mesmo padrão de alelo mosaico *penA*, todas apresentando o padrão XXXIV (PBP2 XXXIV) com uma substituição de aminoácido adicional (A501P) (Costa-Lourenço *et al.*, 2017b). Em contraste, a H041 demonstrou pertencer ao padrão X (PBP2 X) com quatro substituições de aminoácidos adicionais (A311V, T316P, A328T e T484S) (Ohnishi *et al.*, 2010). No início das análises a respeito deste gene cada sequência identificada recebia uma nomenclatura em números romanos. Até 2011 já tinham sido caracterizados 34 padrões, sendo nomeados de I a XXXIV (Ito *et al.*, 2005; Whiley *et al.*, 2007; Ohnishi *et al.*, 2011a). No entanto, atualmente no banco de sequência de genes do NG STAR (método proposto de tipificação que inclui *penA*, disponível em fase experimental no PubMLST) há relatos de 2032 alelos *penA* identificados. Neste caso não tem sido mais adotada a nomenclatura em números romanos (PubMLST, 2019).

A susceptibilidade reduzida à ceftriaxona também é facilitada pela presença de mutações na porina B (*porB1b*), denominada *penB*, que alteram aminoácidos G101 e A102, diminuindo a entrada da ceftriaxona na célula; expressão aumentada da bomba de efluxo MtrCDE, que aumenta o efluxo da ceftriaxona; e alterações de aminoácidos no domínio de ligação da transpeptidase e betalactâmicos na PBP2, como as já relatadas A501V e A501T.

Tais alterações foram identificadas em amostras de *N. gonorrhoeae* com susceptibilidade reduzida a CEEs que não possuíam o alelo mosaico *penA* (Zhao *et al.*, 2009; Ohnishi *et al.*, 2011a; Unemo *et al.*, 2012; Unemo, del Rio e Shafer, 2016). Assim como para a penicilina, o fator X pode influenciar na CMI de ceftriaxona e cefixima no gonococo (Unemo e Shafer, 2014). Em *N. gonorrhoeae* mutações no gene *ponA1* e *pilQ*, que codificam respectivamente a PBP1 e a proteína PilQ, não alteram consideravelmente a CMI de CEE (Unemo *et al.*, 2012).

O *Gonococcal Resistance to Antimicrobials Programme* (GRASP) monitora desde 2000 isolados de *N. gonorrhoeae* na Inglaterra e País de Gales. Em uma análise feita em 2010, 99% dos isolados a partir de 2004 demonstraram ser susceptíveis à ceftriaxona (n = 9.951) e à cefixima (n = 7.830). Contudo, há um pequeno, mas significativo, aumento na proporção de gonococos com susceptibilidade reduzida a esses antimicrobianos, de 0% em 2014 a 1,5% em 2008 em relação à cefixima e um aumento de 33% entre 2003 e 2008 em relação à ceftriaxona. Um estudo que analisou esses isolados aponta para um crescimento lento da CMI de cefalosporinas nos gonococos isolados na Inglaterra e País de Gales, sendo esse fenômeno denominado “Minimal Inhibitory Concentration creep, MIC creep” (Chisholm, *et al.*, 2010).

1.5 Alternativas para o tratamento

Neisseria gonorrhoeae tem, ao longo do tempo, se mostrado hábil em adquirir mecanismos de resistência, mesmo na ausência da pressão gerada por um tratamento em curso. Muitas das cepas que estão em circulação ao redor do mundo estão próximas de se tornarem extensivamente resistentes a drogas (XDR, do inglês *extensively drug resistant*). Essa classificação é atribuída a amostras que são susceptíveis a uma ou duas classes de antimicrobianos, enquanto não são susceptíveis a pelo menos um antimicrobiano de cada classe (Magiorakos *et al.*, 2012; Goire *et al.*, 2014).

Tendo em vista a prevalência de amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes a penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina e o aparecimento de amostras resistentes a azitromicina no Brasil, torna-se de extrema importância a vigilância epidemiológica do gonococo, uma vez que as recomendações de tratamento são feitas baseadas em evidências epidemiológicas de susceptibilidade ou resistência. Espectinomicina, gentamicina e cefixima apresentam-se como possíveis formas de tratamento da gonorreia no Brasil, baseado no cenário mundial onde esses antimicrobianos já foram ou são utilizados para este fim.

1.5.1 Espectinomicina

Em 1944 Sacks, Waksman e colaboradores descobriram a espectinomicina, sendo isolada a partir do actinomiceto *Streptomyces griseus*. Foi o primeiro antimicrobiano representante da classe dos aminoglicosídeos, que na verdade é um aminociclitol (Tavares, 2014). A espectinomicina atua ligando-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, no 16S rRNA, bloqueando a translocação do RNA transportador (carreando um aminoácido/peptídeo) do sítio A para o sítio P reação essa catalisada pelo fator de alongação da tradução EF-G, inibindo assim a tradução do mRNA (Tavares, 2014; Unemo e Shafer, 2014). A interação com o 16S rRNA ocorre na hélice 34 onde há os pares de bases G1064 – C1192 (Unemo e Shafer, 2014).

Em Londres, em 1983, a penicilina foi substituída pela espectinomicina no tratamento de gonorreia, uma vez que houve um aumento de amostras de *N. gonorrhoeae* produtoras de penicilinas (Easmon *et al.*, 1984). No mesmo ano nos EUA, foi realizado um estudo comparando a ação de ceftriaxona com a de espectinomicina para tratar pacientes com infecção gonocócica anorretal ou orofaríngea, visto que a prevalência de amostras de *N. gonorrhoeae* produtoras de penicilinas estava aumentando e a penicilina não era bem aceita pelos pacientes devido ao custo alto e sua forma de administração (duas injeções intramusculares totalizando 10 mL). Foi observada uma taxa de cura para a infecção na orofaringe de 94% para pacientes que foram medicados com ceftriaxona e 43% para espectinomicina. A taxa de cura para a infecção anorretal foi de 100% para ambos os antimicrobianos (Judson, Ehret e Handsfield, 1985).

A espectinomicina é absorvida pela via parental e já demonstrou não ser eficiente para tratar faringite gonocócica (Tavares, 2014). Entretanto, é eficiente para tratar infecções gonocócicas anogenitais e o nível mundial de susceptibilidade é alto (Unemo, del Rio e Shafer, 2016).

Em 1967 foi identificada na Holanda a primeira amostra de *N. gonorrhoeae* apresentando resistência à espectinomicina (CMI > 168 µg/mL) (Stolz, Zwart e Michel, 1975). Pouco tempo depois, em 1973 em Copenhague na Dinamarca, foram descritas três amostras de gonococos com o mesmo perfil, possuindo CMI > 480 µg/mL (Reyn *et al.*, 1973). Em 1981, em Filipinas, foi isolada uma amostra de *N. gonorrhoeae* produtora de penicilinase (PPNG) resistente à espectinomicina, tendo CMI > 2.048 µg/mL (Ashford *et al.*, 1981). Na então República da Coreia, desde 1981, o tratamento para infecções gonocócicas em militares do EUA era espectinomicina. Um estudo foi conduzido por Boslego e

colaboradores em 1987 com 97 militares que apresentavam a infecção e foram tratados em monoterapia com espectinomicina. Foi constatada falha terapêutica em 8,2% (n = 8) dos militares, onde sete desses isolados apresentaram CMI ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$. Essa alta prevalência de resistência culminou na substituição da espectinomicina pela ceftriaxona no tratamento de militares do EUA (Boslego *et al.*, 1987). Em Londres nos anos 1983 e 1984 foram isoladas, respectivamente, seis e oito amostras de *N. gonorrhoeae* não produtoras de penicilinases resistentes à espectinomicina com CMI ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$ (Easmon *et al.*, 1984).

A resistência à espectinomicina reportada em isolados de *N. gonorrhoeae* é resultado de mutações pontuais na hélice 34 do 16S rRNA na qual há a substituição de citosina por timina na posição 1192 (C1192T) (Galimand *et al.*, 2000). A mutação C1192T já foi descrita em uma amostra apresentando CMI > 1024 $\mu\text{g/mL}$ (Unemo *et al.*, 2009). Outro mecanismo de resistência à espectinomicina presente no gonococo afeta a proteína ribossomal S5, componente da subunidade 30S do ribossoma bacteriano. Essa proteína é codificada pelo gene *rpsE*, o qual pode sofrer a deleção de nucleotídeos das posições 79 a 81, códon que codifica uma valina, sofrendo a deleção de uma valina na posição 25 (Val25). Outras mutações em *rpsE* que afetam a susceptibilidade a espectinomicina são aquelas que levam a uma alteração de lisina para ácido glutâmico na posição 26. Essas mutações podem elevar a CMI do gonococo para > 1.024 $\mu\text{g/mL}$ (Unemo *et al.*, 2013). Ainda afetando a proteína ribossomal S5 pode haver a substituição na posição 24 de treonina para prolina (Tre24Pro) (Ilin *et al.*, 2013). As alterações na proteína S5 provavelmente interrompem sua ligação ao 16S rRNA levando à resistência à espectinomicina (Unemo e Shafer, 2014).

Em diversos países apenas a espectinomicina, CEE e CEE combinadas com azitromicina, permanecem sendo recomendadas para o tratamento empírico de gonorreia (Lee *et al.*, 2019). Na Coreia do Sul, apesar do uso da espectinomicina em monoterapia para tratamento de gonorreia ser feito desde os anos 2000, desde 1993 não foram isoladas amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes à espectinomicina, mantendo-se um alto nível de susceptibilidade (Lee *et al.*, 2015, 2019). No Japão, em um estudo que analisou amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas de 2001 a 2002 foi constatado que a maioria delas era susceptível à espectinomicina e à ceftriaxona (Ito *et al.*, 2004).

O uso da espectinomicina para tratar gonorreia foi abandonado depois dos primeiros registros de resistência. Entretanto, relatos de resistência à espectinomicina têm sido raros nas últimas décadas (Lee *et al.*, 2015). Inclusive no Brasil, onde um estudo conduzido em Belo Horizonte, Minas Gerais, analisou 201 amostras isoladas entre 2011 e 2012, todas

apresentaram susceptibilidade à espectinomicina, assim como para cefixima e ceftriaxona (Costa *et al.*, 2013).

A espectinomicina faz parte da recomendação de tratamento de gonorreia feita pela Organização Mundial da Saúde, sendo a administração feita em monoterapia para infecção gonocócica urogenital e anorretal, conjuntivite gonocócica neonatal e em combinação com a azitromicina, em casos de falha terapêutica (WHO, 2016c). Já o CDC aponta que, quando disponível, a espectinomicina é uma alternativa eficaz para tratar infecção gonocócica anorretal e urogenital (CDC, 2018). A espectinomicina fez parte da recomendação de tratamento para gonorreia feita pelo Ministério da Saúde no Brasil em 2006, onde era a segunda opção juntamente com a cefixima e ofloxacina, todos em monoterapia. As primeiras opções eram ciprofloxacina e ceftriaxona, ambos em monoterapia (Ministério da Saúde, 2006). Atualmente nenhum desses antimicrobianos faz parte da recomendação, exceto a ceftriaxona (CONITEC, 2018).

1.5.2 Gentamicina

A gentamicina também pertence à classe dos aminoglicosídeos, possuindo assim o mesmo mecanismo de ação da espectinomicina, alterando a síntese de proteínas e levando à morte celular. É um composto natural obtido a partir do fungo *Micromonospora purpurea* e outros do mesmo gênero. Esse antimicrobiano é um complexo formado por três antimicrobianos denominados gentamicina C1, C1-a e C2 (Tavares, 2014).

Em 1994, foi realizado um estudo no Malawi, na África Oriental, onde avaliaram a eficácia de cinco tratamentos para uretrite gonocócica. Utilizando gentamicina em monoterapia foi observada uma taxa de cura de 93 a 95%, assim como ciprofloxacina em monoterapia e a combinação de amoxicilina, clavulanato, probenecida e doxiciclina. A partir desse estudo o *Malawian STD Advisory Committee* selecionou como forma de tratamento de uretrite a combinação de gentamicina 240 mg (IM) em dose única com doxiciclina 100 mg duas vezes ao dia por sete dias (Lule *et al.*, 1994). Outro estudo realizado no mesmo país em 1996 verificou uma taxa de cura de 92% quando utilizada gentamicina em monoterapia. Apesar de ter ocorrido uma diminuição na taxa de cura comparado com o estudo feito em 1994 a diferença não foi significativa (Daly *et al.*, 1997). Seguindo o padrão dos estudos anteriores, em 2007 foi avaliada a susceptibilidade do gonococo à gentamicina no Malawi, onde foi constatada plena susceptibilidade a este antimicrobiano. Para tal foi utilizado um ponto de corte sugestivo dado por estudos anteriores associado à cura clínica, como no estudo

feito em 1994. Os pontos de corte utilizados foram: susceptibilidade $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; susceptibilidade intermediária = $8 - 16 \mu\text{g/mL}$; resistência $\geq 32 \mu\text{g/mL}$. Mesmo após quase 14 anos utilizando a gentamicina como forma de tratamento de uretrites não foi observada nenhuma resistência a esse antimicrobiano (Brown *et al.*, 2010).

Mais recentemente, em 2013, uma análise feita pelo CDC revelou uma taxa de cura de infecções gonocócicas urogenitais de 100% (202 participantes) quando utilizada a terapia combinada de gentamicina 240 mg (IM) e azitromicina 2 g (VO). Essa terapia combinada também curou 10/10 infecções gonocócicas da orofaringe e 1/1 retal, entretanto, apresentou efeitos adversos como náusea moderada (27% dos participantes), diarreia (19%) e dor/desconforto abdominal e vômito (ambos 7%). Apesar dos efeitos adversos, as combinações de antimicrobianos se mostraram eficazes para tratar gonorreia, sendo uma opção para pacientes que não podem ser tratados com cefalosporinas (Kirkcaldy, 2013).

Gentamicina, assim como ertapenem, solitromicina, zoliflodacina e gepotidacin (os últimos três antimicrobianos ainda estão em fase de testes) podem vir a ser o futuro do tratamento de gonorreia, seja em terapias combinadas ou para tratar pacientes que apresentarem amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes à ceftriaxona (Unemo e Shafer, 2014; Bastos, 2017).

A gentamicina é recomendada pela OMS em casos de falha terapêutica com a terapia combinada proposta, sendo a gentamicina administrada juntamente com a azitromicina (WHO, 2016c). Já o CDC indica a gentamicina em combinação com a azitromicina como potencial tratamento para alérgicos a betalactâmicos (CDC, 2018). No Brasil o Ministério da Saúde não indica o uso da gentamicina em nenhum caso (CONITEC, 2018), mesmo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária possuindo o sulfato de gentamicina registrado e comercializado (ANVISA, 2019).

Até recentemente não havia relatos de resistência clínica à gentamicina em *N. gonorrhoeae* (Ross e Lewis, 2012). Em concordância, um estudo feito em Manaus, Brasil, com 83 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas em 2009 revelou que todas as amostras apresentaram susceptibilidade à gentamicina [ponto de corte mencionado por Brown *et al.*, 2010 (susceptibilidade $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; susceptibilidade intermediária = $8 - 16 \mu\text{g/mL}$; resistência $\geq 32 \mu\text{g/mL}$)] (Ferreira *et al.*, 2015). No entanto, em um artigo publicado no Reino Unido em 2019, Eyre e colaboradores relataram falha terapêutica em uma paciente tratada primeiramente com 1 g ceftriaxona (IM) e, em uma segunda abordagem com 240 mg de gentamicina (IM) associada a 2 g de azitromicina (VO). A remissão de sintomas nesta

paciente só foi possível após tratamento com ertapenem 1 g (IV) 1 vez por dia, durante 3 dias (Eyre *et al.*, 2019).

1.5.3 Cefixima

A cefixima é uma cefalosporina de terceira geração, pertencente à classe dos betalactâmicos, e, como já citado, possui o mesmo espectro e mecanismo de ação da ceftriaxona. Entretanto, diferente da ceftriaxona, sua absorção é via oral (Tavares, 2014). As cefalosporinas de administração oral têm sido, nos últimos anos, amplamente utilizadas no Japão para tratar gonorreia, inclusive em regime monoterápico. Mais recentemente, a cefixima tem sido recomendada como forma de tratamento em diversos países, como Japão e Canadá e pela OMS (Unemo, del Rio e Shafer, 2016).

Mutações no alelo mosaico *penA* tem sido relacionadas à susceptibilidade reduzida e resistência a cefixima no gonococo. Algumas dessas mutações levam a substituição de glicina por serina na posição 545 (Gli545Ser), isoleucina por metionina na posição 312 (Ile312Met) e valina por treonina na posição 316 (Val316Tre), além de outras já descritas para ceftriaxona no item 1.4.3 (Lewis, 2010; Unemo, del Rio e Shafer, 2016). Da mesma forma, outros mecanismos que afetam a atividade de ceftriaxona, como por exemplo superexpressão da bomba de efluxo MtrCDE e alterações na porina B, também reduzem a susceptibilidade a cefixima.

Falhas terapêuticas utilizando cefixima para tratar gonorreia já foram reportadas no Japão, Austrália, Canadá, África do Sul e alguns países da Europa (Unemo, del Rio e Shafer, 2016). Em 1995, em Kanagawa no Japão, foi identificada a primeira amostra de *N. gonorrhoeae* apresentando resistência à cefixima, com uma CMI = 0,25 µg/mL. Esta apresentou alterações A501V e P551S na sequência não mosaico da PBP2. A partir de 1997 as taxas de susceptibilidade reduzida e resistência a cefixima no Japão aumentaram significativamente, tendo seu pico em 2002 com 57,1% das amostras sendo resistentes (CMI > 0,125 µg/mL) (Shimuta *et al.*, 2015). No início dos anos 2000 foram reportadas no Japão falhas terapêuticas envolvendo um regime de 400 mg de cefixima por dia durante três dias, onde as amostras de *N. gonorrhoeae* apresentavam CMI de 0,5 a 1 µg/mL e alterações mosaico na PBP2 (Yokoi *et al.*, 2007). Em 2006 todas as CEE de administração oral foram excluídas da recomendação de tratamento feita pela Japanese Society of Sexually Transmitted Infection, sendo a nova recomendação a ceftriaxona (IV), cefodizime (IV) e espectinomicina (IM) (Unemo, del Rio e Shafer, 2016).

Atualmente, no Brasil, a cefixima não possui registro válido na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por esse motivo não pode fazer parte da recomendação de tratamento sugerida pelo Ministério da Saúde (CONITEC, 2018). Em 2018 o Departamento de IST, HIV/AIDS e Hepatites Virais do Ministério da saúde (DIAHV) solicitou uma audiência pública com oito empresas farmacêuticas para esclarecimentos sobre a produção da cefixima no Brasil, onde foi demonstrada a importância do seu uso no contexto do tratamento da gonorreia. Argumentou-se que trata-se de uma droga utilizada mundialmente e administrada via oral, o que resulta em maior adesão de pacientes e profissionais da área da saúde ao tratamento quando comparada com a ceftriaxona, que é um medicamento injetável (Ministério da saúde, 2018). A cefixima faz parte da recomendação da OMS para o tratamento de infecções gonocócicas, sendo sugerida sua administração em combinação com a azitromicina ou em monoterapia (WHO, 2016c). A cefixima também é sugerida pelo CDC em combinação com a azitromicina quando a ceftriaxona não estiver disponível (CDC, 2018).

Um estudo feito por Bazzo e colaboradores, o mesmo já citado para azitromicina e ceftriaxona, analisou 550 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas entre 2015 e 2016 em sete regiões do país. Foi constatada plena susceptibilidade à cefixima quando considerado o ponto de corte do CLSI ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$). Contudo, baseado no ponto de corte do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ e $R > 0,125 \mu\text{g/mL}$), 0,2% ($n = 1$) das amostras foram consideradas resistentes e 6,9% ($n = 38$) apresentaram CMI muito próxima à que caracteriza a resistência ($0,125 \mu\text{g/mL}$) (Bazzo *et al.*, 2018; CLSI, 2018; EUCAST, 2018b).

A cefixima e outras cefalosporinas administradas por via oral nunca foram amplamente utilizadas no Brasil, tornando a emergência e disseminação de resistência à CEE pouco provável neste tempo progressivo. Além disso, a ceftriaxona foi recentemente incluída na recomendação de tratamento de gonorreia. Nenhuma amostra de *N. gonorrhoeae* apresentando resistência à CEE (ceftriaxona e cefixima) foi descrita até o momento no país. Além disso, desde 2011 a venda de antibióticos somente é permitida mediante prescrição médica, o que dificulta a evolução da resistência devido ao mau uso destes medicamentos (Ministério da Saúde, 2017; Bazzo *et al.*, 2018).

1.6 Características gerais das agências CLSI, EUCAST e BrCAST

1.6.1 CLSI

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) é uma organização internacional sem fins lucrativos que inclui mais de 60 países. O CLSI visa o desenvolvimento de padrões para teste em laboratórios clínicos, sendo este desenvolvimento feito através de um consenso entre a indústria, o governo e profissionais da área da saúde (CLSI, 2019b). Este instituto não foca apenas na área da microbiologia, mas dentro desta área o CLSI tem diversos objetivos, como desenvolver métodos de referência para realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos e critérios para avaliar os resultados obtidos nestes testes, assim como disponibilizar parâmetros para o controle deles. Na área da microbiologia o CLSI possui dois documentos principais, o M100 (padrões para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos), onde se encontram os pontos de corte para cada microrganismo e antimicrobiano, além de cepas controles que devem ser utilizadas para cada teste; e o M02 (padrões para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos por disco) que é um guia na realização dos testes de disco difusão. O CLSI não disponibiliza gratuitamente seus documentos, sendo necessário comprá-los, além disso, todos os documentos são em inglês (CLSI, 2019a, 2019c).

1.6.2 EUCAST

O *European committee on antimicrobial susceptibility testing* (EUCAST) é um comitê cujos componentes são ECDC, ESCMID e *European national breakpoint committees*. O EUCAST atua nos aspectos técnicos e na determinação de pontos de corte dos testes fenotípicos (*in vitro*) de susceptibilidade a antimicrobianos. Este comitê disponibiliza seus documentos online, o que significa dizer que qualquer pessoa pode acessar essas informações. Entretanto, assim como o CLSI, seus documentos são em inglês (EUCAST, 2019a). O EUCAST disponibiliza em seu site, além de pontos de corte e protocolos de análise, valores de CMI e diâmetros de halo de grandes coleções de amostras para diversos antimicrobianos, que podem fornecer elementos para o reconhecimento de pontos de corte epidemiológicos (ECOFFs) (http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/). Em seu site o EUCAST disponibiliza diversos documentos que servem de guias e apresenta padrões para a realização

de testes de susceptibilidade a antimicrobianos para bactérias, micobactérias, fungos e patógenos veterinários (<http://www.eucast.org/>).

1.6.3 BrCAST

O *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) é formado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. O BrCAST tem como foco a determinação de pontos de corte para interpretação dos resultados obtidos nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, assim como a sua revisão periodicamente, e propor à ANVISA seu uso nos laboratórios clínicos do Brasil. Também é seu foco o desenvolvimento, padronização, e estabelecimento de protocolos para controle de qualidade de testes de diagnóstico de susceptibilidade a antimicrobianos. Além disso, a agência assume como objetivos promover o treinamento e educação em relação a estes testes e procurar obter um consenso com o EUCAST e CLSI (BrCAST, 2019a). Em 2018 foi decretada uma lei que torna obrigatório, por parte de laboratórios da rede pública e privada, o uso dos critérios de interpretação dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos fornecidos pelo BrCAST. Até 11 de dezembro de 2019 os laboratórios devem se adequar à esta lei (Imprensa Nacional, 2018).

2. Justificativa

Ao longo dos anos *N. gonorrhoeae* tem adquirido mecanismos de resistência contra todos os antimicrobianos utilizados na terapêutica da gonorreia, o que torna constante as mudanças na recomendação de tratamento. Em 2017, o uso da ciprofloxacina deixou de ser recomendado pelo Ministério da Saúde como tratamento da gonorreia no Brasil devido a detecção de percentuais de resistência acima de 50% em diferentes regiões do país, sendo então substituída pela terapia combinada de 500 mg de ceftriaxona com 1 g de azitromicina e, em casos de pacientes alérgicos à betalactâmicos, 2 g de azitromicina em monoterapia. (Ministério da Saúde, 2017; CONITEC, 2018). No entanto, estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) detectaram evidências de disseminação clonal da resistência a azitromicina em gonococos no Rio de Janeiro. Entre 116 amostras coletadas de 2006 a 2015 foi observado um percentual de de resistência de 17% a este antimicrobiano (Costa-Lourenço, 2017b), a qual cresceu para 38% entre 60 amostras isoladas nos anos de 2015 a 2017 (Barros dos Santos, 2018).

Tendo em vista o atual panorama de susceptibilidade do gonococo é de grande importância que se conheça o perfil das amostras que estão circulando no estado, tanto em relação aos antimicrobianos que são a atual recomendação de tratamento (ceftriaxona e azitromicina) quanto em relação a possíveis futuras opções de terapia, como cefixima, espectinomicina e gentamicina. Atualmente não há dados para amostras isoladas no Rio de Janeiro no que diz respeito aos antimicrobianos citados acima, exceto para a azitromicina. Por este motivo o presente projeto teve como intuito determinar o perfil de susceptibilidade de amostras isoladas no Rio de Janeiro durante os últimos anos de forma a realizar uma vigilância epidemiológica no que se refere a provável eficiência do uso destes antimicrobianos de importância clínica.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de susceptibilidade das amostras de *Neisseria gonorrhoeae* recebidas no LImm entre 2014 e 2018 frente a antimicrobianos que podem ser utilizados para o tratamento de gonorreia.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os halos de inibição obtidos com discos de penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, azitromicina, cefixima, ceftriaxona, espectinomicina e gentamicina. Interpretar o perfil de susceptibilidade segundo os critérios do CLSI para os antimicrobianos que já tem pontos de corte definidos.

- Determinar a concentração mínima inibitória de azitromicina, cefixima, ceftriaxona, espectinomicina e gentamicina. Interpretar o perfil de susceptibilidade segundo os critérios do CLSI, EUCAST e BrCAST, levando em conta os pontos de corte definidos pelas respectivas agências, quando disponíveis. Para os antimicrobianos para os quais não há pontos de corte definidos, comparar a distribuição das CMIs obtidas com a apresentada pela ferramenta *MIC and Zone Distributions and ECOFFs*, disponibilizada pelo EUCAST.

- Identificar amostras com susceptibilidade reduzida a azitromicina, cefixima, ceftriaxona, espectinomicina e gentamicina para posterior avaliação de mecanismos de resistência associados.

4. Metodologia

4.1 Identificação e estoque das amostras

Este estudo incluiu 117 amostras de *N. gonorrhoeae*, isoladas na região metropolitana do Rio de Janeiro entre fevereiro de 2014 e dezembro de 2018, que pertencem à coleção de conveniência do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), localizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. As amostras que compõem esta coleção são provenientes das seguintes instituições: Laboratório de Análises Clínicas Sérgio Franco (n = 107), Instituto Evandro Chagas (IPEC) (n = 2), Laboratório Richet (n = 4), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (n = 1) e Centro de Saúde Vasco Barcelos – Nova Iguaçu (CSVB) (n = 3).

Ao serem recebidas no laboratório, as amostras foram selecionadas levando em consideração a morfologia colonial que apresentavam em ágar chocolate; ou seja, colônias pequenas, transparentes, mucoides e brilhantes (Winn *et al.*, 2008). Em seguida, foram identificadas por coloração de Gram, testes bioquímicos de produção de oxidase e catalase, e MALDI-TOF (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight*).

Para a identificação por MALDI-TOF, cada amostra foi aplicada com um palito de madeira em uma placa metálica que compõe o equipamento. Em seguida, as amostras foram tratadas com 1 µL de ácido fórmico 70% (Merck. Darmstadt, Alemanha) e, após secagem em temperatura ambiente, com 1 µL de Matriz HCCA [composta por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonik GmbH. Bremen, Alemanha) diluído na concentração de 10 mg/mL em solvente orgânico composto por 50% de acetonitrila (Tedia, EUA) e 2,5% de ácido trifluoroacético (Tedia, EUA)]. Em seguida, as amostras foram novamente secadas em temperatura ambiente e os analitos submetidos à técnica de MALDI-TOF.

Em geral as amostras foram recebidas já semeadas em ágar chocolate e, após identificação, foram repicadas em outra placa de Petri contendo ágar chocolate, o qual é preparado utilizando ágar base GC (Difco, EUA) acrescido de 1% de Hemoglobina liofilizada de bovino (BBL, France) e 1% de suplemento VX (Laborclin. Brasil). As amostras foram estocadas em meio líquido *Brain Heart Infusion* (Difco, EUA) acrescido de 20% de glicerol (Merck, Alemanha), e armazenadas em nitrogênio líquido.

Houve casos em que a amostra recebida se encontrava em meio de transporte Amies. Nesses casos o swab foi utilizado para realizar semeadura em ágar chocolate. Após crescimento as amostras foram selecionadas, identificadas e estocadas conforme descrito.

4.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por disco difusão

Todas as amostras foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por meio da disco difusão para determinação do perfil de susceptibilidade seguindo a padronização recomendada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para este teste foi utilizada como controle a cepa de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226, recomendada pelo CLSI M100. (CLSI, 2019a).

Para a realização deste teste foram utilizadas placas de Petri grandes descartáveis (150 x 15 mm) contendo meio ágar base GC + 1% de suplemento VX (Laborclin. Brasil) com espessura de 4 mm (60 ml). As culturas foram crescidas em meio ágar chocolate e, a partir delas, feitas suspensões correspondentes à escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em meio Mueller Hinton caldo (MHC) (Difco, EUA). As suspensões foram semeadas em três direções diferentes na superfície do meio com o auxílio de um *swab*. Após esse processo, os discos contendo os antimicrobianos azitromicina (15 µg), cefixima (5 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), espectinomicina (100 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 U) e tetraciclina (30 µg) foram depositados no meio de cultura respeitando a distância mínima de centro para centro de 24 mm. As placas foram incubadas a uma temperatura de 35 - 36°C durante 18 - 24 horas em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação foi realizada a leitura dos resultados, sendo registrados os halos de inibição para cada antimicrobiano (The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

Como não encontramos fornecedores para os discos de espectinomicina, estes foram preparados *in house*. Para tanto, 10 µL de solução de espectinomicina a 10 mg/mL foram depositadas em discos estéreis (Cefar, São Paulo). Todos os demais discos contendo antimicrobianos são de preparação comercial (Cefar. São Paulo).

Esta análise foi realizada para que se mantenha a vigilância sobre a susceptibilidade apresentada pelas amostras contemporâneas aos antimicrobianos não mais recomendados como tratamento primário (penicilina, tetraciclina e ciprofloxacina),

para coletar dados de disco difusão que podem ser úteis na triagem de amostras (cefixima e ceftriaxona), e para determinar um banco de dados que permita coletar informações sobre o comportamento de azitromicina, gentamicina e espectinomicina neste sistema.

A tabela 1 mostra os pontos de corte para disco difusão sugeridos pelas agências que foram utilizados nesse projeto.

O ponto de corte utilizado para azitromicina no teste de disco difusão será baseado no estudo feito no LMM em 2016 onde foi sugerido que uma amostra pode ser considerada resistente quando o halo for ≤ 26 mm. Este estudo correlacionou CMI e diâmetros de halos para azitromicina de 56 amostras de *N. gonorrhoeae* e concluiu que um halo ≤ 26 mm para azitromicina é um bom ponto de corte para caracterizar amostras resistentes (Barros dos Santos, 2016).

4.3 Determinação da concentração mínima inibitória a antimicrobianos

Todas as amostras foram submetidas à ágar diluição para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de azitromicina, cefixima, ceftriaxona, espectinomicina e gentamicina. Esse teste foi realizado seguindo a padronização recomendada pelo CLSI (CLSI, 2019a). O EUCAST (2019) não especifica qualquer condição especial para a realização da técnica (EUCAST, 2019b).

Para este teste foi utilizada como controle a cepa de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226, recomendada pelo CLSI M100 (CLSI, 2019a).

Para a realização deste teste foram utilizadas placas de Petri médias descartáveis (90 x 15 mm) contendo meio ágar base GC + 1% de suplemento VX (Laborclin. Brasil) com espessura de 4 mm (20 ml). Para cada antimicrobiano foi preparada uma série de placas com concentrações crescentes do respectivo antimicrobiano e duas placas controle sem adição de antimicrobianos no início e no final da série de placas. As faixas de concentrações utilizadas para cada antimicrobiano estão listadas na Tabela 2.

As culturas utilizadas foram ativadas e repicadas em meio ágar chocolate e, a partir delas, foram feitas suspensões em meio MHC correspondentes à escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). 10 μ L dessa suspensão foram diluídos em 90 μ L de meio MHC (obtendo-se 10^7 UFC/mL) para que 2 μ L desta suspensão corresponda a 10^4

UFCs. Foram aplicados 2 µL de cada amostra em cada uma das placas, seguindo a ordem: controle inicial, placa com menor concentração do antimicrobiano até a com a maior concentração e, por último, o controle final. As placas foram incubadas a uma temperatura de 35 a 36°C durante 18 - 24 horas em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação foi feita a leitura dos resultados, onde a CMI corresponde à menor concentração de antimicrobiano em que não é possível visualizar crescimento bacteriano.

A tabela 3 mostra os pontos de corte para ágar diluição sugeridos pelas agências que foram utilizados nesse projeto.

Segundo o EUCAST o *Epidemiological cut off value* (ECOFF ou ponto de corte epidemiológico) é utilizado quando não há dados clínicos sobre CMIs de microrganismos infecciosos (EUCAST, 2019b). O ECOFF é definido como a CMI mais alta para microrganismos desprovidos de mecanismos de resistência adquiridos que possam ser detectados fenotipicamente. Essa CMI mais alta determina o fim da distribuição das CMIs das amostras consideradas selvagens e, a partir dela, os microrganismos são considerados “não selvagens”; ou seja, engloba amostras que adquiriram algum mecanismo de resistência (EUCAST, 2018a). Já os chamados “*clinical breakpoints*” (pontos de corte clínicos), dividem as amostras em susceptíveis, intermediárias e resistentes. Estes são baseados em observações clínicas, se houve ou não sucesso na terapêutica da infecção, e na correlação destes dados com as CMIs dos microrganismos (EUCAST, 2019).

Visto que para gentamicina não há pontos de corte sugeridos pelo CLSI, EUCAST e BrCAST para *N. gonorrhoeae*, será apenas reportado as concentrações mínimas inibitórias que as amostras apresentaram (BrCAST, 2019b; CLSI, 2019a; EUCAST, 2019b). A termo de discussão será levado em conta o estudo feito no Malawi, já apresentado no tópico 1.5.2., onde os pontos de corte utilizados foram: susceptibilidade ≤ 4 µg/mL; susceptibilidade intermediária = 8 – 16 µg/mL; resistência ≥ 32 µg/mL (Brown *et al.*, 2010). Estes pontos de corte foram baseados em um estudo de cura clínica feito por Daly e colaboradores em 1997 (Daly *et al.*, 1997).

Ainda, as CMIs para azitromicina e gentamicina das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* incluídas neste estudo foi comparada com as CMIs relatadas para amostras coletadas em todo o mundo, disponíveis na ferramenta do EUCAST “*MIC and zone diameter distributions and ECOFF*”

(http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/). Neste link, *N. gonorrhoeae* foi selecionada como “species”, e dados de CMI para os respectivos antimicrobianos foram obtidos da tabela apresentada. Com estes dados foi gerado um gráfico que pôde ser comparado ao construído para as amostras deste estudo. É digno de nota que tais gráficos podem ser também gerados automaticamente no site do EUCAST, selecionando a opção “*show all graphs*”.

Tabela 1 – Pontos de corte para disco difusão adotados neste estudo

Agência	Penicilina (mm)			Tetraciclina (mm)			Ciprofloxacina (mm)			Ceftriaxona (mm)			Cefixima (mm)			Espectinomicina (mm)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
CLSI 2019	≥ 47	46 - 27	≤ 26	≥ 38	31 - 37	≤ 30	≥ 41	28 - 40	≤ 27	≥ 35	-	-	≥ 31	-	-	≥ 18	17 - 15	≤ 14
EUCAST 2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BrCAST (2019b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Azitromicina: R ≤ 26 mm (Barros dos Santos, 2016). Não há ponto de corte definido pelo CLSI, EUCAST e BrCAST para disco difusão de gentamicina.

Tabela 2 – Especificações para a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por ágar diluição

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	Ácido acético glacial	Mueller Hinton Caldo	10	0,640	32 – 0,06
Cefixima	453.45	Sigma 18588	C ₁₆ H ₁₅ N ₅ O ₇ S ₂ · 3H ₂ O	507.50	DMSO	Tampão fosfato pH7 0,1M	0,5	0,08	1 – 0,016
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	1 – 0,016
Espectinomicina	332.25	Sigma S4014-5G	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇ · 2HCl · 5H ₂ O	495.35	Água	Água	10	5,12	128 – 2
Gentamicina	C ₁ : 477.6 C ₂ : 463.6 C _{1a} : 449.5 Média: 464.97	Sigma G1264-1G	C ₁ : C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇ · 5 · H ₂ SO ₄ C ₂ : C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇ · 5 · H ₂ SO ₄ C _{1a} : C ₁₉ H ₃₉ N ₅ O ₇ · 5 · H ₂ SO ₄	955.36	Água	Água	10	0,640	32 – 0,5

^aSolvente e diluyente – Especificados pelo CLSI (M100, Tabela 6A) e/ou pela Sigma-Aldrich; ^b0,016; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 µg/mL

Tabela 3 – Pontos de corte para concentração mínima inibitória adotados neste estudo

Agência	Azitromicina (µg/ml)			Ceftriaxona (µg/ml)			Cefixima (µg/ml)			Espectinomicina (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
CLSI 2019	≤ 1	-	-	≤ 0,25	-	-	≤ 0,25	-	-	≤ 32	64	≥ 128
EUCAST 2019	-	-	ECOFF ^a = 1	≤ 0,125	-	> 0,125	≤ 0,125	-	> 0,125	≤ 64	-	> 64
BrCAST 2019	-	-	ECOFF ^a = 1	≤ 0,125	-	> 0,125	-	-	-	≤ 64	-	> 64

^a ECOFF: *Epidemiological cut off value*. Não há ponto de corte definido pelo CLSI, EUCAST e BrCAST para concentração mínima inibitória de gentamicina.

4.3.1 Preparo das placas com antimicrobianos

Para iniciar o preparo das placas com antimicrobianos deve-se primeiramente estabelecer a faixa de concentração que será utilizada para formar a série de placas. As escolhas dessas faixas foram feitas baseadas nos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI para cada antimicrobiano, buscando abranger os pontos de corte para susceptibilidade e resistência, quando estes estavam disponíveis. Além disso, foi levada também em consideração a distribuição de CMIs dos respectivos antimicrobianos utilizada pelo EUCAST para determinação de ECOFFs; as concentrações adotadas para o preparo das placas do presente abrangiam a maioria das CMIs relatadas neste banco de dados (CLSI, 2019a; EUCAST, 2019c).

Após a determinação da faixa de concentração a ser utilizada nas placas e tomando como referência a Tabela 7 do CLSI M100 (*Preparing dilutions of antimicrobial agents to be used in agar dilution susceptibility tests*, Anexo 1) foi estabelecida a concentração de uma solução-mãe a partir da qual seriam feitas soluções estoques e diluições para incorporação dos antimicrobianos em ágar (CLSI, 2019a). No caso da ceftriaxona, por exemplo, foi preparada uma solução-mãe a 1 mg/mL, que pode facilmente ser diluída a 0,640 mg/mL, dando entrada nas concentrações recomendadas pela Tabela 7 do M100 para a preparação das placas.

No cálculo da quantidade de antimicrobiano a ser pesada para preparar cada solução- mãe foi desconsiderado o peso relativo a moléculas adjuvantes na preparação comercial adquirida (como moléculas de água ou ácido sulfúrico). Na tabela 2 estão descritos os dados utilizados para preparação das placas com antimicrobianos, incluindo valores que basearam os cálculos de antimicrobiano a ser pesado, solventes e diluentes, e a faixa de concentração que foi utilizada na série de placas para cada antimicrobiano.

5. Resultados

Todas as 117 amostras de *N. gonorrhoeae* incluídas neste estudo apresentaram plena susceptibilidade a ceftriaxona, cefixima e espectinomicina. Em relação à ciprofloxacina 75% (n = 88) das amostras foram caracterizadas como não susceptíveis (intermediário e resistentes); das 29 amostras susceptíveis 9 foram coletadas em 2015 e, deste ano em diante, os números de amostras susceptíveis diminuiu (2016, n = 7/27 (26%); 2017, n = 5/26 (19%); 2018, n = 3/20 (15%)). Foram identificadas 115 amostras com perfil intermediário ou resistente a penicilina, representando 98% da coleção. Fato interessante é que as duas amostras susceptíveis a penicilina são de 2017 e 2018. No que diz respeito à tetraciclina, 75% (n = 88) da coleção possui um perfil de resistência ou susceptibilidade intermediária a este antimicrobiano. Todos estes dados estão detalhados na tabela 4.

Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* por disco difusão segundo critérios do CLSI 2019

Antimicrobiano	Perfil de susceptibilidade % (n)		
	Susceptível	Intermediário	Resistente
Cefixima	100 (117)	-	-
Ceftriaxona	100 (117)	-	-
Ciprofloxacina	25 (29)	8 (10)	67 (78)
Espectinomicina	100 (117)	-	-
Penicilina	2 (2)	68 (80)	30 (35)
Tetraciclina	25 (29)	36 (42)	39 (46)

Ponto de corte CLSI 2019 (em mm): Cefixima - S \geq 31; Ceftriaxona - S \geq 35; Ciprofloxacina - S \geq 41, I = 40 – 28, R \leq 27; Espectinomicina - S \geq 18, I = 17 – 15, R \leq 14; Penicilina – S \geq 47, I = 46 – 27, R \leq 26; Tetraciclina - S \geq 38, I = 37 – 31, R \leq 30.

Visto que nenhuma das instituições (BrCAST, CLSI e EUCAST) possui ponto de corte para disco difusão de azitromicina, foi feita uma correlação entre o diâmetro dos halos obtidos no teste de susceptibilidade à azitromicina por disco difusão e a CMI determinada pela ágar diluição para cada uma das 117 amostras da coleção. Na figura 2 a linha azul representa tanto o ponto de corte para CMI de azitromicina sugerido pelo CLSI (S \leq 1 μ g/mL), separando as amostras consideradas sensíveis e resistentes, quanto o ECOFF sugerido pelo EUCAST e BrCAST (ECOFF = 1 μ g/mL). O ECOFF indica a maior concentração de azitromicina que determina o fim da distribuição das CMIs das

amostras consideradas selvagens, ou seja, das amostras que apresentam uma distribuição de CMIs normal dentro de uma grande coleção. Assim, para azitromicina, amostras com CMI $> 1 \mu\text{g/mL}$ são consideradas não-selvagens, fora da distribuição de CMIs considerada normal. A linha vermelha indica a divisão entre amostras consideradas susceptíveis e resistentes segundo o ponto de corte sugerido por Barros dos Santos, 2016. Este estudo correlacionou CMIs e diâmetros de halos para azitromicina para 56 amostras de *N. gonorrhoeae* e concluiu que um halo ≤ 26 mm para azitromicina é um bom ponto de corte para caracterizar amostras resistentes (Barros dos Santos, 2016).

Ao comparar os dados da figura 2 é possível observar a associação entre CMIs de amostras consideradas não selvagens pelo BrCAST e EUCAST e resistentes pelo CLSI, com diâmetros de halos que são menores ou iguais a 26 mm. O mesmo ocorre quando comparadas as CMIs de amostras selvagens (BrCAST e EUCAST)/ susceptíveis (CLSI) com halos maiores que 26 mm. Além disso, quando analisados os quadrantes superior direito e inferior esquerdo do diagrama espera-se que neles não haja nenhuma amostra, pois estas seriam, por exemplo, classificadas como resistentes caso fosse considerado o diâmetro de halo, mas possuindo uma CMI que indica susceptibilidade. Isto significa dizer que amostras que se encontram nestes dois quadrantes possuem uma disparidade entre a classificação dada pelo diâmetro de halo e pela CMI. Quando estes quadrantes se encontram sem nenhuma amostra, ou ainda com um número bem reduzido em relação ao total de amostras analisadas, pode-se dizer que há uma boa correlação na classificação dada tanto pelo diâmetro de halo quanto pela CMI para aquele determinado antimicrobiano e microrganismo.

Quando analisada apenas as CMIs das amostras em relação à azitromicina é possível observar que, ao longo dos anos estudados, houve um aumento na detecção de amostras com perfil de resistência, com exceção de 2018 em que houve uma diminuição do número de amostras com este perfil (tabela 5). Em 2014 e 2015 o percentual de amostras resistentes foi de 14% ($n = 3$, em cada ano), enquanto em 2016 este percentual aumentou para 26% ($n = 7$) e em 2017 para 38% ($n = 10$). Em 2018, este caiu para 30% ($n = 6$), contudo se mantendo alto e sendo maior do que os observados de 2014 a 2016. Considerando a média dos 5 anos contemplados neste estudo o percentual de resistência a azitromicina foi de 24% ($n = 29$). É importante chamar atenção para o fato de que esta é uma coleção de conveniência proveniente de laboratórios de análises clínicas,

podendo assim estar selecionando amostras não responsivas a tratamentos primários utilizados ou pertencentes a camadas sociais específicas da população. Assim, não é possível inferir os dados obtidos para toda a população de infectados no Rio de Janeiro. No entanto, o L IMM recebe amostras desta mesma forma desde 2006, portanto aumentos e diminuições relativas de resistência podem ser indicativas de mudanças no perfil de susceptibilidade das amostras circulando nesta região.

Tabela 5 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* determinados por ágar diluição em relação à azitromicina

CMI Azitromicina ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil de susceptibilidade % (n)					
	2014 (n = 22)	2015 (n = 22)	2016 (n = 27)	2017 (n = 26)	2018 (n = 20)	Total (n = 117)
$\leq 0,061$	27 (6)	23 (5)	15 (4)	15 (4)	25 (5)	20 (24)
0,125	27 (6)	18 (4)	22 (6)	4 (1)	25 (5)	19 (22)
0,25	9 (2)	18 (4)	11 (3)	8 (2)	10 (2)	11 (13)
0,5	18 (4)	23 (5)	11 (3)	23 (6)	5 (1)	16 (19)
1	4 (1)	4 (1)	15 (4)	11 (3)	5 (1)	8 (10)
2	4 (1)	-	4 (1)	15 (4)	10 (2)	7 (8)
4	-	4 (1)	4 (1)	4 (1)	5 (1)	3 (4)
8	-	4 (1)	4 (1)	11 (3)	5 (1)	5 (6)
16	4 (1)	4 (1)	-	-	10 (2)	3 (4)
32	4 (1)	-	11 (3)	8 (2)	-	5 (6)
≥ 32	-	-	4 (1)	-	-	1 (1)

Linha vermelha: CLSI ($S \leq 1 \mu\text{g/mL}$); BrCAST e EUCAST ($\text{ECOFF} = 1 \mu\text{g/mL}$). Esta linha separa amostras selvagens e não selvagens segundo as agências.

Assim como para azitromicina, quando analisado o perfil de susceptibilidade para gentamicina não há ponto de corte disponível para disco difusão para *N. gonorrhoeae* por nenhuma das agências usadas como referência neste trabalho (CLSI, EUCAST e BrCAST e EUCAST). A figura 3 mostra a correlação dos diâmetros de halo obtidos para gentamicina pela disco difusão e as CMI's determinadas por ágar diluição para este mesmo antimicrobiano. Na ausência de pontos de corte definidos, está indicada na tabela a divisão das amostras segundo os pontos de corte para disco difusão sugeridos por Bala e colaboradores (2016; linhas verticais, $S \geq 16 \text{ mm}$, $I = 13-15 \text{ mm}$, $R \leq 12 \text{ mm}$) e para CMI segundo Brown e colaboradores (2010; linhas horizontais; $S \leq 4 \mu\text{g/mL}$, $I = 8-16 \mu\text{g/mL}$, $R \geq 32 \mu\text{g/mL}$).

A figura 3 segue a mesma linha de raciocínio utilizada na figura 2, já explicada anteriormente. Nela é possível observar que a correlação entre os pontos de corte sugeridos por Bala (2016) e Brown (2010) para gentamicina no gonococo não é boa, tendo amostras com diâmetros de halo indicando susceptibilidade (Bala, $S \geq 16$ mm), que apresentam CMI indicando resistência intermediária (Brown, $I = 8-16$ $\mu\text{g/mL}$). O mesmo vale para quando analisamos amostras com diâmetro de halo de resistência (Bala, $R \leq 12$ mm), mas com CMIs que as classificaria como possuindo resistência intermediária (Brown, $I = 8-16$ $\mu\text{g/mL}$).

CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro do halo (mm)																Total	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2		3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	0	1
32																		0
16		1	2	2	4	3	1	3	1	1								18
8	2	2	2	3	9	1	9	9	5	5	6	2	1	2	2	1		71
4				1	1	2	2	4	4	2	2		1		1			20
2										2	1					1		4
1																		0
$\leq 0,5$	1					1						1					1	4
Total	3	3	4	6	4	7	2	6	0	0	9	3	2	2	3	2	1	117

Figura 3 – Diagrama de dispersão da concentração mínima inibitória (CMI) e diâmetro de halo de 117 isolados de *N. gonorrhoeae* em relação à gentamicina. Os números no corpo central do diagrama indicam o número de amostras que apresentou a respectiva combinação de diâmetro de halo e CMI. Linhas azuis indicam pontos de corte sugeridos que diferenciam amostras sensíveis de amostras com resistência intermediária por disco difusão (linha vertical, Bala *et al.*, 2016) e ágar diluição (linha horizontal, Brown *et al.*, 2010); linhas vermelhas indicam pontos de corte sugeridos que diferenciam amostras com resistência intermediária das resistentes segundo as mesmas respectivas técnicas e autores.

Avaliando os resultados deste trabalho, a distribuição das CMIs para gentamicina obtidas com as 117 amostras de *N. gonorrhoeae* coletadas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018 foi semelhante à descrita para 2.767 amostras de diferentes fontes de isolamento, regiões geográficas e períodos de tempo disponíveis no EUCAST (EUCAST, 2019c) (figura 4). Já a distribuição das CMIs para azitromicina obtida com as 117 amostras analisadas no atual estudo foi diferente daquela observada para 3.727 amostras de diferentes fontes de isolamento, regiões geográficas e períodos de tempo disponíveis no EUCAST (figura 5). Levando em consideração o ponto de corte para

azitromicina (CLSI, $S \leq 1 \mu\text{g/mL}$; EUCAST/BrCAST, ECOFF = $1 \mu\text{g/mL}$) 24% ($n = 29$) das amostras obtidas no Rio de Janeiro seriam consideradas não-susceptíveis/ não selvagem, enquanto apenas 2% ($n = 74$) das amostras do EUCAST seriam classificadas assim.

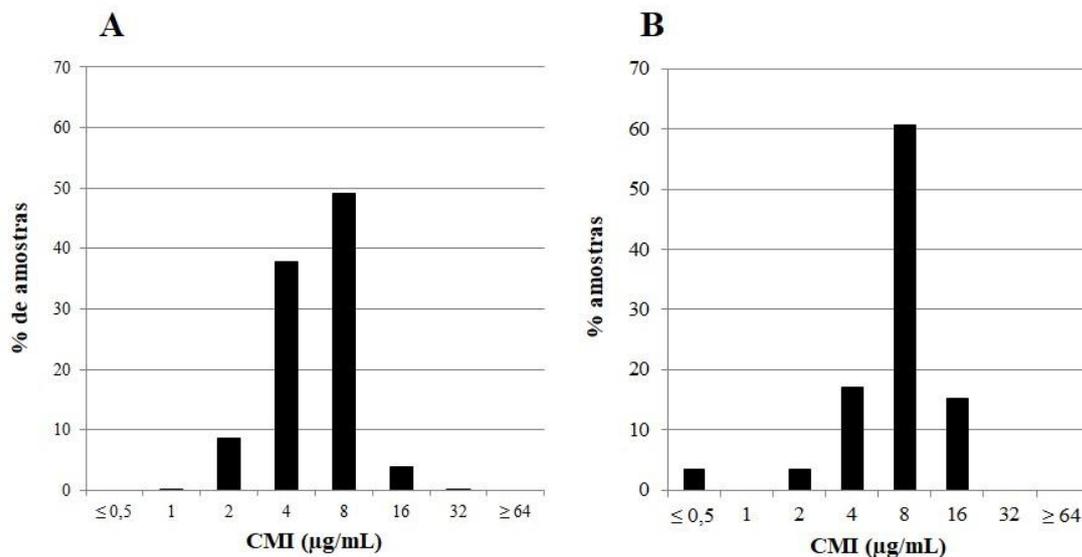


Figura 4 – Distribuição das CMIs de gentamicina de 2.767 amostras de *N. gonorrhoeae* de diferentes fontes de isolamento, regiões geográficas e período de tempo disponíveis no EUCAST (A) e de CMIs de gentamicina das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018 (B) (EUCAST, 2019c).

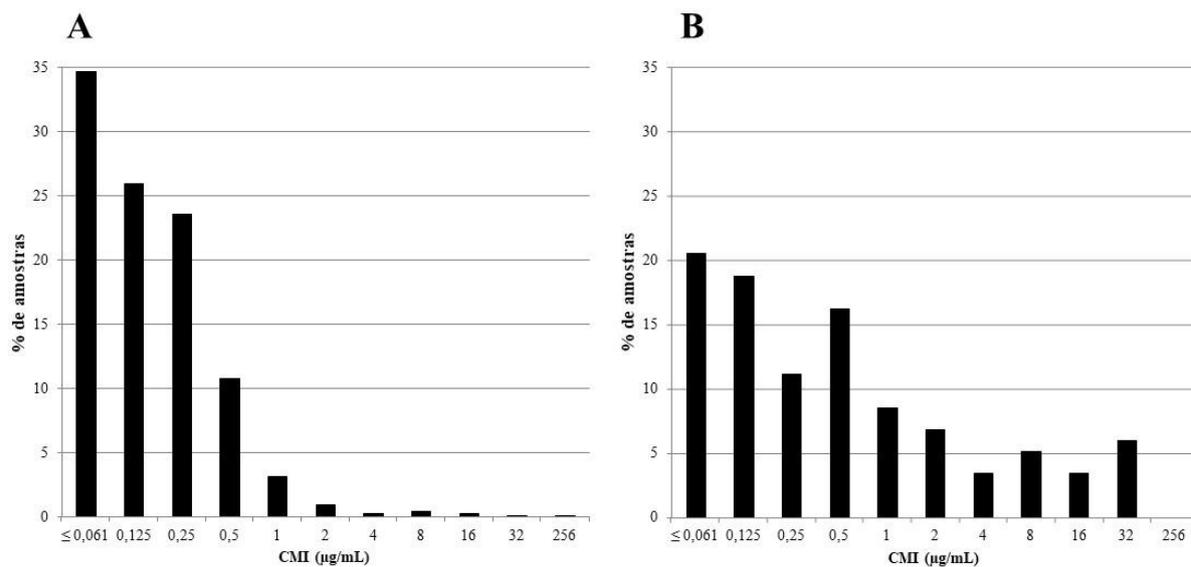


Figura 5 – Distribuição das CMIs de azitromicina de 3.727 amostras de *N. gonorrhoeae* de diferentes fontes de isolamento, regiões geográficas e período de tempo disponíveis no EUCAST (A) e de CMIs de azitromicina das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018 (B) (EUCAST, 2019c).

Todas as 117 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas de 2014 a 2018 apresentaram CMI's na ágar diluição que as caracterizaram como susceptíveis a ceftriaxona, sendo levado em conta os pontos de corte de todas as agências, BrCAST, CLSI e EUCAST. Na tabela 6 a linha azul representa os pontos de corte do BrCAST e EUCAST ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$) e a linha vermelha o ponto de corte do CLSI ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$). Apenas seis amostras apresentaram CMI igual a $0,061 \mu\text{g/mL}$, sendo esta uma diluição abaixo do ponto de corte de susceptibilidade sugerido pelo BrCAST e EUCAST (tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* determinados por ágar diluição em relação à ceftriaxona

CMI Ceftriaxona ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil de susceptibilidade % (n)					
	2014 (n = 22)	2015 (n = 22)	2016 (n = 27)	2017 (n = 26)	2018 (n = 20)	Total (n = 117)
$\leq 0,015$	82 (18)	77 (17)	89 (24)	77 (20)	75 (15)	80 (94)
0,031	9 (2)	18 (4)	11 (3)	19 (5)	15 (3)	15 (17)
0,061	9 (2)	5 (1)	-	4 (1)	10 (2)	5 (6)
0,125	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-

Linha azul: BrCAST e EUCAST ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$).

Linha vermelha: CLSI ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$).

O mesmo pode ser observado quando analisada as CMI's obtidas para as 117 amostras em relação à cefixima e levado em conta o ponto de corte CLSI ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$), sendo todas susceptíveis a cefixima. Entretanto, quando considerado o ponto de corte estabelecido pelo EUCAST ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$) nossos dados levariam à classificação de uma amostra como não-susceptível (CMI = $0,25 \mu\text{g/mL}$) e outras sete amostras como apresentando susceptibilidade reduzida a cefixima (CMI de $0,125 \mu\text{g/mL}$). A tabela 7 retrata estes dados, nela a linha azul representa o ponto de corte do EUCAST ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$) e a linha vermelha o ponto de corte do CLSI ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 7 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* determinados por ágar diluição em relação à cefixima

CMI Cefixima ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil de susceptibilidade % (n)					
	2014 (n = 22)	2015 (n = 22)	2016 (n = 27)	2017 (n = 26)	2018 (n = 20)	Total (n = 117)
$\leq 0,015$	82 (18)	82 (18)	63 (17)	65 (17)	55 (11)	69 (81)
0,031	9 (2)	5 (1)	19 (5)	19 (5)	40 (8)	18 (21)
0,061	-	5 (1)	11 (3)	12 (3)	-	6 (7)
0,125	5 (1)	9 (2)	7 (2)	4 (1)	5 (1)	6 (7)
0,25	5 (1)	-	-	-	-	1 (1)
0,5	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-

Linha azul: EUCAST ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$).

Linha vermelha: CLSI ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$).

A tabela 8 expõe o perfil de susceptibilidade das 117 amostras em relação à espectinomicina. Todos os isolados de *N. gonorrhoeae* apresentaram susceptibilidade a espectinomicina sendo considerados todos os pontos de corte propostos para este antimicrobiano. Nesta tabela a linha azul representa o ponto de corte de susceptibilidade do BrCAST e EUCAST ($S \leq 64 \mu\text{g/mL}$) e a linha vermelha do CLSI ($S \leq 32 \mu\text{g/mL}$). 41% das amostras apresentaram susceptibilidade reduzida quando considerado o ponto de corte do CLSI.

Tabela 8 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das 117 amostras de *N. gonorrhoeae* determinados por ágar diluição em relação à espectinomicina

CMI Espectinomicina ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil de susceptibilidade % (n)					
	2014 (n = 22)	2015 (n = 22)	2016 (n = 27)	2017 (n = 26)	2018 (n = 20)	Total (n = 117)
≤ 2	-	-	-	4 (1)	-	1 (1)
4	-	4 (1)	-	-	-	1 (1)
8	-	-	7 (2)	19 (5)	10 (2)	8 (9)
16	50 (11)	73 (16)	41 (11)	50 (13)	35 (7)	49 (58)
32	50 (11)	23 (5)	52 (14)	27 (7)	55 (11)	41 (48)
64	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-

Linha azul: BrCAST e EUCAST ($S \leq 64 \mu\text{g/mL}$).

Linha vermelha: CLSI ($S \leq 32 \mu\text{g/mL}$).

Considerando o conjunto de resultados obtidos, a Tabela 9 apresenta o perfil de susceptibilidade das amostras que apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos possivelmente utilizados para tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae* e seriam selecionadas para estudos posteriores focados na identificação dos respectivos mecanismos associados. Nesta tabela a amostra resistente a cefixima foi classificada assim segundo o ponto de corte do EUCAST 2019. Com exceção das amostras de 2014, todas estas serão sequenciadas em uma parceria com o CDC, com isso, no futuro será possível avaliar mecanismos de resistência associados à azitromicina e cefixima, dando foco para os mecanismos de maior impacto, sendo respectivamente mutações nos alelos *rrl* (23S rRNA) e o alelo mosaico *penA*.

Tabela 9 – Descrição das amostras de *N. gonorrhoeae* resistentes a algum dos antimicrobianos possivelmente utilizados para o tratamento de gonorreia utilizando como referências pontos de corte do BrCAST, EUCAST e CLSI (2019)

Ano	Origem	Espécime clínico	Sexo	Idade	AZM	CFM	CRO	ESP
2014	IPEC	Sec. uretral	M	-	R	S	S	S
2014	DASA	Sec. vaginal	F	59	R	R	S	S
2014	DASA	Sec. uretral	M	50	R	S	S	S
2015	DASA	Sec. uretral	M	52	R	S	S	S
2015	DASA	Sec. uretral	M	29	R	S	S	S
2015	DASA	Sec. uretral	M	18	R	S	S	S
2016	DASA	Sec. uretral	M	30	R	S	S	S
2016	DASA	Esperma	M	22	R	S	S	S
2016	DASA	Sec. uretral	M	29	R	S	S	S
2016	DASA	Sec. uretral	M	39	R	S	S	S
2016	DASA	Sec. uretral	M	42	R	S	S	S
2016	DASA	Sec. uretral	M	64	R	S	S	S
2016	DASA	Sec. uretral	M	28	R	S	S	S
2017	DASA	Sec. uretral	M	26	R	S	S	S
2017	CSVV	Sec. uretral	M	29	R	S	S	S
2017	DASA	Sec. uretral	M	26	R	S	S	S
2017	DASA	-	M	-	R	S	S	S
2017	DASA	Sec. uretral	M	-	R	S	S	S
2017	DASA	Urina	M	55	R	S	S	S
2017	DASA	Sec. uretral	M	55	R	S	S	S
2017	DASA	Sec. uretral	M	22	R	S	S	S
2017	DASA	Sec. uretral	M	23	R	S	S	S
2017	DASA	Urina	M	36	R	S	S	S
2018	DASA	Sec. uretral	M	27	R	S	S	S
2018	DASA	Sec. uretral	M	21	R	S	S	S
2018	DASA	Sec. uretral	M	32	R	S	S	S
2018	DASA	Sec. uretral	M	23	R	S	S	S
2018	DASA	Urina	M	39	R	S	S	S
2018	FIOCRUZ	Orofaringe	-	-	R	S	S	S

CSVV: Centro de Saúde Vasco Barcelos; DASA: Laboratório de Análises clínicas Sérgio Franco; FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz; IPEC: Instituto Evando Chagas; Sec.: secreção; M: masculino; F: feminino; S: susceptível; R: resistente; AZM: azitromicina; CFM: cefixima; CRO: ceftriaxona; ESP: espectinomicina.

6. Discussão

Neisseria gonorrhoeae, o agente etiológico da infecção sexualmente transmissível gonorreia, é um microrganismo que tem preocupado entidades internacionais devido à disseminação de cepas resistentes a diversos antimicrobianos, correndo o risco de tornar-se intratável, e pela disseminação mundial, visto que esta infecção é a segunda IST bacteriana mais comum no mundo segundo a OMS (WHO, 2016c). Desde a introdução da primeira classe de antimicrobianos, as sulfonamidas, o gonococo tem se mostrado eficiente na aquisição e desenvolvimento de mecanismos de resistência, sendo assim, atualizações nas recomendações de tratamento da gonorreia fazem-se necessárias para acompanhar a evolução do agente etiológico (WHO, 2012, 2016a, 2016c). Para as sulfonamidas, penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, azitromicina e até mesmo a ceftriaxona, que já foram ou são utilizadas para o tratamento de gonorreia, mecanismos de resistência que influenciam na concentração mínima inibitória das cepas e, conseqüentemente, na terapêutica da infecção já foram detectados (Lewis, 2010; Unemo e Shafer, 2014).

O presente estudo incluiu 117 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro entre 2014 e 2018, para as quais foi feita a caracterização do perfil de susceptibilidade através de duas técnicas, uma qualitativa (disco difusão) e uma quantitativa (CMI por ágar diluição). Para fins apenas de comparação foram utilizados os pontos de corte sugeridos por diferentes agências, o BrCAST, CLSI e EUCAST. A maioria dos pontos de corte do CLSI e EUCAST diferem, sendo assim, esta diferença foi explorada. Já em relação ao BrCAST, seus pontos de corte são iguais aos do EUCAST. Quando analisados os perfis de susceptibilidade por meio da disco difusão foram observados percentuais de amostras não susceptíveis (susceptibilidade intermediária + resistentes) à ciprofloxacina e tetraciclina representando 75% (n = 88) da coleção, enquanto para penicilina este valor foi de 98% (n = 115). Estes resultados corroboram os encontrados por Bazzo e colaboradores em um estudo feito com amostras coletadas em capitais de outros sete estados brasileiros, onde foram analisadas 550 amostras isoladas entre 2015 e 2016. Neste estudo nacional foram constatadas, por meio da ágar diluição, altos percentuais de amostras consideradas não susceptíveis a ciprofloxacina (56,1%, n = 309), penicilina (97,5%, n = 536) e tetraciclina (95,8%, n = 527), quando analisadas todas em conjunto (Bazzo *et al.*, 2018).

Ainda considerando o estudo de Bazzo e colaboradores, podemos observar o mesmo em relação à CEE ceftriaxona, onde 100% das amostras em ambos os estudos demonstraram ser plenamente susceptíveis quando utilizado o ponto de corte do CLSI ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, ao utilizar o ponto de corte do EUCAST ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$), o estudo de Bazzo apresentou duas amostras com CMI de $0,125 \mu\text{g/mL}$, uma diluição abaixo daquela que caracteriza a resistência, enquanto no presente estudo as seis amostras com CMI mais próxima deste ponto de corte apresentaram $\text{CMI} = 0,061 \mu\text{g/mL}$, duas diluições abaixo do ponto de corte. Em relação à cefixima, de acordo com o EUCAST ($S \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$), foram detectadas amostras no limite do ponto de corte para sensibilidade ($\text{CMI} = 0,125 \mu\text{g/mL}$) em todas as cidades estudadas por Bazzo e colaboradores, totalizando 6,9% ($n = 38$) do total de amostras da coleção. No presente estudo este percentual foi de 6% ($n = 7$), sendo que em cada ano estudado foi detectada pelo menos uma amostra com este perfil. Comparados com os pontos de corte do CLSI todas as amostras foram consideradas susceptíveis, e apenas uma apresentou CMI próxima do ponto de corte ($S \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$), com $\text{CMI} = 0,25 \mu\text{g/mL}$ (Bazzo *et al.*, 2018). Estas informações demonstram que o perfil de susceptibilidade das amostras do Rio de Janeiro segue um padrão similar às isoladas em outros pontos do Brasil.

Em relação à azitromicina, um estudo feito no LIMM que caracterizou 116 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas de 2006 a 2015 no Rio de Janeiro, constatou um percentual de resistência ($\text{CMI} \geq 2 \mu\text{g/mL}$, referente ao ponto de corte do CLSI e ECOFF do EUCAST e BrCAST) em relação à azitromicina de 17% ($n = 20$) (Costa-Lourenço *et al.*, 2018). O percentual de resistência a azitromicina no atual estudo foi de 24% ($n = 29$), um número bem superior ao detectado no estudo realizado por Bazzo e colaboradores (6,9%; $n = 38$; Bazzo *et al.*, 2018). Sendo assim, ao analisar os dados obtidos em anos anteriores no Rio de Janeiro (Costa-Lourenço *et al.*, 2018) e no estudo nacional (Bazzo *et al.*, 2018), constata-se um aumento proporcional no número de amostras resistentes a este antimicrobiano no Rio de Janeiro nos últimos anos. Outro estudo realizado no LIMM que analisou 93 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas entre 2014 e 2017 no Rio de Janeiro, constatou o surgimento, depois de 2016, de um complexo clonal ligado ao ST1901 que agrupou amostras com CMI para azitromicina variando de 2 a $64 \mu\text{g/mL}$. Até então não havia sido constatada ocorrência clonal de isolados apresentando resistência a azitromicina no Brasil (Barros dos Santos *et al.*, 2019). O ST1901 já se mostrou capaz de desenvolver resistência a altas concentrações

de ceftriaxona e cefixima (CMI 2 – 4 µg/mL) (Unemo *et al.*, 2012). Além disso, vários casos de falhas terapêuticas envolvendo o uso da ceftriaxona e cefixima já foram relacionados a este ST em lugares como França, Suécia, Eslovênia e especialmente no Japão, onde este ST vem sendo detectado há vários anos e onde ele provavelmente surgiu (Unemo e Nicholas, 2012). Os três primeiros estudos citados neste parágrafo e os resultados obtidos no presente projeto, deixam clara a importância de se manter sob vigilância o perfil das amostras de *N. gonorrhoeae* que estão em circulação no Rio de Janeiro, visto que a azitromicina em combinação com a ceftriaxona faz parte da atual recomendação de tratamento feita pelo Ministério da Saúde (CONITEC, 2018). Em lugares como Austrália, Canadá, Europa e EUA a recomendação de tratamento é a mesma do Brasil: terapia combinada de ceftriaxona e azitromicina. Em todos estes locais há um programa de vigilância de susceptibilidade a antimicrobianos no gonococo em andamento, onde uma rede de laboratórios ou clínicas especializadas em IST contribuem com amostras para estudos integrados de vigilância e manutenção da recomendação de tratamento atualizada. Tais programas têm registrado um aumento na detecção de amostras resistentes a azitromicina depois que seu uso foi implantado (Costa-Lourenço *et al.*, 2017b; AGSP *et al.*, 2019; CDC, 2019a; ECDC *et al.*, 2019; Public Health Agency of Canada, 2019). A análise feita na Austrália em 2017 observou que desde 2014, quando a recomendação de tratamento citada acima foi estabelecida, houve uma diminuição na proporção de amostras com CMI elevada para ceftriaxona, mas, em compensação, ocorreu um aumento no número de amostras resistentes a azitromicina (AGSP *et al.*, 2019).

Apesar de todas as 117 amostras de *N. gonorrhoeae* serem susceptíveis a espectinomicina tanto pela disco difusão quanto pela ágar diluição, 41% (n = 48) apresentaram susceptibilidade reduzida (CMI = 32 µg/mL) quando levado em consideração o ponto de corte do CLSI ($S \leq 32$ µg/mL). Um estudo que determinou a CMI de espectinomicina por ágar diluição de 201 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas entre 2011 e 2012 em Minas Gerais, Brasil, relatou que todas as amostras eram susceptíveis a espectinomicina, considerando o mesmo ponto de corte citado acima (Costa *et al.*, 2013). Ainda que em 2006 o Ministério da Saúde tenha escolhido a espectinomicina como parte da recomendação de tratamento da gonorreia, ela era a segunda opção e nunca fez parte da primeira linha de tratamento (Ministério da Saúde, 2006). Atualmente, também faz parte das recomendações do CDC, que indica seu uso

como uma alternativa, e da OMS, que preconiza seu uso em monoterapia para tratar infecções gonocócicas urogenitais e anorretais, conjuntivite gonocócica neonatal e, em combinação com a azitromicina, em casos de falha terapêutica (WHO, 2016c; CDC, 2018). Além disso, o nível mundial de susceptibilidade a este antimicrobiano é alto e os casos de amostras resistentes têm sido raros nas últimas décadas (Lee *et al.*, 2015; Unemo, del Rio e Shafer, 2016).

Os dados levantados no presente projeto demonstram a possibilidade do uso bem-sucedido de espectinomicina para o tratamento de gonorreia no Rio de Janeiro e estabelece um ponto de partida para monitoramento de mudanças na CMI desta droga após sua introdução no tratamento.

Quanto à cefixima, o fato de ser administrada por via oral pode ser um atrativo para seu uso substituindo a ceftriaxona. Entretanto, fazer uso da cefixima pode não ser apropriado. A experiência do Japão sugere que *N. gonorrhoeae* desenvolve mais facilmente resistência a cefixima de que a ceftriaxona, fenômeno que pode favorecer um *MIC creep* para este antimicrobiano (Shimuta *et al.*, 2015; Unemo, del Rio e Shafer, 2016). De fato, entre as 117 amostras avaliadas no presente estudo, em 24 a CMI foi mais alta para cefixima do que para ceftriaxona, e em apenas 6 amostras a CMI de ceftriaxona foi maior do que a para cefixima (77 amostras apresentaram CMI para ambos antimicrobianos abaixo da menor diluição testada, o que inviabiliza a comparação) (Anexo 2). Além disso, já foram detectadas amostras com susceptibilidade reduzida a cefixima tanto no Rio de Janeiro (a primeira isolada em 2010, com novos casos até os dias atuais), como em outras regiões do Brasil (Belo Horizonte, Distrito Federal, Manaus, Salvador, Santa Catarina e São Paulo) detectadas em 2015 e 2016 (Costa-Lourenço *et al.*, 2017b; Bazzo *et al.*, 2018). Sendo assim, a introdução de cefixima como a cefalosporina de escolha para tratamento de gonorreia é uma boa opção do ponto de vista da facilidade de dispensação e conforto para os pacientes, mas exigira uma maior vigilância com relação ao perfil de susceptibilidade das amostras brasileiras (Costa-Lourenço, 2017; Bazzo *et al.*, 2018).

BrCAST, CLSI e EUCAST não possuem ponto de corte para gentamicina. Os dados obtidos no presente estudo, salvo a limitação de que tenha sido avaliada uma pequena coleção, mostram que não há boa correlação entre diâmetro de halo e CMI para gentamicina no gonococo. Provavelmente este é um dos motivos pelos quais as agências não determinam um ponto de corte para este antimicrobiano. Ratificando esta

dificuldade há ainda uma grande diferença na interpretação de resultados se seguidos os pontos de corte atualmente sugeridos na literatura. Nesta coleção, por exemplo, se utilizados os pontos de corte para disco difusão propostos (Bala *et al.*, 2016), 6 amostras seriam caracterizadas como resistentes (5%) e 24 amostras como apresentando resistência intermediária (20%). Em contraste, adotados os pontos de corte para CMI utilizados por Brown e colaboradores (2010), nenhuma das amostras analisadas neste estudo seria caracterizada como resistente, mas 76% (n = 89) seriam classificadas como apresentando susceptibilidade intermediária, e apenas 24% (n = 28) como susceptíveis.

Vale ressaltar que até recentemente, não havia relatos de resistência clínica à gentamicina em *N. gonorrhoeae* (Ross e Lewis, 2012). Num dos estudos a respeito, o CDC obteve uma taxa de cura de infecções gonocócicas urogenitais de 100% (202 participantes) quando utilizada a terapia combinada usando gentamicina 240 mg (IM) e azitromicina 2 g (VO) (Kirkcaldy, 2013). Também, três estudos feitos no Malawi, país da África oriental, demonstraram a eficácia do uso da gentamicina por praticamente 14 anos. No entanto, o tratamento utilizado no Malawi é baseado em dose única de gentamicina 240 mg (IM) e duas doses de doxiciclina 100 mg por dia durante 7 dias; um tratamento mais complicado quando comparado ao atual praticado no Brasil (uma única dose de ceftriaxona 500 mg (IM) e 1 g de azitromicina consumido como 2 comprimidos de 500 mg (Lule *et al.*, 1994; Daly *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2010; CONITEC, 2018). Em 2018, a gentamicina foi utilizada com sucesso no Canadá em um paciente com uretrite causada por *N. gonorrhoeae* resistente a ceftriaxona (CMI = 1 µg/mL). Este paciente foi tratado uma vez com ceftriaxona 250 mg (IM) e azitromicina 2 g (VO), mas a infecção foi recorrente e ele foi novamente tratado com estes antibióticos. Após determinarem que se tratava de uma amostra resistente à CEE, o paciente foi tratado com gentamicina 240 mg (IM) e azitromicina 2 g (VO). Os testes para detecção de *N. gonorrhoeae* feitos 4 semanas após este tratamento deram negativo (Berenger *et al.*, 2019).

No entanto, em um artigo publicado no Reino Unido em 2019, Eyre e colaboradores, (2019) relataram falha terapêutica em uma paciente tratada primeiramente com 1 g ceftriaxona (IM) e, em uma segunda abordagem com 240 mg de gentamicina (IM) associada a 2 g de azitromicina (VO). A remissão de sintomas nesta paciente só foi possível após tratamento com ertapenem 1 g (IV) 1 vez por dia, durante 3 dias. A bactéria foi identificada como geneticamente relacionada ao clone FC428, que

já foi isolado em vários continentes e é frequentemente descrito como resistente a ceftriaxona e com resistência intermediária a azitromicina. De fato, a amostra apresentava CMI 1 $\mu\text{g/mL}$ para ceftriaxona e $> 32 \mu\text{g/mL}$ para ciprofloxacina. No entanto, ratificando a dificuldade de estabelecimento de pontos de corte coerentes com a clínica médica, esta amostra apresentava CMI para azitromicina 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e para gentamicina 4 $\mu\text{g/mL}$. Estes seriam, conforme os pontos de corte atualmente propostos, consideradas selvagem para azitromicina e sensível para gentamicina. A pesquisa de mecanismos de resistência nesta amostra identificou *penA* modificado contendo, entre outras, as mutações A311V e T483S, consideradas definitivas para resistência a CEE; e mutações em *gyrA* (S91F e D95A) e *parC* (S87R). No que diz respeito a azitromicina não foram identificadas de mutações nos alelos de 23S, mas uma deleção -35A no promotor de *mtrR*. Não foram descritos mecanismos possivelmente associados à não-susceptibilidade clínica a gentamicina relatada.

A gonorreia é uma IST que possui tratamento sintomático, ou seja, o tratamento é feito baseado nos sintomas apresentados pelo paciente, sem que seja feito o isolamento do agente etiológico e o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Por isso a vigilância epidemiológica, especialmente sobre o perfil de susceptibilidade das amostras que estão circulando no país, é tão importante. As recomendações de tratamento se baseiam em evidências epidemiológicas. Um exemplo foi a atualização na recomendação de tratamento de gonorreia em 2017, motivada por taxas de resistência a ciprofloxacina acima de 50% em todo o país (Ministério da Saúde, 2017). Outro aspecto importante para o monitoramento da doença no país seria a obtenção de um maior número de dados dos pacientes afetados. Com dados epidemiológicos é possível realizar uma caracterização mais precisa das coleções de amostras, saber se a infecção é mais prevalente em algum grupo específico de indivíduos, entender rotas de transmissão e traçar melhores estratégias para campanhas de prevenção.

O Brasil é um país de grande extensão territorial, e que tem por princípio tratar ISTs em unidades básicas de saúde, não necessariamente vinculadas a clínicas especializadas. A pulverização dos pacientes em muitos postos de atendimento associada à dificuldade de manutenção e isolamento do microrganismo dificulta o estabelecimento de um programa de vigilância. Além disso, em um país tão grande e tão diverso, os padrões observados nos atuais estudos (feitos em capitais) podem não refletir o que ocorre no país como um todo. Como exemplo, o relatório feito pelo

programa de vigilância da susceptibilidade do gonococo na Austrália em 2017 detectou diferentes perfis de susceptibilidade das amostras dependendo da região estudada. Foi observado que apesar de haver um maior número de casos de gonorreia nas regiões remotas, o percentual de resistência aos antimicrobianos entre estes isolados foi baixa. Em contraste, nas regiões mais populosas (Victoria, New South Wales e Queensland) foi observado o contrário: os percentuais de resistência aos antimicrobianos foram maiores, porém, havia menor incidência da infecção (AGSP *et al.*, 2019). É possível que no Brasil haja divergências do tipo que, se fossem identificadas, poderiam contribuir para uma mais refinada política de tratamento para os pacientes.

Este estudo coletou dados detalhados de susceptibilidade em amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas por laboratórios de análises clínicas no Rio de Janeiro, considerando antimicrobianos antigos, atualmente recomendados e possivelmente utilizados em futuros protocolos de tratamento. Os resultados confirmam a necessidade do uso de cefalosporinas para o tratamento da doença no Rio de Janeiro e chama atenção para a emergência da resistência a azitromicina nestas amostras. Ainda, CMIs estabelecidas para cefixima, espectinomicina e gentamicina estabelecem uma referência para o perfil de susceptibilidade destas amostras antes da eventual introdução de tais antimicrobianos para o tratamento de gonorreia. Espera-se que sejam úteis para o monitoramento da evolução deste perfil em anos futuros.

7. Conclusão

A partir dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que, assim como observado em diversos países, no Rio de Janeiro as taxas de amostras resistentes a ciprofloxacina, penicilina e tetraciclina são altas, todas acima de 75%.

No Brasil a azitromicina permanece sendo parte da recomendação de tratamento da gonorreia, mas observa-se um aumento no número proporcional de amostras resistentes a este antimicrobiano no Rio de Janeiro nos últimos anos. Ainda no que diz respeito à política de tratamento vigente, todas amostras de *N. gonorrhoeae* analisadas neste estudo demonstraram possuir susceptibilidade à ceftriaxona. Uma amostra foi identificada como resistente a cefixima, mas não a ceftriaxona, segundo os critérios do EUCAST, o que chama atenção para as diferenças de classificação por estas agências.

Com relação a antimicrobianos considerados possíveis futuras terapias para gonorreia a espectinomicina demonstrou bom potencial para fazer parte da recomendação de tratamento, sendo todas as amostras susceptíveis a ela. No entanto, para gentamicina, mais de 50% das amostras tinham CMI próxima do ponto de corte de resistência atualmente sugerido na literatura. Estas amostras, contudo, apresentavam um perfil de CMI semelhante ao descrito para uma grande coleção de amostras pelo EUCAST.

8. Referências Bibliográficas

- Abrams, A.J., Kirkcaldy, R.D., Pettus, K., Fox, J.L., Kubin, G., e Trees, D.L. (2017) A case of decreased susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* in the absence of a mosaic penicillin-binding protein 2 (*penA*). Allele. Sex Transm Dis. 44, 492–494.
- AGSP, Lahra, M.M., Enriquez, R., e George, C.R.R. (2019) Australian gonococcal surveillance programme annual report, 2017. Commun Dis Intell. 43.
- ANVISA. (2019) Sulfato de gentamicina. Obtido em 4 de novembro de 2019, de <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351240244201640/>
- Ashford, W.A., Adams, H.J.U., Johnson, S.R., Thornsberry, C., Potts, D.W., English, J.C., Biddle, J.W., e Jaffe, H.W. (1981) Spectinomycin-resistant penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet. 2, 1035-1037
- Baarda, B.I., e Sikora, A.E. (2015) Proteomics of *Neisseria gonorrhoeae*: the treasure hunt for countermeasures against an old disease. Front Microbiol. 6, 1190
- Bala, M., Singh, V., Philipova, I., Bhargava, A., Chandra Joshi, N., e Unemo, M. (2016) Gentamicin in vitro activity and tentative gentamicin interpretation criteria for the CLSI and calibrated dichotomous sensitivity disc diffusion methods for *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother, 71, 1856–1859.
- 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.
- Barros dos Santos, K.T. (2018) *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a azitromicina isoladas no Rio de Janeiro: detecção, mecanismos moleculares associados e diversidade clonal. Dissertação (Mestrado em Ciências: Microbiologia). Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 85f.
- Barros dos Santos, K.T., Skaf, L.B., Justo-da-Silva, L.H., Medeiros, R.C., Francisco Junior, R. da S., Caniné, M.C.A., Fracalanza, S E.L., e Bonelli, R.R. (2019) Evidence for clonally associated increasing rates of azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Rio de Janeiro, Brazil. BioMed Res Int, 2019, 3180580.
- Bastos, L.F.C.S. (2017) OPAS/OMS Brasil - A resistência da gonorreia a antibióticos está em ascensão e são necessários novos medicamentos | OPAS/OMS. Pan American Health Organization / World Health Organization. Obtido em 18 de junho de 2019, de https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5456:a-resistencia-da-gonorreia-a-antibioticos-esta-em-ascensao-e-sao-necessarios-novos-medicamentos&Itemid=812
- Bazzo, M.L., Golfetto, L., Gaspar, P.C., Pires, A.F., Ramos, M.C., Franchini, M., Ferreira, W.A., Unemo, M., Benzaken, A.S., Brazilian-GASP Network, Andrade, L.F., Arnhold, G.H.O., Bazzo, M.L., Benzaken, A.S., Carvalho, S.V.F., Costa, L.M.B., Costa, M.R.R., de Matos, R.B., Dias, L.G., Eidt, L., Ferreira, W.A., Franchini, M., Gaspar, P.C., Gerbase, A.C., Golfetto, L., Gomes, J.S., Lannoy, L.H., Machado, H.M., Martins, J.M., Muniz, C.A.S.C., Pereira, L.F.M., Pires, A.F., Porto, C.C., Ramos, M.C., Rocco, F., Santos, T.M., Schörner, M.A., Silva, M.F.P., Silva, M.P.P., Carvalho da Silva, R.J., Timm, L.N., Vasconcelos, W.S., e Zoccoli, C.M. (2018) First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015–16. J Antimicrob Chemother. 73, 1854-1861.
- 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 azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013-14. J Antimicrob Chemother. 71, 2471–2478.
- Berenger, B. M., Demczuk, W., Gratrix, J., Pabbaraju, K., Smyczek, P., & Martin, I. (2019). Genetic characterization and enhanced surveillance of ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain, Alberta, Canada, 2018. Emerg Infect Dis. 25, 1660-1667.
- Boslego, J.W., Tramont, E.C., Takafuji, E.T., Diniega, B.M., Mitchell, B.S., Small, J.W., Khan, W.N., e Stein, D.C. (1987) Effect of spectinomycin use on the prevalence of spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. N Engl J Med, 317, 272–278.

- BrCAST (2019a) BrCAST. Obtido de <http://brcast.org.br/missao-e-objetivo/>
- BrCAST (2019b) Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Obtido de <http://brcast.org.br/>
- Brown, L.B., Krysiak, R., Kamanga, G., Mapanje, C., Kanyamula, H., Banda, B., Mhango, C., Hoffman, M., Kamwendo, D., Hobbs, M., Hosseinipour, M.C., Martinson, F., Cohen, M.S., e Hoffman, I.F. (2010) *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi, 2007. *Sex Transm Dis.* 37, 169–172.
- 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 (1989) 1989 Sexually transmitted diseases treatment guidelines. Obtido em 1 de junho de 2017, de <https://www.cdc.gov/mmwr//preview/mmwrhtml/00001459.htm>
- CDC (2007) Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *Ann Emerg Med.* 50, 232–234.
- CDC (2014) Gonorrhea - CDC Fact Sheet. Obtido em 21 de maio de 2019, de <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/stdfact-gonorrhea.htm>
- CDC (2018) Gonococcal infections - 2015 STD treatment guidelines. Obtido em 6 de agosto de 2018, de <https://www.cdc.gov/std/tg2015/gonorrhea.htm>
- CDC (2019a) Sexually transmitted disease surveillance 2017: gonococcal isolate surveillance project (GISP) supplement & profiles. Obtido em 22 de novembro de 2019, de https://www.cdc.gov/std/stats17/gisp2017/docs/gisp_2017_supplement_final_2019.pdf
- CDC (2019b) The biggest antibiotic-resistant threats in the U.S. *Centers for Disease Control and Prevention*. Obtido em 10 de dezembro de 2019, de <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- Chalkley, L.J., Janse van Rensburg, M.N., Mathee, 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, S.A., Neal, T.J., Alawattagama, A.B., Birley, H.D.L., Howe, R.A., e Ison, C.A. (2009) Emergence of high-level azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 64, 353–358.
- Chisholm, S.A., Dave, J., e Ison, C.A. (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, 3812–3816.
- Chisholm, Stephanie A., Mouton, J.W., Lewis, D.A., Nichols, T., Ison, C.A., e Livermore, D.M. (2010) Cephalosporin MIC creep among gonococci: time for a pharmacodynamic rethink? *J Antimicrob Chemother.* 65, 2141–2148.
- Chopra, I., e Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol mol biol rev.* 65, 232-260.
- CLSI (2018) M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing
- CLSI (2019a) M100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- CLSI (2019b) About CLSI: Who we are. *Clinical & Laboratory Standards Institute*. Obtido 26 de novembro de 2019, de <https://clsi.org/about/about-clsi/>
- CLSI (2019c) CLSI antimicrobial susceptibility testing (AST) standards. *Clinical & Laboratory Standards Institute*. Obtido em 26 de novembro de 2019, de <https://clsi.org/meetings/ast/>
- 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, L.M.B., Pedroso, E.R.P., Vieira Neto, V., Souza, V.C.P., e Teixeira, M.J.B. (2013) Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 46, 304–309.

Costa-Lourenço, A.P.R. (2017) Resistência a antimicrobianos e filogenia e amostras de *Neisseria gonorrhoeae* obtidas na cidade do Rio de Janeiro entre 2006 e 2015. Dissertação (Doutorado em Ciências: Microbiologia). Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 71f.

Costa-Lourenço, A.P.R., Abrams, J.A., Barros dos Santos, K.T., Coelho-Souza, T., Moreira, B.M., Fracalanza, S.E.L., Trees, D.L., e Bonelli, R.R. (2017a) Reduced susceptibility to cefixime but not ceftriaxone: an uncertain perspective for the treatment of gonorrhoea in Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 49, 515–516.

Costa-Lourenço, A.P.R., Santos, K.T.B., Fracalanza, S.E.L., Moreira, B.M., e Bonelli, R.R. (2017b) 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, 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.

Daly, C.C., Hoffman, I., Hobbs, M., Maida, M., Zimba, D., Davis, R., Mughogho, G., e Cohen, M.S. (1997) Development of an antimicrobial susceptibility surveillance system for *Neisseria gonorrhoeae* in Malawi: comparison of methods. *J Clin Microbiol.* 35, 2985–2988.

Day, M.J., Spiteri, G., Jacobsson, S., Woodford, N., Amato-Gauci, A.J., Cole, M.J., Unemo, M., e Euro-GASP network. (2018) Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC infect dis.* 18, 609.

Easmon, C.S., Forster, G.E., Walker, G.D., Ison, C.A., Harris, J.R., e Munday, P.E. (1984) Spectinomycin as initial treatment for gonorrhoea. *Br Med J (Clin Res Ed.)*, 289, 1032–1034.

ECDC, Cowan, S., Hoffmann, S., Epstein, J., Viktorova, J., Ndeikoundam, N., Bercot, B., Kohl, P., Buder, S., Bremer, V., Jansen, K., Tzelepi, E., Raftopoulos, V., Balla, E., Dudás, M., Sigmundsdóttir, G., Hauksdóttir, G.S., Asmundsdóttir, L.R., Colgan, A., Igoe, D., Crowley, B., Suligoj, B., Stefanelli, P., Pakarna, G., Mavcutko, V., Perrin, M., Hoffmann, P., Cassar, R., Barbara, C., Vella, F., Melillo, J.M., Kløvstad, H., Steinbakk, M., Majewski, S., Mlynarczyk-Bonikowska, B., Azevedo, J., Borrego, M.J., Pavlik, P., Truska, P., Klavs, I., Jeverica, S., Vazquez, J., Diaz, A., Torreblanca, R.A., Velicko, I., Unemo, M., Soteriou, S., e Pieridou, D. (2019) Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe – Results summary 2017. 24.

Edwards, J.L., e Butler, E.K. (2011) The Pathobiology of *Neisseria gonorrhoeae* Lower Female Genital Tract Infection. *Front Microbiol.* 2, 102.

EUCAST. (2018a) EUCAST General consultation on “Considerations in the numerical estimation of epidemiological cutoff (ECOFF) value”. Obtido de http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/2018/ECOFF_procedure_2018_General_Consultation_20180531.pdf

EUCAST (2018b) EUCAST: clinical breakpoints.

EUCAST (2019a) EUCAST: EUCAST. Obtido 27 de novembro de 2019, de <http://www.eucast.org/>

EUCAST (2019b) Breakpoint tables for interpretation of MICs zone diameters.

EUCAST (2019c) Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Obtido 28 de março de 2019, de

<https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micid=f=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=169>

EUCAST (2019d) – EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cutt-off values. Obtidos em 13 de dezembro de 2019, de

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_definitions_of_clinical_breakpoints_and_ECOFFs.pdf

- Euzéby, J. P. (2019) List of prokariotic names with standing in nomenclatures. Obtido de <http://www.bacterio.net/>
- Eyre, D.W., Town, K., Street, T., Barker, L., Sanderson, N., Cole, M.J., Mohammed, H., Pitt, R., Gobin, M., Irish, C., Gardiner, D., Sedgwick, J., Beck, C., Saunders, J., Turbitt, D., Cook, C., Phin, N., Nathan, B., Horner, P., e Fifer, H. (2019) Detection in the United Kingdom of the *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, October to December 2018. Euro Surveill. 24, 1900147.
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., e Vila, J. (2009) Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb biotechnol. 2, 40–61.
- Fedarovich, A., Cook, E., Tomberg, J., Nicholas, R.A., e Davies, C. (2014) Structural effect of the Asp345a insertion in penicillin-binding protein 2 from penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Biochemistry. 53, 7596–7603.
- Ferreira, W., de Souza Vasconcelos, W., Souza Gomes, J., de Fátima Pinto da Silva, M., e Ferreira, C. (2015) Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to gentamicin, chloramphenicol and other antibiotics in Manaus, Amazon, Brazil. J Bras Doenças sex transm. 27, 58–60.
- Galarza, P.G., Alcalá, B., Salcedo, C., Canigia, L.F., Buscemi, L., Pagano, I., Oviedo, C., e Vázquez, J.A. (2009) Emergence of high level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain isolated in Argentina. Sex Transm Dis. 36, 787–788.
- Galimand, M., Gerbaud, G., e Courvalin, P. (2000) Spectinomycin Resistance in *Neisseria* spp. Due to Mutations in 16S rRNA. Antimicrob Agents Chemother. 44, 1365–1366.
- Gallagher, J.C., e MacDougall, C. (2017) *Antibiotics Simplified*. In: Part 2: Antibacterial drugs. 4th. (Jones & Bartlett Learning), 57-148.
- Gascoyne-Binzi, D.M., Heritage, J., e Hawkey, P.M. (1993) Nucleotide sequences of the tet(M) genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 32, 667–676.
- Giles, J.A., Falconio, J., Yuenger, J.D., Zenilman, J.M., Dan, M., e Bash, M.C. (2004) Quinolone resistance-determining region mutations and por type of *Neisseria gonorrhoeae* isolates: resistance surveillance and typing by molecular methodologies. J Infect Dis. 189, 2085–2093.
- 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.
- Goire, N., Lahra, M.M., Chen, M., Donovan, B., Fairley, C.K., Guy, R., Kaldor, J., Regan, D., Ward, J., Nissen, M.D., Sloots, T.P., e Whiley, D.M. (2014) Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance. Nat Rev Microbiol. 12, 223–229.
- Hooper, D.C. (2001) Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 32, S9–S15.
- Hu, M., Nandi, S., Davies, C., e Nicholas, R.A. (2005) High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rpsJ* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother. 49, 4327–4334.
- Ilina, E.N., Malakhova, M.V., Bodoev, I.N., Oparina, N.Y., Filimonova, A.V., e Govorun, V.M. (2013) Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Front Microbiol. 4, 186.
- Imprensa Nacional. (2018) PORTARIA N° 64, DE 11 DE DEZEMBRO DE 2018 - Imprensa Nacional. Obtido em 27 de novembro de 2019, de <http://www.in.gov.br/materia>
- Ito, M., Yasuda, M., Yokoi, S., Ito, S., Takahashi, Y., Ishihara, S., Maeda, S., e Deguchi, T. (2004) Remarkable increase in central Japan in 2001-2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to penicillin, tetracycline, oral cephalosporins, and fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 48, 3185–3187.

- Ito, M., Deguchi, T., Mizutani, K.S., Yasuda, M., Yokoi, S., Ito, S.I., Takahashi, Y., Ishihara, S., Kawamura, Y., e Ezaki, T. (2005) Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 137–143.
- IUSTI/WHO (2012) 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. Obtido de https://iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/Gonorrhoea_2012.pdf
- Johnson, S.R., e Morse, S.A. (1988) Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: genetics and mechanisms of resistance. *Sex Transm Dis.* 15, 217–224.
- Judson, F.N., Ehret, J.M., e Handsfield, H.H. (1985) Comparative study of ceftriaxone and spectinomycin for treatment of pharyngeal and anorectal gonorrhea. *JAMA.* 253, 1417–1419.
- Kampmeier, R.H. (1983) Introduction of sulfonamide therapy for gonorrhea. *Sex Transm Dis.* 10, 81–84.
- Kirkcaldy, R.D. (2013) Treatment of gonorrhoea in an era of emerging cephalosporin resistance and results of a randomised trial of new potential treatment options. *SexTransm Infect.* 89, A14–A15.
- Knapp, J.S., e Clark, V.L. (1984) Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction. *Infect Immun.* 46, 176–181.
- Lee, H., Unemo, M., Kim, H.J., Seo, Y., Lee, K., e Chong, Y. (2015) Emergence of decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 70, 2536–2542.
- Lee, H., Suh, Y.H., Lee, S., Kim, Y.K., Han, M.S., Bae, H.G., Unemo, M., e Lee, K. (2019) Emergence and Spread of Cephalosporin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* with Mosaic *penA* Alleles, South Korea, 2012–2017. *Emerg Infect Dis.* 25, 416–424.
- Lewis, D.A. (2010) The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *SexTransm Infect.* 86, 415–421.
- Lule, G., Behets, F.M., Hoffman, I.F., Dallabetta, G., Hamilton, H.A., Moeng, S., Liomba, G., e Cohen, M.S. (1994) STD/HIV control in Malawi and the search for affordable and effective urethritis therapy: a first field evaluation. *Genitourin Med* 70, 384–388.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., e Monnet, D.L. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18, 268–281.
- Meyer, T. F. (1999) Pathogenic *Neisseriae*: complexity of pathogen-host cell interplay. *Clin Infect Dis.* 28, 433–441.
- Ministério da Saúde (2006) Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis. Obtido de http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_controle_das_dst.pdf
- Ministério da Saúde (2017) NOTA INFORMATIVA Nº 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/.DIAHV/SVS/MS. Obtido em https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/112254/mod_resource/content/1/SEI_25000.429872_2017_33.pdf
- Ministério da saúde (2018) Audiência pública sobre produção de medicamentos contra gonorreia conta com participação de apenas um laboratório. Obtido de <http://www.aids.gov.br/pt-br/noticias/audiencia-publica-sobre-producao-de-medicamento-contra-gonorreia-counta-com-participacao-de>
- 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.
- Morse, S.A., Johnson, S.R., Biddle, J.W., e Roberts, M.C. (1986) High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* 30, 664–670.

- Mubaiwa, T.D., Semchenko, E.A., Hartley-Tassell, L.E., Day, C.J., Jennings, M.P., e Seib, K.L. (2017) The sweet side of the pathogenic *Neisseria*: the role of glycan interactions in colonisation and disease. *Pathog Dis.* 75.
- 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., Watanabe, Y., Ono, E., Takahashi, C., Oya, H., Kuroki, T., Shimuta, K., Okazaki, N., Nakayama, S., e Watanabe, H. (2010) Spread of a chromosomal cefixime-resistant *penA* gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 1060–1067.
- 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.
- Olesky, M., Hobbs, M., e Nicholas, R.A. (2002) Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 2811–2820.
- Palmer, H.M., Young, H., Winter, A., e Dave, J. (2008) Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. *J Antimicrob Chemother.* 62, 490–494.
- Public Health Agency of Canada. (2019) National surveillance of antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Canada: annual summary 2017. Obtido em 22 de novembro de 2019, de <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/national-surveillance-antimicrobial-susceptibilities-neisseria-gonorrhoeae-annual-summary-2017.html>
- PubMLST (2019) NG MAST. Obtido em 23 de junho de 2019, de https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_neisseria_seqdef&page=downloadAlleles&scheme_id=67&render=1
- Reyn, A., Schmidt, H., Trier, M., e Bentzon, M.W. (1973) Spectinomycin hydrochloride (Trobicin) in the treatment of gonorrhoea. Observation of resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *SexTransm Infect.* 49, 54–59.
- Ropp, P.A., Hu, M., Olesky, M., e Nicholas, R.A. (2002) Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 769–777.
- Ross, J.D.C., e Lewis, D.A. (2012) Cephalosporin resistant *Neisseria gonorrhoeae*: time to consider gentamicin? *SexTransm Infect.* 88, 6–8.
- Rouquette-Loughlin, C.E., Balthazar, J.T., e Shafer, W.M. (2005) Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* 56, 856–860.
- Russel, M.E., Jerse, A.E., e Gray-Owen, S.D. (2019) Progress Toward a Gonococcal Vaccine: The Way Forward. *Front Immunol.* 10, 2417.
- 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.
- Sparling, P.F., Sarubbi, F.A., e Blackman, E. (1975) Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 124, 740–749.
- Starnino, S., Stefanelli, P., e *Neisseria gonorrhoeae* Italian Study Group (2009) Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 63, 1200–1204.
- Stolz, E., Zwart, H. G., e Michel, M. F. (1975) Activity of eight antimicrobial agents in vitro against *N. gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis.* 51, 257–264.

- Tavares, W. (2014) *Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico*. 3 ed. (Atheneu, São Paulo).
- The National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003) M2-A8 Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - Oitava edição.
- Unemo, Magnus, Fasth, O., Fredlund, H., Limnios, A., e Tapsall, J. (2009) Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. *J Antimicrob Chemother.* 63, 1142–1151.
- 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, Magnus, Golparian, D., Nicholas, R., Ohnishi, M., Galloway, 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, Magnus, e Nicholas, R.A. (2012) Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol.* 7(12), 1401–1422.
- Unemo, Magnus. (2013) Laboratory diagnostic of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus.
- Unemo, Magnus, Golparian, D., Skogen, V., Olsen, A.O., Moi, H., Syversen, G., e Hjelmevoll, S.O. (2013) *Neisseria gonorrhoeae* strain with high-level resistance to spectinomycin due to a novel resistance mechanism (mutated ribosomal protein S5) verified in Norway. *Antimicrob Agents Chemother.* 57, 1057–1061.
- Unemo, Magnus, Golparian, D., e Hellmark, B. (2014) First three *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Sweden: a threat to currently available dual-antimicrobial regimens for treatment of gonorrhoea? *Antimicrob Agents Chemother.* 58, 624–625.
- 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. (2015) Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. *BMC infect dis.* 15, 364.
- 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 Slyke, C.J., Arnold, R.C., e Buchholtz, M. (1943) Penicillin therapy in sulfonamide-resistant gonorrhoea in men. *Am J Public Health Nations Health.* 33, 1392–1394.
- Wainwright, M., e Swan, H.T. (1986) C.G. Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy. *Med Hist.* 30, 42–56.
- 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.
- Whiley, D.M., Limnios, E.A., Ray, S., Sloots, T.P., e Tapsall, J.W. (2007) Diversity of *penA* alterations and subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Sydney, Australia, that are less susceptible to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 3111–3116.
- WHO (2012) Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Obtido de <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/>
- WHO (2016a) Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016-2021: towards ending STI. Obtido de <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246296/WHO-RHR-16.09-eng.pdf;jsessionid=ABAE48478884E1C67C9C1F3D74F51F52?sequence=1>
- WHO (2016b) 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 (2016c) WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. World Health Organization, Geneva. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379221/>

- 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.
- Wüthrich, D., Brilhante, M., Hausherr, A., Becker, J., Meylan, M., e Perreten, V. (2019) A novel trimethoprim resistance gene, *dfrA35*, characterized from *Escherichia coli* from Calves. *mSphere*. 4.
- Yokoi, S., Deguchi, T., Ozawa, T., Yasuda, M., Ito, S., Kubota, Y., Tamaki, M., e Maeda, S. (2007) Threat to cefixime treatment for gonorrhoea. *Emerg Infect Dis*. 13, 1275–1277.
- 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.
- Zhao, S., Tobiason, D.M., Hu, M., Seifert, H.S., e Nicholas, R.A. (2005) The *penC* mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol*. 57, 1238–1251.

9. Anexos

Anexo 1 – Esquema representativo da estratégia de diluição de antimicrobianos

Table 7. Preparing Dilutions of Antimicrobial Agents to Be Used in Agar Dilution Susceptibility Tests

Antimicrobial Solution										
Step	Concentration, $\mu\text{g/mL}$	Source	Volume, mL	+	Diluent, mL	=	Intermediate Concentration, $\mu\text{g/mL}$	=	Final Concentration at 1:10 Dilution in Agar, $\mu\text{g/mL}$	Log ₂
1	5120	Stock	–		–		5120		512	9
	5120	Stock	2		2		2560		256	8
2	5120	Stock	1		3		1280		128	7
3	5120	Stock	1		7		640		64	6
4	640	Step 3	2		2		320		32	5
5	640	Step 3	1		3		160		16	4
6	640	Step 3	1		7		80		8	3
7	80	Step 6	2		2		40		4	2
8	80	Step 6	1		3		20		2	1
9	80	Step 6	1		7		10		1	0
10	10	Step 9	2		2		5		0.5	-1
11	10	Step 9	1		3		2.5		0.25	-2
12	10	Step 9	1		7		1.25		0.125	-3

Anexo 2 – CMI para cefixima e ceftriaxona de todas as amostras investigadas neste estudo

Amostra	Ano	CMI Cefixima ($\mu\text{g/mL}$)	CMI Ceftriaxona ($\mu\text{g/mL}$)
11212	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11213	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11214	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11215	2014	0,031	0,031
11252	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11253	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11308	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11309	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11463	2014	0,25	0,061
11464	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11495	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11513	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11514	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11531	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11532	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11548	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11549	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11550	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11647	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11649	2014	0,031	0,061
11650	2014	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11681	2014	0,125	0,031
11741	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11742	2015	$\leq 0,015$	0,031
11743	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11745	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11777	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11778	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11779	2015	0,125	0,061
11809	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11815	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
11816	2015	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$

Amostra	Ano	CMI Cefixima (µg/mL)	CMI Ceftriaxona (µg/mL)
11817	2015	≤ 0,015	0,031
11818	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
11880	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
11882	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
11977	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
11978	2015	0,061	0,031
12041	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
12211	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
12226	2015	0,125	0,031
12227	2015	0,031	≤ 0,015
12228	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
12258	2015	≤ 0,015	≤ 0,015
12308	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12309	2016	0,061	≤ 0,015
12341	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12342	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12413	2016	0,125	≤ 0,015
12415	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12416	2016	0,061	≤ 0,015
12439	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12440	2016	0,031	≤ 0,015
12441	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12483	2016	0,031	≤ 0,015
12485	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12486	2016	0,125	≤ 0,015
12487	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12524	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12525	2016	0,031	≤ 0,015
12526	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12527	2016	0,061	0,031
12529	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12546	2016	≤ 0,015	0,031
12547	2016	0,031	0,031
12548	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12549	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12567	2016	0,031	≤ 0,015
12577	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12578	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12600	2016	≤ 0,015	≤ 0,015
12642	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12643	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12644	2017	0,031	0,031
12645	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12797	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12819	2017	0,031	0,031
12822	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12823	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12841	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12880	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12906	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12907	2017	0,031	≤ 0,015
12908	2017	≤ 0,015	≤ 0,015
12995	2017	0,061	0,031

Amostra	Ano	CMI Cefixima ($\mu\text{g/mL}$)	CMI Ceftriaxona ($\mu\text{g/mL}$)
12996	2017	0,061	0,031
13013	2017	0,061	0,061
13014	2017	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13028	2017	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13029	2017	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13048	2017	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13049	2017	0,031	$\leq 0,015$
13069	2017	0,125	0,031
13070	2017	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13127	2017	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13128	2017	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13133	2017	0,031	$\leq 0,015$
13206	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13286	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13340	2018	0,031	0,031
13342	2018	0,125	$\leq 0,015$
13370	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13371	2018	0,031	$\leq 0,015$
13414	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13415	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13527	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13536	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13568	2018	$\leq 0,015$	0,031
13588	2018	0,031	$\leq 0,015$
13601	2018	0,031	$\leq 0,015$
13602	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13611	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13666	2018	0,031	$\leq 0,015$
13667	2018	0,031	0,061
13668	2018	0,031	0,061
13669	2018	$\leq 0,015$	$\leq 0,015$
13670	2018	0,031	0,031

Amostras em negrito: amostras que possuem a CMI de ceftriaxona maior do que a de cefixime