

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Larissa Akie Natsumeda

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA 23S À
AZITROMICINA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS
DE *Neisseria gonorrhoeae* NA CIDADE DE SÃO PAULO – BRASIL**

São Paulo

2018

Larissa Akie Natsumeda – RA: 002969

**Avaliação do Mecanismo de Resistência 23S à Azitromicina e
Caracterização Genotípica de Isolados de *Neisseria
gonorrhoeae* na cidade de São Paulo - Brasil**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Biomedicina do
Centro Universitário São Camilo,
orientado pela professora Dra. Dyana
Alves Henriques, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.**

**São Paulo
2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani

Natsumeda, Larissa Akie

Avaliação do mecanismo de resistência 23S à azitromicina e caracterização genotípica de isolados de *Neisseria gonorrhoeae* na cidade de São Paulo – Brasil / Larissa Akie Natsumeda. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018. 43 p.

Orientação de Dyana Alves Henrique

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Anti – infecciosos 2. Azitromicina 3. *Neisseria gonorrhoeae* 4. Resistência a medicamentos I. Henrique, Dyana Alves II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 615.1

Larissa Akie Natsumeda

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA 23S À
AZITROMICINA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE
ISOLADOS DE *Neisseria gonorrhoeae* NA CIDADE DE SÃO
PAULO - BRASIL**

São Paulo, 29 de outubro de 2018.

Professor Orientador – Prof^a Dr^a Dyana Alves Henriques

Professor Examinador – Prof^a Dr^a Jeane Bueno Facioli

RESUMO

NATSUMEDA, L.A. Avaliação do Mecanismo de Resistência 23S à Azitromicina e Caracterização Genotípica de Isolados de *Neisseria gonorrhoeae* na cidade de São Paulo – Brasil. 2018. 42f. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, 2018.

A gonorreia, segunda Infecção Sexualmente Transmissível (ISTs) bacteriana mais frequente, é causada por *Neisseria gonorrhoeae*, sendo sintomática em 90% dos homens e 50% das mulheres. Atualmente, as cefalosporinas de espectro estendido são preconizadas para o tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae*. Além disso, o tratamento empírico de uretrites inclui a azitromicina, em função de sua atividade frente a *Chlamydia trachomatis*. A azitromicina pertence à classe dos macrolídeos e inibe a síntese proteica por ligar-se a região 23S do rRNA. Em 2016, foi relatada a primeira falha terapêutica dessa associação, devido à redução de sensibilidade à azitromicina. Essa redução de sensibilidade pode ser causada por mutações nos alelos do gene 23S, que podem ocorrer nas posições A2059 e/ou A2611. Quanto maior o número de alelos mutados, maior será a concentração inibitória mínima (CIM), sendo que, quando há um alelo mutado, a probabilidade de surgimento de mutações nos demais alelos aumenta. No Brasil, ainda há relatos escassos sobre as taxas de resistência à azitromicina. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* provenientes da cidade de São Paulo, avaliar a similaridade genética dos isolados com redução de sensibilidade à azitromicina e determinar os possíveis mecanismos de resistência a este antimicrobiano. Um total de 124 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* foram coletados entre os anos de 2003 a 2015, provenientes de pacientes ambulatoriais do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS – CRT Santa Cruz, São Paulo – SP. Estes isolados foram identificados pela técnica de MALDI-TOF MS. As CIMs de penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina e azitromicina foram determinadas pela técnica de diluição em ágar e interpretadas de acordo com o EUCAST. Os isolados que apresentaram redução de sensibilidade à azitromicina foram submetidos à técnica de PFGE para caracterização de sua similaridade genética. Isolados com 80% ou mais de similaridade foram incluídos em um mesmo grupo clonal. Um isolado de cada grupo clonal foi selecionado para avaliação de mutações nos alelos do gene rRNA 23S. Essas regiões foram amplificadas utilizando *primers* específicos e sequenciadas usando o Big Dye Terminator kit e o sistema ABI PRISM 3500. As sequências obtidas foram comparadas às da cepa de *N. gonorrhoeae* FA 1090 usando o software LaserGene. Todos os isolados tiveram sua identificação confirmada por MALDI-TOF, sendo que a maior parte das amostras avaliadas foram coletadas em 2003 (29/124). Dentre as 124 amostras, foi observada uma redução de sensibilidade para penicilina, ciprofloxacina e azitromicina em 89,6% (112/124), 28% (35/124), e 30,6% (37/121) dos isolados, com CIMs variando entre $\leq 0,015$ e $>4 \mu\text{g/mL}$, $\leq 0,00025$ e $>2 \mu\text{g/mL}$, e $\leq 0,015$ e $>1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Nenhum isolado apresentou redução de sensibilidade à ceftriaxona, com CIMs que variaram entre $\leq 0,001$ e $0,06 \mu\text{g/mL}$. Os isolados com redução de sensibilidade à azitromicina foram distribuídos em nove grupos clonais, sendo o clone I o mais frequente, o qual continha doze isolados distribuídos ao longo dos anos. Um isolado de cada clone foi selecionado para o sequenciamento dos alelos do rRNA 23S. Após comparação com as sequências dos alelos da cepa de *N. gonorrhoeae* FA1090, observou-se que apenas uma amostra (256) apresentou mutação nos 4 alelos do rRNA na posição 2611. A redução de sensibilidade à ciprofloxacina e/ou à azitromicina, tratamento empírico combinado de escolha no Brasil até 2015, foi observada desde 2003. Embora tenha sido possível observar a presença de um clone predominante entre os isolados resistentes à azitromicina, outros genótipos foram detectados entre as amostras, indicando que o surgimento e disseminação desse fenótipo não foi causada pela disseminação de um único clone epidêmico.

Palavras-chave: Anti – infecciosos, azitromicina, *Neisseria gonorrhoeae*, resistência a medicamentos.

ABSTRACT

NATSUMEDA, L.A. Evaluation of Azithromycin Resistance Mechanism 23S and Genotypic Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* in the city of São Paulo – Brazil. 2018. 42f. Dissertation (Master's degree in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, 2018.

Gonorrhea, the second most common bacterial sexually transmitted infection (STIs), is caused by *Neisseria gonorrhoeae*. It is symptomatic in 90% of men and 50% of women. Currently, extended-spectrum cephalosporins are the antimicrobials of choice for the treatment of *N. gonorrhoeae* infections. In addition, azithromycin is included as empiric treatment of urethritis due to its activity against *Chlamydia trachomatis*. Azithromycin belongs to macrolide class of antibiotics and inhibits protein synthesis by binding to the 23S region of the rRNA. In 2016, the first therapeutic failure of this association was reported due to reduced susceptibility to azithromycin. This reduction of susceptibility may be caused by mutations in the 23S gene alleles, which may occur at positions A2059 and / or A2611. The greater the number of mutated alleles, the greater the MIC, and when there is a mutated allele, the probability of the appearance of mutations in the others increases. In Brazil, there are still limited reports on rates of resistance to azithromycin. Therefore, the objective of this study was to evaluate: i) the susceptibility profile of clinical isolates of *N. gonorrhoeae* from the city of São Paulo; ii) the genetic similarity of the isolates with reduced susceptibility to azithromycin; and iii) the possible mechanisms of resistance to this antimicrobial. A total of 124 clinical isolates of *N. gonorrhoeae* were collected from 2003 to 2015 from outpatients of the STD / AIDS - CRT Reference and Training Center in Santa Cruz, São Paulo, Brazil. These isolates were identified by MALDI-TOF. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of penicillin, ceftriaxone, ciprofloxacin, and azithromycin were determined by agar dilution technique and interpreted according to EUCAST. The isolates that showed reduced susceptibility to azithromycin were submitted to analysis of genetic relatedness by PFGE. Isolates with 80% or more of similarity were included in the same clonal group. One isolate from each clonal group was selected for evaluation of 23S rRNA gene allele mutations. These regions were amplified using specific primers and sequenced using the Big Dye Terminator kit and the ABI PRISM 3500 system. The obtained sequences were compared to the *N. gonorrhoeae* FA 1090 strain using the LaserGene software. All *N. gonorrhoeae* isolates had their identification confirmed by MALDI-TOF MS, with most isolates collected in the year 2003 (29/124). Among the 124 isolates, a reduction of susceptibility to penicillin, ciprofloxacin and azithromycin was observed in 89.6% (112/124), 28% (35/124), and 30.6% (37/121) of the isolates, with MICs ranging from ≤ 0.015 -> 4 $\mu\text{g/mL}$, ≤ 0.00025 -> 2 $\mu\text{g/mL}$, and ≤ 0.015 - > 1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. No isolates showed susceptibility to ceftriaxone, with MICs ranging from ≤ 0.001 to 0.06 $\mu\text{g/mL}$. The isolates with reduced susceptibility to azithromycin were distributed in twelve clonal groups, with clone I being the most frequent, which contained nine isolates distributed over the years. One isolate from each clone was selected for 23S rRNA allele sequencing. After comparison with the sequences of the *N. gonorrhoeae* FA1090 strain alleles, only the isolate 256 was found to have mutation in the 4 rRNA alleles at position 2611. Although reduction of susceptibility to ciprofloxacin and/or azithromycin, has been observed since 2003, ciprofloxacin and azithromycin were the antimicrobials of choice for empirical treatment of urethritis in Brazil until 2015. Although it was possible to observe the presence of a predominant clone among isolates resistant to azithromycin, other genotypes were detected among these isolates, indicating that the emergence of this phenotype was not caused by dissemination of a single epidemic clone.

Keywords: anti-infective, azithromycin, *Neisseria gonorrhoeae*, drugs resistance.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estimativa da Organização Mundial da Saúde do número de novos casos de infecções sexualmente transmissíveis em 2012.

Figura 2 – Evolução da resistência a antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae*. Alterações de cores indicam eventos que impactaram o nível de resistência ao longo do tempo.

Figura 3 – Taxas de resistência às fluoroquinolonas em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, conforme levantamento do *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*.

Figura 4 – Taxas de resistência às cefalosporinas em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, conforme levantamento do *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*.

Figura 5 – Representação do domínio V da subunidade 23S do rRNA, com destaque nos locais que podem ocorrer mutações relacionado com redução de sensibilidade à azitromicina.

Figura 6 – Representação do domínio V da subunidade 23S do rRNA, com destaque no local de atuação das metiltransferases.

Figura 7 – Taxas de resistência à azitromicina em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, conforme levantamento do *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*.

Figura 8 – Distribuição das amostras de *N. gonorrhoeae* de acordo com o ano de isolamento.

Figura 9 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de penicilina para os isolados de *N. gonorrhoeae*.

Figura 10 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de ceftriaxona para os isolados de *N. gonorrhoeae*.

Figura 11 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de ciprofloxacina para os isolados de *N. gonorrhoeae*.

Figura 12 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de azitromicina para os isolados de *N. gonorrhoeae*.

Figura 13 – Perfil clonal dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* com redução de sensibilidade à azitromicina após a digestão do DNA utilizando SpeI.

Figura 14 – Alinhamento dos diferentes alelos do gene 23S rRNA do isolado clínico de *N. gonorrhoeae* 260.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Oligonucleotídeos e condições da reação em cadeia da polimerase utilizados para amplificação dos genes codificadores da região 23S rRNA em *N. gonorrhoeae*.

Tabela 2 – Perfil de sensibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae*.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC – *American Type Culture Collection*

CEE – Cefalosporina de Espectro Estendido

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CRT DST/AIDS – Centro de Referência e Tratamento

DIP – Doença Inflamatória Pélvica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetracético

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GASP – *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IST – Infecção Sexualmente Transmissível

LEMC – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica

MALDI-TOF MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

PFGE – *Pulsed Field Electrophoresis – eletroforese em campo pulsado*

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossômico

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Seleção das Amostras	24
3.2 Determinação do Perfil de Sensibilidade	24
3.3 Avaliação da Similaridade Genética pela técnica de PFGE	25
3.4 Avaliação dos mecanismos de resistência	25
3.4.1 Extração de DNA	25
3.4.2 Amplificação dos genes de interesse por PCR.....	26
3.4.3 Sequenciamento e Interpretação do Resultado.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Isolados bacterianos	28
4.2 Perfil de Sensibilidade	28
4.3 Similaridade Genética	33
4.4 Caracterização do mecanismo de resistência	36
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

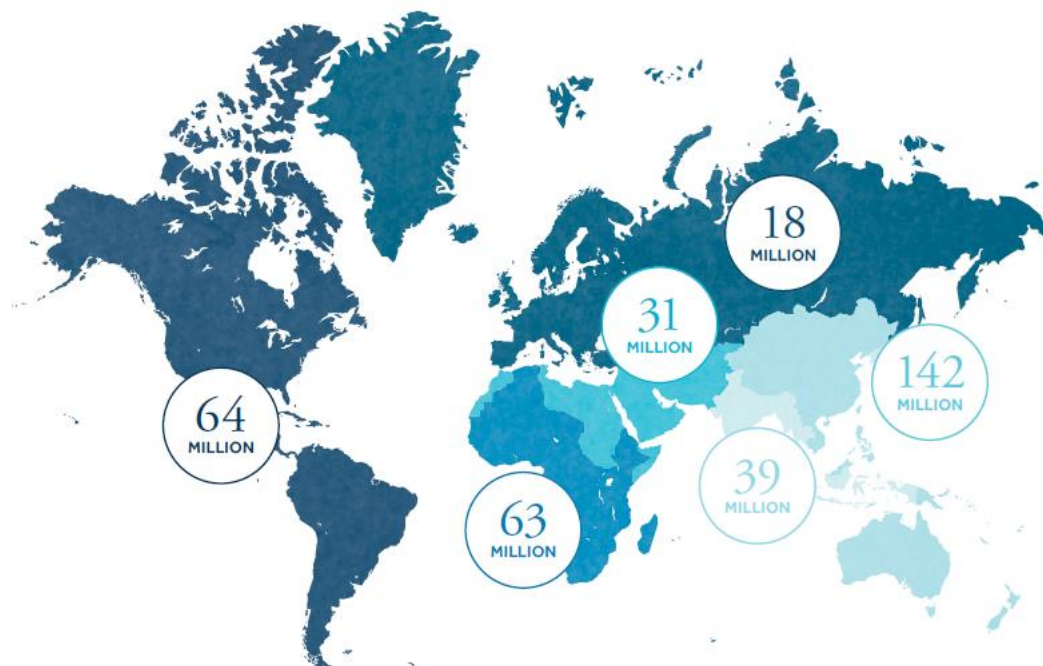
1. INTRODUÇÃO

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que quatro Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) seriam responsáveis por um total de 498,9 milhões de novos casos em adultos entre 15 e 49 anos – clamidiose, tricomoníase, sífilis e a gonorreia. De acordo com este levantamento, esta última infecção seria responsável por 106,1 milhões de casos, um aumento de 21% se comparado com a incidência de 2005 (UNEMO; SHAFER, 2014).

A gonorreia, causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae*, consiste em uma infecção transmitida pelo ato sexual ou de forma congênita, durante a gestação ou no parto, durante a passagem do recém-nascido pelo canal vaginal; nestes casos, pode provocar infecção ocular, a qual, se não tratada, pode culminar em cegueira. Em mulheres adultas, a maioria dos casos é assintomática, enquanto que nos homens da mesma faixa etária os sintomas podem acometer em até 90% dos casos. Os quadros sintomáticos incluem, principalmente, uretrite em homens e cervicite em mulheres (UNEMO; SHAFER, 2014). Caso a infecção não seja diagnosticada ou tratada corretamente, pode levar a complicações, como doença inflamatória pélvica (DIP), endometriose, edema peniano, epididimite, gravidez ectópica, aborto e até a infertilidade (BARRETO et al., 2004). Além disso, o risco de contrair a infecção pelo HIV pode aumentar em até três vezes em pacientes com gonorreia (WHO, 2012; COSTA et al., 2013).

De acordo com a OMS, a gonorreia é a segunda infecção bacteriana sexualmente transmissível mais frequente no mundo, perdendo somente para a tricomoníase. Além disso, a emergência de resistência a diversas classes de antimicrobianos tem tornado a gonorreia uma preocupação global (UNEMO; SHAFER, 2014; UNEMO; NICHOLAS, 2012). Dados de um estudo global, publicado em 2012, estimaram 357 milhões de novos casos de ISTs por ano (**Figura 1**). Desse total, indicaram a presença de 78 milhões de casos de gonorreia no mundo, sendo 11 milhões somente nas Américas (WI et al., 2017; NEWMAN et al., 2015).

Figura 1 – Estimativa da Organização Mundial da Saúde do número de novos casos de infecções sexualmente transmissíveis em 2012.



Fonte: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/ghss-stis/en/>

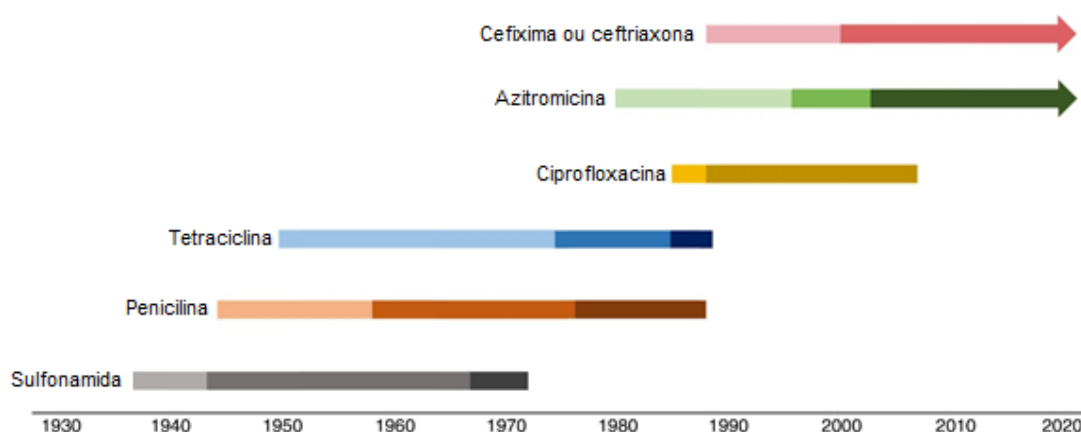
Esse aumento na incidência da gonorreia, bem como das demais ISTs, pode estar associado com a redução do uso de preservativos, prescrição indiscriminada do uso de antimicrobianos, baixa escolaridade, baixa renda, histórico de outras ISTs, aumento no número de parceiros, homens que fazem sexo com homens, pacientes gravidas e trabalhadores do sexo (BARBOSA *et al.*, 2010; POGETTO *et al.*, 2011; PIAZETTA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014; BARCELOS *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2014). No Brasil, os dados disponíveis sugerem uma frequência de 2% de casos de gonorreia; no entanto, a ausência de exigência de notificação compulsória e os baixos índices de diagnóstico do agente etiológico de uretrite – as quais normalmente são tratadas de forma empírica – sugere que estes números são subestimados (FERNANDES *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2014).

O diagnóstico da gonorreia pode ser realizado por bacterioscopia do material clínico – secreção uretral/vaginal ou ocular - utilizando coloração de Gram, na qual serão observados diplococos gram-negativos intracelulares em leucócitos polimorfonucleares. A cultura em ágar chocolate, ágar Thayer-Martin ou ágar New York City, com incubação em microaerofilia de 24 a 48 horas, é

considerada a técnica padrão-ouro devido à alta sensibilidade (86,2%) e especificidade (100%). Técnicas de biologia molecular, baseadas na detecção de regiões espécie-específicas do DNA bacteriano, também são disponíveis comercialmente e podem ser empregadas diretamente em espécimes clínicos (UNEMO et al., 2013).

Os tratamentos para a gonorreia com antimicrobianos foram modificados ao longo do tempo, conforme as cepas desenvolveram resistência a esses compostos (**Figura 2**). Os primeiros relatos de tratamento de infecção gonocócica indicavam a utilização de sulfonamidas, a qual era efetiva em 80 a 90% dos casos. Porém, já no final da década de 1940, a maioria das cepas eram resistentes a esta classe de antimicrobianos. Após a descoberta da penicilina, iniciou-se uma nova era no tratamento de infecções, entre elas a gonorreia. Inicialmente, este antimicrobiano era indicado apenas para o tratamento de gonorreia oftálmica em crianças; posteriormente, no entanto, foi evidenciada sua efetividade no tratamento de uretrite causada por este patógeno. Sua utilização na prática clínica, no entanto, foi reduzida após a descrição, em 1976, de elementos genéticos móveis que carregavam o gene *bla*_{TEM-1}, que codifica uma penicilinase, e conferiam resistência às penicilinas (UNEMO; SHAFER, 2014).

Figura 2 - Evolução da resistência a antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae*.



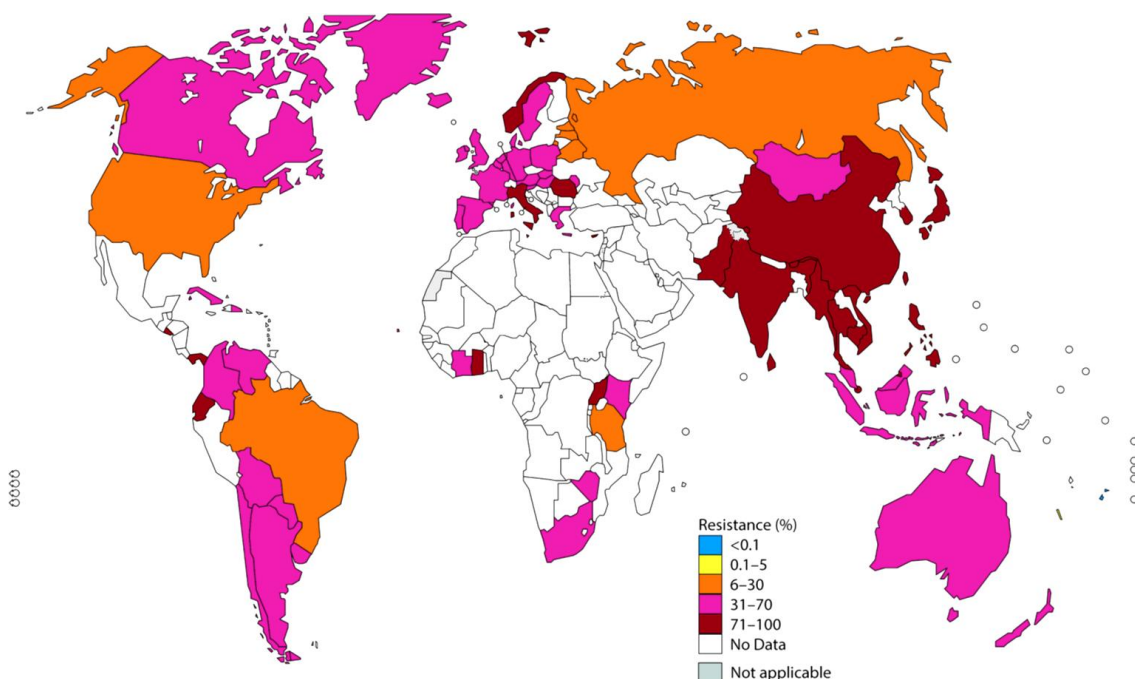
Fonte: (COSTA-LOURENÇO et al., 2017)

Alterações de cores indicam eventos que impactaram o nível de resistência ao longo do tempo.

Entre as décadas de 1950 e 1980, as tetraciclinas também foram indicadas para o tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae*, principalmente em pacientes com alergia às penicilinas. Os relatos globais de altos níveis de resistência mediada por *tetM*, um mecanismo plasmidial (UNEMO; SHAFER, 2014; TAPSALL, 2001) fizeram com que as tetraciclinas fossem substituídas pelas espectinomicinas. Em 1981, esta classe de antimicrobianos era considerada a primeira opção de tratamento na Coreia do Sul. No mesmo ano, no entanto, resistência a essa classe de antimicrobianos foi observada nas Filipinas, e em 1983, também foi descrita no Reino Unido (UNEMO; SHAFER, 2014).

As fluoroquinolonas também foram utilizadas como primeira opção de tratamento, em função de sua alta eficácia clínica, inclusive no Brasil (JUNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009). No entanto, o desenvolvimento e a disseminação da resistência a essa classe em um curto período de tempo fizeram com que ela deixasse de ser recomendada para o tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae* em muitos países (**Figura 3**). Essa resistência às quinolonas em *N. gonorrhoeae* é causada, principalmente, por mutações nos genes *gyrA* e *parC*, que codificam as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, respectivamente, as quais levam a uma redução de afinidade do sítio alvo (UEHARA et al., 2011).

Figura 3 – Taxas de resistência às fluoroquinolonas em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, conforme levantamento do *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*.



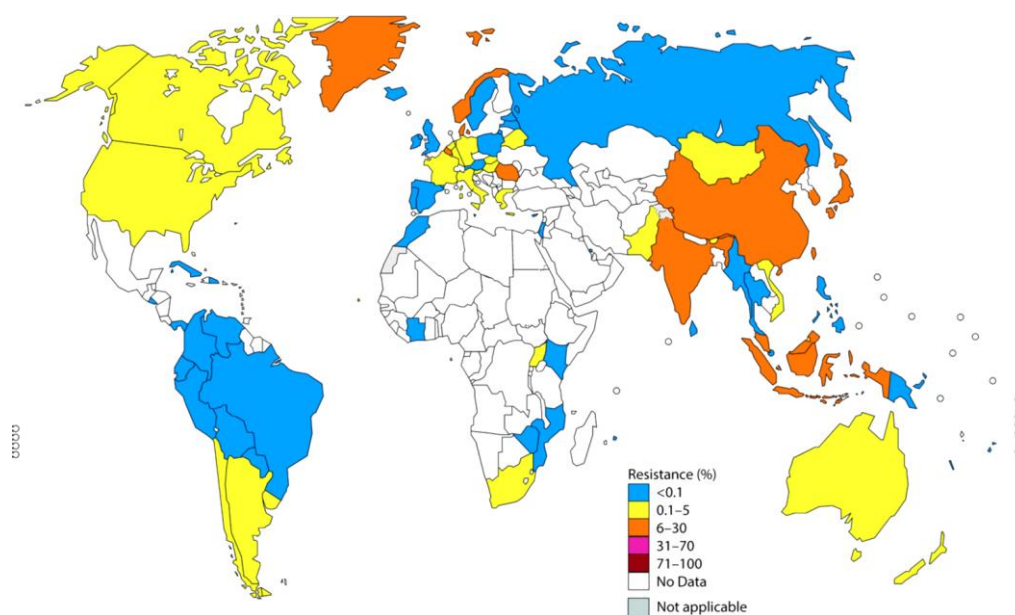
Fonte: (WI et al., 2017)

Até 2015, de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde, o tratamento recomendado para infecções anogenitais no Brasil era a associação de ciprofloxacina e azitromicina, ambos por via oral. No entanto, o uso dessa associação não é indicada em locais, onde a taxa de resistência à ciprofloxacina igual ou superior a 5%, o uso deste antimicrobiano é contraindicado. Ferreira e colaboradores (2007) avaliaram o perfil de sensibilidade de 249 cepas de *N. gonorrhoeae* isoladas entre os anos de 2005 e 2006, em Manaus, e detectaram uma redução de sensibilidade em 5,6% dos isolados. Uehara e colaboradores (2011) encontraram resultados semelhantes em isolados do Rio de Janeiro e de São Paulo, nos quais a taxa de resistência a ciprofloxacina foi de 7,7% e 3,1%, respectivamente, no mesmo ano.

Em função da baixa eficácia clínica das quinolonas em muitos países e em alguns estados brasileiros, as cefalosporinas de espectro extendido (CEEs), como a cefixima e a ceftriaxona, substituíram essa classe de antimicrobianos nas diretrizes atuais de tratamento de uretrites. Embora as taxas de resistência às CEEs ainda sejam baixas na maioria dos países (**Figura 4**), já existem relatos

de falha terapêutica com este antimicrobiano, que podem ser mediada por alterações, principalmente no gene *penA* (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Figura 4 – Taxas de resistência às cefalosporinas em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, conforme levantamento do *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*.



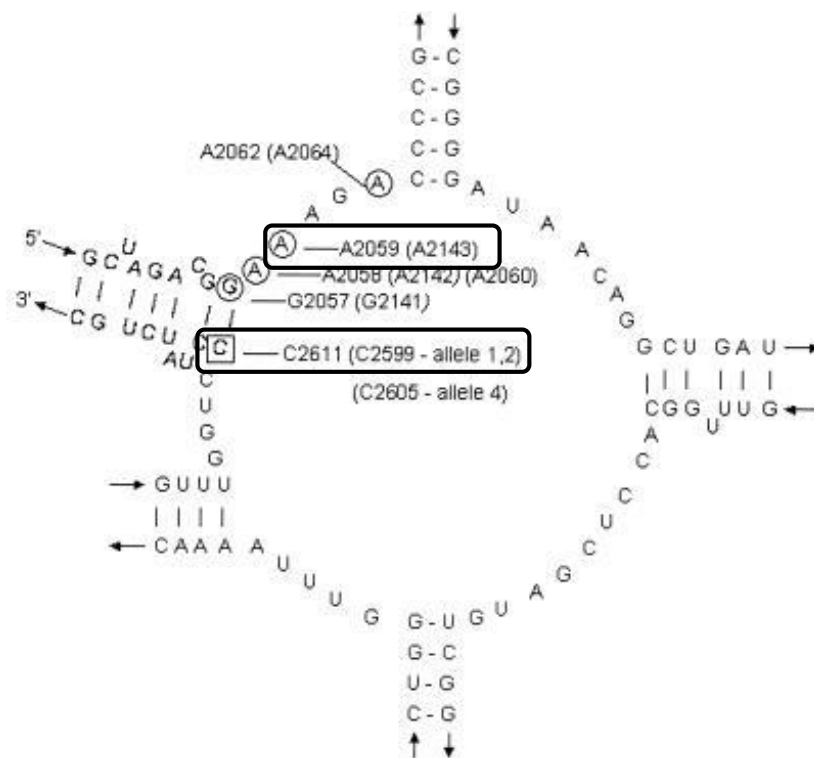
Fonte: (WI et al., 2017)

Assim como a gonorreia, a clamídia é uma IST de crescente importância epidemiológica, apresentando cerca de 92 milhões de novos casos por ano, segundo a OMS (PIAZZETTA et al., 2011). Também é majoritariamente assintomática em ambos os sexos, com sintomas e complicações semelhantes aos da gonorreia. Considerando as dificuldades de obtenção de um diagnóstico laboratorial adequado para os dois microrganismos, as uretrites causadas por essas duas infecções são normalmente tratadas com o mesmo esquema terapêutico. Desta forma, a azitromicina é considerada uma das principais opções terapêuticas empíricas, visto que, em casos de infecção por clamídia, a eficácia clínica é de até 97% (GEISLER et al., 2015). Devido à combinação anterior da azitromicina com a ciprofloxacina, e posteriormente, com as CEEs, já é possível observar uma redução na sensibilidade de *N. gonorrhoeae* à azitromicina (WHO, 2016; WORKOWSKI; BOLAN, 2015; NDOWA; LUSTI-NARASIMHAN; UNEMO, 2012). Porém, poucos estudos brasileiros avaliaram a

frequência de amostras resistentes à azitromicina. Bazzo e colaboradores (2018) avaliaram 550 amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas de todas as regiões brasileiras de uretrites de homens que fazem sexo com homem (HSH). Esses autores observaram que somente 6,9% e 8,9% apresentavam resistência ou redução da sensibilidade à azitromicina.

A azitromicina pertence à classe dos macrolídeos e inibe a síntese proteica através de sua ligação no domínio V na porção 23S do rRNA (DEMCZUK et al., 2017). Em *N. gonorrhoeae* são descritos três mecanismos relacionados à redução de sensibilidade à azitromicina. O primeiro e mais comum é a presença de mutações em regiões específicas do RNA ribossômico (rRNA), que diminuem a afinidade da azitromicina no seu sítio de ação. A mutação A2059G em pelo menos um dos quatro alelos do gene 23S eleva a concentração inibitória mínima (CIM) a valores acima de 512 mg/L (KATZ et al, 2012); enquanto que a mutação C2611T é capaz de conferir níveis moderados de resistência – os valores de CIM variam entre 2 e 32 mg/L (DEMCZUK et al, 2016). Por convenção, a localização da mutação é baseada na numeração utilizada para *Escherichia coli*, sendo em *N. gonorrhoeae* as localizações A2045G e C2597T, respectivamente. Quanto maior a quantidade de alelos com mutações, maior será a CIM; além disso, se a cepa possui mutação em um alelo, rapidamente pode adquirir mutações nos demais alelos (DEMCZUK et al, 2017).

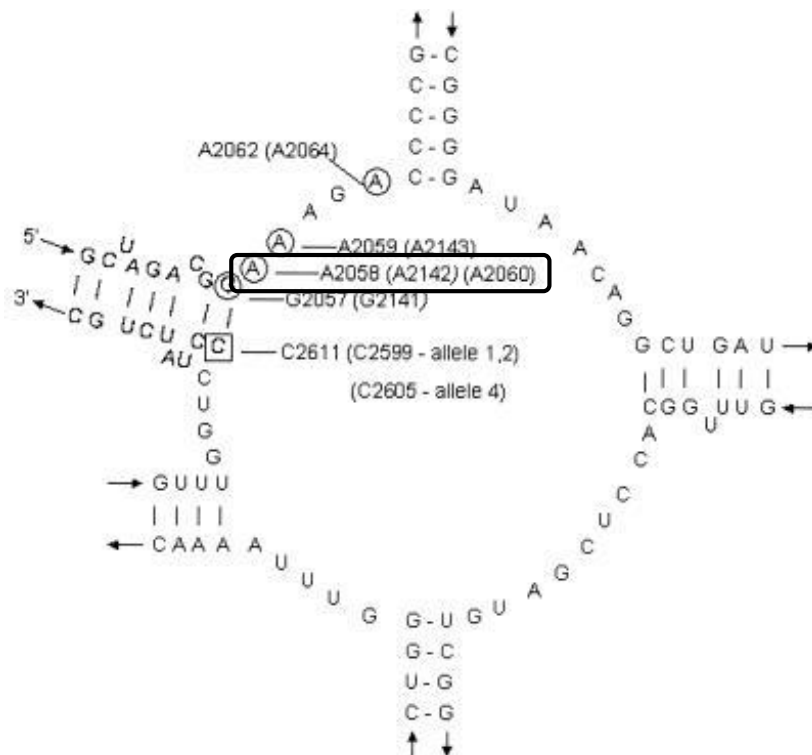
Figura 5 – Representação do domínio V da subunidade 23S do rRNA, com destaque nos locais que podem ocorrer mutações relacionadas com a redução de sensibilidade à azitromicina.



Fonte: (NG et al., 2002)

A afinidade da azitromicina pelo RNAr também pode ser afetada pela metilação de nucleotídeos específicos (A2058) do mesmo. Em *N. gonorrhoeae*, essa modificação é promovida por uma metiltransferase codificada pelos genes do grupo *erm*. Esses genes são comumente carregados por transposons e podem conferir altos níveis de resistência à eritromicina quando associados a outros mecanismos de resistência. Entretanto, os valores de CIM de azitromicina para os isolados carregadores de genes *erm* podem ficar abaixo do ponto de corte clínico, variando entre 1 e 4 mg/L, na ausência de outros mecanismos associados (ROBERTS *et al.*, 1999).

Figura 6 – Representação do domínio V da subunidade 23S do rRNA, com destaque no local de atuação das metiltransferases.



Fonte: (NG et al., 2002)

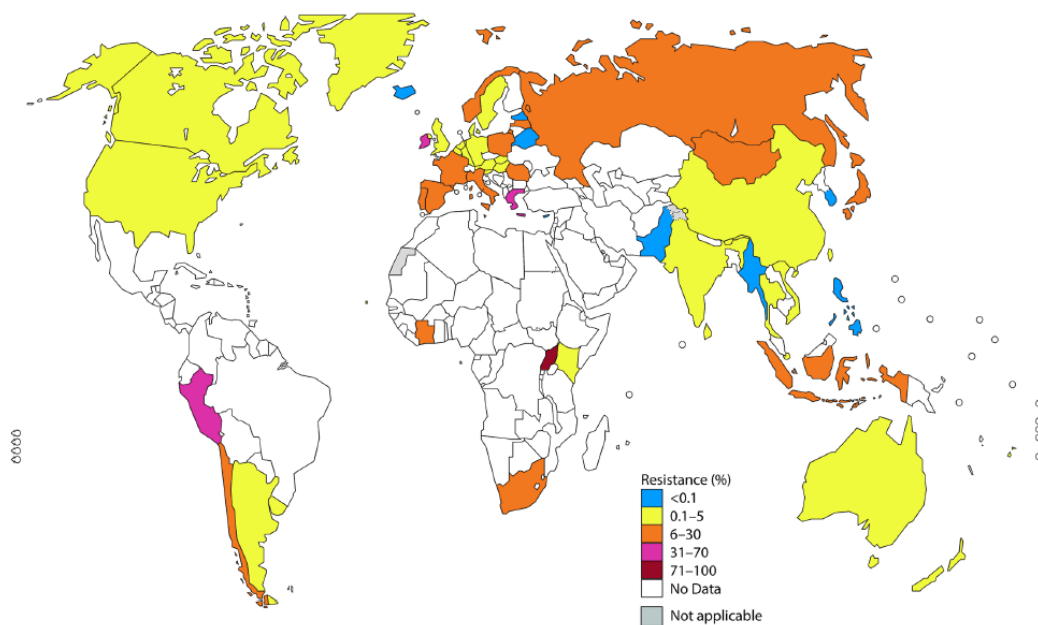
Sistemas de efluxo que atuam no transporte ativo dos antimicrobianos para fora da célula bacteriana também podem afetar o acesso da azitromicina ao ribossomo (UNEMO; SHAFER, 2014). Elevações nos valores de CIM dos substratos do sistema de efluxo MtrCDE normalmente são provocadas por deleções na posição -35A no gene *mtrR*, sendo este responsável pela codificação de uma proteína repressora da expressão do sistema; assim, a diminuição da expressão de MtrR provoca a hiperexpressão de MtrCDE (ZALUCKI et al, 2012; DEMCZUK et al, 2016). Este sistema, pertencente à família RND, é capaz de transportar não somente macrolídeos, mas também betalactâmicos, quinolonas e tetraciclina para o exterior da célula bacteriana (UNEMO; SHAFER, 2014).

Devido a uma elevação na resistência aos antimicrobianos, em 1990, houve a criação do WHO *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme* (WHO GASP), o qual avalia a incidência da doença e os tratamentos preconizados regionalmente; entretanto, somente alguns países fazem parte desse programa. Entre eles estão os Estados Unidos, Canadá, Austrália, Caribe,

alguns países europeus e da América Latina e sudeste da Ásia. O Brasil não faz parte do GASP e também não possui um programa nacional de vigilância para gonorreia, porém, em 2015, o Ministério da Saúde estimou 9.285.000 casos por ano, apesar desses dados terem sido de um pequeno estudo, enquanto a OMS estimou 1.541.800 casos por ano no Brasil (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Em 2014, 35 dos 45 países participantes do GASP reportaram casos de *N. gonorrhoeae* resistente à azitromicina, sendo que, destes, apenas 13 apresentaram taxas de resistência maiores do que 5% (WI et al, 2017).

Figura 7 – Taxas de resistência à azitromicina em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, conforme levantamento do *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*.



Fonte: (WI et al., 2017)

No Brasil, existem poucos relatos a respeito da atividade *in vitro* da azitromicina frente a isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*. Costa e colaboradores (2013) avaliaram o perfil de sensibilidade de 201 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* obtidos em um Centro de Referência de IST em Belo Horizonte. Neste estudo, 22,4% dos isolados apresentaram sensibilidade reduzida à azitromicina. Além disso, como dito anteriormente, Bazzo e colaboradores (2018) publicaram um estudo de vigilância com amostras brasileiras de *N.*

gonorrhoeae, obtidas entre os anos de 2015 e 2016. Estes autores descreveram taxas menores de resistência a qual foi, aproximadamente, 15%. Entretanto, nenhum estudo brasileiro até o momento descreveu os mecanismos que levaram a esta redução de sensibilidade à azitromicina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de sensibilidade e caracterizar os mecanismos de resistência à azitromicina em isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos;
- Descrever e comparar o perfil de similaridade genética entre os isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* resistentes à azitromicina;
- Avaliar a presença de mutações nos genes codificadores da subunidade 23S do RNAr.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das Amostras

As amostras incluídas no estudo foram provenientes de pacientes ambulatoriais do Centro de Referência e Tratamento em IST/AIDS – CRT Santa Cruz durante os anos de 2003 a 2015. Os isolados foram posteriormente encaminhados ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - LEMC/Alerta e armazenados a -70°C no banco de micro-organismos do mesmo, pertencente à disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Posteriormente, a identificação bacteriana confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemanha), com auxílio do software Biotyper MALDI 3.1 (Bruker Daltonics, Alemanha).

3.2 Determinação do Perfil de Sensibilidade

A determinação da CIM de penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina e azitromicina para os isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* foi realizada pela técnica de diluição em ágar. Em tubos contendo GC ágar, foram adicionados hemoglobina 1% e suplemento VITOX, previamente preparados e estabilizados em banho-maria a 56°C, e as soluções do antimicrobiano. Após homogeneização, o meio de cultura contendo concentrações crescentes de antimicrobianos foi vertido em placas de Petri 90x15 mm previamente identificadas, que foram utilizadas imediatamente ou armazenadas a 4°C por no máximo 24 horas.

Uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL de cada amostra foi obtida em solução salina 0,9% tamponada para pH 7,0. Com o auxílio de um inoculador, 2 a 3 µL dessa suspensão bacteriana foi inoculada nas placas preparadas, a fim de obter um inóculo final de 10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas por 20 a 24 horas a 35°C em microaerofilia. A CIM de cada antimicrobiano foi considerada a primeira concentração em que não houve crescimento bacteriano. A interpretação dos resultados foi realizada utilizando os pontos de corte preconizados pelo *European Committee on Antimicrobial*

Susceptibility Testing (EUCAST, 2018) e a cepa de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 foi utilizada para o controle de qualidade.

3.3 Avaliação da Similaridade Genética pela técnica de PFGE

Para a avaliação da correlação clonal entre as amostras de *N. gonorrhoeae* que apresentaram redução de sensibilidade à azitromicina foi realizada a técnica eletroforese de campo pulsado (PFGE). Após digestão do DNA bacteriano com enzima de restrição Spe I (Nem England Biolab, Inc., Beverly, Mass, USA - 1µL por amostra), a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em TBE 0,5x (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,002 M), no sistema CHEF-DR II (Bio Rad Laboratories, California, EUA) à temperatura de 13°C, utilizando corrente elétrica de 200 volts por 23 horas. O gel foi corado com UniSafe Dye® (Uniscience, Miami, EUA) e foi fotografado sob luz ultravioleta. A interpretação foi realizada de acordo com o coeficiente de similaridade de Dice e o dendrograma formado pelo método UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*). Tolerância nas posições de 1,5% e um limiar de similaridade 80% foram utilizados para a divisão dos isolados em grupos clonais.

3.4 Avaliação dos mecanismos de resistência

As amostras que apresentaram sensibilidade reduzida à azitromicina foram avaliadas pela reação de polimerase em cadeia (PCR) e, posteriormente pelo sequenciamento dos respectivos amplicons para detecção de mutações no sítio de ligação deste fármaco (subunidade 23S do rRNA).

3.4.1 Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada por técnica *in house*. As amostras foram crescidas em ágar chocolate e uma alça cheia de 10µL foi colocada em 100 mL de água destilada estéril. Estas foram centrifugadas por 15 minutos a 4000/rpm. Os sobrenadantes foram então descartados e as amostras ressuspensas em 1,0 mL de TE (1mM de EDTA em Tris HCl 10mM pH 8,0) e 0,5 mL de SDS 10%, além de 50µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubadas a

37°C por 1 hora. Com esse período de tempo passado, foi adicionado 1,8 mL de NaCl 5M e misturado delicadamente, seguido de uma adição de 1,5 mL de CTAB 10% NaCl, o qual foi homogeneizado e as amostras incubadas a 65°C por 20 minutos. Depois foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), homogeneizado delicadamente por inversão e centrifugado por 10 minutos a 12000/rpm. Os sobrenadantes foram transferidos a um novo tubo e centrifugados por 15 minutos a 12000/rpm. Esses sobrenadantes foram então descartados e os *pellets* foram ressuspensos em água e armazenados a -20°C até o uso.

3.4.2 Amplificação dos genes de interesse por PCR

Uma solução mãe foi preparada, em fluxo laminar, contendo master-mix (TopTaq Master Mix, Qiagen, Hilden, Alemanha), água estéril e sequências iniciadoras das reações numa concentração final de 0,5 µM. Após a homogeneização foram distribuídos 19 µL da solução em cada tubo de amplificação, previamente identificados, e logo em seguida 1 µL do DNA bacteriano previamente extraído. Para a pesquisa de mutações nos alelos do 23S rRNA utilizou-se um *primer forward* comum e um *primer reverse* específico para a amplificação de cada alelo, conforme a Tabela 1. As reações que foram positivas na pesquisa de mutações foram submetidas a uma nova reação de amplificação utilizando o mesmo *primer forward* da primeira reação e o *primer reverse* comum (Tabela 1). As condições de cada reação também são apresentadas na **Tabela 1**. Após amplificação, a revelação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EUA), utilizando UniSafe Dye® como corante seguido de visualização sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Oligonucleotídeos e condições de reação utilizados para amplificação dos genes codificadores do 23S rRNA em *N.gonorrhoeae*.

Oligonucleotídeo	Sequência	Condições de ciclagem	Tamanho esperado do amplicon	Referência
F-seq	5'-ACGAATGGCGTAACGATGGCCACA-3'	35 ciclos 94°C, 1 min 59°C, 1 min 72°C, 1 min	712pb	Ng <i>et al.</i> , 2002
R-seq	5'-TTCGTCCACTCCGGTCCTCTCGTA-3'			
R alelo 1	5'-TCAGAATGCCACAGCTTACAAACT-3'	30 ciclos 94°C, 1 min	2.054pb	
R alelo 2	5'-GCGACCATACCAAACACCCACAGG-3'	66°C (alelos 2 e 3), 1,5 min	2.240pb	
R alelo 3	5'-GATCCCGTTGCAGTGAAGAAAGTC-3'	ou 68°C (alelos 1 e 4), 1,5 min	2.217pb	
R alelo 4	5'-AACAGACTTACTATCCCATTCAGC-3'	72°C, 2,5 min	1.847pb	

3.4.3 Sequenciamento e Interpretação do Resultado

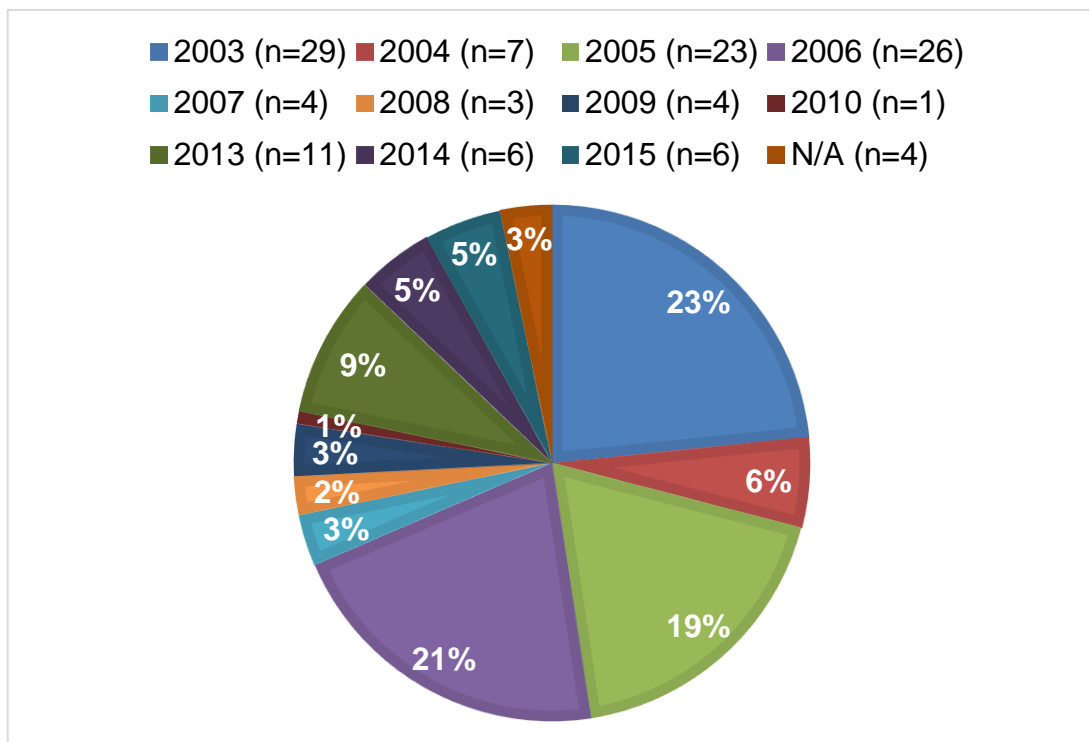
Os produtos de PCR foram purificados a partir do gel de agarose com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em um espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE, Cambridge, Inglaterra) e então submetido à reação preparatória para o sequenciamento com o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reações de sequenciamento foram realizadas no aparelho ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências de DNA obtidas e comparadas com as sequências dos alelos do 23S rRNA da cepa *N. gonorrhoeae*, FA1090 utilizando o programa Lasergene Software Package (DNASTAR, Madison, EUA), disponível *online* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4. RESULTADOS

4.1 Isolados bacterianos

Um total de 124 isolados clínicos foram considerados viáveis e tiveram sua identificação confirmada como *N. gonorrhoeae* pelo MALDI-TOF MS. Podemos observar que um número maior de isolados foi recuperado nos anos de 2003 e 2006 (Figura 8).

Figura 8 – Distribuição das amostras de *N. gonorrhoeae* de acordo com o ano de isolamento, N/A, não disponível.



4.2 Perfil de Sensibilidade

Foi possível observar uma grande variação nos valores de CIM de penicilina, ciprofloxacina e azitromicina, conforme apresentado na Tabela 2. A redução de sensibilidade para penicilina, ciprofloxacina e azitromicina foi verificada em 89,5% (112/124), 28,2% (33/124) e 30,6% (37/121) dos isolados, respectivamente. Nenhum dos isolados incluídos no estudo apresentou redução

de sensibilidade à ceftriaxona. Os isolados com redução de sensibilidade foram obtidos desde o ano de 2003.

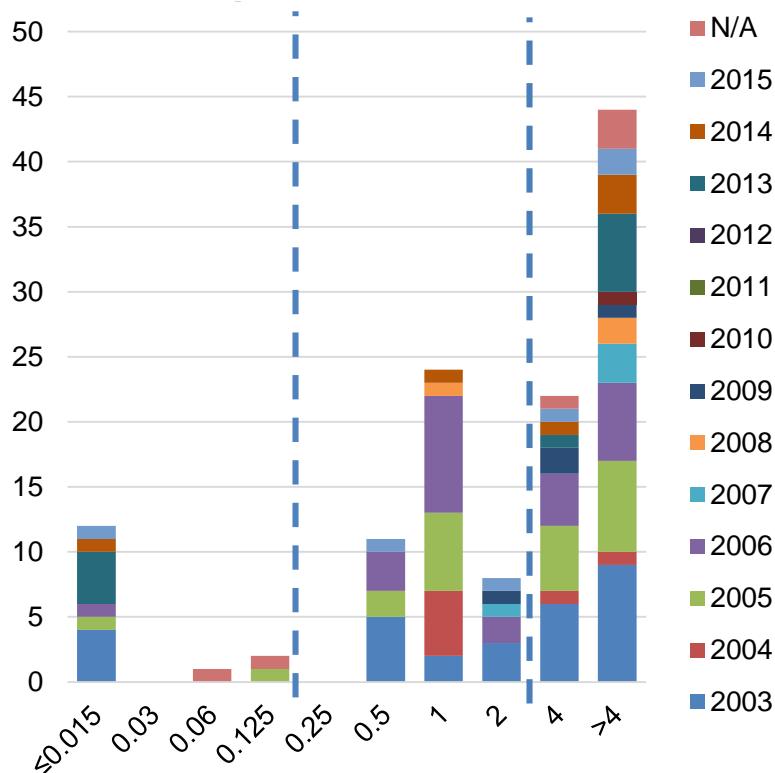
Tabela 2 – Perfil de sensibilidade dos isolados de *N. gonorrhoeae*.

	Varição (mg/L)	CIM ₅₀ (mg/L)	CIM ₉₀ (mg/L)	S%	I%	R%
Penicilina	≤0,015 - >4	4	>4	10,5	29,8	59,7
Ceftriaxona	≤0,001- 0,06	0,002	0,008	100	0	0
Ciprofloxacina	≤0,00025 - >2	0,002	>2	71,7	2,4	25,8
Azitromicina	≤0,015 - >1	0,25	0,5	69,4	24	6,6

Os resultados foram interpretados segundo os critérios do BrCAST/EUCAST (2018). **Abreviações:** **CIM₅₀**: concentração inibitória mínima de 50% das amostras; **CIM₉₀**: concentração inibitória mínima de 90% das amostras; **S**: sensível; **I**: intermediário; **R**: resistente.

As distribuições das CIM de penicilina (**Figura 9**), ceftriaxona (**Figura 10**), ciprofloxacina (**Figura 11**) e azitromicina (**Figura 12**) para os isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* são apresentadas a seguir. É possível ainda correlacionar os anos de isolamento de cada uma das amostras e o valor de CIM encontrado, bem a categorização das amostras, de acordo com os critérios do EUCAST/BrCAST.

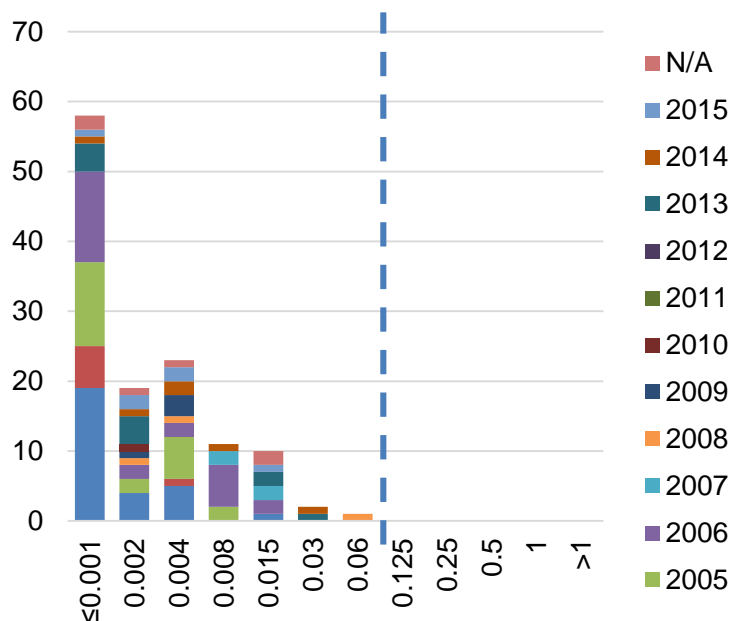
Figura 9 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas, de penicilina para os isolados de *N. gonorrhoeae*.



As linhas tracejadas indicam os pontos de corte de acordo com os critérios do EUCAST, sendo as amostras mais à direita consideradas resistentes. (n=124) As CIMs estão em mg/L. N/A, dados indisponíveis.

A penicilina foi o antimicrobiano que apresentou menor atividade *in vitro* frente às amostras de *N. gonorrhoeae*. É possível observar no gráfico que haviam amostras com redução de sensibilidade e resistentes desde o ano de 2003, com CIMs variando de 0,125 mg/L a >4 mg/L. **(Figura 9).**

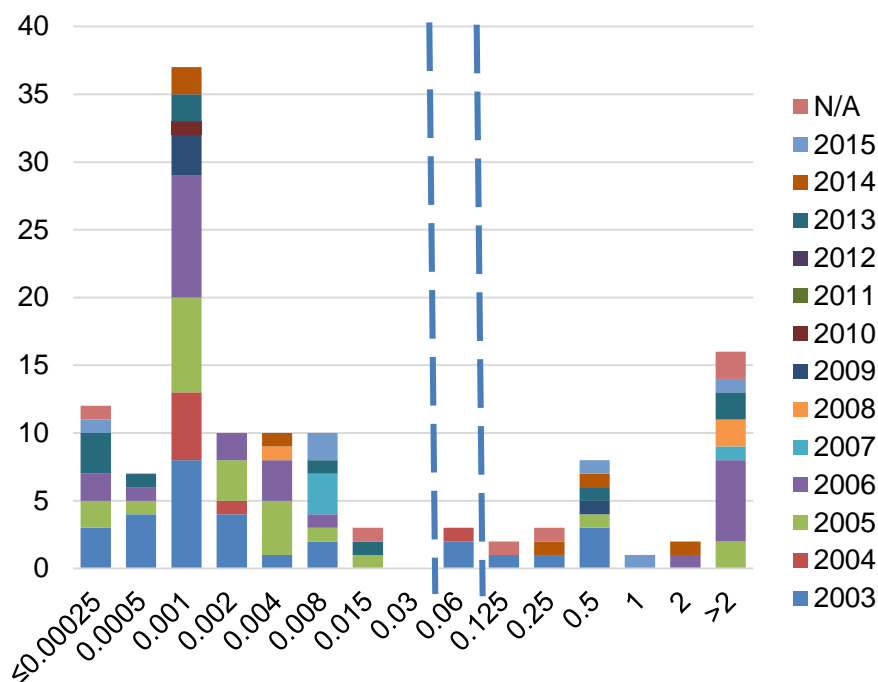
Figura 10 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas, de ceftriaxona para os isolados de *N. gonorrhoeae*.



Os isolados representados do lado direito da linha tracejada apresentam sensibilidade reduzida a este antimicrobiano, de acordo com os critérios do EUCAST. (n=124) As CIMs estão em mg/L. N/A, dados indisponíveis.

Todas as amostras apresentaram-se sensíveis a ceftriaxona, tendo CIMs $\leq 0,001$ mg/L a 0,06 mg/L (**Figura 10**), sendo o antimicrobiano com maior atividade *in vitro*..

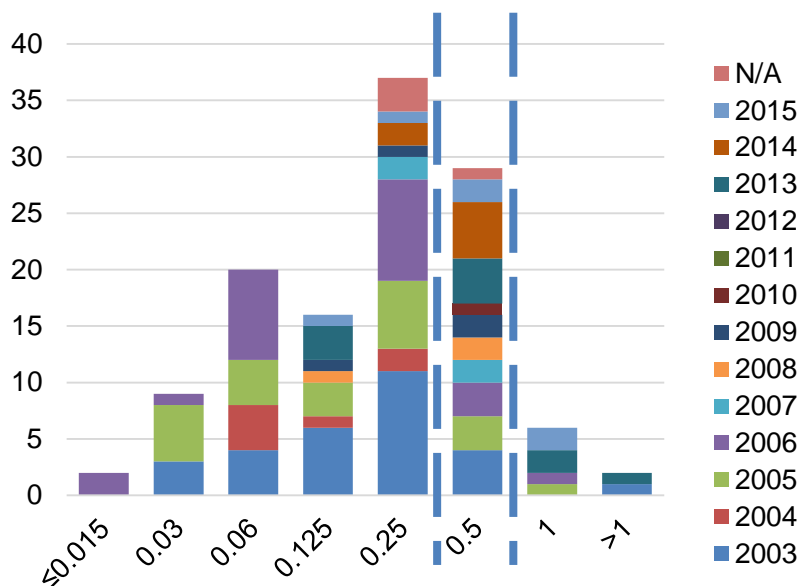
Figura 11 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas, de ciprofloxacina para os isolados de *N. gonorrhoeae*.



As linhas tracejadas indicam os pontos de corte de acordo com os critérios do EUCAST, sendo as amostras mais à direita consideradas resistentes. (n=124) As CIMs estão em mg/L. N/A, dados indisponíveis.

Já para a ciprofloxacina foi possível observar que os isolados apresentaram uma redução da sensibilidade desde o ano de 2003. De acordo com o perfil apresentado, 28,2% dos isolados clínicos apresentaram um perfil de sensibilidade reduzida à ciprofloxacina. Dentre estas amostras, 71,7%, 2,4% e 25,8% foram classificadas como sensíveis, intermediárias e resistentes à ciprofloxacina, respectivamente. As CIMs variaram de $\leq 0,000025$ a >2 mg/L. (Figura 11).

Figura 12 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas, de azitromicina para os isolados de *N. gonorrhoeae*.



As linhas tracejadas indicam os pontos de corte de acordo com os critérios do EUCAST, sendo as amostras mais à direita consideradas resistentes. (n=121) As CIMs estão em mg/L. N/A, dados indisponíveis.

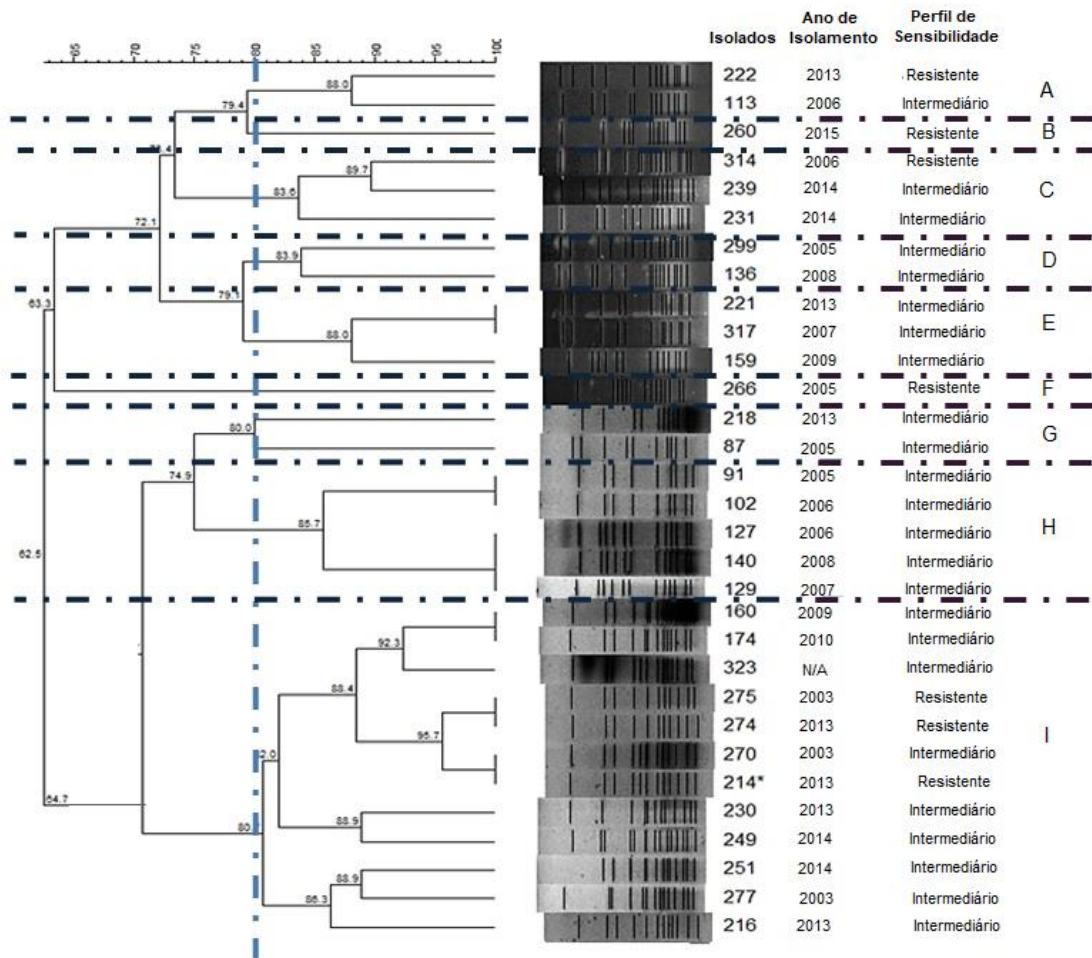
A azitromicina foi o segundo antimicrobiano com maior atividade *in vitro*, apresentando um percentual de 6,6% de isolados resistentes. Ao observar o gráfico, é possível observar amostras do ano de 2003 que apresentaram redução de sensibilidade, ou seja, com CIMs à partir de 0,5 mg/L. (**Figura 12**).

4.3 Similaridade Genética

Conforme apresentado na **Figura 13**, foram observados nove grupos clonais entre as 31 amostras que apresentaram redução da sensibilidade à azitromicina. O clone I foi o mais frequentemente observado, apresentando 12 amostras, sendo 3 dessas amostras resistentes à azitromicina. Os isolados pertencentes ao clone I distribuíram-se entre os anos de 2003 a 2014. Os três clones resistentes à azitromicina, pertencentes a esse clone, foram recuperados nos anos de 2003 e 2013. Além desses três isolados resistentes à azitromicina, ainda é possível observar outros quatro isolados também resistentes nos clones A, B, C e F, sendo esses recuperados nos anos 2013, 2015, 2006 e 2005,

respectivamente. Portanto, podemos concluir que as taxas de redução de sensibilidade à azitromicina não foram provocadas pela disseminação de um único grupo clonal.

Figura 13 - Perfil clonal dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* com redução de sensibilidade à azitromicina após a digestão do DNA utilizando SpeI.

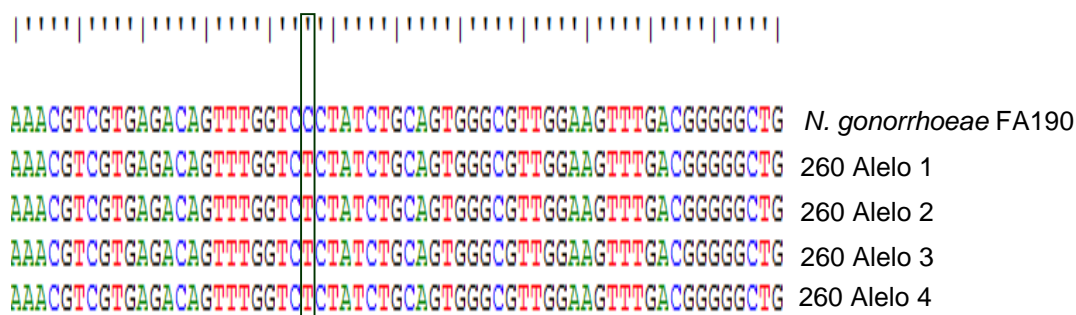


As linhas horizontais indicam os distintos clusters obtidos utilizando 80% de similaridade. 0,8% de coeficiente de DICE, 1,5% de tolerância foram utilizados.

4.4 Caracterização do mecanismo de resistência

Um representante de cada grupo clonal foi selecionado para a avaliação da presença de mutações nos alelos do gene codificador do 23S rRNA. Após a extração do DNA, amplificação e sequenciamento, as seqüências de cada alelo foram comparadas àquelas presentes na cepa de *N. gonorrhoeae* FA 1090. Dos nove isolados sequenciados, apenas a amostra 260 apresentou mutações nos quatro alelos na posição 2611, na qual há a troca de uma citosina por uma timina (Figura 14).

Figura 14 - Alinhamento dos diferentes alelos do gene 23S rRNA do isolado clínico de *N. gonorrhoeae* 260.



A seqüência foi comparada com aquela da *N. gonorrhoeae* FA 1090. Em destaque, a mutação encontrada na posição 2611 em todos os alelos.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliado o perfil de sensibilidade de uma coleção de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, obtidos entre os anos de 2003 e 2015 em um centro de referência de tratamento de ISTs da cidade de São Paulo. Além disso, foi realizada a caracterização molecular de isolados com redução de sensibilidade à azitromicina, um dos antimicrobianos indicados nas diretrizes para tratamento empírico de uretrites no Brasil.

No presente estudo foram encontrados cerca de 60% de cepas com resistência à penicilina. Melendez e colaboradores (2018) descreveram uma resistência de 22,4% à penicilina em Baltimore, sendo essa a mesma taxa de resistência descrita na Polônia em 2012 (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2014). Em um estudo realizado na China, a resistência à penicilina aumentou de 76,4% a 92,5%, no período de 2007 a 2014 (ZHAO et al., 2017). Estudos brasileiros detectaram resistência de 22% em Manaus (FERREIRA, et al., 2008), 22,4% em Belo Horizonte (COSTA, et al., 2013). No estudo de Bazzo (2018), cerca de 37% das amostras coletadas nas cinco regiões brasileiras apresentaram resistência à penicilina. Com exceção ao estudo da China, todos apresentaram uma resistência menor à penicilina, do que no nosso estudo, inclusive os estudos brasileiros.

Em relação à ceftriaxona, 100% dos isolados apresentaram sensibilidade *in vitro*. Em Baltimore, também foi possível observar essa sensibilidade (MELENDEZ et al., 2018), ocorrendo o mesmo na Polônia (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2014) e na China (ZHAO et al., 2017). Nas amostras de Belo Horizonte (COSTA et al., 2013) e nacionais de Bazzo e colaboradores (2018) também foi possível observar uma sensibilidade de 100%, porém no estudo de Manaus, 6,4% das amostras apresentaram um diâmetro menor no disco difusão do que a utilizada de parâmetro para sensibilidade (FERREIRA et al., 2008).

A ciprofloxacina foi o segundo antimicrobiano com menor eficácia *in vitro*, apresentando taxas de resistência de 25,8%. No estudo de Baltimore, cerca de 44% das amostras eram resistentes à ciprofloxacina (MELENDEZ et al., 2018), enquanto que na Polônia foi observado 60,5% de resistência (MLYNARCZYK-

BONIKOWSKA et al., 2014). Na China, essa resistência foi de 71,7% em 2007 para 100% em 2014 (ZHAO et al., 2017), demonstrando o motivo pelo qual a ciprofloxacina não é mais o tratamento recomendado pela OMS para a gonorreia. Em estudos brasileiros, como por exemplo, em Belo Horizonte, 21,4% das amostras apresentaram resistência, cerca de 5% a menos do que no presente estudo (COSTA et al., 2013). Já Bazzo e colaboradores (2018) apresentaram em seu estudo uma taxa de 55,6% de resistência. Por outro lado, em Manaus foram encontrados apenas isolados intermediários (5,5%) (FERREIRA et al., 2008). Apesar de serem observados isolados resistentes no Brasil, a ciprofloxacina foi recomendada para o tratamento empírico de uretrites no Brasil até o ano de 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015)

No caso da azitromicina, em nosso estudo, pudemos observar uma redução de sensibilidade de cerca de 30%, sendo 6,6% dos isolados resistentes à azitromicina. Em Baltimore, apenas 2,1% das amostras apresentaram resistência à azitromicina (MELENDEZ et al., 2018), enquanto que na Polônia a resistência chegou a 8,8% (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2014). Na China, 100% das amostras foram sensíveis à azitromicina tanto em 2007 quanto em 2014 (ZHAO et al., 2017). Cepas de *N. gonorrhoeae* isoladas na Itália nos períodos de 2007 e 2008, demonstraram um perfil de resistência em 20% das amostras, sendo 2,3% com valores de CIM maior ou igual a 128 mg/L (STARMINO; STEFANELLI, 2009). Nos escassos estudos brasileiros, foi observada uma resistência de 6,4% à azitromicina em Manaus, no período de 2005 a 2006, demonstrando que já existiam cepas resistentes desde esse período (FERREIRA et al., 2008). Similarmente, em nosso estudo podemos observar isolados com redução de sensibilidade desde 2003. Em Belo Horizonte, houve uma redução de sensibilidade de 22,4% das amostras, sendo 4,5% resistentes (COSTA et al., 2013). Bazzo e colaboradores (2018), por outro lado, observaram uma redução de sensibilidade à azitromicina de apenas 15%; valor significativamente menor do que o encontrado em nosso estudo. Com exceção da Polônia e da Itália, as porcentagens de resistência à azitromicina foram inferiores que às encontradas em nosso estudo.

Takayama e colaboradores (2014) caracterizaram 122 cepas de *N. gonorrhoeae* quanto aos mecanismos de resistência à azitromicina, entre os

anos de 2005 e 2011. Neste estudo foram detectadas oito cepas resistentes a azitromicina, sendo que três dessas apresentavam uma mutação do gene 23S rRNA nos quatro alelos na posição C2611T.

Whiley e colaboradores (2017) caracterizaram 124 isolados na Austrália nos períodos de Janeiro a Julho de 2017. Foram observados 10 genótipos diferentes, assim como dois mecanismos de resistência; um deles relacionado à mutação do gene *mtrR* em três genótipos, enquanto que os outros sete, apresentaram mutações no gene 23S no rRNA na posição C2611T. Em 2011 foi publicado o primeiro relato de *N. gonorrhoeae* resistente à azitromicina no Havaí, sendo que essa cepa apresentava a mutação A2059G nos quatro alelos do gene 23S, enquanto que não havia nenhuma mutação na posição C2611T (KATZ et al., 2011).

Assim como nos estudos de Takayama e colaboradores e Whiley e colaboradores, em nosso estudo foi possível detectar a mutação C2611T, sendo que no nosso foi em apenas uma das cepas, no do Japão, foram três cepas e na Austrália foram sete cepas. Essa mutação, como dito anteriormente, se comparada a A2059G, confere um menor valor da CIM. Além disso, nesses estudos não foram encontradas cepas com a mutação A2058G. Nossos resultados sugerem a presença de outros mecanismos de resistência à azitromicina, como metiltransferases codificadas pelo grupo *erm*, ou uma mutação no gene *mtrR*, levando a hiperexpressão dos sistemas de efluxo (TAKAYAMA et al., 2014; WHILEY et al., 2017), já que somente uma das amostras resistentes à azitromicina apresentou mutação no gene que codifica a subunidade 23S do RNAr. A azitromicina é utilizada há alguns anos no tratamento empírico de uretrites em função de sua ação frente à clamídia. Pouco se sabe, no entanto, sobre o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* frente a este antimicrobiano e sobre os mecanismos responsáveis por essa redução de sensibilidade em nosso país

6. CONCLUSÃO

Foi possível observar uma redução de sensibilidade à azitromicina em aproximadamente 30% dos isolados incluídos neste estudo. Essa redução de sensibilidade foi observada desde o ano 2003 e foi superior àquela recentemente descrita por Bazzo e colaboradores, que avaliaram isolados brasileiros obtidos entre os anos de 2015 e 2016 de pacientes com uretrite que pertenciam ao grupo HSH. Além disso, foi possível observar altas taxas de resistência à penicilina e uma importante redução de sensibilidade à ciprofloxacina, uma vez que estes foram os antimicrobianos com menor atividade *in vitro*. Observamos, também, que a redução de sensibilidade aos antimicrobianos testados aumentou gradativamente com o passar dos anos, sendo a ciprofloxacina o exemplo mais claro, em que isolados com valores de CIM maiores que 2 µg/mL começaram a ser detectados a partir de 2005.

Os isolados que apresentaram redução de sensibilidade à azitromicina foram divididos em nove grupos clonais, indicando que esta porcentagem de redução de sensibilidade à azitromicina não se deve à disseminação de um único clone epidêmico, apesar de haver um clone predominante entre os isolados avaliados. Neste estudo, apenas um isolado apresentou mutações no 23S rRNA, indicando que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos na redução de sensibilidade à azitromicina observada em nosso estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, V.G.; SEAH, C; MARTIN, I.; MELANO, R.G. Azithromycin resistance is coevolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 5, n. 58, p.2528-2534, 2014.

BAZZO, M.L.; GOLFETTO, L.; GASPAR, P.C.; PIRES, A.F.; RAMOS, M.C.; FRANCHINI, M.; FERREIRA, W.A.; UNEMO, M.; BENZAKEN, A.S. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015-16. **J Antimicrob Chemother**. [Epub ahead of print], 2018.

BARBOSA, M.J.; MOHERDAUI, F.; PINTO, V.M.; RIBEIRO, D.; CLEUTON, M.; MIRANDA, A.E. Prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection in men attending STD clinics in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 5, n. 43, p. 500 – 503, 2010.

BARCELOS, M.R.B.; VARGAS, P.R.M.; BARONI, C.; MIRANDA, A.E. Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: prevalência e fatores de risco. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.7, n.30, p.349-354, 2008.

BARRETO, N.A; SANT'ANNA, R.R; SILVA, L.B.; UEHARA, A.A; GUIMARÃES, R.C.; DUARTE, I.M; ASENSI, M.D. Caracterização fenotípica e molecular de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002–2003. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 3, n. 16, p.32-42, 2004.

BELDA JUNIOR, W.; VELHO, P.E.N.F.; ARNONE, M.; FAGUNDES, L.J. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in São Paulo, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 38, n. 2, p.293-295, 2007.

BELKACEM, A.; JACQUIER, H.; GOUBARD, A.; MOUGARI, F.; RUCHE, G.L.; PATEY, O.; MICAËLO, M.; SEMAILLE, C.; CAMBAU, E.; BERCOT, B. Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013–14. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 9, p.2471-2478, 2016.

COSTA, L.M.; PEDROSO, E.R.P.; NETO, V.V.; SOUZA, V.C.P.; TEIXEIRA, M.J.B. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 3, p. 304-9, 2013.

COSTA-LOURENÇO, A.P.R.; SANTOS, K.T.B.; MOREIRA, B.M.; FRACALANZZA, S.E.L.; BONELLI, R.R. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. **Braz J Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 617-628. 2017.

DEMCZUK, W.; MARTIN, I.; PETERSON, S.; BHARAT, A.; DOMSELAAR, G.V.; GRAHAM, M.; LEFEBVRE, B.; ALLEN, V.; HOANG, L.; TYRRELL, G.; HORSMAN, G.; WYLIE, J.; HALDANE, D.; ARCHIBALD, C.; WONG, T.; UNEMO, M.; MULVEY, M.R. Genomic Epidemiology and Molecular Resistance Mechanisms of Azithromycin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014. **J Clin Microbiol**, v.54, n. 5, p. 1304-1313. maio 2016.

DEMCZUK, W.; SIDHU, S.; UNEMO, M.; WHILEY, D.M.; ALLEN, V.G.; DILLON, J.R.; COLE, M.; SEAH, C.; TREMBIZKI, E.; TREES, D.L.; KERSH, E.N.; ABRAMS, A.J.; VRIES, H.J.C.; DAM, A.P.V.; MEDINA, I.; BHARAT, A.; MULVEY, M.R.; DOMSELLAR, G.V.; MARTIN, I. *Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance, a novel antimicrobial resistance multilocus typing scheme for tracking global dissemination of *N. gonorrhoeae* strains. **J Clin Microbiol**, v. 55, n. 5, p.1454-1468, 2017. American Society for Microbiology.

FERNANDES, L.B.; ARRUDA, J.T.; APPROBATO, M.S.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: fatores associados à infertilidade em mulheres atendidas em um serviço público de reprodução humana. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 36, n. 8, p.353-358, 2014. FapUNIFESP (SciELO).

FERREIRA, W.A.; FERREIRA, C.M.; SCHETTINI, A.P.M.; SARDINHA, J.C.G.; BENZAKEN, A.S.; GARCIA, M.A.; GARCIA, E.G.; OLIVEIRA, L.A. *Neisseria gonorrhoeae* produtoras de betalactamase resistentes a azitromicina em Manaus, Amazonas, Brasil. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 16, n. 2, p.28-32, 2004.

FERREIRA, W.A.; VASCONCELOS, W.S.; SILVA, M.F.P.; GOMES, J.S.; FERREIRA, C.M.; BENZAKEN, A.S.; SILVA, M.I.S. Resistência da *Neisseria gonorrhoeae* a antimicrobianos em Manaus: Período 2005. -. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 19, n. 2, p.65-69, 2007.

GEISLER, W.M.; LEE, J.Y.; LENSING, S.Y.; JOHNSON, S.; PERRY, R.C.W.; KADRINKA, C.M.; KERNDT, P.R. Azithromycin versus doxycycline for urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *New England Journal Of Medicine*, v. 373, n. 26, p.2512-2521, 2015. **N. Engl. J. Med.** (NEJM/MMS).

JÚNIOR, W.B.; SHIRATSU, R.; PINTO, V.. Abordagem nas doenças sexualmente transmissíveis. **An Bras Dermatol**, v. 2, n. 84, p.151-159, 2009.

KATZ, A.R.; KOMEYA, A.Y.; SOGE, O.O.; KIAHA, M.I.; LEE, M.V.C.; WASSERMAN, G.M.; MANINGAS, E.V.; WHELEN, A.C.; KIRKCALDY, R.D.; SHAPIRO, S.J.; BOLAN, G.A.; HOLMES, K.K. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: case report of the first isolate identified in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 841-3, 2012

LIMA, Y.A.R.; TURCHI, M.D.; FONSECA, Z.C.; GARCIA, F.L.B.; CARDOSO, F.A.B.; REIS, M.N.G.; GUIMARÃES, E.M.B.; ALVES, R.R.F.; CARVALHO, N.R.; ALVES, M.F.C. Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 25, p.16-21, 2014. Elsevier BV.

MELENDEZ, J.; HARDICK J.; BARNES M.; PAGE K.R.; GAYDOS C.A. Antimicrobial Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Baltimore, Maryland, 2016: The Importance of Sentinel Surveillance in the Era of Multi-Drug-Resistant Gonorrhea. **Antibiotics**, v. 7, n. 3, p.77-83, 2018. MDPI AG.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas (PCDT): atenção integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis (IST). Brasília. 2015

MURRAY, P. *et al.* **Microbiologia médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.191. 2007

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B.; SERWIN A.B.; GOLPARIAN D.; WALTHOFFEN S.W; MAJEWSKI S.; KOPER M.; MALEJCZYK M.; DOMEIKA M.; UNEMO M. Antimicrobial susceptibility/resistance and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Poland, 2010-2012. **Bmc Infectious Diseases**, v. 14, n. 65, p.1-7, 2014.

NDOWA F, LUSTI-NARASIMHAN M, UNEMO M. The serious threat of multidrug-resistant and untreatable gonorrhoea: The pressing need for global action to control the spread of antimicrobial resistance, and mitigate the impact on sexual and reproductive health. **Sex Transm Infect.** v.88, n.5, p.317-318. 2012.

NEWMAN L.; Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. v.10, n.12. 2015.

NG, L.K.; MARTIN, I.; LIU, G.; BRYDEN, L. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 9, p.3020-5, 2002.

OLIVEIRA, A.M.F.; SANTOS, J.E.F.; OLIVEIRA, L.L.; SOUZA, L.B.S.; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. Fatores de virulência de *Neisseria* spp. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v.8, n.1, p.39-44, 2004.

PIAZZETTA, R.C.P.S.; CARVALHO, N.S.; ANDRADE, R.P.; PIAZZETTA, G.; PIAZZETTA, S.R.; CARNEIRO, R. Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoea* em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 11, p.328-333, 2011.

POGETTO, M.R.B., SILVA, M.G., PARADA, C.M.G.L. Prevalence of sexually transmitted diseases in female sex workers in a city in the interior of São Paulo, Brazil. **Rev. Latino-Am. Enferm.**, v.3, n.19, p.493-499, 2011.

ROBERTS, M.C.; CHUNG, W.O.; ROE, D.; XIA, M.; MARQUEZ, C.; BORTHAGARAY, G.; WHITTINGTON, W.L.; HOLMES, K.K. Erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral comensal *Neisseria* spp. carry known rRNA methylase genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 6, p. 1367-72, 1999.

STARNINO, S.; STEFANELLI P.. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 6, p.1200-1204, 2009. Oxford University Press (OUP).

SUAY-GARCÍA, B.; PÉREZ-GRACIA, M. T.. Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: latest developments. **Eur. J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis.**, v. 36, n. 7, p.1065-1071, 2017. Springer Nature.

TAKAYAMA, Y.; NAKAYAMA S.; SHIMUTA K.; MORITA-ISHIHARA T.; OHNISHI M. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005–2011. **J Infect Chemother**, v. 20, n. 5, p.339-341, 2014. Elsevier BV.

TAPSALL J.W. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. WHO document WHO/CDS/DRS/2001.3. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2001.

UEHARA, A.A.; AMORIN, E.L.T.; FERREIRA, M.F.; ANDRADE, C.F.; CLEMENTINO, M.B.M., FILIPPIS, I.; NEVES, F.P.G.; PINTO, T.C.A.; TEIXEIRA, L.M.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M.; FRACALANZZA, S.E.L. Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 12, p.4208-4212, 2011. American Society for Microbiology.

UNEMO M. Gonorrhoea, *In* Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. **World Health Organization (WHO)**, Geneva, Switzerland. p 21–54. 2013.

UNEMO, M.; A NICHOLAS, R.. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 12, p.1401-1422, 2012. Future Medicine Ltd.

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

WHILEY D.M.; KUNDU R.L.; JENNISON A.V.; BUCKLEY C.; LIMNIOS A.; HOGAN T.; ENRIQUEZ R.; NASSER J.E.; GEORGE C.R.; LAHRA M.M.; Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* spreading amongst men who have sex with men (MSM) and heterosexuals in New South Wales, Australia, 2017. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.73, n.5, p.1242-1246. 2017.

WI, T.; LAHRA, M.M.; NDOWA, F.; BALA, M.; DILLON, A.R.; RAMON-PARDO, P.; EREMIN, S.R.; BOLAN, G.; UNEMO, M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. **Plos Medicine**, v. 14, n. 7, p.1-16, 2017. Public Library of Science (PLoS).

World Health Organization (WHO). Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO; 2012.

World Health Organization (WHO). WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO; 2016.

World Health Organization (WHO). Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016-2021: Towards ending STIs. Geneva: WHO; 2016.

WORKOWSKI K.A., BOLAN G.A.; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. **MMWR Recomm Rep.** v.64, p.1-137. 2015

ZALUCKI, Y.M.; DHULIPALA, V.; SHAFER, W.M.. Dueling regulatory properties of a transcriptional activator (MtrA) and repressor (MtrR) that control efflux pump gene expression in *Neisseria gonorrhoeae*. **MBio**, v. 3, n. 6, p.e00446-12, 2012.

ZHAO, L.; LIU A.; LI R.; ZHAO S. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and molecular characteristics of *N. gonorrhoeae* with decreased

susceptibility to ceftriaxone in Shandong, China, 2007 to 2014. **Int J Antimicrob Agents**, v. 51, n. 1, p.52-56, 2018. Elsevier BV.