



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES
RESISTENTES DE *Neisseria gonorrhoeae* ISOLADAS
NUMA POPULAÇÃO DE HOMENS QUE TÊM SEXO
COM HOMENS DA ÁREA DE LISBOA**

JOANA LOURENÇO MESSIAS CALADO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Janeiro 2016



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES
RESISTENTES DE *Neisseria gonorrhoeae* ISOLADAS
NUMA POPULAÇÃO DE HOMENS QUE TÊM SEXO
COM HOMENS DA ÁREA DE LISBOA**

JOANA LOURENÇO MESSIAS CALADO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Orientadora: Professora Doutora Rita Castro
Coorientadora: Professora Doutora Filomena Pereira
Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT/UNL)
Unidade de Microbiologia Médica

Janeiro 2016

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Rita Castro, orientadora desta Dissertação de Mestrado, da Unidade de Microbiologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por ter orientado o trabalho conducente à dissertação, por toda a simpatia, disponibilidade e incentivo na progressão deste trabalho.

À Professora Doutora Filomena Pereira, coorientadora desta Dissertação de Mestrado, da Unidade Clínica Tropical, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por toda a dedicação e empenho na concretização deste trabalho.

À Técnica Superior Ângela Mendes, da Unidade de Microbiologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por toda a ajuda indispensável e apoio ao nível do trabalho laboratorial.

Aos pais e irmão que me deram todo o apoio que necessitei para poder realizar e chegar ao fim desta etapa da minha vida. Aos meus tios e prima por todo o apoio e carinho.

Hugo Costa, que esteve sempre do meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, sem nunca deixar de acreditar e confiar no meu trabalho.

Às minhas amigas e colegas Sofia Simões, Marta Nascimento e Elizeth Lopes por todo o apoio e amizade, por estarem sempre presentes e disponíveis para ajudar.

Aos meus amigos Susana Dias, Ruben Martins, Cátia Lopo, Inês Franco, Carla Pinto, Maria João, Teresa São José e Cátia Simões por todo o apoio.

Muito obrigada.

RESUMO

A infecção por *Neisseria gonorrhoeae* é a segunda infecção sexualmente transmissível mais prevalente na Europa. Atualmente, a terapêutica indicada para o tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* consiste na administração de ceftriaxona em combinação com a azitromicina. No entanto, foram relatadas falhas terapêuticas após a administração de cefalosporinas de terceira geração, a nível mundial.

A inexistência de uma alternativa à terapêutica de primeira linha, adequada e eficaz, torna imperativo a realização de vigilância epidemiológica de resistências, sobretudo nas populações de risco, como os homens que têm sexo com homens (HSH).

O conhecimento abrangente sobre a base genética associada a perfis de suscetibilidade e resistência aos antibióticos tem elevada importância, uma vez que os testes de amplificação de ácidos nucleicos estão a substituir rapidamente o método de cultura no diagnóstico de infecção por *N. gonorrhoeae*.

O teste de suscetibilidade aos antibióticos foi realizado para a penicilina, a tetraciclina, a espectinomicina, a ceftriaxona, a cefixima, a ciprofloxacina e a azitromicina, através dos métodos difusão em disco e Etest, de forma a obter-se o fenótipo de resistência de cada isolado de *N. gonorrhoeae* em estudo. Com base no fenótipo de resistência, pesquisou-se a presença de mutações nos genes *penA*, *mtrR*, *parC* e *gyrA*.

Assim, na população estudada (homens que têm sexo com homens) obtiveram-se 30 culturas positivas para *N. gonorrhoeae*, das quais 73% apresentaram resistência intermédia ou resistência à penicilina, 60% à tetraciclina e 37% à ciprofloxacina.

O reduzido número de casos positivos não permitiu retirar conclusões com valor estatístico quantitativo, no entanto, qualitativamente, permitiu compreender que as mutações detetadas são idênticas às obtidas por outros autores, estando associadas a fenótipos de resistência.

ABSTRACT

Neisseria gonorrhoeae infection is the second most prevalent sexually transmitted infection in Europe. Currently, dual therapy for *N. gonorrhoeae* infections (e.g., treatments including ceftriaxone and azithromycin) is now recommended. However, treatment failures have been reported following administration of third-generation cephalosporins.

The lack of an appropriate and effective alternative for first-line therapy makes it imperative to carry out epidemiological surveillance of resistance, especially among at-risk populations, such as men who have sex with men (MSM).

In an era in which *N. gonorrhoeae* infection is increasingly being diagnosed by nucleic acid amplification tests, knowledge on molecular surveillance of resistance, is highly important.

Antibiotic susceptibility testing was carried out to penicillin, tetracycline, spectinomycin, ceftriaxone, the cefixime, ciprofloxacin, and azithromycin, by the diffusion disc and Etest methods, so as to obtain the resistance phenotype of each *N. gonorrhoeae* isolate under study.

Polymerase chain reaction and direct DNA sequencing were performed to identify mutations within the *penA*, *mtrR*, *gyrA* and *parC* genes of the isolates, which thus explain the resistant phenotypes.

Thus, the study population (men who have sex with men) yielded 30 positive cultures for *N. gonorrhoeae*, of which 73% had intermediate resistance or resistance to penicillin, 60% to tetracycline and 37% to ciprofloxacin.

The reduced number of positive cases does not allow us to draw conclusions in quantitative statistical value. However, allowed in qualitative conclusions that the detected mutations are identical to those obtained by other authors, and are associated with resistance phenotypes.

ÍNDICE GERAL

Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice geral	iv
Lista de abreviaturas	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Justificação da tese	1
1.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3
1.2.1. Fisiologia, características bioquímicas e estrutura	3
1.2.2. Manifestações clínicas e transmissão da infeção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5
1.2.3. Diagnóstico laboratorial	5
1.2.3.1. Identificação presuntiva	6
1.2.3.2. Identificação confirmatória	6
1.2.4. Teste de suscetibilidade aos antibióticos	7
1.2.5. Terapêutica para a infeção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	8
1.3. Perspetiva histórica no desenvolvimento de resistências aos antibióticos	8
1.3.1. Era pré-quinolona	9
1.3.2. Era quinolona.....	10
1.3.3. Era pós-quinolona.....	10
1.4. Mecanismos de ação e de desenvolvimento de resistência a antibióticos.....	11
1.4.1. Sulfonamidas	12
1.4.2. β -lactâmicos.....	13
1.4.3. Tetraciclina	15
1.4.4. Aminociclitol.....	16

1.4.5.	Macrólidos	17
1.4.6.	Fluoroquinolonas	18
1.4.7.	Cefalosporinas de terceira geração	19
1.5.	Terapêuticas do futuro	20
1.5.1.	Aumento da dose das cefalosporinas de terceira geração.....	20
1.5.2.	Associação de antibióticos	20
1.5.3.	Novos fármacos	20
1.6.	Objetivos.....	22
1.6.1.	Objetivo geral	22
1.6.2.	Objetivos específicos	22
2.	Material e métodos	23
2.1.	Caracterização da população em estudo	23
2.2.	Colheita e transporte de amostras	23
2.3.	Identificação de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	23
2.3.1.	Teste da oxidase.....	23
2.3.2.	Coloração de Gram.....	24
2.3.3.	Teste rápido de utilização de açúcares	24
2.3.4.	Testes bioquímicos e enzimáticos	24
2.4.	Teste de suscetibilidade aos antibióticos	25
2.4.1.	Método de difusão em disco.....	28
2.4.2.	Método Etest.....	28
2.5.	Pesquisa de mutações em genes que contribuem para a resistência aos antibióticos	29
2.5.1.	Extração de ADN dos isolados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	29
2.5.2.	Amplificação dos genes que contribuem para a resistência por reação em cadeia da polimerase.....	29
2.5.3.	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de pcr	31
2.5.4.	Sequenciação dos produtos de pcr.....	32

2.5.5.	Análise dos resultados da sequenciação	32
2.5.6.	Pesquisa de mutações	32
3.	Resultados e discussão	34
3.1.	Resultados dos testes de suscetibilidade aos antibióticos.....	35
3.1.1.	Teste de suscetibilidade à penicilina	37
3.1.2.	Teste de suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração	38
3.1.3.	Teste de suscetibilidade à tetraciclina	39
3.1.4.	Teste de suscetibilidade à ciprofloxacina	40
3.1.5.	Teste de suscetibilidade à azitromicina	41
3.1.6.	Teste de suscetibilidade à espectinomicina	41
3.2.	Pesquisa de mutações em genes que contribuem para a resistência aos antibióticos	42
3.2.1.	Pesquisa de mutações no repressor MtrR e no promotor do gene <i>mtrR</i> ... 42	
3.2.2.	Pesquisa de mutações que contribuem para a resistência à penicilina 44	
3.2.3.	Pesquisa de mutações que contribuem para a resistência às cefalosporinas de terceira geração	47
3.2.4.	Pesquisa de mutações que contribuem para a resistência à tetraciclina ... 48	
3.2.5.	Pesquisa de mutações na região determinante de resistência às quinolonas.....	49
4.	Conclusão	51
5.	Referências bibliográficas	55
6.	Anexos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

µl – Microlitros

µM – Micromole

aa - Aminoácidos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ARN – Ácido Ribonucleico

ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro

ARNr – Ácido Ribonucleico ribossomal

ARNt – Ácido Ribonucleico de transferência

AziI – Resistência intermédia à azitromicina

BSS – Solução de sal tamponada

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

CLSI – Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CMRNG – *Neisseria gonorrhoeae* com resistência mediada por mutações cromossómicas

CQ – Controlo de Qualidade

DHPS – Dihidropteroato Sintetase

DIP – Doença Inflamatória Pélvica

dNTPs – Desoxirribonucleótidos

ESSTI – Vigilância Europeia de Doenças Sexualmente Transmissíveis

Etest – Teste estilométrico

EUCAST – Comité Europeu para o Teste de Suscetibilidade Antimicrobiano

Euro-GASP – Programa Europeu de Vigilância Antimicrobiana dos Gonococos

EV – Endovenosa

g – grama

HSH – Homens que têm sexo com homens

IM – Intramuscular

IST – Infecções Sexualmente Transmissíveis

K₂HPO₄ – Fosfato de potássio dibásico anidro

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
LOS – Lipooligossacarídeo
LpxC – UDP-3-O-(acil)-N-acetilglucosamina diacetilase
ml – Mililitros
mm – Milímetros
NAATs – Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos
NRL – Laboratório de Referência de *Neisseria*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PABA – Ácido para-aminobenzóico
pb – Pares de bases
PBP – Proteínas Ligantes à Penicilina
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PenI – Resistência intermédia à penicilina
PenR – Resistência à penicilina mediada por mutações cromossômicas
PPNG – *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinas
PVX - Gelose de chocolate com PolyViteX
QRDR – Região determinante na resistência às quinolonas
QRNG – *Neisseria gonorrhoeae* resistentes às quinolonas
TetI – Resistência intermédia à tetraciclina
TetR – Resistência à tetraciclina mediada por mutações cromossômicas
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α
TRNG - *Neisseria gonorrhoeae* com resistência de alto nível à tetraciclina mediada por plasmídeo
VCA3 – Gelose de chocolate com PolyVitex e com uma combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Número de novos casos de infecção por <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>T. pallidum</i> e <i>T. vaginalis</i> em homens e mulheres com idades entre os 15 e os 49 anos, em milhões, em 2008. Adaptado de WHO (2012) (11).	1
Figura 2: Suscetibilidade diminuída à cefixima dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> detetadas na Europa, 2011. Adaptado de ECDC, 2013 (13).	2
Figura 3: Representação da estrutura de superfície de <i>N. gonorrhoeae</i> . Adaptado de Koneman <i>et al.</i> (20).	4
Figura 4: Organização do operão <i>mtrCDE</i> de <i>N. gonorrhoeae</i> . Adaptado de Ohneck <i>et al.</i> (28).	4
Figura 5: Diferentes antibióticos que foram introduzidos para o tratamento da infecção por <i>N. gonorrhoeae</i> . Adaptado de Dillon <i>et al.</i> (41).	9
Figura 6: Alvos dos antibióticos que têm sido utilizados ao longo do tempo no tratamento da infecção por <i>N. gonorrhoeae</i> com os respetivos genes de resistência. Adaptado de Goire <i>et al.</i> (64).	12
Figura 7: Mecanismo de ação das sulfonamidas no metabolismo do ácido tetraidrofóbico (forma reduzida do ácido fólico), um importante metabolito na síntese de ADN. Adaptado de Osório & Morgado (66).	12
Figura 8: Mecanismo de ação das tetraciclina. Adaptado de Pfizer (2000) (88).	15
Figura 9: Inibição da síntese proteica pela espectinomicina. Adaptado de Kurahashi (185).	16
Figura 10: Mecanismo de ação dos macrólidos, através da ligação reversível à subunidade ribossomal 50S. Adaptado de Kurahashi (185).	17
Figura 11: Mecanismo de ação das fluoroquinolonas. Adaptado de Kohanski <i>et al.</i> (100).	18
Figura 12: Esquema do protocolo de extração de ADN genómico com utilização do <i>kit</i> comercial <i>QIAamp® DNA Mini Kit</i> , de acordo com as instruções do fabricante.	29
Figura 13: Resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> em estudo, pelos métodos de difusão em disco e Etest.	36
Figura 14: Eletroforese dos produtos de PCR dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> (nº1 a nº13) após amplificação do promotor do gene <i>mtrR</i> e do gene parcial <i>mtrR</i>	43

Figura 15: Alinhamento com sequências que codificam o promotor do gene *mtrR* e parte do gene *mtrR* da estirpe *N. gonorrhoeae* CH95 (GenBank Z25796), da estirpe *N. meningitidis* LNP21362 (GenBank CP006869) e do isolado nº 9..... 44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de interpretação dos resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos de acordo com as normas CLSI (126,130,132).	26
Tabela 2: Intervalos de controlo de qualidade para <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 (126,130).	27
Tabela 3: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados na técnica de PCR e localização da região sequenciada.	30
Tabela 4: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na PCR.	30
Tabela 5: Condições de amplificação da PCR.	31
Tabela 6: Resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em disco (126).	35
Tabela 7: Resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método Etest (33,126).	35
Tabela 8: Fenótipos de resistência dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> obtidos nos exsudados rectais e uretrais.	37
Tabela 9: Mutações no domínio de ligação ao ADN no repressor MtrR e no promotor do gene <i>mtrR</i> , fenótipos dos isolados estudados, obtidos a partir de exsudados rectais e exsudados uretrais.	43
Tabela 10: Padrões de mutações da PBP2 e mutações no repressor MtrR e na sequência que codifica o promotor do gene <i>mtrR</i> , e CMI para a penicilina dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> estudados.	45
Tabela 11: Padrões de mutações no domínio da transpeptidase da PBP2 presentes nos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> em estudo (110,111,115).	46
Tabela 12: Mutações no repressor MtrR e no promotor do gene <i>mtrR</i> e CMI para a tetraciclina dos isolados estudados.	48
Tabela 13: Mutações na região QRDR e CMI para a ciprofloxacina dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i> com o fenótipo QRNG.	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. JUSTIFICAÇÃO DA TESE

A infecção causada por *Neisseria gonorrhoeae* tem um elevado potencial de epidemia e elevados níveis de resistência a antimicrobianos tradicionais, diminuindo as opções de tratamento e, conseqüentemente, as hipóteses de se tornar uma infecção curável (10).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2008, na globalidade, surgiram 106 milhões de novos casos de infecção por *N. gonorrhoeae* em adultos (figura 1). No entanto, a incidência em vários países é subestimada devido a diagnósticos subóptimos, ausência de notificação de casos e vigilância (11).

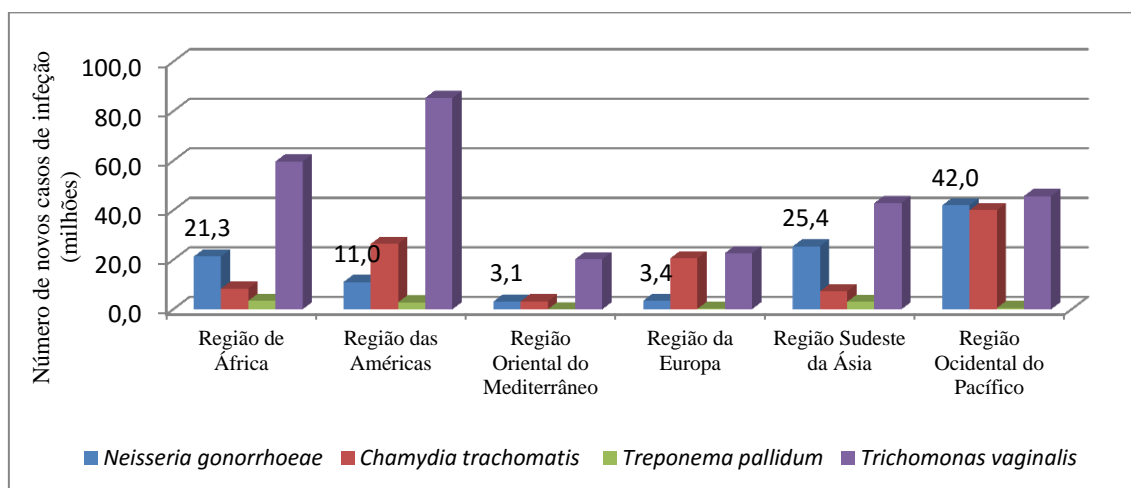


Figura 1: Número de novos casos de infecção por *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. pallidum* e *T. vaginalis* em homens e mulheres com idades entre os 15 e os 49 anos, em milhões, em 2008. Adaptado de WHO (2012) (11).

Na Europa a infecção por *N. gonorrhoeae* é a segunda infecção bacteriana sexualmente transmissível mais comum (12). A diminuição da suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas de terceira geração tornou-se uma importante questão de saúde pública, provavelmente é apenas uma questão de tempo para que este fenótipo se torne generalizada na Europa. A figura 2 apresenta a dispersão dos isolados de *N. gonorrhoeae* com suscetibilidade diminuída à cefixima na Europa, em 2011 (13).

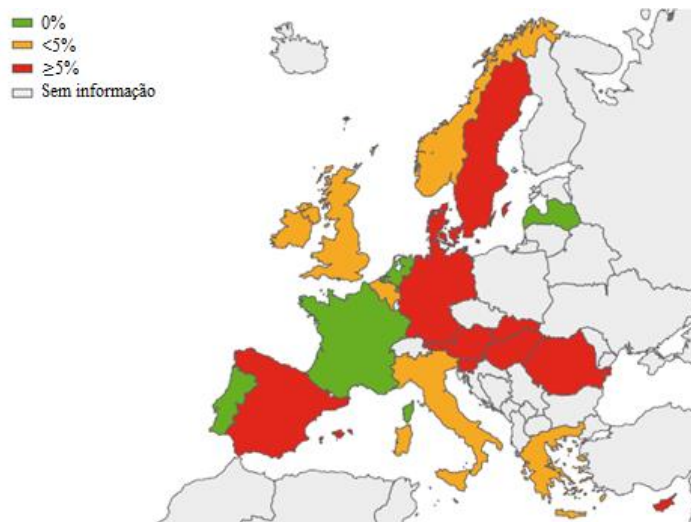


Figura 2: Suscetibilidade diminuída à cefixima dos isolados de *N. gonorrhoeae* detetadas na Europa, 2011. Adaptado de ECDC, 2013 (13).

Esta situação acarreta elevados custos para os sistemas de saúde e pode ter consequências profundas para o doente, sendo imperativo que novas e melhores estratégias de controlo sejam elaboradas e implementadas (14).

Consideram-se como fatores cruciais: a vigilância epidemiológica; o diagnóstico laboratorial da infeção por *N. gonorrhoeae*; a realização do teste de suscetibilidade aos antibióticos; terapêutica adequada com controlo da eficácia e a utilização correta do antibiótico (tipo e dose); a notificação dos casos de infeção por *N. gonorrhoeae*; a caracterização molecular dos isolados de *N. gonorrhoeae* (14).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana requerem cultura de *N. gonorrhoeae*. No entanto, em algumas áreas geográficas com população de alta prevalência, os testes de amplificação de ácidos nucleicos estão a substituir rapidamente a cultura para o diagnóstico de infeção por *N. gonorrhoeae*. Assim, o conhecimento abrangente sobre a base genética associada a perfis de suscetibilidade e à resistência a muitos antimicrobianos é crucial para o desenvolvimento de ensaios moleculares para deteção de resistência antibacteriana em *N. gonorrhoeae* (15,16).

Os mecanismos genéticos de resistência de *N. gonorrhoeae* a agentes antibacterianos são complexos e não estão completamente esclarecidos. No entanto, a aquisição de determinados genes e o desenvolvimento de mutações em genes e regiões reguladoras estão relacionadas de forma inequívoca no desenvolvimento de resistência (15,16).

A infeção por *N. gonorrhoeae* na população de homens que têm sexo com homens (HSH) ocorre frequentemente em locais extragenitais, e além disso, a maioria destas infeções são assintomáticas. Por este motivo, este grupo é um dos principais meios de

transmissão da infecção por *N. gonorrhoeae* (13,17). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda a implementação na rotina do rastreio de infecção por *N. gonorrhoeae* em locais extragenitais para todos os HSH sexualmente ativos (18,19).

Neste estudo, considera-se importante a vigilância epidemiológica eficaz sobretudo das populações em maior risco, como é o caso da população de HSH, e o diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae* por cultura com pesquisa dos fenótipos de resistência, bem como a caracterização molecular dos isolados resistentes.

1.2. *Neisseria gonorrhoeae*

A espécie *Neisseria gonorrhoeae* pertence à família *Neisseriaceae* que inclui três gêneros que são *Neisseria*, *Moraxella* e *Kingella*. Este microrganismo pertence ao gênero *Neisseria* designação que provém do nome do médico alemão *Albert Neisser*, o qual foi o primeiro a descrevê-lo (em 1897) a partir da observação microscópica de um exsudado uretral e da conjuntiva. O nome da espécie *N. gonorrhoeae* provém dos nomes *gone* que significa “semente” e *rhoia* que indica “fluxo”, ou seja, refere-se a um “fluxo de sementes” que se relaciona com os sintomas da infecção por *N. gonorrhoeae* (20,21).

1.2.1. FISIOLOGIA, CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E ESTRUTURA

O microrganismo *N. gonorrhoeae* é uma bactéria de Gram-negativo que morfológicamente se dispõe em diplococos. As espécies do gênero *Neisseria* spp. apresentam reação de oxidase e de catalase positivas. Além disto, produzem ácido a partir da utilização de diferentes hidratos de carbono (20).

As espécies do gênero *Neisseria* são constituídas por uma membrana citoplasmática interna, uma fina camada de peptidoglicano, um espaço periplasmático e uma membrana externa com lipopoligossacarídeos (LOS), tal como está representada a figura 3 (22,23).

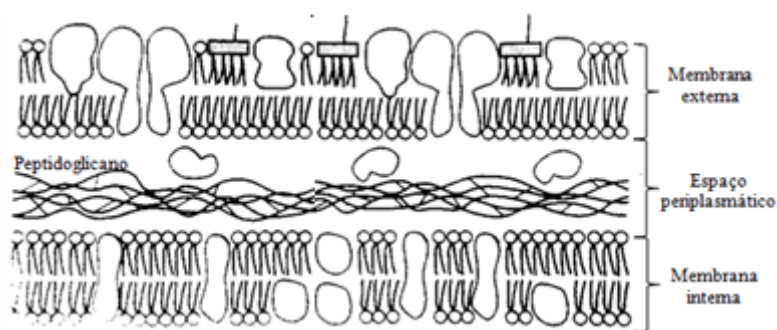


Figura 3: Representação da estrutura de superfície de *N. gonorrhoeae*. Adaptado de Koneman *et al.* (20).

Bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE

A bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE encontra-se presente nos isolados de *N. gonorrhoeae* e pertence à família de bombas de efluxo de resistência-nodulação-divisão celular (RND). Esta bomba de efluxo permite a expulsão direta de diversos compostos hidrofóbicos do espaço periplasmático, tais como agentes antimicrobianos (β – lactâmicos, macrólidos e tetraciclina), corantes (violeta de cristal) e detergentes (Triton X-100 e o nonoxinol-9) (24,25).

A proteína MtrR é um membro da família TetR e é codificada pelo gene *mtrR* que se encontra localizado a 250 pares de bases (pb) acima de *mtrCDE*. Este gene é transcrito divergentemente em cadeias opostas. A proteína MtrR regula negativamente a transcrição de *mtrCDE*, através da ligação de dois homodímeros numa sequência de ADN na região do promotor de *mtrCDE*, como demonstrado na figura 4 (26,27).

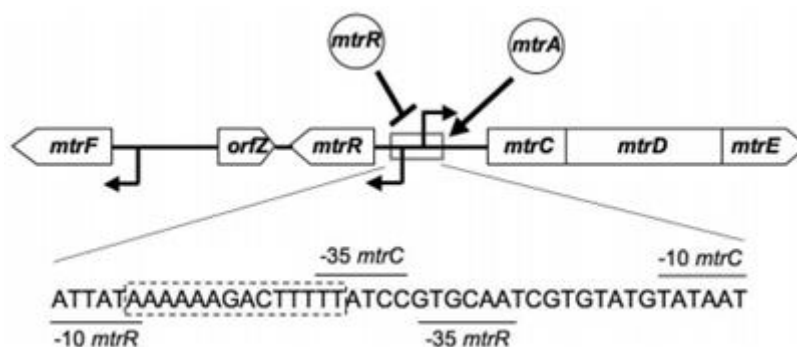


Figura 4: Organização do operão *mtrCDE* de *N. gonorrhoeae*. Os círculos selecionam os reguladores de transcrição. As setas indicam os promotores de *mtrF*, *mtrR* e *mtrCDE*. Os promotores de *mtrCDE* e *mtrR* estão apresentados na sequência aumentada. A caixa a picotado marca a região invertida (com 13pb) entre os hexâmeros -10 e -35 na sequência que se encontra na sequência do promotor do gene *mtrR*. Adaptado de Ohneck *et al.* (28).

1.2.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRANSMISSÃO DA INFEÇÃO POR *Neisseria gonorrhoeae*

A infecção genital masculina é primariamente restrita à uretra e apresenta sintomas como disúria e corrimento uretral purulento, contudo esta pode ser assintomática. Caso a infecção não seja tratada, pode evoluir com complicações, como a epididimite, a prostatite e o abscesso na cavidade peritoneal (21,29).

Nas mulheres, o local primário da infecção é o colo do útero e, quando sintomática, geralmente apresenta corrimento cérvico-vaginal purulento, disúria, hemorragia anormal ou intermenstrual e dor abdominal ou pélvica. As infecções genitais ascendentes na mulher podem causar salpingite, doença inflamatória pélvica e abscesso no tubo ovariano. Estas podem estar na origem de uma gravidez ectópica e esterilidade (21,30).

A população HSH e as mulheres podem adquirir infecção da faringe e/ou rectal, através de relações sexuais orais e/ou anais desprotegidas com um parceiro infetado. A maioria das infecções na população HSH são assintomáticas, portanto recomenda-se o rastreio de rotina anual de infecção por *N. gonorrhoeae* em locais extragenitais (17,18).

A conjuntivite em recém-nascidos é adquirida durante a passagem através do canal do parto infetado por *N. gonorrhoeae*. A infecção ocular manifesta-se por uma secreção purulenta abundante, hiperemia conjuntival, edema palpebral, podendo ocorrer cegueira se não tratada (31).

A infecção disseminada por *N. gonorrhoeae* ocorre quando a referida espécie invade a corrente sanguínea. As complicações desta patologia incluem alterações permanentes das articulações, peri-hepatite, endocardite, e raramente, meningite (32).

A transmissão da infecção por *N. gonorrhoeae* ocorre por inoculação direta da secreção da mucosa infetada de pessoa a pessoa, por via genital-genital, genital-anal, oro-genital, oro-anal ou transmissão por parte da mãe para o recém-nascimento durante o parto (2).

1.2.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A colheita de amostras para a pesquisa de *N. gonorrhoeae*, por método de cultura, deve ser efetuada com uma zaragatoa que deve ser inserida 2 a 3 centímetros na uretra masculina ou 1 a 2 centímetros no canal endocervical, seguida por duas ou três rotações. O melhor sistema de transporte da amostra é o próprio meio de cultura inoculado com a zaragatoa, após a colheita, colocado imediatamente numa atmosfera enriquecida com CO₂ e transportado para o laboratório (18).

1.2.3.1. Identificação presuntiva

A identificação presuntiva de *N. gonorrhoeae* a partir de um isolado num meio seletivo pode ser realizada com base na morfologia das colónias, na observação típica de diplococos aos pares, tétrades ou em grupo (de um esfregaço efetuado a partir de colónias e corado pela coloração de Gram) e através da observação de uma reação de oxidase positiva (18,33).

Cultura

Para o isolamento primário, as amostras de locais anatómicos normalmente não estéreis (por exemplo, uretra, cérvix, vagina, reto e orofaringe) devem ser semeadas num meio de cultura seletivo (por exemplo, meio de cultura Thayer-Martin ou Martin-Lewis) e as amostras de locais anatómicos estéreis, como a conjuntiva, devem ser semeadas em meios de cultura não seletivos (por exemplo, meio de cultura agar de chocolate) (18).

Os meios inoculados são incubados entre 35 °C a 36,5 °C numa atmosfera enriquecida com 5% de CO₂ e examinados após 24 horas e 48 horas. O CO₂ suplementar pode ser fornecido por uma incubadora de CO₂, através de um frasco fechado com uma vela sem cheiro ou por saquetas geradoras de CO₂ (18).

Coloração de Gram

A coloração pelo método de Gram tem elevada especificidade (> 99%) e sensibilidade (> 95%) no diagnóstico de infeção por *N. gonorrhoeae* em homens sintomáticos (18).

No caso de homens assintomáticos, amostras endocervicais, orofaringe ou amostras rectais, esta técnica apresenta menor sensibilidade (18).

Teste da Oxidase

O teste da oxidase tem como objetivo detetar a presença da enzima citocromo c oxidase presente na cadeia respiratória de um microrganismo. Neste teste o substrato N,N-tetrametil-1,4-fenilenediamina entra em contato com as colónias e caso a enzima esteja presente resulta em reação positiva, visualizada pela alteração de cor. A espécie *N. gonorrhoeae* apresenta teste de oxidase positivo (33).

1.2.3.2. Identificação confirmatória

A identificação presuntiva de *N. gonorrhoeae* é suficiente para iniciar a terapia antimicrobiana, mas testes adicionais devem ser realizados para confirmar a identificação (34). Estes testes podem ser bioquímicos e enzimáticos, que incluem: a

reação de catalase; a resistência à colistina; a produção de polissacarídeo de sacarose; o teste de utilização de açúcares; a redução de nitrato (33).

Teste de utilização de açúcares

Esta técnica depende de enzimas formadas durante o crescimento do microrganismo que utilizam os hidratos de carbono como a glucose, a maltose, a lactose e/ou a sacarose. Na execução do teste é incubada uma suspensão do isolado a estudar juntamente com os referidos hidratos de carbono. Caso haja produção de ácido, devido à utilização dos mesmos, observa-se mudança de cor. Diferentes espécies de *Neisseria* spp. utilizam hidratos de carbono diferentes. A espécie *N. gonorrhoeae* apenas utiliza a glucose (35).

Teste bioquímico comercial

Um teste confirmatório para identificação laboratorial de *N. gonorrhoeae* pode ser um teste bioquímico comercial, como por exemplo, o sistema *API NH*, que permite a identificação confirmatória de *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. e *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*). A identificação é obtida através de reações enzimáticas ou fermentações de açúcares em 10 microtubos com substratos desidratados, que se traduzem por mudanças de cor espontâneas ou reveladas através da adição de reagentes (36).

1.2.4. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

O método de diluição em placa com agar é o método de referência para testar a suscetibilidade aos antibióticos para a espécie *N. gonorrhoeae*, no entanto, pode ser muito difícil de executar em laboratórios com capacidade limitada. O método de difusão em disco e o método epsilométrico (Etest) são métodos alternativos ao método de referência no estudo da suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* (18).

A fim de se desenvolver uma perspetiva global sobre a resistência antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, os laboratórios de referência realizam testes de suscetibilidade antimicrobiana para uma vasta gama de antibióticos: cefalosporinas de terceira geração (por exemplo, a ceftriaxona e a cefixima) penicilina, tetraciclina, espectinomicina, fluoroquinolonas (por exemplo, a ciprofloxacina), e a azitromicina (18).

Apenas a estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 é designada pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI) para o controlo de qualidade dos testes de suscetibilidade aos antibióticos para a espécie *N. gonorrhoeae* (33).

1.2.5. TERAPÊUTICA PARA A INFEÇÃO POR *Neisseria gonorrhoeae*

A terapêutica recomendada no caso de infecções uretrais, cervicais, rectais e da faringe não complicadas por *N. gonorrhoeae* em adultos e adolescentes, quando a sensibilidade antimicrobiana da infecção é desconhecida, é a ceftriaxona 250 mg ou 500mg via intramuscular em dose única em conjunto com 1 grama (g) ou 2 g de azitromicina em dose única oral (37,2).

Esta terapêutica combinada para a infecção por *N. gonorrhoeae* garante também o tratamento de coinfeções por *C. trachomatis* e reflete a preocupação da emergência de resistência de *N. gonorrhoeae* aos antibióticos (38).

Os regimes terapêuticos alternativos são:

- ✓ Cefixima 400 mg em dose única oral em conjunto com 2 g de azitromicina em dose única oral, se a ceftriaxona não estiver disponível ou a administração de antibióticos injetáveis não for possível ou recusada pelo indivíduo;
- ✓ Ceftriaxona 500 mg por via intramuscular, numa dose única, se azitromicina não estiver disponível ou o indivíduo ser incapaz de tomar a medicação oral;
- ✓ Espectinomicina 2 g por via intramuscular, numa dose única em conjunto com 2 g de azitromicina em dose única oral, perante suspeita ou confirmação de resistência às cefalosporinas de terceira geração ou quando o indivíduo tem uma história de anafilaxia à penicilina ou às cefalosporinas (2).

1.3. PERSPETIVA HISTÓRICA NO DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIAS AOS ANTIBIÓTICOS

A espécie *N. gonorrhoeae* facilmente desenvolve ou adquire mecanismos de resistência aos antibióticos, pelo que ao longo do tempo tem desenvolvido resistência aos diferentes antibióticos utilizados no seu tratamento. Assim o aparecimento das resistências, por parte deste microrganismo, foi dividido em três eras: pré-quinolona, quinolona e pós-quinolona (figura 5) (39,40).

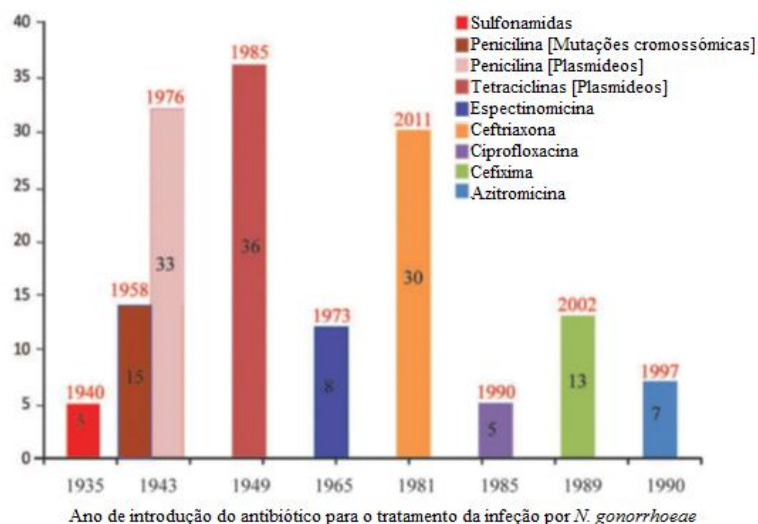


Figura 5: Diferentes antibióticos que foram introduzidos para o tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae*. As barras verticais representam o número de anos que um determinado antibiótico foi usado antes de qualquer indicação de resistência. Os números a vermelho indicam o ano quando a resistência a esse antibiótico foi documentada pela primeira vez. Adaptado de Dillon *et al.* (41).

1.3.1. ERA PRÉ-QUINOLONA

As sulfonamidas começaram a ser utilizadas no tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* em 1935, mas rapidamente deixaram de ser eficazes, uma vez que, em 1940 começaram a emergir resistências a estes antibióticos (42).

A penicilina começou a ser utilizada como terapêutica para a infecção por *N. gonorrhoeae* em 1943, inicialmente para os casos de resistência às sulfonamidas, mas mais tarde, veio a utilizar-se como antimicrobiano de primeira linha (43).

Durante os 40 anos seguintes, a penicilina foi utilizada no tratamento desta patologia, até que se começou a verificar uma diminuição da suscetibilidade a este fármaco através resistências mediadas por mutações cromossômicas e, posteriormente, devido a resistências mediadas por plasmídeos com genes que codificam enzimas β -lactamases. No início dos anos 70, foi aumentada a dose intramuscular da então recomendada 50 000 unidades (U), em 1945, para 4,8 milhões U. No final de 1989, a penicilina deixou de ser um tratamento eficaz e foi abandonada como fármaco de primeira linha (44,45).

Coincidente com o desenvolvimento de resistência à penicilina por *N. gonorrhoeae*, esta espécie também desenvolveu resistência a outros antibióticos, incluindo a tetraciclina, o cloranfenicol, a estreptomomicina e a eritromicina (46).

A tetraciclina foi uma importante terapêutica alternativa à penicilina para indivíduos alérgicos a este antibiótico (47). Aos poucos, e com o uso constante de tetraciclina na

terapêutica de coinfeções, como por exemplo na infecção por *C. trachomatis*, a *N. gonorrhoeae* adquiriu resistência também a este antibiótico. A resistência de alto nível à tetraciclina, mediada por mutações cromossômicas e por plasmídeos incorporados, surgiu na década de 1970, juntamente com a resistência à penicilina (48). A espectinomicina foi um outro importante antimicrobiano, desenvolvido nos anos 1960, para casos de infecção por *N. gonorrhoeae* resistente as antibióticos ou em indivíduos alérgicos a outros fármacos. Foi utilizado sobretudo no tratamento de infecção por *N. gonorrhoeae* produtora de penicilinase (PPNG). Este antibiótico não é eficaz nos casos de infecção da faringe. Além disso, nos anos 80, surgiram rapidamente resistências de alto nível à espectinomicina, quando foi utilizada como terapêutica de primeira linha nos militares norte-americanos, na Coreia do Norte (49–51).

1.3.2. ERA QUINOLONA

Em resposta ao aumento do número de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à penicilina, tetraciclina e espectinomicina, em todo o mundo, o CDC recomendou o uso de cefalosporinas de terceira geração ou fluoroquinolonas para o tratamento de primeira linha da infecção por *N. gonorrhoeae*. As fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina e a ofloxacina, foram amplamente utilizadas no tratamento desta infecção a partir de meados da década de 1980 em diante. Apesar de não ser adequada para as mulheres grávidas ou crianças, a ciprofloxacina tem a vantagem de possuir poucos efeitos secundários, de poder ser administrada como dose única e de apresentar excelente eficácia no tratamento de infecções em todos os locais anatómicos, incluindo da faringe (52).

Três antibióticos desta família de antibióticos (ciprofloxacina, ofloxacina e levofloxacina) foram aprovados pelo CDC, no ano de 1993, como fármacos de primeira linha para o tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* (53,54).

No ano 2000, as fluoroquinolonas deixaram de ser prescritas para o tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* em vários países da Europa devido ao desenvolvimento de resistências e em 2007 deixaram de ser recomendadas pelo CDC (53,55).

1.3.3. ERA PÓS-QUINOLONA

Em 2006, 39% dos casos de infecção por *N. gonorrhoeae* na população HSH eram resistentes às quinolonas, então o CDC passou a recomendar apenas as cefalosporinas de terceira geração como terapêutica de primeira linha (56). A ceftriaxona (via

intramuscular) e a cefixima (via oral), em conjunto com a azitromicina, têm sido utilizadas no tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* (57).

A utilização generalizada de cefalosporinas orais no Japão desenvolveu isolados de *N. gonorrhoeae* com suscetibilidade diminuída a este antibiótico e ausência de resposta ao tratamento (58,59). Muitos desses isolados também eram resistentes às fluoroquinolonas, às tetraciclina e à penicilina (60,61).

Deguchi *et al.*(58) e Yokoi *et al.*(9) relataram as primeiras falhas terapêuticas com cefalosporinas orais. Ocorreram no Japão, no início do ano 2000, em indivíduos que foram tratados com doses múltiplas de 200 mg de cefixima e que estavam infetados com isolados de *N. gonorrhoeae* com concentrações mínimas inibitórias (CMI) que variavam entre 0,125 µg/ml e 1 µg/ml.

Na Noruega, Unemo *et al.*(3) relataram os primeiros dois casos de falha terapêutica com a cefixima na Europa. Ambos falharam o tratamento com 400 mg de cefixima, mas foram curados com 500 mg de ceftriaxona.

Ison *et al.*(6), Unemo *et al.*(8) Unemo *et al.*(4), e Allen *et al.*(7) relataram falhas terapêuticas com a cefixima em Inglaterra, Áustria, França e Canada, respetivamente.

1.4. MECANISMOS DE AÇÃO E DE DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Os mecanismos de resistência aos antibióticos desenvolvidos pela espécie *N. gonorrhoeae* envolvem destruição ou modificação do antibiótico, por meios enzimáticos, modificação ou proteção do alvo, o que diminui a afinidade, diminuição do influxo ou aumento do efluxo do antibiótico. Geneticamente, estas alterações podem resultar de mutações cromossômicas, conjugação de plasmídeos com genes de resistência e transferência horizontal de genes, particularmente através de outras espécies de *Neisseria* spp. Múltiplos determinantes de resistência podem coexistir num único microrganismo, de forma que uma única estirpe possa ser resistente a diferentes antibióticos (62,63).

Os alvos de ação dos antibióticos utilizados no tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae*, ao longo do tempo (sulfonamidas, β-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrólidos e cefalosporinas de terceira geração), bem como os genes que contribuem para o desenvolvimento de resistência, com exceção da sulfonamida, encontram-se representados na figura 6.

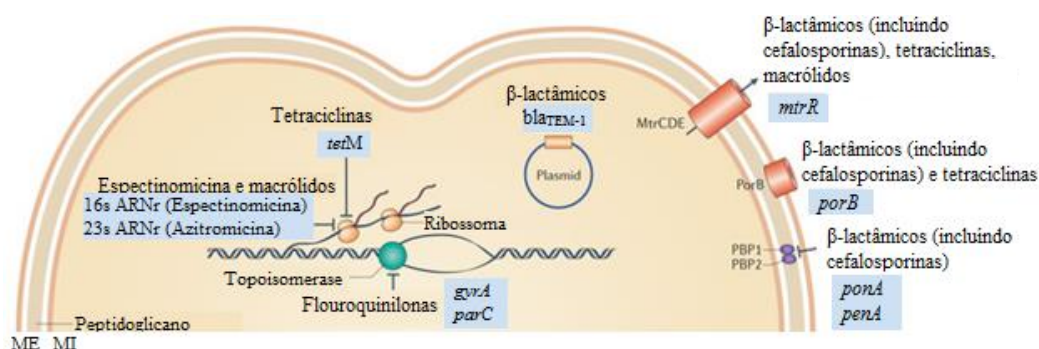


Figura 6: Alvos dos antibióticos que têm sido utilizados ao longo do tempo no tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* com os respectivos genes de resistência. ME – Membrana externa; MI – Membrana Interna. Adaptado de Goire *et al.*(64).

1.4.1. SULFONAMIDAS

Mecanismo de ação

As sulfonamidas inibem a síntese do ácido fólico, um importante metabolito na síntese de ADN. Estas são um análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico (PABA) e atuam por inibição competitiva pela ligação à enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), enzima fundamental para a síntese do ácido fólico bacteriano, impedindo-a de realizar a sua função (figura 7) (65).

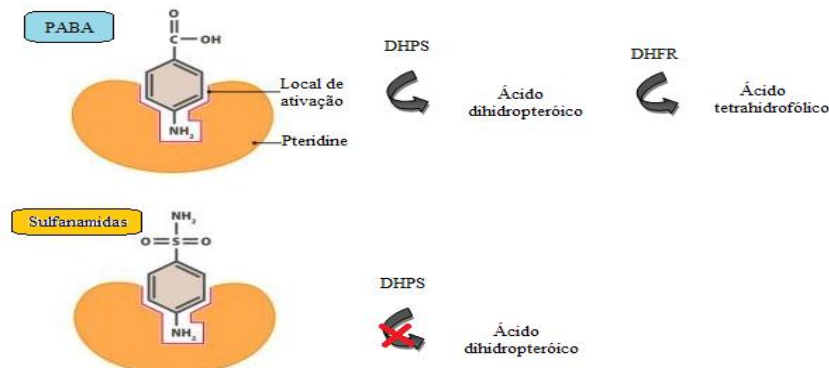


Figura 7: Mecanismo de ação das sulfonamidas no metabolismo do ácido tetrahidrofólico (forma reduzida do ácido fólico), um importante metabolito na síntese de ADN. DHFR - Diidrofolato redutase; DHPS - Dihidropteroato sintetase. Adaptado de Osório & Morgado(66).

Mecanismo de resistência

A espécie *N. gonorrhoeae* desenvolveu resistência a este antimicrobiano através da hiperprodução do PABA, competindo assim com uma maior vantagem pelo local de ligação com o antibiótico. Além disso desenvolveu uma mutação no gene *folP* que codifica a DHPS, produzindo assim uma enzima mutante com pouca afinidade para as sulfonamidas (67).

1.4.2. B-LACTÂMICOS

Mecanismo de ação

Os alvos de agentes β -lactâmicos são as proteínas de ligação à penicilina (PBP), as quais se localizam na membrana da célula e que participam no metabolismo da parede celular. Quando o antimicrobiano se liga à PBP inibe a síntese da parede bacteriana (68).

Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência à penicilina podem resultar de plasmídeos que contenham o gene *bla*_{TEM-1}, de PBPs com baixa afinidade à penicilina (através de mutações nos genes *penA* e *ponA*), da sobre-expressão da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE (através de mutações na região promotora do gene *mtrR* ou no próprio gene *mtrR* que codifica o repressor MtrR) e da redução da permeabilidade da membrana exterior devido a alterações da porina PorB (através de mutações no gene *porB*) (26,69–71). É provável que as mutações no gene *pilQ*, que codificam uma proteína da família da secretina, também estejam envolvidas no desenvolvimento de resistência à penicilina (72).

Gene *bla*_{TEM-1}

Os isolados de *N. gonorrhoeae* PPNG contêm plasmídeos portadores do gene *bla*_{TEM-1}, que codifica a enzima β -lactamase do tipo TEM-1. Esta enzima hidrolisa o anel β -lactâmico da penicilina, desativando-a. Os plasmídeos são facilmente transferíveis entre isolados de *N. gonorrhoeae*, espalhando-se rapidamente. Os plasmídeos que codificam penicilinasas são do tipo: Ásia, África, Toronto, Rio, Nîmes e Nova Zelândia. Os plasmídeos dos tipos Ásia, África e Toronto têm sido associados a surtos epidemiológicos (70,73).

Mutações no gene *penA*

O gene *penA* codifica a proteína PBP2 implicada na síntese da parede celular.

A inserção de um ácido aspártico na PBP2 (A345a) é uma das mutações mais frequentemente encontrada em isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência à penicilina. Este microrganismo com resistência à penicilina também pode conter mosaicos alelos *penA* que podem ser adquiridas através de transferência de sequências de ADN, por transformação, entre estirpes *N. gonorrhoeae* e *Neisseria* spp. comensais que têm uma PBP2 com baixa taxa de acilação com a penicilina (74,75).

Mutações no gene *ponA*

O gene *ponA* codifica a PBP1 também envolvida na síntese da parede celular bacteriana. Na presença da mutação L421P a taxa de acetilação com os antibióticos β -lactâmicos diminui três a quatro vezes em comparação com a estirpe do tipo selvagem. Assim, estando presente a substituição L421P na PBP1, a espécie *N. gonorrhoeae* pode desenvolver resistência de alto nível à penicilina (76).

Mutações no gene *porB*

A porina PorB codificada pelo gene *porB* encontra-se na membrana externa dos isolados de *N. gonorrhoeae* e permite a passagem de pequenas moléculas como β -lactâmicos e tetraciclinas (77,78). As mutações mais frequentes que se desenvolvem no gene *porB* são substituições no aminoácido A121 ou substituições duplas nos aminoácidos G120 e A121 e estão associados a uma suscetibilidade diminuída aos antibióticos β -lactâmicos e tetraciclina (79,80). No entanto, as mutações no gene *porB* não aumentam a resistência na ausência de uma mutação no gene *mtrR* ou no seu promotor, sugerindo que a bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE e a porina PorB funcionam em conjunto para aumentar a resistência à penicilina e à tetraciclina, limitando a concentração do antibiótico no espaço periplasmático (79).

Bomba de efluxo *MtrC-MtrD-MtrE*

Mutações no domínio de ligação ao ADN do repressor MtrR (por exemplo, A39T ou G45D) diminuem significativamente a atividade do repressor, resultando num nível baixo ou intermédio de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, tetraciclina e macrólidos (24,26). Outras mutações no domínio dos múltímeros (por exemplo, H105Y e E202G) também podem ter impacto na função da proteína MtrR, diminuindo a suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* aos referidos antibióticos (81).

Na sequência que codifica o promotor do gene *mtrR* está presente uma repetição invertida com 13 pb entre os hexâmeros -10 e -35, onde a deleção de uma adenina (-A) ou uma dupla inserção do nucleótido timina (+TT) nesta região, impedem que a ARN polimerase interaja com o promotor do gene *mtrR* e, conseqüentemente, resultando num nível elevado de resistência (26,82).

Mutações no gene *mtrR* e/ou no promotor do gene *mtrR* diminuem a ligação do repressor MtrR ao promotor da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE causando uma sobre-expressão da bomba de efluxo e diminuindo assim a suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* aos referidos antibióticos (81,83,84).

Mutações no gene *pilQ*

Multímeros da proteína PilQ formam o pilus tipo IV, este encontra-se na membrana externa e permite que os antibióticos se difundam para o espaço periplasmático (85,86). A mutação E666K na proteína PilQ perturba a formação do complexo multimérico diminuindo a formação do pilus, causando um aumento da resistência aos antibióticos (72).

As mutações no gene *pilQ2* só aumentam a resistência à penicilina se também estiverem presentes mutações nos genes *penA*, *mtrR* e *porB* (72,76).

1.4.3. TETRACICLINA

Mecanismo de ação

A tetraciclina inibe a síntese proteica através da sua ligação reversível à subunidade ribossomal 30s (ARNm). Esta ligação impede o acesso do aminoacil-ARNt (ácido ribonucleico de transferência) ao local de ação no complexo ARNm – ribossoma e consequentemente não ocorre a adição de aminoácidos aos péptidos em formação (figura 8) (87).

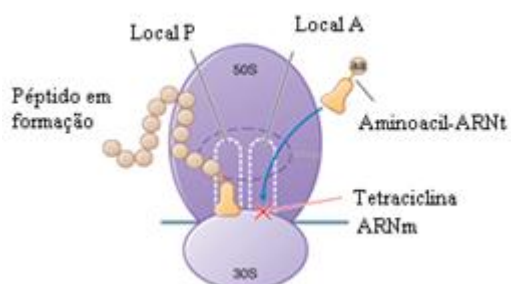


Figura 8: Mecanismo de ação das tetraciclinas. Impedem a ligação do aminoacil-ARNt ao complexo ARNm-Ribossoma. Adaptado de Pfizer (88).

Mecanismos de resistência

A resistência à tetraciclina é mediada por diversos mecanismos que incluem a aquisição do gene *tetM* (presente num plasmídeo) que codifica uma proteína protetora do ribossoma, a modificação do alvo (mutação no gene *rpsJ*, que codifica a proteína ribossômica 10S), a sobre-expressão da bomba de efluxo (devido a mutações no gene *mtrR* ou no seu promotor) e a diminuição da permeabilidade da membrana (devido a mutações no gene *porB*) (26,69,80,90).

Mutações no gene *rpsJ*

O gene *rpsJ* codifica a proteína ribossômica 10S que se encontra no ribossoma e está envolvida na ligação do ARNt ao ribossoma. Este gene está associado especificamente à

resistência dos isolados de *N. gonorrhoeae* à tetraciclina. A mutação pontual V57M resulta numa alteração do local de ligação da tetraciclina, diminuindo a afinidade do antibiótico pelo ARNm. A resistência de alto nível à tetraciclina mediada por mutações cromossômicas resulta da combinação de mutações em três locais no gene *mtrR* ou no seu promotor, no gene *porB* e no gene *rpsJ1* (90).

Gene *tetM*

A proteína TetM (codificada pelo gene *tetM*) tem homologia com o fator de alongação EF-G (medeia o movimento 5'-3' do ribossoma sobre o ARNm), pelo que ambas as proteínas competem pela ligação à subunidade ribossomal 30s, sendo que TetM tem uma afinidade maior do que EF-G, e bloqueia a ligação da tetraciclina ao ribossoma (91).

1.4.4. AMINOCICLITOL

Mecanismo de ação

A espectinomicina liga-se à molécula ARNr 16S localizada na subunidade ribossomal 30S de *N. gonorrhoeae* e inibe a tradução proteica, através do bloqueio do fator de alongação EF-G que impede a translocação do ARNt-péptido do local A para o local P (figura 9) (92).

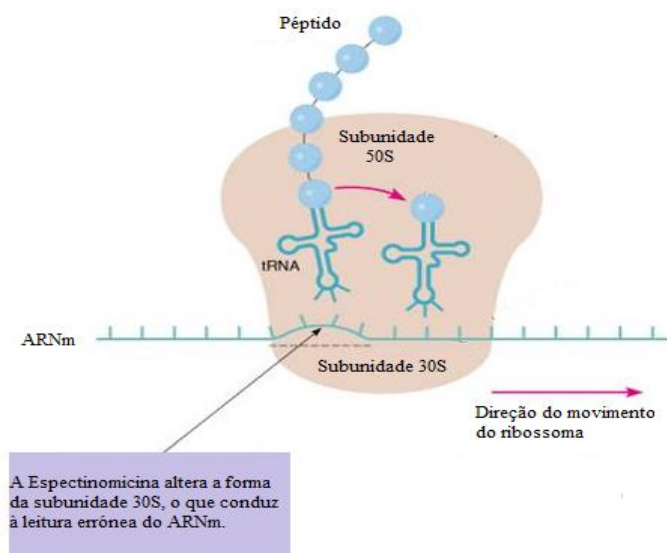


Figura 9: Inibição da síntese proteica pela espectinomicina. Adaptado de Kurahashi (185).

Mecanismos de resistência

A interação entre a espectinomicina e o ARNr 16S ocorre na hélice 34 (nucleótidos G1064 a C1194), mutações neste local podem contribuir para o desenvolvimento de resistência por parte de *N. gonorrhoeae* a este antibiótico. A mutação C1192U, por

exemplo, causa resistência de alto nível (CMI > 1024 µg/ml), pois altera a afinidade do microrganismo à espectinomicina (93).

1.4.5. MACRÓLIDOS

Mecanismo de ação

Os macrólidos atuam através da ligação reversível ao ARNr 23S na subunidade ribossomal 50S, inibindo a translocação (figura 10) (94).

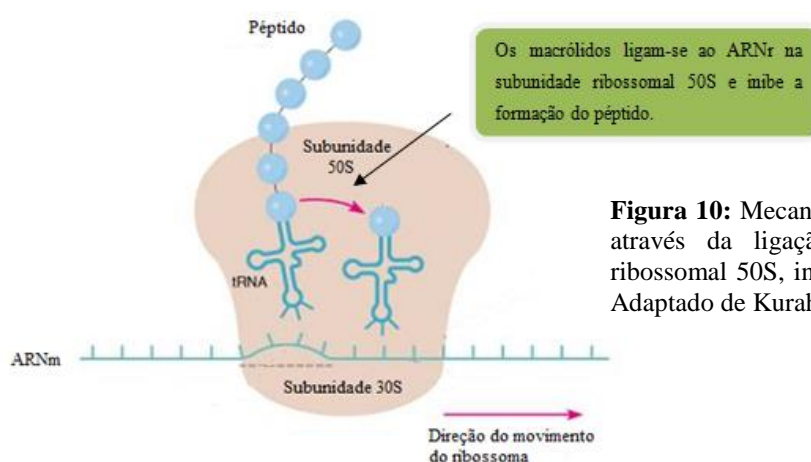


Figura 10: Mecanismo de ação dos macrólidos, através da ligação reversível à subunidade ribossomal 50S, inibindo a síntese de proteínas. Adaptado de Kurahashi (185).

Mecanismos de resistência

A resistência de *N. gonorrhoeae* aos macrólidos pode resultar de vários mecanismos como a modificação do ARNr 23S através da ação de metilases ARNr, mutações específicas em ARNr 23S e sobre-expressão de bombas de efluxo (92). O aumento da atividade da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE é o mecanismo mais comum na resistência de *N. gonorrhoeae* à azitromicina (96).

ARNr 23S

A metilação do ARNr 23S por enzimas metilases de ARNr é responsável por bloquear a ligação dos macrólidos ao seu alvo de ação no ribossoma de *N. gonorrhoeae*. Estas metilases são codificadas pelos genes *ermB*, *ermC* e *ermF* (95).

As mutações C2611T (baixo nível de resistência) e A2059G (elevado nível de resistência) nos alelos de ARNr 23S também impedem a ligação dos macrólidos ao ARNr 23S (96,97).

1.4.6. FLUOROQUINOLONAS

Mecanismo de ação

As quinolonas interferem no metabolismo do ADN bacteriano por inibição de duas enzimas, a ADN girase e a topoisomerase IV. Impedem que ocorra o processo de replicação, promovendo a rutura das cadeias de nucleótidos, resultando em um efeito bactericida (98,99).

A enzima ADN girase catalisa o superenrolamento do ADN linear e é composta por duas subunidades GyrA e duas subunidades GyrB, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respetivamente (98,99).

A topoisomerase IV é um tetrâmero com duas subunidades ParC e duas subunidades ParE, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respetivamente (figura 11) (92).

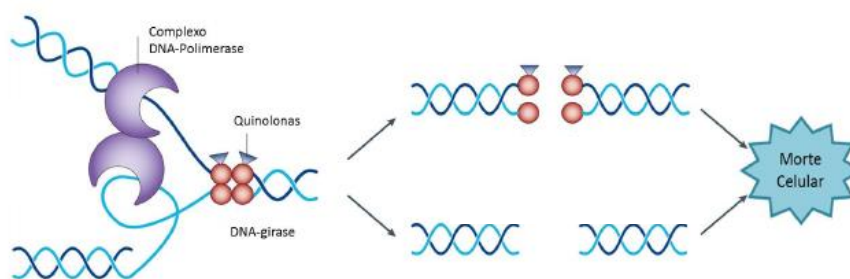


Figura 11: Mecanismo de ação das fluoroquinolonas. Adaptado de Kohanski *et al.* (2010) (100).

Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência desenvolvidos por *N. gonorrhoeae* às fluoroquinolonas devem-se a mutações nos genes *gyrA* e *parC* numa região bem definida denominada de região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) (101,102).

Gene *gyrA*

As mutações mais frequentemente detetadas na subunidade GyrA, da enzima ADN girase, são S91F e/ou D95N ou D95G. Estas alteram a afinidade de ligação das quinolonas à enzima ADN girase (98,99).

A resistência é normalmente observada em *N. gonorrhoeae* com mutações apenas no gene *gyrA*, ou com mutações em ambos os genes *gyrA* e *parC* (98,99).

Gene *parC*

As mutações mais frequentes na subunidade ParC da topoisomerase IV são D86N, S88P ou E91K. Estas diminuem a ligação das fluoroquinolonas à topoisomerase IV (98,99).

1.4.7. CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO

Mecanismo de ação

As cefalosporinas fazem parte da família dos β -lactâmicos e são classificadas por gerações: a 1ª geração exibe atividade nos microrganismos de coloração Gram-positiva e atividade moderada na presença de bactérias de coloração de Gram-negativo; a 2ª geração tem atividade aumentada sobre as bactérias de coloração Gram-negativo e para anaeróbios; por último, a 3ª geração apresenta atividade em bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo, nomeadamente na presença de microrganismos da família de *Enterobacteriaceae* (103).

As cefalosporinas impedem a ligação do peptidoglicano à parede celular bacteriana, uma vez que se ligam ao anel β -lactâmico das PBPs (92).

Mecanismos de resistência

A resistência às cefalosporinas de terceira geração por *N. gonorrhoeae* deve-se principalmente a mutações que modificam o alvo de ação (PBPs), como são exemplo mutações nos genes *penA* e *ponA* (92).

A resistência a estes antibióticos também se pode desenvolver a partir do aumento de efluxo e diminuição do influxo, uma vez que, têm sido detetadas mutações adicionais nos genes *mtrR* e *porB* entre isolados de *N. gonorrhoeae* com diminuição da suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração (15,104,105).

Há uma maior proporção de isolados *N. gonorrhoeae* com resistência à cefixima do que à ceftriaxona devido ao facto de o desenvolvimento de resistência à cefixima ocorrer na presença de mosaicos alelos *penA*, enquanto para o desenvolvimento de resistência à ceftriaxona são também necessárias mutações nos genes *penA*, *mtrR* e *porB* (15,106,107).

Mosaico alelo *penA*

Os mosaicos alelos *penA* (ou seja, alelos gerados num isolado recetor por recombinação de genes de regiões semelhantes do isolado doador, estreitamente relacionados), podem ser adquiridos por espécies de *Neisseria* spp. comensais presentes na faringe (*N. sicca*, *N. perflava*, *N. cinerea*, e / ou *N. flavescens*) por transformação *in vivo* e recombinação homóloga. Este é considerado o mecanismo mais comum de diminuição da suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração (108–115).

As proteínas PBP2 com estrutura mosaico têm mais de 70 aminoácidos alterados (92).

Gene penA

Padrões de mutações não mosaico no gene *penA* também podem contribuir para a resistência, são exemplo as substituições A501V e A501T. As mutações G542S, P551S e P551L já foram associadas estatisticamente ao aumento da CMI às cefalosporinas de terceira geração dos isolados de *N. gonorrhoeae* (92,116).

1.5. TERAPÊUTICAS DO FUTURO

Devido à rápida aquisição de resistência por parte dos isolados de *N. gonorrhoeae* aos antibióticos disponíveis o desenvolvimento de terapêuticas alternativas é prioritário.

1.5.1. AUMENTO DA DOSE DAS CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO

Tem sido proposto o aumento da dose e duração da terapêutica com a ceftriaxona para os casos em que se observa diminuição da suscetibilidade a este fármaco (117,118).

1.5.2. ASSOCIAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

Vários autores sugeriram diferentes associações de antibióticos de forma a ultrapassar a resistência de *N. gonorrhoeae*, de acordo com as seguintes recomendações:

- Ceftriaxona 1g IM, dose única, seguida de cefixima oral 400mg por dia durante dois dias ou de azitromicina oral 2g, dose única (118);
- Combinação de espectinomicina 2g IM e azitromicina oral 2g, ambas em dose única, como alternativa à ceftriaxona 250mg nos casos de resistência à cefixima (39).

1.5.3. NOVOS FÁRMACOS

O ertapenem é uma molécula relativamente recente da família dos carbapenemos que poderia constituir uma alternativa terapêutica nos casos de resistência à ceftriaxona. Contudo, o aparecimento de resistências codificadas pelo gene *penA* torna-a uma opção terapêutica ineficaz nestes casos (119,120).

O péptido antimicrobiano LL-37 faz parte da família das catelicidinas humanas e já foi demonstrado que apresenta atividade bactericida e imuno-moduladora para os isolados de *N. gonorrhoeae* (121).

O *aminocoumarin* é uma classe de antibacterianos naturais (obtidos a partir de espécies de *Streptomyces* sp.). Fazem parte desta classe a novobiocina, clorobiocina e a coumermicina (122).

O eugenol é um antisséptico natural extraído da planta *Ocimum sanctum*, e foi evidenciado em ratos que apresenta atividade antimicrobiana, particularmente em isolados de *N. gonorrhoeae* multirresistentes (123).

A solitromicina é um novo macrólido que revelou ter elevada atividade, *in vitro*, em isolados de *N. gonorrhoeae* multirresistentes (124).

Terminalia macroptera é uma planta africana com várias aplicações medicinais que demonstrou ter atividade antimicrobiana em vários isolados de *N. gonorrhoeae*, incluindo PPNG e TRNG (125).

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Estudar a taxa de infecção por *Neisseria gonorrhoeae*, o perfil de resistência e pesquisar mutações de estirpes resistentes, presentes numa população de homens que têm sexo com homens, que frequentaram uma clínica de rastreio de infeções sexualmente transmissíveis de Lisboa.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a taxa de infecção por *N. gonorrhoeae* na população de homens que têm sexo com homens que frequentaram uma clínica de rastreio de infeções sexualmente transmissíveis em Lisboa.
- ✓ Verificar os perfis de suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* aos seguintes agentes antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, azitromicina, ciprofloxacina, levofloxacina, espectinomicina, ceftriaxona e cefixima.
- ✓ Pesquisar mutações nos genes *penA*, *mtrR*, *gryA* e *parC* dos isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência intermédia ou resistência aos antibióticos testados.
- ✓ Determinar a contribuição de mutações nos referidos genes no desenvolvimento de resistência aos antibióticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

Os isolados de *Neisseria gonorrhoeae* estudados neste trabalho foram obtidos através da cultura de amostras de exsudados rectais ou exsudados uretrais (no caso de indivíduos com sintomatologia) de HSH que se dirigiram a uma clínica de rastreio de infeções sexualmente transmissíveis, localizada no Bairro Alto, em Lisboa, durante o período de Janeiro de 2013 a Fevereiro de 2015.

2.2. COLHEITA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

As amostras de exsudados uretrais e rectais foram semeadas, imediatamente após a colheita, em meio de cultura de chocolate VCA3 (gelose de chocolate com PolyVitex e com uma combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos, bioMériux). As placas semeadas foram incubadas numa jarra com atmosfera enriquecida em CO₂, proporcionada por uma vela, e posteriormente enviadas para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, onde foram colocadas numa estufa a 36 °C.

2.3. IDENTIFICAÇÃO DE *Neisseria gonorrhoeae*

A identificação da espécie *N. gonorrhoeae* foi realizada a partir de colónias puras no meio de cultura de chocolate PVX (gelose de chocolate com PolyViteX, bioMériux) após incubação durante a noite, a 36 °C com uma atmosfera com cerca de 5% de CO₂.

2.3.1. TESTE DA OXIDASE

As colónias obtidas no meio de cultura PVX foram testadas com o teste da oxidase (Bactident ® Oxidase, Merck). Neste teste, a superfície da reação da tira entrou em contato direto com uma ou duas colónias e passados cerca de 2 minutos foi observado o resultado. Para o controlo de qualidade, foi realizado o mesmo procedimento com a estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922, sendo expectável um resultado negativo (sem alteração de cor) e com a estirpe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sendo expectável um resultado positivo (alteração da cor da tira para violeta) (33).

2.3.2. COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram foi realizada numa lâmina com um esfregaço, obtido a partir de colónias puras presentes no meio de cultura de chocolate PVX. A lâmina corada foi observada com a objetiva de imersão (1000x).

2.3.3. TESTE RÁPIDO DE UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES

O teste rápido de utilização de açúcares foi realizado sempre que se obteve isolados Gram-negativos com morfologia de diplococos e com o teste de oxidase positivo.

Para o teste foi prepara a solução de sal tamponada (BSS) com:

- 100 mililitros (ml) de água destilada;
- 0,04 gramas (g) de fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4);
- 0,01 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4);
- 0,8 g de cloreto de potássio (KCl);
- 0,01 g de vermelho de fenol.

O pH foi ajustado a 8,4 após a solução ser esterilizada através de autoclavagem.

A partir de colónias puras do meio de cultura PVX, obtidas após incubação durante a noite a 36 °C numa atmosfera com 5% de CO₂, foi preparada uma suspensão com turvação equivalente a 5 da escala McFarland (bioMérieux) em 1 ml da solução BSS. Deste inóculo foram dispensados 100 microlitros (µl) em 5 poços de uma microplaca de plástico esterilizada. A quatro poços foram adicionados 25 µL de cada carboidrato (glucose, frutose, sacarose e maltose) numa solução a 20% e ao quinto poço não se adicionou nada, para servir como controlo negativo. Como controlo positivo foram utilizadas as estirpes *Neisseria meningitidis* ATCC 13090 e *Neisseria lactamica* ATCC 23971. A placa foi incubada a 36 °C em aerobiose e após duas a quatro horas foi observado o resultado (35).

2.3.4. TESTES BIOQUÍMICOS E ENZIMÁTICOS

A confirmação da identificação de *N. gonorrhoeae* foi realizada com o teste bioquímico e enzimático comercial api®NH (bioMérieux).

A partir de colónias puras em meio de cultura PVX, após incubação durante a noite a 36 °C numa atmosfera com 5% de CO₂, foi preparada uma suspensão com uma turvação equivalente a 4 da escala McFarland (bioMérieux) em 2 ml de solução API NaCl 0,85% Medium (bioMérieux). O inóculo foi distribuído nas cúpulas da galeria, fornecida pelo

kit comercial e de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a galeria ficou a incubar durante 2 horas a 36 °C, numa atmosfera aeróbia. A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (40).

2.4. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

O estudo da suscetibilidade aos antibióticos foi realizado por dois métodos: método de difusão em disco e o método epsilométrico (Etest). Em ambos os métodos foram incluídos os seguintes antibióticos: penicilina, cefixima, ceftriaxona, tetraciclina, ciprofloxacina, azitromicina e espectinomicina (33).

O método difusão em disco tem como vantagens a facilidade de execução e reprodução, a utilização de reagentes de baixo custo e o facto de fornecer resultados de fácil interpretação clínica. Contudo, apenas apresenta resultados qualitativos. Neste método os resultados obtidos da leitura dos diâmetros dos halos de inibição foram interpretados como isolado suscetível (S), com resistência intermédia (I) ou resistente (R) a um determinado antibiótico, de acordo com as normas estabelecidas do Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI) (tabela 1) (126).

No método Etest, as tiras apresentam um custo elevado e o número de antimicrobianos a serem testados por placa é limitado. No entanto, este é um método de fácil execução e com resultados quantitativos (127–129). Neste método os resultados obtidos para a concentração mínima inibitória (CMI) também foram classificados como isolado suscetível (S), com resistência intermédia (I) ou resistente (R), de acordo com as normas estabelecidas no CLSI (tabela 1) (126).

Isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à cefixima e ceftriaxona são recentes, portanto dificulta a definição de outras categorias de resistência, para além da “suscetível”. Como o aumento do valor da CMI para um antibiótico pode prever o desenvolvimento de resistência, o Projeto de Vigilância de Isolados de Gonococos (GISP) do CDC desenvolveu valores de alerta, sendo estes abaixo dos valores de critério definidos pelo CLSI, com o fim de vigilância de resistência e de proporcionar uma maior sensibilidade na deteção da diminuição da suscetibilidade da espécie *N. gonorrhoeae*. O valor de alerta para a cefixima é de $CMI \geq 0,25 \mu\text{g/ml}$ e para a ceftriaxona é de $CMI \geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ (38).

Não estão definidos critérios de interpretação para a azitromicina no CLSI, contudo o CDC no GISP, em 2010, definiu o valor de alerta para este antibiótico de $CMI \geq 2,00 \mu\text{g/ml}$ (38) e em 2005 o Laboratório de Referência de *Neisseria* (NRL) recomendou a utilização do valor crítico de halos de inibição de diâmetros de $\leq 30 \text{ mm}$ para interpretação de *N. gonorrhoeae* com suscetibilidade diminuída para a azitromicina (130). O Comité Europeu para o Teste de Suscetibilidade Antimicrobiano (EUCAST) definiu para a azitromicina, os critérios de isolado suscetível com $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ e isolado resistente $CMI \geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ (131).

A estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 está designada pelo CLSI para ser utilizada no Controlo de Qualidade (CQ). Se ao efetuar-se o estudo de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 pelo método de difusão em disco e pelo método Etest e os diâmetros dos halos e as CMIs corresponderem aos valores de critérios do CLSI de CQ (Tabela 2) os resultados obtidos dos isolados em estudo podem ser considerados como válidos (130,132).

Tabela 1: Critérios de interpretação dos resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos de acordo com as normas CLSI (126,130,132).

Antibiótico	Método	Critérios de Interpretação		
		S	I	R
Penicilina	Disco (10 U) (mm)	$\geq 47,00$	27,00-46,00	$\leq 26,00$
	Etest ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 0,06$	0,12-1,00	$\geq 2,00$
Cefixima	Disco (5 μg) (mm)	$\geq 31,00$	ND	ND
	Etest ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 0,25$	ND	ND
Ceftriaxona	Disco (30 μg) (mm)	$\geq 35,00$	ND	ND
	Etest ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 0,25$	ND	ND
Tetraciclina	Disco (30 μg) (mm)	$\geq 38,00$	31,00-37,00	$\leq 30,00$
	Etest ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 0,25$	0,50-1,00	$\geq 2,00$
Ciprofloxacina	Disco (5 μg) (mm)	$\geq 41,00$	28,00-40,00	$\leq 27,00$
	Etest ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 0,06$	0,12-0,50	$\geq 1,00$
Azitromicina	Disco (15 μg) (mm)	ND	ND	$\leq 30,00$
	Etest ($\mu\text{g/ml}$)	ND	ND	$\geq 2,00$
Espectinomicina	Disco (100 μg) (mm)	$\geq 18,00$	15,00-17,00	$\leq 14,00$
	Etest ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 32,00$	64,00	≥ 128

S – Suscetível, I – Resistência intermédia, R – Resistente, CMI – Concentração mínima inibitória; ND – Limites não definidos.

Tabela 2: Intervalos de controlo de qualidade para *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (126,130).

Antibiótico	Intervalos de Controlo de Qualidade de ATCC 49226	
Penicilina	Disco (10U) (mm)	26-34
	CMI (µg/ml)	0,25-1,00
Cefixima	Disco (5µg) (mm)	37-45
	CMI (µg/ml)	0,004-0,030
Ceftriaxona	Disco (30µg) (mm)	39-51
	CMI (µg/ml)	0,004-0,015
Tetraciclina	Disco (30g) (mm)	30-40
	CMI (µg/ml)	0,25-1,00
Ciprofloxacina	Disco (5µg) (mm)	48-58
	CMI (µg/ml)	0,001-0,008
Azitromicina	Disco (15µg) (mm)	27-36
	CMI (µg/ml)	0,125-0,500
Espectinomicina	Disco (100µg) (mm)	23-29
	CMI (µg/ml)	8,0-32,0

As amostras foram classificadas de acordo com os seguintes padrões de resistência (33,126,133):

- **CMRNG** (*Neisseria gonorrhoeae* com resistência mediada por mutações cromossómicas) - Resistência à penicilina (CMI $\geq 2,0$ µg/ml) e com CMI para a tetraciclina entre 2,0 µg/ml e a 8,0 µg/ml;
- **PPNG** (*Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinas) – Pesquisa de β -lactamase positiva;
- **TetR** (Resistência à tetraciclina mediada por mutações cromossómicas) - Pesquisa de β -lactamase negativa, suscetível à penicilina (CMI $< 2,0$ µg/ml) e com resistência à tetraciclina (CMI ≥ 2 µg/ml);
- **TRNG** (*Neisseria gonorrhoeae* com resistência de alto nível à tetraciclina mediada por plasmídeo) – Resistência de alto nível à tetraciclina devido à presença do plasmídeo com o gene *tetM* (CMI ≥ 16 µg/ml);
- **PenR** (Resistência à penicilina mediada por mutações cromossómicas) - Pesquisa de β -lactamase negativa e resistência à penicilina mediada por mutações cromossómicas (CMI ≥ 2 µg/ml);
- **PenI** (Resistência intermédia à penicilina) - Pesquisa de β -lactamase negativa, com resistência intermédia à penicilina mediada por mutações cromossómicas (0,12 µg/ml \geq CMI $\leq 1,0$ µg/ml);

- **TetI** (Resistência intermédia à tetraciclina) - Resistência intermédia à tetraciclina ($0,5 \mu\text{g/ml} \geq \text{CMI} \leq 1,0 \mu\text{g/ml}$);
- **QRNG** (*Neisseria gonorrhoeae* com resistência às quinolonas) - Resistência para a ciprofloxacina mediada por mutações cromossômicas ($\text{CMI} \geq 1,0 \mu\text{g/ml}$);
- **AznR** (*Neisseria gonorrhoeae* com resistência intermédia à azitromicina) – Isolados com $\text{CMI} \geq 2 \mu\text{g/ml}$ à azitromicina;

2.4.1. MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

O estudo da suscetibilidade aos antibióticos foi realizado em todos os isolados de *N. gonorrhoeae* pelo método de difusão em disco (126).

O inóculo foi obtido por suspensão em meio de cultura de Muller-Hinton (OXOID), a partir de colónias puras, após crescimento durante a noite a 36 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂ no meio de chocolate PVX, tendo sido ajustada a turvação ao equivalente a 0,5 da escala McFarland (bioMérieux). Após o ajuste da suspensão, o meio de cultura GC agar (OXOID) com 1% de suplemento de crescimento (Biovitex – Restoring Fluid, Biolite), foi inoculado com estrias por toda a superfície da placa, rodando a mesma 60°, duas vezes. Os discos dos antibióticos foram colocados na superfície do meio inoculado com uma distância mínima de 24 mm entre centro a centro de cada disco. As placas foram invertidas e incubadas a 36 °C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 20 a 24 horas. Posteriormente, os diâmetros das zonas de inibição, incluindo o diâmetro do disco, foram medidos e foram utilizados os critérios de interpretação para classificar a isolado em estudo como sensível, com resistência intermédia ou resistente (126).

2.4.2. MÉTODO ETEST

O teste de suscetibilidade aos antibióticos realizado pelo método Etest também foi executado para todos os isolados de *N. gonorrhoeae* incluídos no estudo. O procedimento foi semelhante ao do método de difusão em disco, em relação à preparação da suspensão com o isolado a estudar e a inoculação no meio de cultura GC com 1% de suplemento de crescimento. Uma ou duas tiras Etest, que se encontravam à temperatura ambiente, foram colocadas sobre a superfície do meio inoculado, tendo em atenção para que a superfície da tira com o antibiótico ficasse em contato com a superfície do meio de cultura. As placas foram invertidas e incubadas a 36 °C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 20 a 24 horas. Posteriormente, os resultados das

CMIs foram interpretados de acordo com as instruções do fabricante, sendo os isolados classificados como S, I ou R, de acordo com os critérios de interpretação já referidos (33,130).

2.5. PESQUISA DE MUTAÇÕES EM GENES QUE CONTRIBUEM PARA A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

2.5.1. EXTRAÇÃO DE ADN DOS ISOLADOS DE *Neisseria gonorrhoeae*

A extração de ADN foi realizada a partir de colônias puras de *N. gonorrhoeae* isoladas no meio de cultura PVX, após incubação durante a noite a 36 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂. A extração do ADN genômico das bactérias em cultura foi executada recorrendo à utilização do *kit* comercial QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) e de acordo com as instruções do fabricante (figura 12). As amostras de ADN foram eluídas numa solução tampão, fornecida no *kit* e congeladas a -20 °C. O ADN da estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 também foi extraído, utilizando-se o mesmo método (134,135).

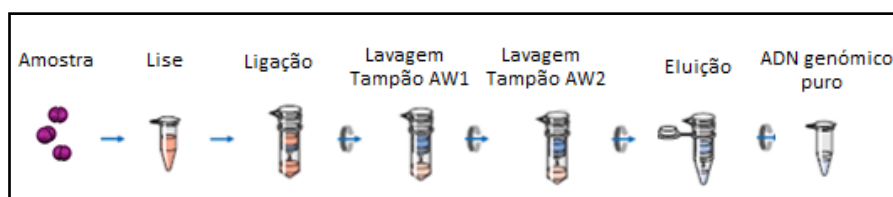


Figura 12: Esquema do protocolo de extração de ADN genômico com utilização do *kit* comercial QIAamp® DNA Mini Kit, de acordo com as instruções do fabricante.

2.5.2. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES QUE CONTRIBUEM PARA A RESISTÊNCIA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Consoante o fenótipo de resistência de cada isolado de *N. gonorrhoeae*, foram selecionados os genes a amplificar, considerando-se que, uma vez estando presente a resistência é esperado encontrarem-se mutações nos genes que contribuem para essa resistência. O gene *penA* (CMRNG, PenR, PenI e CefR), o gene *mtrR* e o promotor do gene *mtrR* (CMRNG, PenR, PenI, TRNG, TetR, TetI e AznR) e os genes *parC* e *gyrA* (QRNG) foram selecionados (16,96,98,111,136).

Tabela 3: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados na técnica de PCR e localização da região sequenciada.

Par <i>primers</i>	Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> (5'-3')	Estirpe <i>N. gonorrhoeae</i> de referência	Região amplificada (Nucleótidos)	Referências
<i>penA</i> -F <i>penA</i> -R	CGATATGATCGAACCTGG ACAATCTCGTTGATACTCG	LM306	1011 a 1869 ^a	(108,110,111,115,137,138)
<i>mtrR</i> -F <i>mtrR</i> -R	GCCAATCAACAGGCATTCTTA GTTGGAACAACGCGTCAAAC	CH95	853 a 1253 ^b	(83,95,137-139)
<i>gyrA</i> -F <i>gyrA</i> -R	TCCGCCACGACCACAAATTC CTGCCAGCATTTTCATGTGAG	MS11	17 a 433 ^c	(140-143)
<i>parC</i> -F <i>parC</i> -R	GTTTCAGACGGCCAAAAGCCC CGGACAACAGCAATTCGCAAT	MS11	121 a 420 ^d	(140-143)

a – Sequência amplificada corresponde aos aminoácidos (aa) 304 a 581. O domínio da transpeptidase da PBP2 corresponde aos aa 340 a 570. b - Sequência amplificada corresponde aos aa 1 a 60 que pertencem ao domínio de ligação do ADN do repressor MtrR. c - Sequência amplificada corresponde aos aa 6 a 144. A QRDR da subunidade GyrA encontra-se entre os aa 55 a 110. d - Sequência amplificada corresponde aos aa 41 a 140. A QRDR da subunidade ParC encontra-se entre os aa 66 a 119.

Os *primers* (TIB® MOLBIOL) utilizados encontram-se apresentados na tabela 3. As soluções de reserva dos *primers* foram preparadas com água desionizada esterilizada, de modo a obter uma concentração final de 100 µM. Posteriormente, a partir destas, foram preparadas soluções de trabalho com uma concentração final de 12,5 µM (16,104,111). A mistura de reação da técnica de PCR (50 µL) foi realizada de acordo com o esquema da tabela 4.

Tabela 4: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na PCR.

Reagentes	Concentração Trabalho	Volume por tubo (µL)	Concentração Final
Água desionizada esterilizada	-	29,2	-
Tampão Taq 10x (Bioline)	10x	5	1x
Desoxirribonucleótidos (Bioline)	200 µM	4	16 µM
Cloreto de magnésio (Bioline)	50 µM	2	2 µM
<i>Primer</i> forward (TIB® MOLBIOL)	12,5 µM	2	0,5 µM
<i>Primer</i> reverse (TIB® MOLBIOL)	12,5 µM	2	0,5 µM
Enzima Taq ADN polimerase (Biotaq®Bioline)	5 U/µL	0,8	2U/µL
ADN	-	5	-
Volume Total	-	50	-

Inicialmente foi utilizado um programa de amplificação por PCR já implementado no laboratório para identificação de um segmento do gene *cpxB* do plasmídeo críptico pJD de *N. gonorrhoeae* e seguidamente foi realizada a otimização da técnica para os diferentes genes a serem estudados, tendo sido ajustada a temperatura para cada par de *primers*.

A amplificação decorreu no termociclador *Eppendorf*[®] (Mastercycler personal), de acordo com as condições de amplificação apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Condições de amplificação da PCR.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	2 min	1 x
Desnaturação	94°C	30 seg	
Hibridação <i>penA</i>	48°C	1 min	40 x
<i>mtrR/gyrA</i>	57°C		
<i>parC</i>	63°C		
Extensão	74°C	30 seg	
Extensão final	74°C	5 min	1 x
Armazenamento	4°C	∞	

Em cada reação de amplificação foi utilizado um controlo positivo constituído por 5 µL de ADN da estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 e um controlo negativo, no qual o ADN foi substituído por água desionizada esterilizada.

2.5.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR foram amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Agarose molecular grade, Bionline) preparado a 1,5% com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5x. Para 100 ml de gel de agarose, foi adicionado 5 µL de brometo de etídio (concentração de 0,5 µg/ml). Depois do gel estar polimerizado foi colocado na tina Horizon[®] 11.14 (Amersham Pharmacia Biotech) com TAE 0,5x. No primeiro poço do gel foi aplicado 2,5 µL de um marcador de massa molecular (Hiperladder IV[®], Bionline) de 1000 pares de bases (pb) com bandas regularmente espaçadas a partir dos 100 pb. Em seguida, foram colocados 10 µL de cada produto amplificado adicionado de 3 µL de uma solução saturada de sacarose corada com azul de bromofenol 6x DNA loading dye (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7,6], Fermentas).

Uma corrente de 90V foi aplicada durante 60 minutos e as bandas de ADN foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) no transiluminador (Gel Doc XR[®], Bio-Rad). Foi esperada a visualização de bandas com 859 pb para o gene *penA*, 400 pb para o gene *mtrR*, 299 pb para o gene *parC* e 416 pb para o gene *gyrA* e nenhuma banda no caso do controlo negativo.

2.5.4. SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos amplificados pela técnica de PCR foram enviados para a empresa STAB Vida©, onde foram sequenciados, em ambos os sentidos.

Os *primers* utilizados para a sequenciação do ADN foram os mesmos utilizados na reação de PCR (tabela 3).

2.5.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS DA SEQUENCIAÇÃO

As sequências de ADN e os cromatogramas foram analisadas e editadas no programa *BioEdit - Sequence Alignment Editor*, versão 7.2.5 com o propósito de criar uma sequência consenso para cada isolado *N. gonorrhoeae* para o respectivo gene. Foi criada uma base de dados com todas as sequências nucleotídicas.

A tradução das sequências de nucleótidos para aminoácidos foi realizada através do programa online *ExPASy - Bioinformatics Resource Portal* (<http://web.expasy.org/translate/>).

O alinhamento das sequências de aminoácidos com a sequência de referência, para cada gene, foi realizado através do programa online *MAFFT - a multiple sequence alignment program* (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>).

As sequências alinhadas foram extraídas em formato FASTA e introduzidas novamente no programa *BioEdit* para pesquisa de possíveis mutações.

2.5.6. PESQUISA DE MUTAÇÕES

As sequências de aminoácidos da proteína PBP2 obtidas pelos isolados estudados foram comparadas com a sequência de aminoácidos da estirpe, suscetível à penicilina e às cefalosporinas de terceira geração, *N. gonorrhoeae* LM306 (Número de acesso no GenBank: M32091) (108). Os padrões de mutações na sequência de aminoácidos da proteína PBP2 (codificada pelo gene *penA*) foram classificados de acordo com Ito *et al.* (110), Whiley *et al.* (115) e Allen *et al.* (111).

A pesquisa de mutações no repressor MtrR e no promotor do gene *mtrR* foi realizada através da comparação das sequências de aminoácidos (número de acesso no GenBank: CAA81045) e de nucleótidos (número de acesso no GenBank: Z25796) da estirpe de *N. gonorrhoeae* CH95. Esta estirpe foi descoberta na Tailândia em 1990 é suscetível à penicilina e apresentou pesquisa de β -lactamases negativa (139).

Em relação aos isolados QRNG, as sequências de aminoácidos da subunidade GyrA (gene *gyrA*) e da subunidade ParC (gene *parC*) foram comparadas com as sequências de aminoácidos das referidas subunidades da estirpe MS11 (número de acesso no GenBank: AAA82128 e AAA82151, respectivamente) (143).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na globalidade, a taxa de infeção por *Neisseria gonorrhoeae* na população de HSH estudada foi de 5,8% (30/518), o que corresponde a 4,9% (25/508) das amostras dos exsudados rectais e a 50,0% (5/10) amostras dos exsudados uretrais, durante Janeiro de 2013 a Fevereiro de 2015. Os casos sintomáticos corresponderam a 1,9% (10/518) da população.

Nos Estados Unidos da América (EUA) a infeção por *N. gonorrhoeae* é a segunda infeção de notificação obrigatória mais relatada, com mais de 300 000 casos identificados em 2011 (38).

Em 2011, o Programa Europeu de Vigilância Gonocócica Antimicrobiana (Euro-GASP) comunicou que em 28 países da União Europeia, foram notificados 39 179 casos de infeção por *N. gonorrhoeae*, contribuindo para uma taxa de 12,6 pessoas por cada 100 000 habitantes destes países (13).

Os dados resultantes de notificação obrigatória em Portugal revelam que a incidência de infeção por *N. gonorrhoeae* tem vindo a aumentar na última década de 0,27 para 0,99 casos por cada 100 000 habitantes entre 2004 e 2013 (144). Note-se que estes números não correspondem à realidade por subnotificação de casos de infeção por *N. gonorrhoeae*.

A prevalência de indivíduos com infeção por *N. gonorrhoeae*, que frequentaram a consulta de Infeções Sexualmente Transmissíveis (IST) no Hospital de São João, no Porto (2001 a 2011) foi de 0,8% (21/2711). Este valor é inferior à proporção obtida no presente estudo. Dos indivíduos infetados por *N. gonorrhoeae* a maioria, 86% (18/21), eram heterossexuais e 14% (3/21) eram HSH, entre os quais 22% (7/21) eram assintomáticos (145).

Em 2003, na cidade de São Francisco dos EUA e em 2007 em várias cidades do mesmo país (Chicago, Los Angeles, Nova Iorque, São Francisco, Seattle) a prevalência de HSH com infeção por *N. gonorrhoeae* foi de 5,6% (32/574) em amostras de exsudados rectais e uretrais e de 5,4% (1620/30000) em amostras de exsudados rectais, respetivamente, resultados semelhantes ao presente estudo (17,146).

3.1. RESULTADOS DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

O método de referência para o estudo da suscetibilidade aos antibióticos para *N. gonorrhoeae* é o método de diluição em agar. No entanto, este é um método complexo de executar, pelo que tanto o método de difusão em disco, como a metodologia Etest têm sido utilizados para estudar a suscetibilidade aos antibióticos de isolados de *N. gonorrhoeae* em substituição do método de referência (33,130).

Os resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos pelos métodos de difusão em disco e Etest encontram-se apresentados nas tabelas 6 e 7, respetivamente.

Tabela 6: Resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em disco (126).

Antibiótico	Concentração do disco	Sensível n (%)	Intermédio n (%)	Resistente n (%)
Penicilina	10 U	2 (7%)	24 (80%)	4 (13%)
Cefixima	5 µg	30 (100%)	0 (0%)	
Ceftriaxona	30 µg	30 (100%)	0 (0%)	
Tetraciclina	30 g	3 (10%)	13 (43%)	14 (47%)
Ciprofloxacina	5 µg	16 (57%)	3 (10%)	11 (37%)
Azitromicina	15 µg	27 (90%)		3 (10%)
Espectinomicina	100 µg	30 (100%)		0 (0%)

Tabela 7: Resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método Etest (33,126).

Antibiótico	Intervalo de concentração da tira Etest	Sensível n (%)	Intermédio n (%)	Resistente n (%)
Penicilina	0,02-32 µg/ml	8 (27 %)	17 (57%)	5 (17%)
Cefixima	0,016-256 µg/ml	30 (100%)	0 (0%)	
Ceftriaxona	0,002-32 µg/ml	30 (100%)	0 (0%)	
Tetraciclina	0,15-256 µg/ml	12 (40%)	13 (43%)	5 (17%)
Ciprofloxacina	0,002-32 µg/ml	19 (63%)	0 (0%)	11 (37%)
Azitromicina	0,016-256 µg/ml	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Espectinomicina	0,064-1024 µg/ml	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Os resultados obtidos pelos métodos de difusão em disco e Etest para os vários antibióticos estudados (penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina e azitromicina) não foram concordantes entre si, com exceção dos que se referem à suscetibilidade à cefixima, à ceftriaxona e à espectinomicina. Estes foram concordantes entre os dois métodos utilizados, uma vez que se verificou que todos os isolados foram suscetíveis a estes antibióticos, como se pode observar na figura 13.

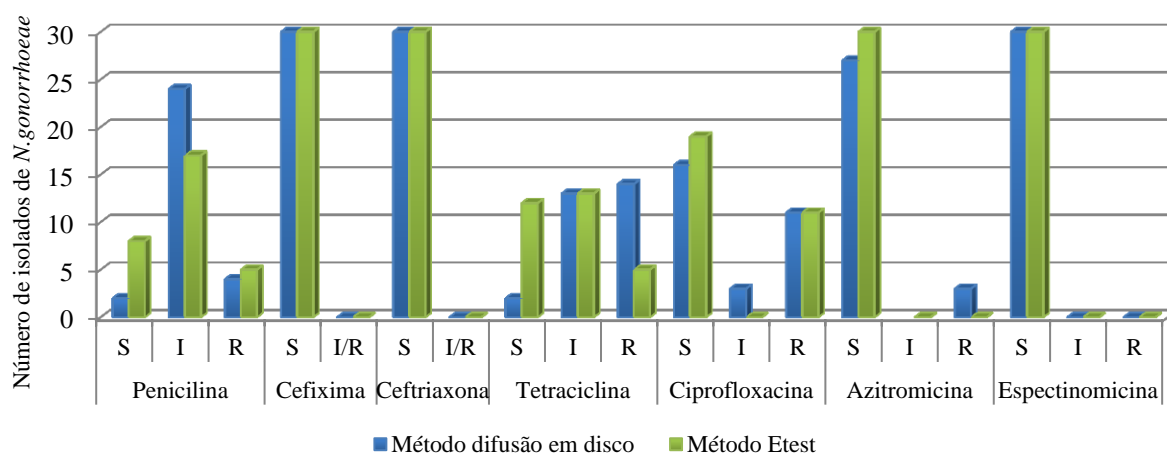


Figura 13: Resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *N. gonorrhoeae* em estudo, pelos métodos de difusão em disco e Etest.

Na Índia, e tal como neste estudo, Singh *et al.* (147) apresentaram também uma maior discrepância de resultados para a penicilina, ciprofloxacina e tetraciclina. Os autores estudaram a suscetibilidade de 295 isolados de *N. gonorrhoeae* através dos métodos de difusão em disco e Etest para a penicilina, ciprofloxacina, espectinomicina, ceftriaxona e tetraciclina. Os resultados foram concordantes em 87,5%, 88,5%, 100%, 98,6% e 74,9%, respetivamente para cada antibiótico.

Devido a estas diferenças entre os dois métodos, decidiu-se apenas discutir os resultados obtidos pelo método Etest, uma vez que, é um método alternativo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para a espécie *N. gonorrhoeae*. Vários autores demonstraram, anteriormente, que existe uma elevada concordância (acima de 90%) com o método de referência (127–129). Além disto, e como anteriormente citado, é um método mais fácil de executar do que o método de referência.

Os isolados de *N. gonorrhoeae* foram classificados de acordo com os correspondentes fenótipos de resistência, tendo em conta os valores obtidos no teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método Etest (tabela 8).

Tabela 8: Fenótipos de resistência dos isolados de *N. gonorrhoeae* obtidos nos exsudados rectais e uretrais.

Fenótipo de resistência	Identificação dos isolados de <i>N. gonorrhoeae</i>
PenI	1, 2*, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20*, 25, 26 e 28*
PPNG	21*, 22, 23 e 27
TetI	1, 2*, 3*, 4, 6, 8, 9, 14, 17, 18, 19, 25 e 27
TetR	12 e 29
TRNG	5 e 13
CMRNG	7
QRNG	1, 5, 6, 7, 12, 17, 21*, 22, 23, 26 e 27
Sem resistências	10, 15, 24, 29 e 30

* - Isolados de *N. gonorrhoeae* obtidas a partir de amostras de exsudados uretrais.

3.1.1. TESTE DE SUSCETIBILIDADE À PENICILINA

No estudo da suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* à penicilina obtiveram-se 27% (8/30) suscetíveis, 57% (17/30) com resistência intermédia e 17% (5/30) resistentes, dos quais 80% (4/5) foram classificados como *N. gonorrhoeae* produtora de penicilinase (PPNG).

Em Portugal, Florindo *et al.* (148) observaram 79,1% (149/187) de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à penicilina, uma proporção muito superior à obtida neste estudo. No entanto, os referidos autores realizaram o estudo entre 2004 e 2009, para o qual contribuíram isolados de 25 laboratórios do país (Algarve, Lisboa, Leiria e Porto) provenientes na sua maioria de uma população composta por homens.

No presente estudo, o número de isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência intermédia foi superior aos que apresentaram resistência. Allen *et al.* no Canadá (111), Starnino *et al.* em Itália (149) e Ilina *et al.* na Rússia (16) também observaram esta situação, em que 77,1% (115/149), 40,3% (131/326), 62,2% (289/464) dos isolados apresentaram resistência intermédia e 12,1% (18/149), 25,5% (83/326) e 11,9% (55/464) foram resistentes, respetivamente.

No estudo que se apresenta, a maioria dos isolados com resistência a este antibiótico foram PPNG (80%). De modo semelhante, os isolados resistentes à penicilina (100%) foram classificados como PPNG, no estudo de Starnino *et al.*(150).

No entanto, a proporção de PPNG em diferentes áreas geográficas é diferente. Por exemplo, na China (2000 a 2012) (151) foi de 36,5% (429/1175), em Portugal (2004 a 2009) (148) foi de 13,4% (29/149) e no Canadá (2008) (111) foi de 27,8% (5/18).

A relevância do fenótipo PPNG em isolados de *N. gonorrhoeae* resulta do facto de conterem um plasmídeo com o gene *bla*_{TEM-1}, que codifica uma β-lactamase tipo TEM-1. Esta enzima hidrolisa o anel β-lactâmico das penicilinas, inativando o antibiótico (152). Após o aparecimento dos isolados PPNG em 1976, estas estirpes propagaram-se rapidamente a nível internacional, o que teve um grande impacto na saúde pública na década de 1980, obrigando a uma mudança para uma terapêutica alternativa (153).

3.1.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE ÀS CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO

A maioria dos isolados de *N. gonorrhoeae* foi suscetível à cefixima e à ceftriaxona. No entanto, houve 1/30 (3,3%) isolado que apresentou uma CMI = 0,25 µg/ml para a cefixima.

Os critérios de interpretação da suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração são diferentes por parte das entidades CLSI e EUCAST. De acordo com a primeira, a suscetibilidade à ceftriaxona e à cefixima é definida com $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$, portanto, isolados com $CMI > 0,25 \mu\text{g/ml}$ são considerados não suscetíveis (126). De acordo com EUCAST, a suscetibilidade aos antibióticos é definida por $CMI \leq 0,12 \mu\text{g/ml}$, sendo que, isolados com $CMI > 0,12 \mu\text{g/ml}$, são classificados como suscetibilidade diminuída/resistência (131). Além, disto o CDC desenvolveu valores de alerta para a cefixima com $CMI \geq 0,25 \mu\text{g/ml}$ e para a ceftriaxona com $CMI \geq 0,125 \mu\text{g/ml}$. A OMS definiu suscetibilidade diminuída para a cefixima com $CMI \geq 0,25 \mu\text{g/ml}$ e para a ceftriaxona com $CMI \geq 0,125 \mu\text{g/ml}$ (10,38). Portanto, o referido isolado, de acordo com as normas de CLSI é suscetível, com o CDC apresenta um valor de alerta e com EUCAST e a OMS apresenta suscetibilidade diminuída/resistência à cefixima. É necessário realizar mais estudos para clarificar os critérios de interpretação do teste de suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração.

A diminuição da suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* às cefalosporinas de terceira geração surgiu pela primeira vez na Ásia. No Japão, entre 1999 e 2002, a percentagem de isolados com $CMI \geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ para a cefixima aumentou de 0% a 30 % (59).

Em Portugal, Florindo *et al.* (148) observou 2,1% (4/187) isolados com suscetibilidade diminuída à ceftriaxona ($0,125 \mu\text{g/ml} \geq CMI \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$).

A diminuição da suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração também tem sido observada em outros países da União Europeia (UE). Em 2011, num estudo com 21

países, observaram-se 7,6% (145/1902) isolados com suscetibilidade diminuída à cefixima, e pela primeira vez, foram detetados dez isolados com diminuição da suscetibilidade à ceftriaxona (13).

Na população de HSH, a nível nacional nos EUA, os isolados de *N. gonorrhoeae* apresentaram um aumento da CMI para a cefixima e para a ceftriaxona de 0,2% (2006) para 3,8% (2011) e de 0,0% (2006) para 1,0% (2011), respetivamente (38).

3.1.3. TESTE DE SUSCETIBILIDADE À TETRACICLINA

Em relação à tetraciclina os resultados da suscetibilidade foram os seguintes 40% (12/30) suscetíveis, 43% (13/30) com resistência intermédia e 17% (5/30) resistentes.

Dois isolados (6,7%) foram classificados como *N. gonorrhoeae* com resistência de alto nível à tetraciclina mediada por plasmídeo (TRNG).

Apenas 3,3% (1/30) isolados foram classificados como *N. gonorrhoeae* com resistência mediada por mutações cromossómicas (CMRNG).

Tal como no estudo da penicilina, também no caso da tetraciclina, o número de isolados com resistência intermédia é superior ao número de isolados com resistência. No Canadá em 2011(111) e na Itália em 2008 (149) também obtiveram 47% (70/149) e 53% (172/326) de isolados com resistência intermédia e 25,5% (38/149) e 19,1% (62/326) de isolados com resistência à tetraciclina, respetivamente.

O primeiro caso de *N. gonorrhoeae* resistente à tetraciclina (TRNG) isolado em Portugal foi documentado em 1990, em um indivíduo atendido num Centro de Infecções Sexualmente Transmissíveis, em Lisboa (154).

Na Europa em 2010 (155) e na China em 2014 (151) relataram uma prevalência de isolados de *N. gonorrhoeae* com o fenótipo TRNG superior à deste estudo, 16% (205/1284) e 46,4% (639/1378), respetivamente. O estudo Europeu foi realizado em 2008 e envolveu 17 países da Europa, a maioria da população era composta por homens, não apresentando a sua tendência sexual. O estudo na China foi realizado entre 2000 a 2012, com indivíduos que frequentaram uma clínica de dermatologia em Guangdong.

Na Europa em 2010 (155) e na China em 2014 (136) observaram prevalências de isolados classificados como CMRNG superiores com 27% (1284) e 27,8% (334).

O primeiro caso de TRNG foi identificado pela primeira vez em 1985, na Georgia (EUA). O aparecimento dos primeiros conjuntos de TRNG conduziu a um estudo de 3 semanas na Georgia, onde se observou que 3,4% (6/174) foram identificados como

TRNG (66). Os isolados TRNG dispersaram-se rapidamente, uma vez que, em abril de 1987, o fenótipo TRNG foi detetado em 17 estados dos EUA (156).

3.1.4. TESTE DE SUSCETIBILIDADE À CIPROFLOXACINA

Em relação à ciprofloxacina os resultados da suscetibilidade foram os seguintes 63% (19/30) suscetíveis e 37% (11/30) resistentes. Este último grupo foi classificado com o fenótipo de *N. gonorrhoeae* resistente às quinolonas (QRNG).

Níveis elevados de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à ciprofloxacina têm sido registados em vários locais da Europa em 2011 (157) num estudo com 17 países da UE, 63% (861/1366) de isolados apresentaram resistência a este antibiótico (157).

A taxa de isolados resistentes a este antibiótico é semelhante à proporção relatada por outros estudos, como por exemplo, em Portugal em 2010(148) e em Itália em 2008(149) obtiveram 37,4% (70/187) e 34,2% (111/326) isolados com resistência à ciprofloxacina, respetivamente (15,16,22).

Atualmente, vários autores observaram que a prevalência de QRNG se mantém elevada no mundo (62,106,107,158).

Estirpes de *N. gonorrhoeae* com mutações nos aminoácidos 91 e 95 na subunidade GyrA da enzima ADN girase, que causam diminuição da suscetibilidade ou resistência à ciprofloxacina aumentam o *fitness* bacteriano em comparação com estirpes de *N. gonorrhoeae* do tipo selvagem, no mesmo modelo murino (159). Este é um exemplo de que os mecanismos de resistência antimicrobiana podem aumentar a sobrevivência e o *fitness* das bactérias, justificando o motivo pelo qual estes mecanismos de resistência são mantidos apesar da interrupção dos antimicrobianos específicos nos regimes de tratamento (106,158,160).

A persistência dos determinantes de resistência antimicrobiana pode dever-se ao facto de não afetarem significativamente o *fitness* bacteriano (aptidão biológica da bactéria em sobreviver, alimentar-se e reproduzir-se, que pode ser demonstrada através do ritmo de crescimento, de capacidade de virulência e/ou da capacidade de transmissão bacteriana entre hospedeiros); de diminuírem o *fitness* bacteriano, surgindo no entanto, outras mutações secundárias compensatórias; e melhorarem a aptidão bacteriana na sua capacidade de transmissão e de virulência (159).

3.1.5. TESTE DE SUSCETIBILIDADE À AZITROMICINA

Todos os isolados de *N. gonorrhoeae* demonstraram ser suscetíveis à azitromicina.

Atualmente a azitromicina é utilizada juntamente com a ceftriaxona como terapêutica combinada para o tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* (38).

A resistência a este antibiótico em isolados de *N. gonorrhoeae* em Portugal, de acordo com os dados de ESSTI (Vigilância Europeia de Doenças Sexualmente Transmissíveis), em 2006 e 2007 foi de 6,9% e 8,3%, respetivamente (155).

Na Europa tem sido registado um aumento dos níveis de resistência à azitromicina. Os autores Cole *et al.* em 2009 (157) e Cole *et al.* em 2010 (155) realizaram estudos com 17 países da UE e observaram 2% (24/1285) e 13% (180/1366) de isolados resistentes à azitromicina.

Isolados com um nível elevado de resistência à azitromicina (CMI \geq 256 $\mu\text{g/L}$) foram detetados em Itália (150), na Argentina (161), na Escócia (162), em Inglaterra (163) e na França (164).

A azitromicina não é recomendada como o único antimicrobiano no tratamento para a infecção por *N. gonorrhoeae*, mas tem um papel importante na terapêutica combinada com as cefalosporinas de terceira geração (165).

3.1.6. TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ESPECTINOMICINA

Todos os isolados de *N. gonorrhoeae* foram suscetíveis à espectinomicina.

Em Portugal, Florindo *et al.* (148) também observaram que todos os isolados de *N. gonorrhoeae* foram suscetíveis à espectinomicina.

Isolados resistentes à espectinomicina foram relatados em 1967 nos Países Baixos (166), 1981 nas Filipinas (167), 1981 na Coreia do Sul (168) e 1983 em Inglaterra (169). Posteriormente, espectinomicina foi removida como monoterapia empírica de primeira linha para a infecção por *N. gonorrhoeae*, a nível internacional (92). Atualmente, tanto quanto é do nosso conhecimento, na Europa os isolados de *N. gonorrhoeae* apresentam suscetibilidade à espectinomicina, tal como observado por vários autores (56,155,157,168).

Este antibiótico pode ser uma alternativa terapêutica em doentes infetados por *N. gonorrhoeae*, com intolerância às cefalosporinas. No entanto, a espectinomicina não está disponível em muitos países, e teme-se que ocorra um desenvolvimento rápido de resistência, caso seja utilizada como terapêutica de primeira linha. Além disso,

espectinomomicina é pouco eficaz no tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* da faringe (170).

3.2. PESQUISA DE MUTAÇÕES EM GENES QUE CONTRIBUEM PARA A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

A pesquisa de mutações nos isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência ou resistência intermédia aos antibióticos estudados foi realizada no domínio da transpeptidase da PBP2 (gene *penA*), no domínio de ligação ao ADN do repressor MtrR (gene *mtrR*), na sequência que codifica o promotor do gene *mtrR* e na região QRDR da subunidade ParC da topoisomerase IV (gene *parC*) e da subunidade GyrA da enzima ADN girase (gene *gyrA*).

O gene *penA* (nucleótidos 1011 a 1869) foi amplificado em 18 isolados de *N. gonorrhoeae* (CMRNG e PenI), o gene *mtrR* e a sequência que codifica o promotor do gene *mtrR* (nucleótidos 853 a 1253) foram amplificados em 23 isolados de *N. gonorrhoeae* (CMRNG, PenI, TRNG, TetR e TetI), e as regiões QRDR dos genes *parC* (nucleótidos 121 a 420) e *gyrA* (nucleótidos 17 a 433) foram amplificadas em 11 isolados de *N. gonorrhoeae* (QRNG).

3.2.1. PESQUISA DE MUTAÇÕES NO REPRESSOR MtrR E NO PROMOTOR DO GENE *mtrR*

A pesquisa de mutações no domínio de ligação ao ADN do repressor MtrR [aminoácidos (aa) 1 a 60] e no promotor do gene *mtrR* foi realizada em 23 isolados de *N. gonorrhoeae* com os fenótipos CMRNG, PenI, TRNG, TetR e TetI (tabela 9 e Anexo A).

Todos os isolados com os fenótipos CMRNG, PenI, TRNG, TetR e TetI apresentaram mutações na região do promotor do gene *mtrR* e/ou no domínio de ligação ao ADN do repressor MtrR.

Mutações no gene *mtrR* e no promotor do gene *mtrR*, tanto isoladamente ou em combinação, causam uma sobre-expressão da bomba de efluxo, diminuindo a suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* a vários antibióticos (macrólidos, penicilinas e tetraciclina) (81,83,84).

Tabela 9: Mutações no domínio de ligação ao ADN no repressor MtrR e no promotor do gene *mtrR*, fenótipos dos isolados estudados, obtidos a partir de exsudados rectais e exsudados uretrais.

Fenótipo de resistência	Identificação dos isolados <i>N. gonorrhoeae</i>	Mutações no repressor MtrR ^a	Mutações no promotor do gene <i>mtrR</i>
	11	A39T	+T
PenI	20* e 26	A39T	WT
	16 e 28*	A39T; R44H	WT
TetI	3*, 4, 14	A39T; R44H	WT
TetR	29	A39T; Y48D	WT
	18 e 19	A39T; R44H	WT
PenI; TetI	1, 6, 8, 17, 25	WT	-A
	2*	G45D	WT
	9		b
PenI; TRNG	13	A39T; Y48D	WT
	5	A39T	WT
PenI; TetR	12	WT	-A
PenR; TetI	27	A39T	WT
CMRNG	7	WT	-A

WT – Isolado do tipo selvagem, ou seja, a sequência de ADN do isolado em estudo é igual à sequência de ADN do isolado de referência; a – As mutações foram pesquisadas nos aa 1 a 60 do repressor MtrR; b- Sequência que codifica o promotor do gene *mtrR* do isolado nº 9 apresenta 100% de identidade nucleotídica com a estirpe *N. meningitidis* C:2b,4:P1.5 (Número de acesso no GenBank AJ270527); * - Isolados de *N. gonorrhoeae* obtidas a partir de amostras de exsudados uretrais.

O isolado nº 9 apresentou a sequência amplificada (que codifica o promotor do gene *mtrR* e o domínio de ligação ao ADN do repressor MtrR) com 100% de identidade nucleotídica com a estirpe *Neisseria meningitidis* LNP21362 (GenBank CP006869), confirmada através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (figuras 14 e 15).

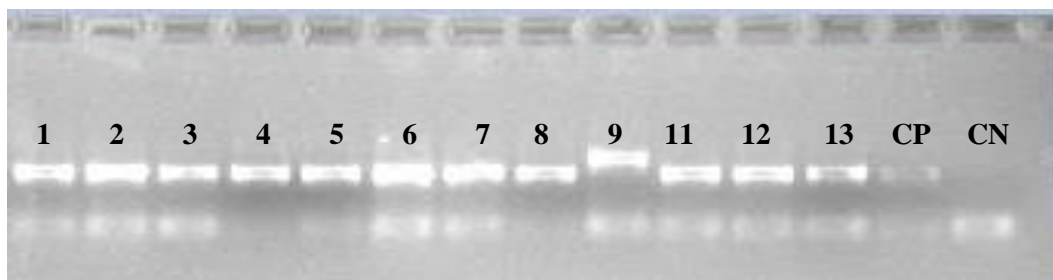


Figura 14: Eletroforese dos produtos de PCR dos isolados de *N. gonorrhoeae* (nº1 a nº13) após amplificação do promotor do gene *mtrR* e do gene parcial *mtrR*. A banda do isolado nº 9 apresenta maior tamanho molecular. CP – Controle positivo e CN – Controle negativo.



Figura 15: Alinhamento com sequências que codificam o promotor do gene *mtrR* e parte do gene *mtrR* da estirpe *N. gonorrhoeae* CH95 (GenBank Z25796), da estirpe *N. meningitidis* LNP21362 (GenBank CP006869) e do isolado n° 9

Trembizki *et al.* (171) também verificaram que dez isolados de *N. gonorrhoeae* tinham a região do promotor do gene *mtrR* com uma identidade nucleotídica de 76,9% com o isolado *N. gonorrhoeae* FA1090 e 94,8% com um isolado *N. meningitidis* (Número de acesso no GenBank CP002422) (171).

A exposição de *Neisseria* spp. a agentes antimicrobianos (no tratamento da infecção por *N. gonorrhoeae* ou outras infecções) pode resultar na seleção de estirpes resistentes, devido a mutações genéticas espontâneas e/ou devido a aquisição de todo ou partes de genes de resistência. Assim, esta pode surgir inicialmente em espécies de *Neisseria* spp. comensais, que atuam como um reservatório de genes que conferem resistência, e podem ser transferidos para estirpes de *N. gonorrhoeae* através do processo de transformação (capacidade de adquirir partes de ADN dispersos no meio e utilizá-lo com se fosse ADN próprio) (83,107,172). A infecção por *N. gonorrhoeae* na faringe geralmente é assintomática. Parece que, *N. gonorrhoeae* e *Neisseria* spp. comensais podem coexistir por longos períodos na faringe, onde pode ocorrer a maioria das transferências de material genético entre as referidas espécies. Uma vez os determinantes de resistência adquiridos por *N. gonorrhoeae* podem ocorrer transferência de sequências de ADN entre estirpes de *N. gonorrhoeae*, via transformação, podendo transmitir rapidamente os determinantes por toda a população (4,173).

3.2.2. PESQUISA DE MUTAÇÕES QUE CONTRIBUEM PARA A RESISTÊNCIA À PENICILINA

A pesquisa de mutações, no domínio da transpeptidase da PBP2 (aa 340 a 575), no domínio de ligação do repressor MtrR (aa 1 a 60) e no promotor do gene *mtrR* foi

realizada em 18/30 isolados de *N. gonorrhoeae* com os fenótipos CMRNG e PenI (tabela 10 e Anexo A).

Nos isolados estudados foram detetados os seguintes padrões de mutações na PBP2: II, V, IX, XII, XIV, XIX, XXII, A, B e o padrão de mutações na PBP2 mosaico: XXXIV (tabela 11) (110,111,115). Com exceção dos padrões A e B, todos os outros foram descritos por Ito *et al.* (110), Whiley *et al.* (115) e Allen *et al.* (111).

Tabela 10: Padrões de mutações da PBP2 e mutações no repressor MtrR e na sequência que codifica o promotor do gene *mtrR*, e CMI para a penicilina dos isolados de *N. gonorrhoeae* estudados.

Padrão de mutações na PBP2 ^a	Mutações no repressor MtrR ^b	Mutações no promotor do gene <i>mtrR</i>	CMI para a penicilina (µg/ml)	Identificação dos isolados <i>N. gonorrhoeae</i>
II		C	0,25	9
II	A39T	WT	0,12	20* e 26
II	A39T/R44H	WT	0,25 0,12	16 18, 19 e 28*
V	WT	-A	1,00	12
IX	WT	-A	0,50	8
XII	WT	-A	0,12	25
XIV	A39T/Y48D	WT	0,12	13
XIX	A39T	WT	0,12	5
XXII	A39T	+T	0,12	11
A	WT	-A	0,12 0,25 2,00	1 6 7
B	G45D	WT	0,12	2*
XXXIV	WT	-A	1,00	17

WT – Isolado do tipo selvagem, ou seja, a sequência de ADN do isolado em estudo é igual à sequência de ADN do isolado de referência; a – Mutações pesquisadas entre os aa 340 e 575 na PBP2; b – As mutações foram pesquisadas nos aa 1 a 60 do repressor MtrR; c - Sequência que codifica o promotor do gene *mtrR* do isolado nº 9 apresenta 100% de identidade nucleotídica com a estirpe *N. meningitidis* C:2b,4:P1.5 (Número de acesso no GenBank AJ270527); * - Isolados de *N. gonorrhoeae* obtidos a partir de amostras de exsudados uretrais.

Stefanelli e Carannante descreveram o padrão de mutações da PBP2, denominado de A, numa estirpe *N. gonorrhoeae* denominada G2859 e introduzida no GenBank com o número de acesso AKM12408 a 20 de Janeiro de 2015.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, o padrão de mutações da PBP2, denominado neste estudo de B, não se encontra descrito na literatura. Este padrão é semelhante ao padrão XXIII, descrito por Whiley *et al.* (115) com exceção da substituição K555L.

Todos os isolados PenI e CMRNG estudados, com exceção do isolado nº 17, apresentaram uma inserção do ácido aspártico (D) na posição 345 na proteína PBP2.

Tabela 11: Padrões de mutações no domínio da transpeptidase da PBP2 presentes nos isolados de *N. gonorrhoeae* em estudo (110,111,115).

Padrão PBP2^a	Mutações dos aminoácidos no domínio transpeptidase da PBP2
II	D345a, F504L, A510V, A516G.
V	D345a, F504L, A510V, A516G, G542S, I566V, N573a, A574V.
IX	D345a, F504L, A510V, A516G, P551L.
XII	D345a, F504L, A510V, A516G, P551S.
XIV	D345a, F504L, A510V, A516G, H541N.
XIX	D345a, F504L, A510V, A516G, H541N, I566V, N573a, A574V.
XXII	D345a, F504L, A510V, A516G, H541N, P552V, K555Q, I556V, I566V, N573a, A574V.
A	D345a, A501T, F504L, A510V, A516G, P551L.
B	D345a, A437V, V443E, L447V, Q457K, I461V, F462I, E464A, R468K, E469K, N472E, F504L, A510V, N512Y, H541N, A549T, P552V, K555Q, I556V, N573a, A574V.
XXXIV b	P343A, V344T, R345V; Q345a, S352T, R373M, G375T, A376P, E377K, E385D, I388V, N406S, R411Q, P412K, A437V, V443E, L447V, Q457K, I461V, F462I, E464A, R468K, E469K, N472E, P480A, F504L, A510V, N512Y, H541N, G545S.

a - Os aminoácidos 340 a 575 da PBP2 dos isolados de *N. gonorrhoeae* foram comparados com os aminoácidos 340 a 575 da PBP2 da isolado *N. gonorrhoeae* M32091 para a pesquisa de mutações; b – Padrão de mutações da PBP2 com estrutura mosaico.

Vários autores observaram que a inserção D345a na PBP2, que causa um aumento de 4 a 8 vezes da CMI para a penicilina, é a mutação mais comum em isolados *N. gonorrhoeae* com resistência intermédia ou resistência à penicilina (16,74,174).

Neste estudo, o padrão de mutações da PBP2 II foi encontrado em 41,2% (7/17) e apenas um isolado apresentou um padrão de mutações da PBP2 com estrutura mosaico.

O isolado com resistência à penicilina (classificado como CMRNG) apresenta o padrão de mutações A, que também se encontra presente em isolados PenI. Foi observado neste estudo que, diferentes padrões de mutações PBP2 estão presentes em isolados com diferentes CMI para a penicilina.

Tem havido a tentativa de associação entre os padrões de mutações da PBP2, mosaicos e não mosaicos, com a resistência à penicilina. Contudo esta correlação não tem sido observada porque a distribuição da CMI para a penicilina dos isolados com os padrões de mutações PBP2 sobrepõem (115).

Neste seguimento, Ito *et al.* (110) e Lee *et al.* (104) observaram que isolados de *N. gonorrhoeae* com valores elevados de CMI para a penicilina (CMI = 1µg/ml e CMI = 8 µg/ml para a penicilina) apenas apresentam o padrão de mutações da PBP2 X. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre este padrão de mutações e os fenótipos dos isolados, uma vez que Ito *et al.* (110) também verificaram que este

padrão, além de outros, estavam presentes em isolados com valores de CMI mais baixos (CMI igual a 0,5 µg/ml e 0,25 µg/ml para a penicilina).

Durante a última década, muitos mosaicos alelos *penA* têm sido descritos, os quais têm cerca de 60 alterações de aminoácidos em comparação com um gene *penA* do tipo selvagem, o que pode resultar em resistência para a penicilina e cefalosporinas de terceira geração (4,106,112).

Em relação às mutações que afetam a bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE neste estudo, os isolados PenI apresentaram as seguintes mutações no repressor MtrR: A39T (4/17), G45D (1/17), A39T/R44H (4/17) e A39T/Y48D (1/17). Também para este fenótipo foram observadas a deleção de uma adenina (6/17) e uma inserção de uma timina (1/17) na região invertida de 13pb do promotor do gene *mtrR*.

O isolado QMRNG tem uma deleção de uma adenina na região invertida de 13pb do promotor do gene *mtrR*.

Tal como neste estudo, Allen *et al.* (111), nos isolados PenI e PenR, encontraram as seguintes mutações A39T (2/30), G45D (6/30) e a dupla mutação A39T/R44H (3/30) no repressor MtrR. Em relação ao promotor do gene *mtrR*, os autores observaram a deleção de uma adenina (19/30) e a inserção de uma timina (2/30) na região invertida de 13pb.

Dewi *et al.* (175) e Olesky *et al.* (80) demonstraram que a presença somente da mutação G45D confere um nível intermédio de resistência para a penicilina e tetraciclina. No estudo apresentado e no estudo de Allen *et al.* (111) também se observou a presença da substituição G45D somente em isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência intermédia à penicilina.

Isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência intermédia à penicilina, à tetraciclina e à azitromicina (substratos da bomba de efluxo MtrCDE), geralmente apresentam mutações no domínio de ligação ao ADN (as mais comuns são G45D e A39T) e no motivo hélice-volta-hélice (entre os aa 32 a 53) do repressor MtrR que se liga no promotor *mtrCDE* (27,176).

3.2.3. PESQUISA DE MUTAÇÕES QUE CONTRIBUEM PARA A RESISTÊNCIA ÀS CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO

No isolado de *N. gonorrhoeae* nº 17 foi observada uma CMI para a ceftriaxona de 0,006 µg/ml e para a cefixima de 0,25 µg/ml. Este isolado apresentou o padrão de mutações da PBP 2 mosaico XXXIV e uma deleção de uma adenina na região invertida do promotor do gene *mtrR*.

A estirpe de *N. gonorrhoeae* F89 identificada como extensivamente resistente aos antibióticos, apresentou alto nível de resistência à cefixima (CMI = 4 µg/ml) e à ceftriaxona (CMI entre 1 a 2 µg/ml). Esta estirpe contém o padrão de mutações da PBP2 mosaico XXXIV e a mutação adicional A501P (4). Esta mutação pode emergir entre estirpes contendo o mosaico alelo XXXIV com a probabilidade do aparecimento de estirpes extensivamente resistentes, em todo o mundo, uma vez que têm sido relatados em vários países isolados de *N. gonorrhoeae* com o mosaico XXXIV (4,111,177–179).

3.2.4. PESQUISA DE MUTAÇÕES QUE CONTRIBUEM PARA A RESISTÊNCIA À TETRACICLINA

A pesquisa de mutações no domínio de ligação ao ADN do repressor MtrR (aa 1 a 60) e no promotor do gene *mtrR* foi realizada em 18 isolados de *N. gonorrhoeae* com os fenótipos CMRNG, TRNG, TetR e TetI (tabela 12 e Anexo A).

Tabela 12: Mutações no repressor MtrR e no promotor do gene *mtrR* e CMI para a tetraciclina dos isolados estudados.

Mutações no repressor MtrR ^a	Mutações no promotor do gene <i>mtrR</i>	CMI para a tetraciclina (µg/ml)	Identificação dos isolados <i>N. gonorrhoeae</i>
A39T/R44H	WT	0,5	3*
		1	4, 14, 18 e 19
A39T/Y48D	WT	16	13
		8	29
A39T	WT	32	5
		1	27
G45D	WT	0,5	2*
WT	-A	0,5	25
		1	1, 6, 8, 17
		2	7, 12
B		0,5	9

WT – Isolado do tipo selvagem, ou seja, a sequência de ADN do isolado em estudo é igual à sequência de ADN do isolado de referência; a – As mutações foram pesquisadas nas aa 1 a 60 do repressor MtrR; b- Sequência que codifica o promotor do gene *mtrR* do isolado nº 9 apresenta 100% de identidade nucleotídica com a estirpe *N. meningitidis* C:2b,4:P1.5 (Número de acesso no GenBank AJ270527; * - Isolados de *N. gonorrhoeae* obtidas a partir de amostras de exsudados uretrais.

No presente estudo, nos isolados de *N. gonorrhoeae* com o fenótipo TetI foram observadas as mutações no repressor MtrR A39T/R44H (5/13), A39T (1/13), G45D

(1/13). Além disto, também foi detetada a deleção de uma adenina (5/13) na região invertida do promotor do gene *mtrR*.

Os isolados TRNG, TetR e CMRNG, no presente estudo, apresentaram as seguintes mutações no repressor MtrR A39T/Y48D (2/5), A39T (1/5) e também a deleção de uma adenina (2/5) na região invertida do promotor do gene *mtrR*.

No estudo apresentado, a substituição A39T e a deleção da adenina na região invertida do promotor do gene *mtrR* estão presentes tanto em isolados TetI como em TRNG, TetR e CMRNG.

Allen *et al.* (111) verificaram mutações semelhantes às observadas no presente estudo, em isolados TetR e TRNG, no repressor MtrR: A39T (2/38), G45D (4/38) e A39T/R44H (1/38). A deleção de uma adenina (27/38) e a inserção de uma timina (3/38) no promotor do gene *mtrR* também estavam presentes nos isolados com os referidos fenótipos (111).

3.2.5. PESQUISA DE MUTAÇÕES NA REGIÃO DETERMINANTE DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS

A pesquisa de mutações na região QRDR da subunidade GyrA do ADN girase (aa 55 a 110) e da subunidade ParC da topoisomerase IV (aa 66 a 119) foi realizada em 11 isolados QRNG (tabela 13 e Anexo A).

Na pesquisa de mutações, na região QRDR, para a subunidade GyrA e ParC, foram observadas as mutações nos isolados de *N. gonorrhoeae* em estudo:

- GyrA_{S91F/D95G} e ParC_{E91G} (3/11 isolados QRNG);
- GyrA_{S91F/D95G} e ParC_{S87R} (2/11 isolados QRNG);
- GyrA_{S91F/D95A} e ParC_{S87N} (4/11 isolados QRNG);
- GyrA_{S91F/D95A} e ParC_{S87R} (1/11 isolados QRNG);
- GyrA_{S91F/D95A} e ParC_{D86N} (1/11 isolados QRNG).

Assim, foi detetado que todos os isolados estudados apresentaram duas mutações na subunidade GyrA e uma mutação na subunidade ParC. Além disto, a substituição S91F na subunidade GyrA está presente em todos os isolados.

Vários autores, tal como no presente estudo, observaram que a combinação de mutações nas subunidades GyrA e ParC na região QRDR está associada a isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência à ciprofloxacina (98,102,180).

Tabela 13: Mutações na região QRDR e CMI para a ciprofloxacina dos isolados de *N. gonorrhoeae* com o fenótipo QRNG.

Subunidade GyrA ^a	Subunidade ParC ^a	CMI para a ciprofloxacina (µg/ml)	Identificação dos isolados <i>N. gonorrhoeae</i>
S91F/D95G	E91G	4	1
		8	6
		> 32	7
S91F/D95A	S87N	1	22, 26
		2	23
		4	5
S91F/D95A	S87R	1	21*
S91F/D95A	D86N	4	27
S91F/D95G	S87R	8	12
		>32	17

a – A pesquisa de mutações foi realizada na região QRDR da subunidade GyrA da ADN girase (aa 55 a 110) e da subunidade ParC da topoisomerase IV (aa 66 a 119); * - Isolados de *N. gonorrhoeae* obtidas a partir de amostras de exsudados uretrais.

Allen *et al.* (111) verificaram que 92,3% (36/39) dos isolados QRNG tinham as substituições GyrA_{S91F/D95G} e ParC_{S87R}. Este padrão de mutações também foi encontrado no presente estudo, mas em apenas 18% (2/11) dos isolados estudados.

Su *et al.* (181), semelhante a este estudo, obtiveram 97,1% (34/35) isolados com a substituição S91F na subunidade GyrA. Além disto, encontraram 13 padrões de mutações diferentes para as subunidades GyrA e ParC, dos quais o padrão GyrA_{S91F/D95G} e ParC_{D86N} estava presente em 40% (14/35) dos isolados QRNG. Este também foi encontrado neste estudo, mas em apenas 1/11 isolado.

Tanto neste estudo, como nos estudos de Su *et al.* (181) e Giles *et al.* (141) se observaram diversos padrões de mutações nas subunidades GyrA e ParC, representando a diversidade de mutações presentes nas estirpes QRNG.

4. CONCLUSÃO

A taxa de infeção por *Neisseria gonorrhoeae* obtida no presente estudo foi semelhante a outros estudos realizados com a mesma população em cidades dos EUA (17,146).

Neste estudo, o teste de suscetibilidade aos antibióticos foi realizado pelos métodos de difusão em disco e Etest, como alternativas ao método de referência (33,130). Decidiu-se utilizar os resultados obtidos pela metodologia Etest, uma vez que se sabe da existência de uma elevada concordância com o método de referência, para estudar a suscetibilidade aos antibióticos (127–129).

O número de isolados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram resistência à penicilina foi inferior ao obtido por Florindo *et al.* (148). Ainda em relação à penicilina, a taxa de isolados com resistência intermédia e com resistência foi semelhante às proporções obtidas por Allen *et al.* (111), Starnino *et al.* (149) e Iliina *et al.* (16). Tanto quanto é do nosso conhecimento, em Portugal não existem estudos sobre a resistência intermédia de *N. gonorrhoeae* a este antibiótico, assim como, para todos os antibióticos estudados.

No presente estudo, a maioria dos isolados resistentes à penicilina eram produtores de β -lactamases (PPNG) tal como no estudo de Starnino *et al.* (150). No entanto, outros autores relataram valores muito mais baixos de isolados PPNG (16,148,151).

A maioria dos isolados de *N. gonorrhoeae* foi suscetível às cefalosporinas de terceira geração. Apenas um isolado apresentou suscetibilidade diminuída à cefixima. Em Portugal (148) e em outros países da União Europeia (13) também foram relatados isolados com suscetibilidade diminuída a este antibiótico.

Isolados classificados como resistência de alto nível à tetraciclina (TRNG) têm sido referidos, por vários autores, com uma taxa superior à obtida neste estudo (151,155). O mesmo foi observado relativo ao fenótipo CMRNG, na sua relação com estudos realizados na China (136) e na Europa (155).

No entanto, a proporção de isolados com resistência à ciprofloxacina (QRNG) foi semelhante aos resultados obtidos nos estudos realizados por Florindo *et al.* (148) e Starnino *et al.* (149).

Todos os isolados estudados foram suscetíveis à azitromicina. No entanto, o número de isolados com resistência a este antibiótico tem vindo a aumentar na Europa e no resto do mundo (155,157,161). Em relação, à espectinomicina todos os isolados foram suscetíveis, tal como se tem verificado por toda a Europa, de acordo com outras publicações (56,155,157,168).

Neste estudo, a sequência que codifica o promotor do gene *mtrR* de um isolado de *N. gonorrhoeae* apresentou 100% de identidade nucleotídica com isolados de *N. meningitidis*. Este fenômeno reflete a elevada taxa de transformação que ocorre em *N. gonorrhoeae*. As espécies do gênero *Neisseria* têm a capacidade de transferirem sequências de ADN entre si. É relevante quando ocorrem transferências de determinantes de resistência, que podem facilmente dispersar por toda a população de *N. gonorrhoeae* (83,107,172).

Em relação à pesquisa de mutações nos isolados de *N. gonorrhoeae*, o reduzido número de casos positivos não permitiu retirar conclusões com valor estatístico quantitativo, no entanto, qualitativamente, permitiu compreender que as mutações detetadas são idênticas às obtidas por outros autores, estando associadas a fenótipos de resistência.

Vários autores concluíram que as mutações (no gene *mtrR* e no promotor do gene *mtrR*) que causam a sobre-expressão da bomba de efluxo MtrC-MtrE-MtrD diminuem a suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* à penicilina, tetraciclina e macrólidos (81,83,84). Neste estudo também se observou que todos os isolados com resistência intermédia e resistência à penicilina e à tetraciclina (os fenótipos CMRNG, PenI, TRNG, TetR e TetI) apresentaram mutações na região do promotor do gene *mtrR* e/ou no domínio de ligação ao ADN do repressor MtrR.

Os isolados estudados e caracterizados com resistência intermédia ou resistência à penicilina, com exceção de um isolado, apresentaram uma inserção do ácido aspártico (D) na posição 345 na proteína PBP2, associação também foi observada por vários autores (16,74,174).

A CMI à penicilina também pode ser aumentada por mutações específicas que aumentam a sobre-expressão da bomba e pela diminuição da permeabilidade da membrana externa através da porina B (provocada pela presença de mutações no gene *porB*) também causa uma diminuição da suscetibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae* ao referido antibiótico (79,105,106,183). Nos resultados deste estudo, observaram-se que os isolados com resistência intermédia ou resistência à penicilina apresentaram mutações na bomba de efluxo MtrC-MtrE-MtrD. O que está de acordo com outros autores, de que as referidas mutações causam resistência intermédia à penicilina e que contribuem no desenvolvimento de resistência ao referido antibiótico (81,83,84,176).

Um isolado deste estudo apresentou a estrutura mosaica XXXIV. Estirpes contendo o referido mosaico podem desenvolver a mutação A501P com a probabilidade do aparecimento de estirpes extensivamente resistentes, em todo o mundo, uma vez que

têm sido relatados em vários países isolados de *N. gonorrhoeae* com o mosaico XXXIV (4,111,177–179).

A diminuição da suscetibilidade deste microrganismo à tetraciclina, tal como para a penicilina, também pode ser observada na presença de mutações que conduzem à sobre-expressão da bomba de efluxo MtrC-MtrE-MtrD e de mutações que alteram a permeabilidade da membrana externa bacteriana (mutações no *gene porB*) (79,105,183). Em todos os isolados classificados como resistentes à ciprofloxacina estavam presentes duas mutações na subunidade GyrA e uma mutação na subunidade ParC que foram verificadas por outros autores estarem associadas a isolados de *N. gonorrhoeae* com resistência à ciprofloxacina (102,143,180).

O método de cultura e os testes de suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* aos antibióticos, a sequenciação do genoma e o aparecimento de outras tecnologias moleculares, combinadas com dados epidemiológicos e análises filogenéticas, têm proporcionado uma melhor compreensão da dinâmica da emergência nacional e internacional, transmissão e evolução da resistência dos isolados de *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos.

Atualmente, o regime terapêutico de primeira linha recomendado nos Estados Unidos da América e na Europa é a combinação da ceftriaxona com a azitromicina (184).

No entanto, a suscetibilidade à ceftriaxona tem vindo a diminuir a nível mundial, nos últimos anos. A resistência à azitromicina é prevalente em alguns países e está a emergir rapidamente (150,162–164).

Neste estudo, os isolados de *N. gonorrhoeae* apresentaram resistência e resistência intermédia à penicilina (73%), à tetraciclina (60%) e à ciprofloxacina (37%), e foram suscetíveis à cefixima, à ceftriaxona, à azitromicina e à espectinomicina. Portanto, os isolados de *N. gonorrhoeae* circulantes na população entre HSH, na área de Lisboa, são suscetíveis à terapêutica recomendada atualmente.

Uma nova possibilidade terapêutica será a utilização da espectinomicina que seria também eficaz em Portugal. No entanto, os problemas com a disponibilidade do fármaco, em muitos países europeus, limitam o posicionamento deste antibiótico nas normas de tratamento de *N. gonorrhoeae* e pode não ser eficaz no tratamento da infeção por *N. gonorrhoeae* na faringe (63).

De uma perspetiva global de saúde pública, num curto espaço de tempo, é essencial a inclusão de um novo regime terapêutico com novos agentes antimicrobianos ou outros compostos terapêuticos.

No entanto, é necessário ter em conta que *N. gonorrhoeae* desenvolveu resistência a todos os antimicrobianos introduzidos na terapia de primeira linha durante os últimos 70 a 80 anos. Por estas razões, é imperativo investir não só na pesquisa de derivados de antimicrobianos, mas também no desenvolvimento e investigação de novos alvos e abordagens terapêuticas para o tratamento da infeção por este microrganismo.

O reforço das capacidades de diagnóstico, o uso correto de antibióticos, a notificação de casos de infeção por *N. gonorrhoeae* com suscetibilidade diminuída aos antimicrobianos, a vigilância de resistência, são essenciais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bignell C, FitzGerald M. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS*. 2011;22:541–7.
2. Bignell C, Unemo M, Jensen J, Babayan K, Barton S, Cusini M, et al. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*. 2013;24:85–92.
3. Unemo M, Golparian D, Syversen G, Vestrheim D, Moi H. Two cases of verified clinical failures using internationally recommended first-line cefixime for gonorrhoea treatment, Norway, 2010. *Eur Surveill*. 2010;15:4–6.
4. Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaouie P. 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*. 2012;56:1273–80.
5. Lewis D, Sriruttan C, Müller E, Golparian D, Gumedede L, Fick D, et al. Phenotypic and genetic characterization of the first two cases of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* infection in South Africa and association with cefixime treatment failure. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(6):1267–70.
6. Ison C, Hussey J, Sankar K, Evans J, Alexander S. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Eur Surveill*. 2011;16(14):1–4.
7. Allen VG, Seah C, Martin IE, Lee C, Siebert H, Towns L, et al. *Neisseria gonorrhoeae* treatment failure and susceptibility to cefixime in Toronto, Canada. *JAMA*. 2013;309(2):163–70.
8. Unemo M, Golparian D, Stary A, Eigentler A. First *Neisseria gonorrhoeae* strain with resistance to cefixime causing gonorrhoea treatment failure in Austria, 2011. *Eur Surveill*. 2011;16:3–5.
9. Yokoi S, Deguchi T, Ozawa T, Yasuda M, Ito SI, Kubota Y, et al. Threat to cefixime treatment for gonorrhoea. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1275–7.
10. World Health Organization. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO; 2012.
11. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections:2008. Geneva: WHO; 2012.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 1990–2010. Stockholm: ECDC; 2012.

13. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report: reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.
14. Tavares E, Fernandes C, Borrego M, Rodrigues A, Cardoso J. Resistência aos antibióticos em *Neisseria gonorrhoeae* – passado, presente e futuro. Soc Port Dermatol Venereol. 2012;70(4):483–93.
15. Lindberg R, Fredlund H, Nicholas R, Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):2117–22.
16. Ilina E, Vereshchagin V, Borovskaya A, Malakhova M, Sidorenko S, Al-Khafaji N, et al. Relation between genetic markers of drug resistance and susceptibility profile of clinical *Neisseria gonorrhoeae* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(6):2175–82.
17. Kent C, Chaw J, Wong W, Liska S, Gibson S, Hubbard G, et al. Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal chlamydia and gonorrhea detected in 2 clinical settings among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. Clin Infect Dis. 2005;41:67–74.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae*. MMWR. 2014;63(2):1–19.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Reports HIV prevention through early detection and treatment of other sexually transmitted diseases: United States. MMWR. 1998;47(No. RR-12):1–24.
20. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5^o ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
21. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiologia médica. 6^o ed. Lisboa: Elsevier Editora Ltd; 2005.
22. Schneider H, Griffiss JM, Mandrell RE, Zollinger WD. Elaboration of a 3.6-kilodalton lipooligosaccharide, antibody against which is absent from human sera, is associated with serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun. 1985;50(3):462–6.
23. Schneider H, Hammack C, Apicella M, Griffiss J. Instability of expression of lipooligosaccharides and their epitopes in *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun. 1988;56(4):942–6.

24. Shafer W, Balthazar J, Hagman K, Morse S. Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to faecal lipids. *Microbiol.* 1995;141:907–11.
25. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc.; 2014;453(2):254–67.
26. Hagman K, Pan W, Spratt B, Balthazar J, Judd R, Shafer W. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system. *Microbiol.* 1995;141:611–22.
27. Lucas CE, Balthazar JT, Hagman KE, Shafer WM. The MtrR repressor binds the DNA sequence between the *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1997;179(13):4123–8.
28. Ohneck E, Ambrozio J, Kunz A, Jerse A, Shafer W. Clinically relevant antibiotic resistance mechanisms can enhance the in vivo fitness of *Neisseria gonorrhoeae*: Antibiotic resistant bacteria - a continuous challenge in the new millennium. *InTech.* 2010;
29. Crawford C, Knapp J, Hale J, Holmes K. Asymptomatic gonorrhoea in men: caused by gonococci with unique nutritional requirements. *Science.* 1977;196(4296):1352–3.
30. Judson F. Gonorrhoeae. *Med Clin North Am.* 1990;74:1353–66.
31. Wan W, Farkas G, May W, Robin J. The clinical characteristics and course of adult gonococcal conjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 1986;102:575–83.
32. Kerle K, Mascola J, Miller T. Disseminated gonococcal infection. *Am Fam Physician.* 1992;45:209–14.
33. Perilla M, Ajello G, Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp J, et al. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. Atlanta: WHO/CDC; 2003.
34. Elias J, Frosch M, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, et al., editors. *Manual of clinical microbiology.* 10^a ed. Washington: American Society of Microbiology; 2011.
35. Tapsall J, Cheng J. Rapid identification of pathogenic species of *Neisseria* by carbohydrate degradation tests: Importance of glucose in media used for preparation of inocula. *Br J Vener Dis.* 1981;57:249–52.
36. Barbe G, Babolat M, Boeufgras J, Monget D, Freney J. Evaluation of API NH, a new 2-hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and

- Moraxella catarrhalis in a routine clinical laboratory. J Clin Microbiol. 1994;32(1):187–9.
37. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR. 2015;64(3):1–137.
 38. Centers for Disease Control and Prevention. Update to CDC’s sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010: oral cephalosporins no longer a recommended treatment for gonococcal infections. MMWR. 2012;61(31):590–4.
 39. Lewis D, Lukehart S. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*: evolution, therapeutic challenges and the need to strengthen global surveillance. Sex Transm Infect. 2011;87(Suppl):ii39–43.
 40. Barbee L, Dombrowski J. Control of *Neisseria gonorrhoeae* in the era of evolving antimicrobial resistance. Infect Dis Clin N Am. 2013;27:723–37.
 41. Dillon J, Parti R, Thakur S. Emergence of resistance and antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae*. Culture. 2015;35(1):1–8.
 42. Kampmeier R. Introduction of sulfonamide therapy for gonorrhea. Sex Transm Dis. 1983;10(2):81–4.
 43. Van Slyke C, Arnold R, Buchholtz M. Penicillin therapy in sulfonamide-resistant gonorrhea in men. Am J Public Heal. 1943;33(12):13920–4.
 44. Centers for Disease Control and Prevention. Gonorrhea: CDC recommended treatment schedules, 1974. MMWR. 1974;23:341–2.
 45. Ohnishi M, Ono E, Shimuta K, Watanabe H, Okamura N. Identification of TEM-135 beta-lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(7):3021–3.
 46. Willcox R. A survey of problems in the antibiotic treatment of gonorrhoea: with special reference to south-east Asia. Br J Vener Dis. 1970;46(3):217–42.
 47. Reyn A, Korner B, Bentzon M. Effects of penicillin, streptomycin and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. Br J Vener Dis. 1958;34(4):227–39.
 48. Whittington W, Knapp J. Trends in resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial agents in the United States. Sex Transm Dis. 1988;15(4):202–10.
 49. Boslego J, Tramont E, Takafuji E, Diniega B, Mitchell B, Small J, et al. Effect of spectinomycin use on the prevalence of spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. N Engl J Med. 1987;317:272–8.
 50. Reyn A, Schmidt H, Triert M, Bentzon M. Spectinomycin hydrochloride (trobicin) in the treatment of gonorrhoea: observation of resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Br J Vener Dis. 1973;(49):54–9.

51. Easman C, Forster G, Walker G, Ison C, Harris J, Munday P. Spectinomycin as initial treatment for gonorrhoea. *Br Med J*. 1984;289:1032–4.
52. Gransden W, Warren C, Phillips I, Al E. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. *Lancet*. 1990;335:351.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Update to CDC’s sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *MMWR*. 2007;50(3):332–6.
54. Ison C, Woodford P, Madders H, Claydon E. Drift in susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin and emergence of therapeutic failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(11):2919–22.
55. Center of Disease Control and Prevention. Increases in fluoroquinolone resistant *Neisseria gonorrhoeae*: among men who have sex with men, United States, 2003, and revised recommendations for gonorrhea treatment, 2004. *MMWR*. 2004;30(16):335–8.
56. Workowski K, Berman S. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR*. 2006;55(RR11):1–94.
57. Newman L, Moran J, Workowski K. Update on the management of gonorrhea in adults in the United States. *Clin Infect Dis*. 2007;44(Suppl 3):S84–101.
58. Deguchi T, Yasuda M, Yokoi S, Ishida K, Ito M, Ishihara S, et al. Treatment of uncomplicated gonococcal urethritis by double-dosing of 200 mg cefixime at a 6-h interval. *J Infect Chemother*. 2003;9(1):35–9.
59. Ito M, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Takahashi Y, Ishihara S, et al. Remarkable increase in central Japan in 2001–2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to penicillin, tetracycline, oral cephalosporins and fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(8):3185–7.
60. Tapsall J. Implications of current recommendations for third-generation cephalosporins use in the WHO Western Pacific region following the emergence of multi-resistant gonococci. *Sex Transm Infect*. 2009;March:256–2588.
61. Muratani T, Inatomi H, Ando Y, Kawai S, Akasaka S, Matsumoto T. Single dose 1 g ceftriaxone for urogenital and pharyngeal infection caused by *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J Uro*. 2008;15(9):837–42.
62. Lewis D. The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sex Transm Infect*. 2010;86(6):415–21.
63. Patel A, Chaudhry U, Sachdev D, Sachdeva P, Bala M, Saluja D. An insight into the drug resistance profile & mechanism of drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Med Res*. 2011;134:419–31.

64. Goire N, Lahra M, Chen M, Donovan B, Fairley C, Guy R, et al. Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(3):223–9.
65. Brunton L, Chabner B, Knollmann B. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 2012. 2112 p.
66. Osório M, Morgado S. Sulfametoxazol. 2011. <http://sulfametoxazol11.wix.com/sulfametoxazol#!>
Acedido a 10 de Setembro de 2015
67. Wesley B. Genetic basis of the association of sulphonamide resistance with methionine auxotrophy in auxotrophy in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Gen Microbiol.* 1989;135:1101–11.
68. Sparling P, Sarubbi F, Blackman E. Inheritance of low-Level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1975;124(2):740–9.
69. Gill M, Simjee S, Al-Hattawi K, Robertson B, Easmon C, Ison C. Gonococcal resistance to b-lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB locus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(11):2799–803.
70. Pagotto F, Aman A, Ng L, Al E. Sequence analysis of the family of penicillinase-producing plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *Plasmid.* 2000;43:24–34.
71. Takahata S, Senju N, Osaki Y, Yoshida T, Ida T. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3638–45.
72. Zhao S, Tobiasson D, Hu M, Seifert H, Robert A. The *penC* mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol.* 2005;57:1238–51.
73. Dillon J, Yeung K. Beta-Lactamase plasmids and chromosomally mediated antibiotic resistance in pathogenic *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2:125–33.
74. Powell A, Tomberg J, Deacon A, Nicholas R, Davies C. Crystal structures of penicillin binding protein 2 from penicillin susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J Biol Chem.* 2009;284:1202–12.
75. Brannigan J, Tirodimos I, Zhang Q, Dowson C, Spratt B. Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin binding protein 2 in penicillin resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 1990;4(6):913–9.

76. Ropp P, Hu M, Olesky M, Nicholas R, Hill C, Carolina N. 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*. 2002;46(3):769–77.
77. Danielsson D, Faruki H, Dyer D, Sparling PF. Recombination near the antibiotic resistance *locus penB* results in antigenic variation of gonococcal outer membrane protein I. *Infect Immun*. 1986;52(2):529–33.
78. Scudamore R, Beveridge T, Goldner M. Penetrability of the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in relation to acquired resistance to penicillin and other antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;15(6):820–7.
79. Olesky M, Zhao S, Rosenberg R, Nicholas R. Porin mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with *penB* mutations. *J Bacteriol*. 2006;188(7):2300–8.
80. Olesky M, Hobbs M, Nicholas R, Hill C, Carolina N. 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*. 2002;46(9):2811–20.
81. Warner D, Shafer W, Jerse A. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. *Mol Microbiol*. 2008;70(2):462–78.
82. Hagman K, Shafer W. Transcriptional control of the *mtr* efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. 1995;177(14):4162–5.
83. Tanaka M, Nakayama H, Huruya K, Konomi I, Irie S, Kanayama A, et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(1):20–6.
84. Veal W, Nicholas R, Shafer W. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an *mtrR* mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. 2002;184(20):5619–24.
85. Tønjum T, Koomey M. The pilus colonization factor of pathogenic neisserial species: organelle biogenesis and structure/function relationships – a review. *Gene*. 1997;192:155–63.
86. Newhall W, Wilde C, William S, Haak R. High molecular weight antigenic protein complex in the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*. 1980;27(2):475–82.
87. Brody, Minneman, Lerner. Human pharmacology. 3^a ed. Missouri: Mosby; 1998.

88. Pfizer Canada. National information program on antibiotics. 2000. <http://www.antibiotics-info.org>, acessado a 26 de Setembro de 2015
89. Morse S, Johnson S, Biddle J, Roberts M. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30(5):664–70.
90. Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas R. 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.* 2005;49(10):4327–34.
91. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action , applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232–60.
92. Unemo M, Shafer W. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):587–613.
93. Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P. Spectinomycin resistance in *Neisseria* spp. due to mutations in 16S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(5):1365–6.
94. Roberts M. Update on macrolide lincosamide streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;282(2):147–59.
95. Cousin S. Acquired macrolide resistance genes and the 1 bp deletion in the *mtrR* promoter in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;51(1):131–3.
96. Zarantonelli L, Borthagaray G, Lee E, Shafer W. Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to *mtrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(10):2468–72.
97. Chisholm S, Dave J, Ison C. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3812–6.
98. Belland R, Morrison S, Ison C, Al E. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol.* 1994;14:371–80.
99. Shultz T, Tapsall J, White P. Correlation of in vitro susceptibilities to newer quinolones of naturally occurring quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains with changes in GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):734–8.
100. Kohanski M, Dwyer D, Collins J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):423–35.

101. Deguchi T, Yasuda M, Asano M, Tada K, Iwata H, Komeda H, et al. DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(2):561–3.
102. Trees D, Sandul A, Whittington W, Knapp S, Sandul A. Identification of novel mutation patterns in the *parC* gene of ciprofloxacin-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(8):1–4.
103. Goodman, Gilman's. Manual of pharmacology and therapeutics. Nova Iorque: McGraw Hill; 2008.
104. Lee S, Lee H, Jeong S, Yong D, Chung G, Lee Y, et al. Various *penA* mutations together with *mtrR*, *porB* and *ponA* mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime or ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(4):669–75.
105. Zhao S, Duncan M, Tomberg J, Davies C, Unemo M, Nicholas R. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3744–51.
106. Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. *Futur Microbiol.* 2012;7(12):1401–22.
107. Unemo M, Shafer W. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1230:19–28.
108. Spratt B. Hybrid penicillin binding proteins in penicillin resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature.* 1988;332(6160):173–6.
109. Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, et al. Mosaic-like structure of penicillin binding protein 2 gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(12):3744–9.
110. Ito M, Deguchi T, Mizutani K-S, Yasuda M, Yokoi S, Ito S-I, et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin binding protein 2 in central Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):137–43.
111. Allen V, Farrell D, Rebbapragada A, Tan J, Tijet N, Perusini S, et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):703–12.
112. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, et al. 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.* 2011;55(7):3538–45.

113. Unemo M, Golparian D, Hestner A. Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden, July 2010. *Eur Surveill.* 2011;16:2–4.
114. Hanage W, Fraser C, Spratt B. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.* 2005;3:6.
115. Whiley D, Limnios E, Ray S, Sloots T, Tapsall J. Diversity of *penA* alterations and subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Sydney, Australia, that are less susceptible to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3111–6.
116. Osaka K, Takakura T, Narukawa K, Takahata M, Endo K, Kiyota H, et al. Analysis of amino acid sequences of penicillin binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone. *J Infect Chemother.* 2008;14(3):195–203.
117. Sacks R, Greene L. New management of gonorrhoea: impact of antibiotic resistance. *BMJ.* 2011;342:3523.
118. Chisholm S, Mouton J, Lewis D, Nichols T, Ison C, Livermore D. Cephalosporin MIC creep among gonococci: time for a pharmacodynamic rethink? *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2141–8.
119. Quaye N, Cole M, Ison C. Evaluation of the activity of ertapenem against gonococcal isolates exhibiting a range of susceptibilities to cefixime. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(6):1568–71.
120. Unemo M, Golparian D, Limnios A, Whiley D, Ohnishi M, Lahra M, et al. In vitro activity of ertapenem versus ceftriaxone against *Neisseria gonorrhoeae* isolates with highly diverse ceftriaxone MIC values and effects of ceftriaxone resistance determinants: ertapenem for treatment of gonorrhoea? *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(7):3603–9.
121. Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp.* 2010;58:15–25.
122. Marcu M, Schulte T, Neckers L. Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90 dependent signaling proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:242–8.
123. Shokeen P, Bala M, Singh M, Tandon V. In vitro activity of eugenol, an active component from *Ocimum sanctum*, against multiresistant and susceptible strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32:174–9.
124. Golparian D, Fernandes P, Ohnishi M, Jensen J, Unemo M. In vitro activity of the new fluoroketolide solithromycin (CEM-101) against a large collection of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and international reference strains, including those with high-level antimicrobial resistance: potential treatment op. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:2739–42.

125. Silva O, Ferreira E, Pato M, Caniça M, Gomes E. In vitro anti-*Neisseria gonorrhoeae* activity of Terminalia macroptera leaves. FEMS Microbiol Lett. 2002;217:271–4.
126. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S23: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty third informational supplement. Wayne: CLSI; 2013.
127. Yeung K, Ng L, Dillon J. Evaluation of Etest for testing antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with different growth media. J Clin Microbiol. 1993;31(11):3053–5.
128. Biedenbach D, Jones R. Comparative assessment of Etest for testing susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin, tetracycline, ceftriaxone, cefotaxime, and ciprofloxacin: investigation using 510(k) review criteria, recommended by the food and drug administration. J Clin Microbiol. 1996;34(12):3214–7.
129. Sanchez M, Barrett M, Jones R. The E-Test applied to susceptibility tests of gonococci, multiply-resistant enterococci, and enterobacteriaceae producing potent b-lactamases. Diagn Microbiol Infect Dis. 1992;15(5):459–63.
130. Centers for Disease Control and Prevention. *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for antimicrobial susceptibility testing. Wayne: CDC; 2005.
131. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: version 4.0. 2014. <http://www.eucast.org>, acedido a 15 de Outubro de 2014.
132. Centers for Disease Control and Prevention. Gonococcal isolate surveillance project: protocol. CDC; 2010.
133. Centers for Disease Control and Prevention. Increases in fluoroquinolone resistant *Neisseria gonorrhoeae*: Hawaii and California, 2001. MMWR. 2002;51(46):1041–4.
134. Endimiani A, Guilarte Y, Tinguely R, Hirzberger L, Selvini S, Lupo A, et al. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Switzerland (1998-2012): emergence of multidrug-resistant clones less susceptible to cephalosporins. BMC Infect Dis. 2014;14(106):1–10.
135. Martin I, Ison C, Aanensen D, Fenton K, Spratt B. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. J Infect Dis. 2004;189(8):1497–505.
136. Li S, Su X, Le W, Jiang F, Wang B, Rice P. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from symptomatic men attending the Nanjing sexually transmitted diseases clinic (2011-2012): genetic characteristics of isolates with reduced sensitivity to ceftriaxone. BMC Infect Dis. 2014 Nov 27;14(1):622.

137. Liao M, Gu W-M, Yang Y, Dillon J-A. Analysis of mutations in multiple *loci* of *Neisseria gonorrhoeae* isolates reveals effects of PIB, PBP2 and MtrR on reduced susceptibility to ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(5):1016–23.
138. Mavroidi A, Tzouveleki LS, Kyriakis KP, Avgerinou H, Daniilidou M, Tzelepi E. Multidrug-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(9):2651–4.
139. Pan W, Spratt B. Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the mtr system. *Mol Microbiol.* 1994;11(4):769–75.
140. Tanaka M, Nakayama H, Haraoka M, Saika T, Kobayashi I, Naito S. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):521–5.
141. Giles J, Falconio J, Yuenger J, Zenilman J, Dan M, Bash M. Quinolone resistance-determining region mutations and por type of *Neisseria gonorrhoeae* isolates: resistance surveillance and typing by molecular methodologies. *J Infect Dis.* 2004;189(11):2085–93.
142. Uehara A, Amorim E, Ferreira M, Andrade C, Clementino M, De Filippis I, et al. Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4208–12.
143. Belland R, Morrison S, Ison C, Huang W. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol.* 1994;14(2):371–80.
144. World Health Organization Regional Office for Europe. Gonorrhoea: Incidence rate (Per 100,000 population). <http://data.euro.who.int/cisid>, acessado a 28 de Maio de 2015.
145. Guedes R, Simões J, Azevedo F, Lisboa C. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em utentes de uma consulta de doenças de transmissão sexual: análise de dez anos. *SPDV.* 2012;70(1):91–7.
146. Centers for Disease Control and Prevention. Clinic-based testing for rectal and pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections by community-based organizations: five cities, United States, 2007. *MMWR.* 2010;10(26):716–9.
147. Singh V, Bala M, Kakran M, Ramesh V. Comparative assessment of CDS, CLSI disc diffusion and Etest techniques for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*: a 6-year study. *BMJ Open.* 2012;2(4).
148. Florindo C, Pereira R, Boura M, Nunes B, Paulino A, Gomes J, et al. Genotypes and antimicrobial-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Portugal (2004-2009). *Sex Transm Infect.* 2010;86(6):449–53.

149. Starnino S, Suligoi B, Regine V, Bilek N, Stefanelli P, Dal Conte I, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* in parts of Italy: detection of a multiresistant cluster circulating in a heterosexual network. *Clin Microbiol Infect. European Society of Clinical Infectious Diseases*; 2008;14:949–54.
150. Starnino S, Stefanelli P. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1200–4.
151. Zheng H, Wu X, Huang J, Qin X, Xue Y, Zeng W, et al. The prevalence and epidemiology of plasmid-mediated penicillin and tetracycline resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Guangzhou, China, 2002–2012. *BMC Infect Dis. BMC Infectious Diseases*; 2015;15(1):1–7.
152. Elwell L, Roberts M, Mayer L, Falkow S. Plasmid-mediated beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977;11(3):528–33.
153. Siegel M, Thornsberry C, Biddle J, O'Mara P, Perine P, Wiesner P. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*: results of surveillance in the United States. *Int J Infect.* 1978;137(2):170–5.
154. Ferreira E, Louro D, Gomes J, Catry M, Pato M. High-level tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Portugal. *Pathol Biol.* 1997;45(5):371–5.
155. Cole M, Chisholm S, Hoffmann S, Sary A, Lowndes C, Ison C. European surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex transm infect.* 2010;86(6):427–32.
156. Knapp J, Zenilman J, Biddle J, Perkins G, DeWitt W, Thomas M, et al. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline. *J Infect Dis.* 1987;155(4):819–22.
157. Cole M, Unemo M, Hoffmann S, Chisholm S, Ison C, Laar M. The European gonococcal antimicrobial surveillance programme, 2009. *Eur Surveill.* 2011;16(42):1–6.
158. Tapsall J, Ndowa F, Lewis D, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug and extensively drug resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(7):821–34.
159. Kunz A, Begum A, Wu H, D'Ambrozio J, Robinson J, Shafer W, et al. Impact of fluoroquinolone resistance mutations on gonococcal fitness and in vivo selection for compensatory mutations. *J Infect Dis.* 2012;205(12):1821–9.
160. Tapsall J, Whiley D, Sloots T. Applications of molecular testing in clinical laboratories for the diagnosis and control of gonorrhoea. *Futur Microbiol.* 2006;1(3):317–24.

161. Galarza PG, Alcalá B, Salcedo C, Canigia LF, Buscemi L, Pagano I, et al. Emergence of high level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain isolated in Argentina. *Sex Transm Dis*. 2009 Dec;36(12):787–8.
162. Palmer H, Young H, Winter A, Dave J. Emergence and spread of azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:490–4.
163. Chisholm S, Neal T, Alawattagama A, Birley H, Howe R, Ison C. Emergence of high-level azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:353–8.
164. Berçot B, Belkacem A, Goubard A, Mougari F, Sednaoui P, Ruche G, et al. High-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolate in France, March 2014. *Eur Surveill*. 2014;19(44):1–3.
165. Bignell C, Garley J. Azithromycin in the treatment of infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis*. 2010 Nov;86(6):422–6.
166. Stolz E, Zwartt H, Michelt M. Activity of eight antimicrobial agents in vitro against *N. gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis*. 1975;257–64.
167. Ashford W, Potts D, Adams H, English J, Johnson S, Biddle J, et al. Spectinomycin-resistant penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet*. 1981;ii:1035–7.
168. Boslego J, Tramont E, Takafujo E, Diniega B, Mitcheil B, Small J, et al. Effect of spectinomycin use on the prevalence of spectinomycin-resistant and of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *N Engl J Med*. 1987;317:272–8.
169. Ison C, Littleton K, Shannon K, Easmon C, Phillips I. Spectinomycin resistant gonococci. *Br Med J*. 1983;287:1827–9.
170. Lindberg M, Ringertz O, Sandstrom E. Treatment of pharyngeal gonorrhoea due to beta-lactamase-producing gonococci. *Br J Vener Dis*. 1982;58:101–4.
171. Trembizki E, Doyle C, Jennison A, Smith H, Bates J, Lahra M, et al. A *Neisseria gonorrhoeae* strain with a meningococcal *mtrR* sequence. *J Med Microbiol*. 2014;63:1113–5.
172. Furuya R, Onoye Y, Kanayama A, Saika T, Iyoda T, Tatewaki M, et al. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population. *J Infect Chemother*. 2007;13:302–4.
173. Ohnishi M, Watanabe Y, Ono E, Takahashi C, Oya H, Kuroki T, et al. Spread of a chromosomal cefixime resistant *penA* gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:1060–7.

174. Dowson C, Jephcott A, Gough K, Spratt B. Penicillin-binding protein 2 genes of non-beta-lactamase-producing, penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*. 1989;3:35–41.
175. Dewi B, Akira S, Hayashi H, Ba-thein W. High occurrence of simultaneous mutations in target enzymes and MtrRCDE efflux system in quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis*. 2004;31(6):353–9.
176. Zalucki YM, Dhulipala V, Shafer WM. Dueling regulatory properties of a transcriptional activator (MtrA) and repressor (MtrR) that control efflux pump gene expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *MBio*. 2012;3(6):e00446–12.
177. Unemo M, Golparian D, Potočnik M, Jeverica S. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. *Eur Surveill*. 2012;17:1–4.
178. Pandori M, Barry P, Wu A, Ren A, Whittington W, Liska S, et al. Mosaic penicillin binding protein 2 in *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in 2008 in San Francisco, California. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):4032–4.
179. Hess D, Wu A, Golparian D, Esmaili S, Pandori W, Sena E, et al. Genome sequencing of a *Neisseria gonorrhoeae* isolate of a successful international clone with decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov;56(11):5633–41.
180. Tompkins J, Zenilman J. Update on quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr Infect Dis Rep*. 2002;4:144–7.
181. Su X, Lind I. Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Denmark from 1995 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(1):117–23.
182. Europe Center for Diseases Control and Prevention. Surveillance report, Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2010. Stockholm: ECDC; 2010.
183. Ohneck E, Zalucki Y, Johnson P, Dhulipala V, Golparian D, Unemo M, et al. A novel mechanism of high-level, broad-spectrum antibiotic resistance caused by a single base pair change in *Neisseria gonorrhoeae*. *MBio*. 2011;2(5):1–8.
184. Ison C, Golparian D, Saunders P, Chisholm S, Unemo M. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal *porA* mutants are spreading internationally. *Sex Transm Infect*. 2013;89(3):197–201.
185. Kurahashi U. Antibiotics LVSM. <http://antibioticslvsm.weebly.com/index.html>, acedido a 15 de Novembro de 2015.

6. ANEXOS

ANEXO A – SEQUÊNCIAS DE NUCLEÓTIDOS E AMINOÁCIDOS

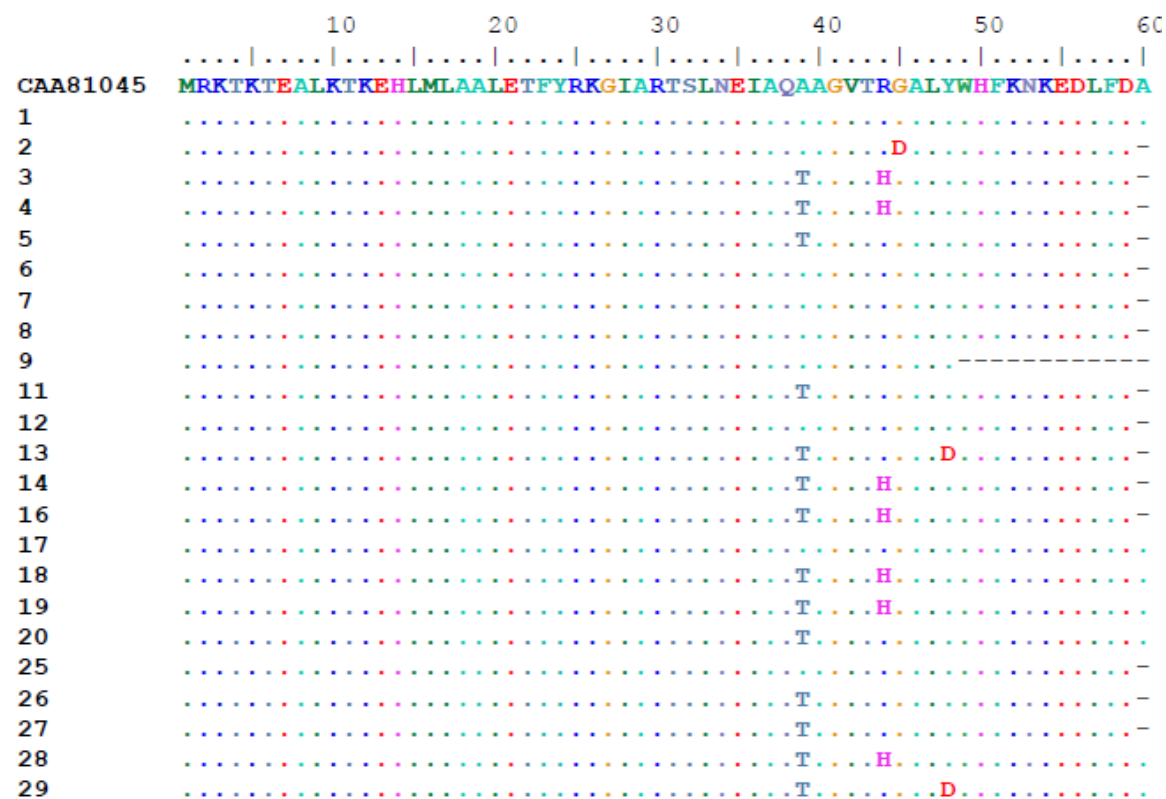


Figura A1: Sequência putativa parcial de aminoácidos do repressor MtrR dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae*. As mutações foram pesquisadas nos aa 1 a 60 do repressor MtrR, através da comparação da sequência de aminoácidos da estirpe de *N. gonorrhoeae* CH95 (número de acesso no GenBank: CAA81045).

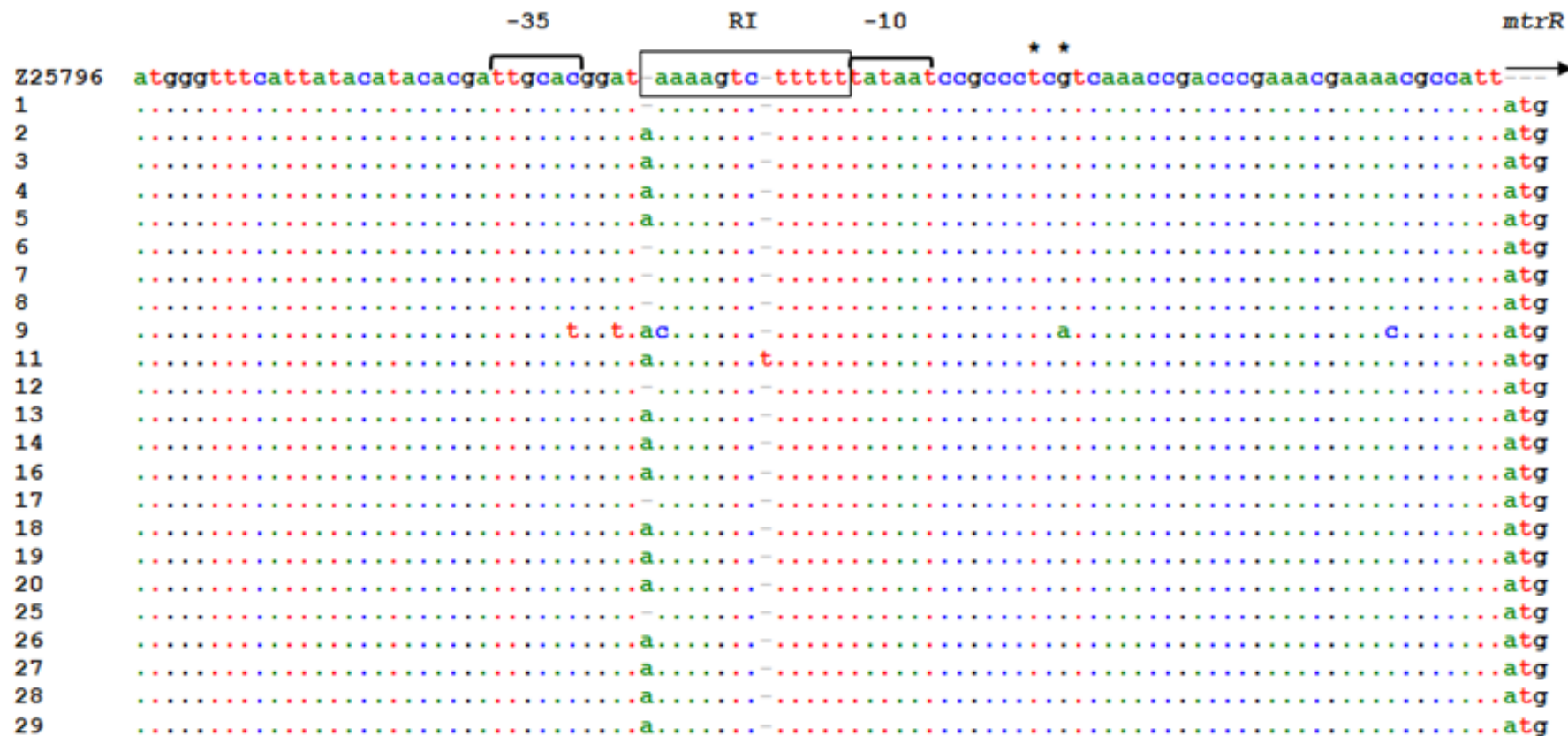


Figura A2: Sequência de nucleótidos do promotor do gene *mtrR* dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae*. A pesquisa de mutações no promotor do gene *mtrR* foi realizada através da comparação das sequências de nucleótidos da estirpe de *N. gonorrhoeae* CH95 (número de acesso no GenBank: Z25796). RI – Região de repetição invertida; * - Codão de iniciação.

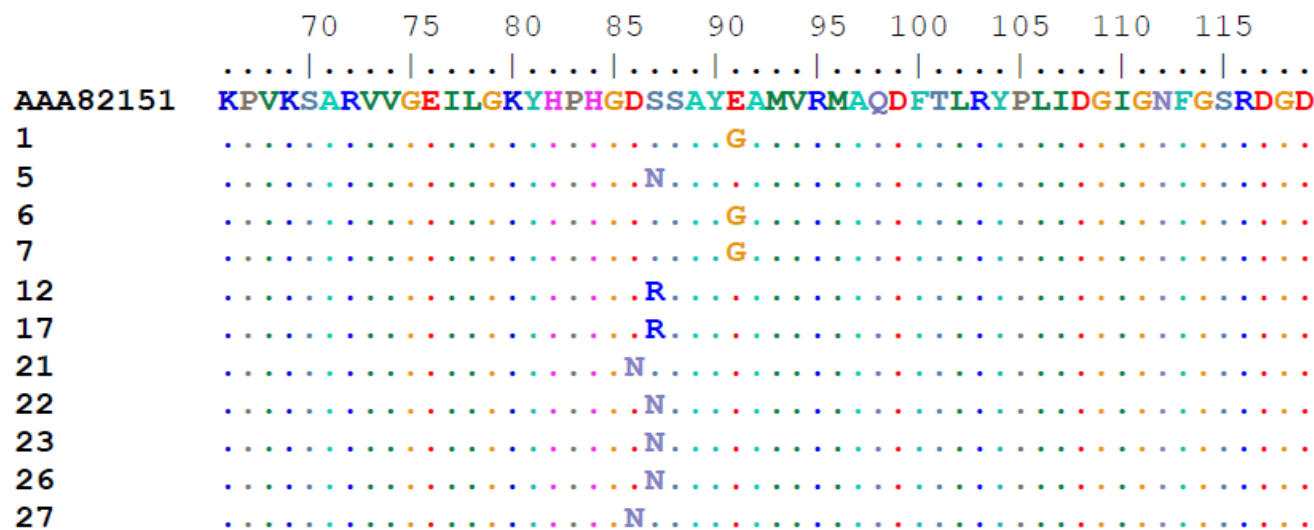


Figura A5: Sequência putativa parcial de aminoácidos da enzima Topoisomerase IV dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae*. A pesquisa de mutações foi realizada na região QRDR da subunidade ParC da topoisomerase IV (aminoácidos 66 a 119), através da comparação com a sequência de aminoácidos das referidas subunidades da estirpe MS11 (número de acesso no GenBank: AAA82151).