

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* ISOLADAS NO RIO DE JANEIRO, 2002–2003

PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *NEISSERIA GONORRHOEAE* ISOLATED IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL, 2002–2003

1º LUGAR – PRÊMIO MELHOR TRABALHO COMPLETO, CATEGORIA: LABORATÓRIO

Nero A Barreto¹, Raquel RP Sant'anna², Luisa BG Silva³, Aline A Uehara⁴,
Renata C Guimarães⁵, Isabele M Duarte⁵, Marise D Asensi⁶

RESUMO

Introdução: ao longo da era antimicrobiana, a *Neisseria gonorrhoeae* vem desenvolvendo resistência a vários agentes. Estima-se que ocorram mais de 1,5 milhão de novos casos por ano no Brasil e a vigilância da emergência e disseminação de cepas resistentes deve ser periodicamente monitorada. **Objetivo:** avaliação da resistência, caracterização fenotípica e molecular de gonococos isolados na região metropolitana do Rio de Janeiro no período de fevereiro de 2002 a junho de 2003, estabelecendo informações básicas para estudos posteriores. Conhecer o perfil sócio-demográfico dos pacientes portadores de gonorréia. **Método:** *Neisseria gonorrhoeae* isoladas de forma consecutiva foram testadas para penicilina, tetraciclina, azitromicina, ciprofloxacina, ceftriaxona e cloranfenicol, utilizando o método E-test para determinação da concentração mínima inibitória (CIM). Para todas as amostras foram realizadas a pesquisa de β -lactamase, análise plasmidial, sorotipagem e eletroforese em campo pulsado (PFGE) para estudo da variabilidade genética. As características sócio-demográficas dos pacientes foram obtidas nos prontuários médicos. **Resultado:** das 115 amostras testadas, 10 (8,7%) eram produtoras de β -lactamase (PPNG), 88 (76,5%) exibiam resistência intermediária a penicilina e 17 (14,8%) eram sensíveis. Para tetraciclina, 39 (33,9%) foram resistentes, 37 (32,2%) manifestavam resistência intermediária e 39 (33,9%) sensíveis. Resistência mediada por plasmídeo a tetraciclina (TRNG, CIM = 16 μ g/mL) foi detectado em 20% dos isolados. Frente ao cloranfenicol, 4 (3,4%) foram resistentes, 14 (12,2%) com resistência intermediária e 97 (84,5%) sensíveis. Foram encontrados 23 (20%) isolados com sensibilidade diminuída à azitromicina (CIM 0,25 – 0,5 μ g/mL) e duas (1,7%) com sensibilidade diminuída à ciprofloxacina (CIM = 0,5 μ g/mL). Todas as amostras foram sensíveis à ceftriaxona. Entre as PPNG, encontramos três tipos distintos de plasmídios, o tipo Ásia (4,4 Mda), África (3,2 Mda) e o Toronto (3,05 Mda). O sorogrupo predominante foi o I-B/WII/III em cerca de 90% das amostras. **Conclusão:** a vigilância da resistência aos antimicrobianos é importante para monitorar a emergência e dispersão de cepas resistentes, auxiliando na escolha terapêutica. Na região Rio de Janeiro, penicilina e tetraciclina não devem ser recomendadas para o tratamento de gonorréia e o uso de azitromicina exige atenção. A análise fenotípica e genotípica das amostras estudadas fornecerá instrumentos comparativos para futuros estudos epidemiológicos. Nossos pacientes portadores de gonorréia são homens brancos, jovens (média de 22 anos), solteiros, heterossexuais, com múltiplas parceiras, com nível de escolaridade e renda familiar baixos, e expostos continuamente a riscos de adquirir uma doença de rota sexual.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*, resistência, plasmídios, sorotipos, β -lactamase

ABSTRACT

Introduction: along of antimicrobial era *Neisseria gonorrhoeae* have been developing resistance to several agents. It is estimated the occurrence of more than 1,5 million new cases for year in Brazil and the emergence of the vigilance and dissemination of resistant strains must be periodically monitored. **Objective:** evaluate the resistance, phenotypic and molecular characterization of gonococcus isolated in the metropolitan area of Rio de Janeiro between February 2002 and June 2003, establishing basic information for further studies. Demographic profile of the patients with gonorrhea was determined. **Method:** samples of *Neisseria gonorrhoeae* isolated consecutively were tested for penicillin, tetracycline, azithromycin, ciprofloxacin, ceftriaxone and cloranfenicol using the E-test method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). All the strains were tested for β -lactamase, plasmidial analysis, serotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) to study the genetic variability. The demographic characteristics of the patients were obtained in medical file. **Result:** of the 115 tested samples, 10 (8,7%) were β -lactamase producing (PPNG), 88 (76,5%) had intermediary resistance to penicillin and 17 (14,8%) were sensitive. For tetracycline 39 (33,9%) were resistant, 37 (32,2%) had intermediary resistance and 39 (33,9%) were sensitive. The resistance mediated by plasmid to tetracycline (TRNG, MIC \geq 16 μ g/mL) was detected in 20% of the isolate. To cloranfenicol, 4 (3,4%) were resistant, 14 (12,2%) had intermediary resistance and 97 (84,5%) were sensitive. Were found 23 (20%) isolates with reduced susceptibility to azithromycin (MIC 0,25 – 0,5 μ g/mL) and 2 (1,7%) with reduced susceptibility to ciprofloxacin (MIC = 0,5 μ g/mL). All the samples were sensitive to ceftriaxone. Among PPNG, we found three distinct type of plasmids, the Asia (4.4 Mda), Africa (3.2 Mda) and Toronto (3.05 Mda) types. The predominant serogroup was I-B/W II/III in about 90 % of the samples. **Conclusion:** the resistance surveillance to antimicrobial is important to monitorate the emergence and spread of resistant strains helping in therapeutic choice. In the area of Rio de Janeiro, penicillin and tetracycline are not recommended for the treatment of gonorrhea and the use of azithromycin demands attention. The phenotypic and genotypic analyses of the studied samples will give comparative instruments for future epidemiological studies. Our patients with gonorrhea are white men, young (average 22 years old), singles, heterosexuals, with multiple partners, with low level of education and familiar income, and continually exposed to risks of acquiring sexually transmitted diseases.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, resistance, plasmids, serotypes, β -lactamase

ISSN: 0103-0465

DST – J bras Doenças Sex Transm 16(3):32-42, 2004

¹Prof. Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense. Setor de DST da UFF.

²Biomédica. Aluna do Curso de Especialização em DST/UFF.

³Bióloga. Setor de DST/UFF.

⁴Bióloga. Setor de DST/UFF.

⁵Monitadora de Bacteriologia. Setor de DST/UFF.

⁶Pesquisadora Doutora do Departamento de Bacteriologia da FIOCRUZ.

Fonte financiadora e apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Proc.466908/00-8; UNESCO/ PNDSTAIDS do Ministério da Saúde. Projeto 914/BRA/58-UNESCO; Trabalho de tese do Curso de Doutorado em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, desenvolvido no Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz.

INTRODUÇÃO

O ressurgimento de infecções gonocócicas resistentes em vários países desenvolvidos e a expansão naqueles em desenvolvimento sugerem evidências de que uma pandemia se aproxima, visto que a disseminação de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a antimicrobianos avança rapidamente no mundo globalizado¹⁻⁶.

A incidência mundial da gonorréia é estimada em 62 milhões de novos casos a cada ano⁷, cuja distribuição difere entre o mundo industrializado e o em desenvolvimento, e entre diferentes grupos socioeconômicos dentro do mesmo país⁸. No Brasil, o Programa Nacional de DST/Aids do Ministério da Saúde, estima que ocorram mais de um milhão e 500 mil novos casos anualmente, entre homens e mulheres (Fabio Moherdau – comunicação pessoal).

A importância do controle da gonorréia não está limitada apenas à frequência numérica, mas à possibilidade de complicações que ela pode causar, como prostatite e epididimite no homem, ou doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e infertilidade na mulher⁹. Tem sido observado que, em pacientes com gonorréia, o risco de contrair infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumentaria de três a cinco vezes¹⁰ e que *Neisseria gonorrhoeae* pode aumentar a replicação do HIV-1, *in vitro*, em até 133 vezes na presença de leucócitos polimorfonucleares¹¹.

Ao longo da era antimicrobiana, *Neisseria gonorrhoeae* vem desenvolvendo resistência a vários agentes utilizados em regimes de tratamento. A produção de penicilinase pela *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) é o tipo mais comum de resistência, resultado da aquisição de plasmídios que codificam uma enzima β -lactamase do tipo TEM-1¹², seguido pela resistência de alto nível à tetraciclina (TRNG), cujas cepas codificam o determinante tet M encontrado num plasmídio conjugativo¹³, estando todos eles disseminados por todo o mundo.

Em outra mão, a resistência cromossômica processa-se através de combinações de mutações em diversos *loci* genéticos que codificam os alvos preferenciais dos antimicrobianos, e é considerada resistência de baixo nível ou de sensibilidade diminuída, que ocorre tanto para penicilinas e tetraciclina quanto para fluoroquinolonas e macrolídeos¹⁴.

Uma característica notável da *Neisseria gonorrhoeae* é sua variabilidade fenotípica e genotípica, expressada por diferentes partes do seu genoma ou pela incorporação de novos materiais genéticos, sejam adquiridos por conjugação ou por transformação¹⁵. Com isso, diversas técnicas com propósito epidemiológico podem ser aplicadas, como a auxotipagem, que avalia o requerimento nutricional de múltiplos compostos para o crescimento da bactéria^{16,17}; a sorotipagem, reação de co-aglutinação com anticorpos monoclonais contra epítopos da principal proteína da membrana externa (PI, Por)^{18,19}; o teste de sensibilidade antimicrobiana, com determinação da concentração inibitória mínima^{20,21}; a análise do conteúdo de plasmídios^{22,23}; e por fim, a genotipagem, que frequentemente utiliza a eletroforese em campo pulsado (PFGE), com bom poder discriminatório^{24,25}. Deste modo, a combinação de vários métodos possibilita rastrear a circulação de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes, correlacionando-as com áreas geográficas específicas ou mesmo com a expressão da doença²⁶⁻³⁰.

Nas duas últimas décadas, vários países, em diferentes regiões do mundo, implementaram programas de vigilância da resistência antimicrobiana para *Neisseria gonorrhoeae*, baseados em dados laboratoriais. Fizeram de forma isolada ou participando de redes internacionais, de maneira que pudessem monitorar a emergência e a prevalência de cepas resistentes e sua circulação, antecipando condutas terapêuticas e contribuindo para o controle da gonorréia³¹⁻³⁸.

No Brasil, a partir dos pioneiros trabalhos de Magalhães em Recife³⁹⁻⁴¹, responsável pelo isolamento da primeira cepa de PPNG, em 1984, portadora do plasmídio tipo Africano, outros estudos foram realizados, como em Belo Horizonte-MG⁴² e em São Paulo⁴³. Na década seguinte, Smânia *et al.*^{44,45} relataram a presença de PPNG e susceptibilidade diminuída a vários antimicrobianos na cidade de Florianópolis-SC. De certa maneira, estes trabalhos foram realizados de forma esporádica e sem o viés da vigilância sistemática.

De São Paulo vieram estudos fenotípicos e epidemiológicos de cepas PPNG isoladas entre 1985 e 1990, evidenciando a cidade como área endêmica e ressaltando a necessidade de implantação de um programa de vigilância sentinela em nível nacional^{46,47}. Coube ao Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PNDST/Aids), do Ministério da Saúde, em 1996, patrocinar a implantação da Rede Nacional de Vigilância da Resistência dos Gonococos – RENAGONO⁴⁸, reunindo doze laboratórios de saúde pública (LACEN) de várias regiões do país, e dois de duas universidades públicas na região sudeste, como parte do Programa de Vigilância Antimicrobiana para Gonococos – GASP, na América Latina e Caribe. Os primeiros resultados foram produzidos em 2001, com amostras isoladas em Manaus-AM, e enviadas para serem processadas no Canadá⁴⁹, registrando altos níveis de resistência à penicilina e tetraciclina, e sensibilidade diminuída a azitromicina e ciprofloxacina.

Ultimamente, raros estudos têm sido realizados em nosso país para a avaliação da resistência antimicrobiana⁵⁰, assim como aqueles necessários para a caracterização fenotípica e genotípica das amostras circulantes, permanecendo desconhecida em nosso ambiente a variabilidade genética de *Neisseria gonorrhoeae*.

OBJETIVO

- Caracterização fenotípica e molecular de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas na região do Rio de Janeiro.
- Desenvolvimento de informações básicas sobre resistência antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae*, contribuindo assim como referência para futuros estudos da RENAGONO.
- Determinar o perfil sociodemográfico dos pacientes portadores de gonorréia em nossa região.

MÉTODO

Origem das amostras

As amostras de *Neisseria gonorrhoeae* foram isoladas de pacientes de ambos os sexos, de demanda espontânea, atendidos

numa clínica de doenças sexualmente transmissíveis (DST) localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro.

No período de fevereiro de 2002 a junho de 2003, as primeiras sete amostras consecutivas de cada mês foram reservadas, perfazendo um total de 119 amostras, das quais 115 foram aproveitadas.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz e, dos pacientes participantes, era solicitado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Isolamento e identificação

O material clínico colhido da fossa navicular da uretra masculina ou do canal endocervical, no sexo feminino, com *swabs* apropriados, foram semeados diretamente em meio de Thayer & Martin modificado e as placas eram imediatamente levadas para a incubadora com 5% de CO₂, em atmosfera úmida, a 35,5°C por 24 a 48 horas. Após este período, as colônias suspeitas eram presumivelmente identificadas pelo método de Gram, e pelas respostas positivas para os testes de catalase e oxidase. A seguir, eram subcultivadas em agar chocolate enriquecido com 1% de fatores de crescimento (AC sup.) para confirmação definitiva com testes de oxidação de carboidratos, no meio de cistina triptose agar (CTA) suplementado com 1% de açúcares (glicose, maltose, lactose e sacarose) e com anticorpos monoclonais (Gonogen II – Becton Dickson, Oxford, UK)^{51,52}.

As amostras assim identificadas eram estocadas em caldo cérebro coração (BHI, Difco Laboratories – Detroit) com 20% de glicérol e armazenadas em *freezer* a -70°C para estudos posteriores⁵².

Pesquisa de β-lactamase

Todas as amostras após crescimento em AC sup. por 20 a 24 horas, foram submetidas ao teste da produção de β-lactamase pelo método da cefalosporina cromogênica⁵³ (*BBL Dryslide Nitrocefin*).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) para penicilina (PG), tetraciclina (TC), azitromicina (AZ), ciprofloxacina (CI), cloranfenicol (CL) e ceftriaxona (TX) foi determinada utilizando o sistema de fita E-test (*AB Biodisk, Solna, Sweden*). Este método é comparável ao método de diluição em agar, procedimento recomendado para avaliar resistência em gonococos, entretanto pela simplicidade e menor custo, pode tornar-se uma alternativa para os países em desenvolvimento⁵⁴⁻⁵⁶. Consiste de uma fita plástica, com um lado impregnado com antimicrobiano, distribuído em concentrações exponenciais predefinidas.

Os testes foram realizados em meio agar GC (*Difco Laboratories – Detroit*) suplementado com 1% de fatores de crescimento, após subcultivo em AC sup.

O inóculo de 10⁸ bactérias por mL foi preparado pela suspensão direta das colônias, com 20 a 24 horas de crescimento, em 5 mL de solução PPS (proteose peptona a 1% em solução salina, pH 7,2)⁵⁷ para leitura em espectrofotômetro numa absorbância entre 0,08 a 0,1 até alcançar turvação corresponde ao tubo 0,5 da escala McFarland, seg. NCCLS⁵⁸. A seguir, a suspensão foi semeada na superfície da placa, em três direções, com auxílio de um *swab*, e esperou-se cerca de 15 minutos para colocação das fitas. Feito isto, as placas foram levadas para a incubadora, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ para um período de 20 a 24 horas numa temperatura de 35,5°C, e os resultados processados de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras testadas foram agrupadas e categorizadas fenotipicamente de acordo com os padrões de susceptibilidade recomendados pelo NCCLS⁵⁸ (**Tabelas 1 e 2**), sendo que para azitromicina e cloranfenicol as definições dos valores de CIM tiveram por base a literatura^{31,32, 36,59}.

As cepas de referências de *Neisseria gonorrhoeae* incluídas no controle de qualidade, foram gentilmente cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz – São Paulo (ATCC 49226) e pelo *Centers for Diseases Control and Prevention*, Atlanta, Ga. USA por intermédio do Dr. David Trees (F-45, P681E, CDC 10328 e CDC 10329).

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de 115 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no período de fevereiro de 2002 a junho de 2003 no Rio de Janeiro.

Antimicrobiano	CIM (µg/mL)	Perfil de sensibilidade = n° (%) de amostras		
		R	RI	S
Penicilina	≤ 0,06 - ≥ 2,0	10 (8,7)	88 (76,5)	17 (14,8)
Tetraciclina	≤ 0,25 - ≥ 2,0	39 (33,9)	37 (32,2)	39 (33,9)
Azitromicina	≤ 0,06 - ≥ 2,0			
23 (20,0)	92 (80,0)			
Ciprofloxacina	≤ 0,06 - ≥ 1,0			
2 (1,7)	113 (98,3)			
Cloranfenicol	≤ 0,25 - ≥ 2,0	4 (3,5)	14 (12,2)	97 (84,3)
Ceftriaxona	≤ 0,25			115 (100,0)

R = resistente;

RI = sensibilidade diminuída ou intermediária;

S = sensível.

Tabela 2 – Resistência mediada por plasmídeo e por cromossomo a penicilina e tetraciclina (n = 115).

Categoria fenotípica	Crítérios ^a	Nº (%) de amostras
1. PPNG (<i>N. gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase)	β-Lac (+); CIM (TC) < 2μg/mL	2 (1,7)
2. TRNG (<i>N. gonorrhoeae</i> com R a TC mediada por plasmídeo)	β-Lac (-); CIM (TC) ≥ 16μg/mL	18 (15,7)
3. PP/TRNG	β-Lac (+); CIM (TC) ≥ 16μg/mL	5 (4,3)
4. CMTR (Resistência cromossômica à TC)	β-Lac (-); CIM (TC) ≥ 2 e < 16μg/mL	13 (11,3)
5. PP/ CMTR	β-Lac (+); CIM (TC) ≥ 2 e < 16μg/mL	3 (2,6)
6. Sensível ^{PT}	CIM < 2 μg/mL para PG e TC.	74 (64,4)

^a β-Lac (+) = β-lactamase positivo; β-Lac (-) = β-lactamase negativo.

Sorotipagem

A classificação em sorogrupos e sorotipos foi realizada por reação de co-aglutinação utilizando um conjunto de anticorpos monoclonais ligados à proteína A de *Staphylococcus*, segundo instruções do fabricante (*Phadebact GC Serovar Test – Boule Diagnostics AB – Sweden*).

Cada amostra foi testada contra um painel com cinco anticorpos monoclonais para a proteína I-A (Ao, Ar, As, At e Av) e nove anticorpos monoclonais para a proteína I-B (Bo, Br, Bs, Bt, Bu, Bv, Bx, By e Bv). A letra maiúscula A representa o sorogrupo WI e a letra B, o sorogrupo W II/III. Quando seguidas por letras minúsculas, correspondem à reação positiva com os respectivos anticorpos (sorotipos). A partir de um crescimento em AC sup. por 20 a 24 horas, as colônias foram suspensas em 1 mL de solução PPS, até alcançar turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala McFarland e, em seguida, aquecida em banho-maria por 10 minutos. Após estabilizar em temperatura ambiente junto com os reagentes previamente homogeneizados em agitador tipo Vortex, 20 μL do antígeno foram adicionados a igual quantidade de anticorpos, sobre uma placa de vidro demarcada, misturados e lidos em até dois minutos, em movimento rotatório. A possibilidade de auto-aglutinação era checada utilizando-se apenas solução salina, como antígeno, para todos os reagentes dos dois painéis, e, quando reação duvidosa acontecia, todo o procedimento era repetido^{18,19,60}.

Análise de plasmídios

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA plasmidial para verificação de seu conteúdo e peso molecular aproximado, empregando-se a técnica rápida de lise alcalina descrita por Birboim & Doly⁶¹, com adaptações para *Neisseria gonorrhoeae*. Resumidamente, cerca de metade de um crescimento abundante em meio AC sup. (placa de 90 × 15mm) por 20 a 24 horas, foi adicionado a 1 mL de solução PPS, e centrifugado duas vezes a 13.000 rpm por dois minutos a 4°C. Após extração, 10 μL do sedimento obtido (DNA plasmidial) era misturado a 2 μL de um tampão carreador (0,25% de azul de bromofenol + 0,25% de xilenocianol + 15% de ficoll tipo 400 + H₂O q.s.p.) e colocados no gel de agarose a 0,7% em tampão TBE 0,5X (TRISMA + EDTA), para corrida eletroforética alimentada por fonte termogeradora a 60 V por três horas.

Finalizada a eletroforese, o gel foi corado com solução aquosa de brometo de etídio (10 μL /100 mL) por 20 minutos e lavado com água destilada por cinco minutos, para ser visualizado e fotografado sob luz UV em aparelho “ImageMaster VDS” (*American Pharmacia Biotech, England*).

Para determinação estimada dos pesos moleculares, utilizaram-se como marcadores controles de peso molecular, as cepas de *E. coli* V517⁶² e *E. coli* R861⁶³, possibilitando assim traçar uma curva de migração plotada em papel semilog [\log_{10} (MDa) × distância (mm)] a partir da localização fotográfica dos plasmídios das respectivas cepas.

O plasmídeo conjugativo de peso molecular de 25,2 MDa (tipo Dutch ou American)⁶⁴, que confere alto nível de resistência a tetraciclina, foi presumivelmente identificado a partir da CIM ≥ 16 μg/mL.

Genotipagem

A eletroforese em campo pulsado (*PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) foi realizada para todas as 115 amostras estudadas, o que permitiu analisar os perfis de macrorrestrrição do DNA cromossomal, utilizando a enzima endonuclease de restrição Spe I (5'-A↓CTAGT - 3') (10U, *American Pharmacia Biotech – England*)⁶⁵⁻⁶⁷. Sucintamente, cerca de ¼ de um crescimento abundante em AC sup. (placa 90 × 15mm) por 20 a 24 horas, foi adicionado a 1 mL de solução PPS, e centrifugado por duas vezes a 13.000 rpm por dois minutos a 4°C. Ao sedimento foram acrescentados 30 μL de EDTA (0,5M, pH 7,5), homogeneizados em agitador tipo Vortex, mais 200 μL da solução TEN (EDTA 0,5M, pH 7 e 8; TRIS base 1M, pH 7 e 8; NaCl 4M, SIGMA), e homogeneizados novamente. A seguir, adicionou-se 230 μL de agarose Low Melting Point a 2,0% (SIGMA), previamente estabilizado a 50°C em banho-maria, para preparação dos blocos de agarose (BIO RAD). Após extração, purificação e digestão do DNA cromossomal foi preparado o gel para a eletroforese em campo pulsado.

Utilizou-se como marcador de peso molecular o *lambda DNA ladder*, 50-300 kpb (BIO RAD). O gel foi preparado com agarose a 1 g% em tampão TBE 0,5X concentrado (TRIS base; BORATO e EDTA), e moldado em suporte próprio (BIO RAD) com 100 mL. Após aplicação das amostras, o aparelho CHEF DR III (BIO RAD) foi programado para o tempo de pulso de 5-15 segundos por 24 horas a 14°C em voltagem igual a 6V sob um ângulo de 120°.

Com o fim da corrida eletroforética, o gel foi corado por 30 minutos com uma solução aquosa de brometo de etídio (50 µL/500 mL) e descorado por 10 minutos com água destilada, para ser visualizado e fotografado sob luz UV em aparelho “ImageMaster VDS” (American Pharmacia Biotech, England).

A avaliação final dos perfis de restrição obtidos com a PFGE foi realizada utilizando o programa “Gel Compar II – Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns. Version 1.5 – Applied Maths, Kortrijk – Belgium”. O grau de identidade entre os perfis foi determinado pela construção de uma matriz de similaridade, aplicando-se o coeficiente de Dice com 2% de tolerância de posição e 2% de otimização. A definição de clones tomou por base as orientações preconizadas por Tenover *et al.*⁶⁸.

Dados sociodemográficos

As informações extraídas dos prontuários médicos dos pacientes incluíam idade, sexo, estado civil, origem étnica, comportamento sexual, história de DST, grau de instrução, renda familiar, uso de preservativo, números de parceiros e uso de antibióticos. A análise estatística utilizou-se do programa Epi Info versão 6.1 (Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Ga. USA) para cálculo de média, mediana e desvio padrão do item idade. Para as demais variáveis, foi empregada a distribuição de frequência simples e percentual.

RESULTADO

Tendências da resistência

Susceptibilidade à penicilina e à tetraciclina

Das 115 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* analisadas (Tabela 1), 10 (8,7%) eram resistentes à penicilina, 88 (76,5%) exibiam resistência intermediária, e 17 (14,8%) eram sensíveis, cuja CIM variou entre 0,008 a 32 µg/mL.

Para tetraciclina, 39 (33,9%) foram resistentes, 37 (32,2%) apresentavam RI e 39 (33,9%) foram sensíveis, com a CIM variando de 0,06 a 32 µg/mL (Tabela 1).

Todas as dez amostras resistentes a PG eram produtoras de β-lactamase, sendo que oito também eram resistentes a TC, uma apresentava RI a TC e outra também apresentava RI a TC e AZ simultaneamente.

Várias categorias de resistência aos dois antibióticos foram encontradas (Tabela 2). Entre todas as amostras, 28 (24,3%) exibiam resistência mediada por plasmídios a PG, a TC ou a ambas, e 16 (13,9%) apresentaram resistência mediada por cromossomo, sendo que três (2,6%) eram PP/CMTR.

Ao todo, 105 (91,3%) amostras foram sensíveis à penicilina, 84 (73%) sensíveis à TC e, por fim, 74 (64,3%) sensíveis ao mesmo tempo aos dois antibióticos.

Das 88 (76,5%) amostras com RI a PG, 26 (29,5%) também eram resistentes a TC, 17 (19,3%) exibiam RI a TC e 20 (22,7%) apresentavam algum tipo de resistência a outros antimicrobianos.

Quanto às 37 amostras com RI a TC, apenas oito (21,6%) eram exclusivamente, ao passo que as 29 (78,4%) restantes exibiam perfil de resistência variado com outros antimicrobianos.

Susceptibilidade a azitromicina, ciprofloxacina, cloranfenicol e ceftriaxona.

Todas as amostras estudadas foram sensíveis a ceftriaxona (CIM ≤ 0,25 µg/mL). Entretanto, em 23 (20%, Tabela 1) isolados foi notada sensibilidade diminuída a azitromicina, sendo que 14 deles apresentaram CIM = 0,25 µg/mL e os outros nove CIM = 0,5 µg/mL. Concomitantemente, um isolado exibia resistência a PG e RI a TC; outro apresentava RI a PG, TC e CI e outro, a PG e CI; dois isolados apresentavam RI a TC; cinco eram resistentes a TC (CIM entre 2 e 8 µg/mL); seis exibiam RI a PG e, finalmente, sete apresentavam RI a PG e a TC.

A seguir, observou-se também que dois (1,7%, Tabela 1) isolados manifestavam sensibilidade diminuída a ciprofloxacina (CIM = 0,5 µg/mL). Um deles, ao mesmo tempo exibia RI a PG, TC e AZ, enquanto outro, a PG e AZ.

Todas as amostras foram testadas para cloranfenicol, quatro (3,5%, Tabela 1) mostraram-se resistentes e 14 (12,2%) manifestaram sensibilidade diminuída.

Análise plasmidial

O conteúdo de plasmídios foi determinado nas 115 amostras (Tabela 3). Todas continham o plasmídio críptico de 2,6 MDa. Dentre as dez PPNG, foram encontrados três tipos distintos de plasmídios produtores de β-lactamase, assim denominados: quatro do tipo Ásia com peso molecular de 4,4 MDa, nove do tipo África de 3,2 MDa e um do tipo Toronto de 3,05 MDa. Cinco delas abrigavam presumivelmente o plasmídio conjugativo tet M de 25,2 MDa, três o plasmídio de transferência de 24,5 MDa e duas não possuíam o plasmídio de transferência. O plasmídio conjugativo foi presumivelmente encontrado em 23 (20%) amostras TRNG e o de transferência em 16 (13,9%) isolados resistentes à tetraciclina (CIM ≤ 8 µg/mL), sendo três PPNG.

Sorotipagem

Todas as 115 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* sorogrupadas e sorotipadas com o painel de 14 anticorpos monoclonais, apresentaram pelo menos um epítipo para ser reconhecido, não ocorrendo nenhuma cepa “não tipável” nem que apresentasse reação cruzada entre as classes PI-A e PI-B. A grande maioria pertencia ao sorogrupo I-B/WII/III, somando 104 (90,4%) cepas contra 11 (9,6%) pertencentes ao sorogrupo I-A/WI (Tabela 4). Quatro perfis sorológicos foram encontrados no sorogrupo I-A/WI e 47 perfis diferentes no sorogrupo I-B/WII/III.

O epítipo predominante no sorogrupo I-A/WI foi o At, presente em nove (81,8%, Tabela 4) das cepas, sendo que em sete de maneira combinada, ora com o As (4 ×) ora com o Ar e As (3 ×). Em outras duas cepas o epítipo At estava sozinho, assim como o Av. O epítipo Ao não foi encontrado em nenhuma cepa.

Tabela 3 – Perfil plasmidial de *Neisseria gonorrhoeae* (n = 115).

Peso molecular (MDa)	n (%)	
	PPNG	Não-PPNG
2,6 + 3,2	1 (0,9)	
2,6 + 3,2 + 4,4	1 (0,9)	
2,6 + 3,2 + 25,2 *	3 (2,6)	
2,6 + 3,2 + 4,4 + 25,2	1 (0,9)	
2,6 + 3,2 + 4,4 + 24,5	2 (1,7)	
2,6 + 3,2 + 24,5	1 (0,9)	
2,6 + 3,05 + 25,2	1 (0,9)	
2,6		74 (64,3)
2,6 + 24,5		13 (11,3)
2,6 + 25,2		18 (15,6)

* TRNG = resistência plasmidial à TC, CIM \geq 16 μ g/mL.

Tabela 4 – Distribuição de sorogrupos e sorotipos entre as 115 amostras de *Neisseria gonorrhoeae*.

PPNG Sorogrupos	Não-PPNG Sorotipos	n = 10	Sorogrupos	Sorotipos	n = 105
I-A / WI	Arst	1	I-A / WI	Ast	2
	Ast	2		Arst	2
	At	1		At	1
	Av	2			
I-B / WII/III	Boprtv	1	I-B / WII/III	Btvy	10
	Botuvy	1		Boprtv	7
	Bstvy	1		Bopr	6
	Bsty	1		Btv, opt, tuv	5 de cada
	Btuvy	1		Bptuvy, oprt	4 de cada
	Btuy	1		Boprtuv, otv, otvy	3 de cada
			Outros*	43	

* Outros: 2 de cada; oprtu, optv, opv, optvy, ostv, psty, st, stvy, vy.

1 de cada; oprtuvy, opru, opstu, opstuy, ost, ostvy, ov, ovy, pr, prstvy, prstuy, prt, prtvy, prvy, ps, pstuy, ptu, ptv, pv, rs, rtv, s, st, sty, tuv.

O sorotipo predominante foi o Ast 4/11(36,3%), seguido do Arst com 3/11 (27,2%).

No sorogrupo I-B/WII/III, predominou o epítipo Bt = 86/104 (82,7%, **Tabela 4**), distribuído de forma combinada em 37 diferentes perfis sorológicos, seguido do Bv = 60/104 (57,7%), que aparecia em 25 diferentes perfis de forma combinada; depois surge o By = 54/104 (51,9%), presente em 20 perfis de forma combinada. A seguir vinha o Bp = 52/104 (50%), presente em 27 perfis de forma combinada e, a partir daí, aparecia o epítipo Bo = 49/104 (47,1%), em 22 perfis; Br = 31/104 (29,8%), em 16 perfis; Bu = 25/104 (24,0%), em 14 perfis, e Bs = 23/104 (22,1%), em 13 perfis sorológicos de forma combinada. O epítipo Bx não foi encontrado em nenhuma amostra. Neste sorogrupo, o sorotipo predominante foi o Btvy, 10/47 (21%), seguido do sorotipo Boprtv, com 8/47 (17%).

Entre as PPNG, 4/10(40%) pertenciam ao sorogrupo I-A/WI com predomínio do sorotipo Ast e 6/10(60%) ao sorogrupo I-B/WII/III. Quanto às amostras não-PPNG, 7/105 (6,6%) eram do sorogrupo I-A/WI e 98/105(93,9%) do sorogrupo I-B/WII/III, predominando o sorotipo Btvy 10/98 (10,2%), seguido do Boprtv 7/98 (7,1%) e do Bopr 6/98 (6,1%, **Tabela 4**).

Com exceção de uma (Ast), todas as amostras TRNG (**Tabela 3**) pertenciam ao sorogrupo I-B/WII/III 22/23 (95,6%), com os sorotipos Bopr e Bopt aparecendo duas vezes cada.

As amostras de *Neisseria gonorrhoeae* com sensibilidade diminuída à azitromicina, 23/115 (20%), e à ciprofloxacina, 2/115 (1,7%), eram do sorogrupo I-B/WII/III, bem como aquelas resistentes ao cloranfenicol 4/115 (3,5%, **Tabela 1**).

Genotipagem

A análise dos padrões de restrição gerados na PFGE após digestão com a endonuclease SpeI de baixa frequência de clivagem dos DNA genômico das 115 amostras de *Neisseria gonorrhoeae*, permitiu identificar um clone A com 51 subclones (predomínio do A₁ e A₃ com sete cepas cada), de outro clone B, com três cepas e mais nove clones (C – K) com uma cepa cada.

Os perfis eletroforéticos obtidos mostraram 8 a 16 fragmentos de DNA com tamanhos estimados entre 20 e 480 kb. O coeficiente

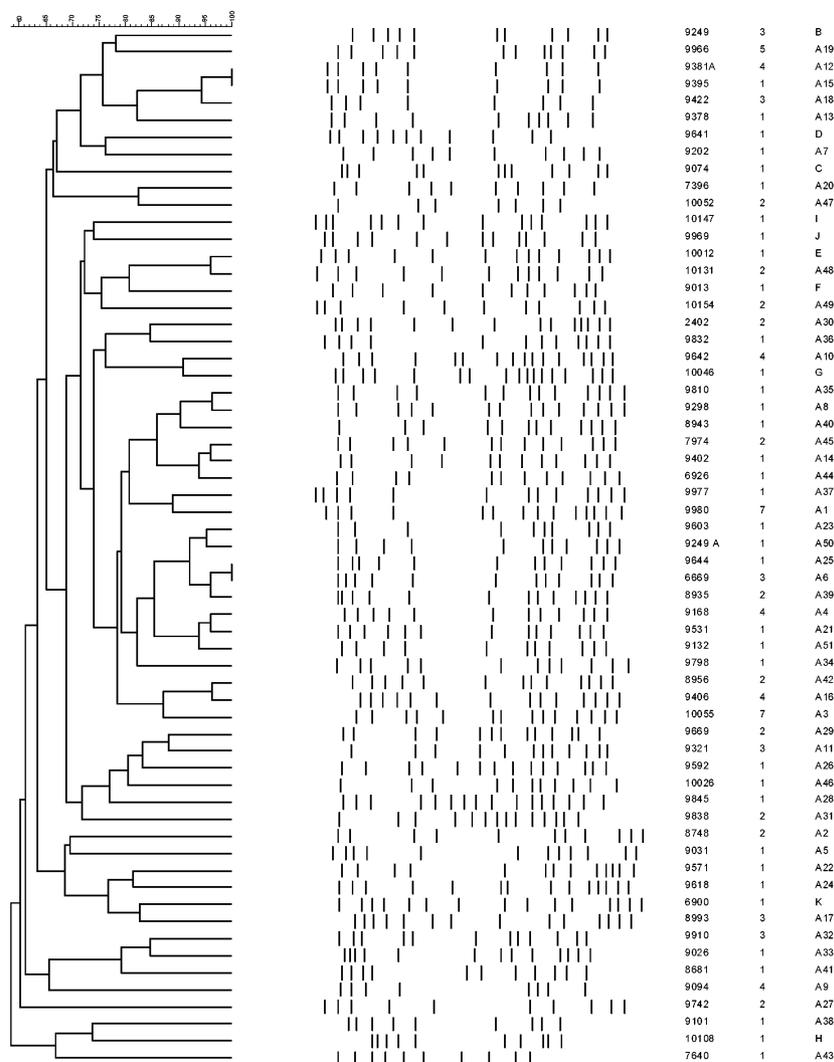


Figura 1 - Representação esquemática da diversidade genômica encontrada nas 115 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* (dendrograma).

de Dice registrou 58,34% de similaridade caracterizando considerável diversidade genética entre as amostras estudadas (**Figura 1**).

As amostras resistentes à penicilina e à tetraciclina, pertenciam ao clone A, com exceção de uma (clone C) que apresentava resistência mediada por plasmídeo à tetraciclina (CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$) e de outra (clone E), que manifestou resistência cromossômica também à tetraciclina (CIM = $4 \mu\text{g/mL}$).

Todas as amostras com sensibilidade diminuída à azitromicina pertenciam ao clone A.

Características sociodemográficas

As 115 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* analisadas pertenciam a 111 pacientes, pois quatro deles retornaram à clínica com

nova infecção. Dos 111 pacientes com diagnóstico laboratorial conclusivo de gonorréia, 100 (90,1%) eram do sexo masculino e 11 (9,9%) do sexo feminino. Com relação à faixa etária (média de 24 anos e mediana de 22 anos), 80 (72,1%) estavam entre 15 e 25 anos, 21 (18,9%) entre 25 e 35 anos, seis (5,4%) entre 35 e 45 anos, e quatro (3,6%) tinham mais de 45 anos. Cinquenta e sete (51,4%) residiam no município de Niterói, 50 (45,0%) no município de São Gonçalo, dois (1,8%) no município de Itaboraí, um (0,9%) na cidade do Rio de Janeiro e um (0,9%) em Londrina – PR. Analisando a etnia, 42 (37,8%) tinham origem étnica branca, 33 (29,7%) eram pardos, 32 (28,8%) negros e 4 (3,6%) não declararam. Setenta e sete (69,4%) eram solteiros, 32 (28,8%) casados e dois (1,8%) divorciados.

Neste estudo, 103 (92,8%) apresentavam-se como heterossexuais e oito (7,2%), não-heterossexuais. Quanto ao grau de instru-

ção formal, 67 (60,4%) possuíam o primeiro grau incompleto, 33 (29,7%) o segundo grau incompleto e 11 (9,9%) do segundo grau completo ao terceiro grau incompleto. Renda familiar de até dois salários mínimos foi declarada por 56 (50,5%) pacientes, 34 (30,6%) declararam renda de três salários, dois (1,8%) acima de dez salários e nove (8,1%) declararam não possuir renda. Sessenta e cinco (58,6%) dos pacientes tinham múltiplos parceiros, 29 (26,1%) declararam ter parceiro fixo e exclusivo, 14 (12,6%) estavam sem parceiro no momento da consulta e três (2,7%) não informaram.

A análise dos prontuários médicos demonstrou que 72 (64,9%) pacientes não relataram história pregressa de DST, enquanto dos pacientes que reportaram algum tipo de DST no passado, 18/39 (46,1%) afirmaram ter tido gonorréia; 4/39 (10,2%) tiveram gonorréia associada a outras DST, por exemplo, sífilis, HPV e escabiose; 3/39 (7,7%) relataram HPV; outros 3/39 (7,7%) tiveram sífilis; 3/39 (7,7%) tiveram sífilis associada a HPV e candidíase; 4/39 (10,2%) disseram ter tido corrimento uretral e 4/39 (10,2%) não souberam informar o tipo de DST.

A maioria dos pacientes reconhecia a importância de utilizar preservativos, mas apenas 28 (25,2%) deles faziam uso regularmente. Dos 111 pacientes estudados, 17 (15,3%) disseram ter feito uso de antimicrobianos, por iniciativa própria, após perceberem sinais de corrimento uretral.

DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenvolvido com a intenção de gerar informações básicas sobre *Neisseria gonorrhoeae*, na região metropolitana do Rio de Janeiro, um dos sítios integrantes da RENAGONO/PNDST E Aids e que possa servir para futuros estudos epidemiológicos no Brasil, comparando tendências regionais da resistência dos gonococos e eficácia de regimes usados no tratamento da gonorréia. Realizado inteiramente com recursos locais, esperamos estimular outros sítios, ajudando na implantação definitiva do programa de vigilância dos gonococos e controle da gonorréia.

O perfil de resistência das *Neisseria gonorrhoeae* encontradas em nossa região revelou a presença de resistência mediada por plasmídios e por cromossomo à penicilina, tetraciclina e ao cloranfenicol. Reflete também a emergência de *Neisseria gonorrhoeae* com sensibilidade diminuída a azitromicina e ciprofloxacina. Nenhuma amostra foi encontrada com resistência à ceftriaxona.

A ocorrência de 8,7% de cepas PPNG entre os isolados, demonstra equivalência com as porcentagens encontradas em outros estudos no Brasil, como o de Recife, que encontrou 8,3% de PPNG⁴¹ e o de Manaus, no qual foi detectado 8,6%⁴⁹. Até agora, os estudos realizados em nosso país revelaram nível baixo de prevalência de PPNG⁴²⁻⁴⁶ em comparação com a tendência em outros países, como, por exemplo, na Jamaica⁶⁹, com 58,6%, em Honduras⁷⁰, com 60%, no Uruguai⁷¹, com 54%, na Nicarágua⁷², com 78%, e em Cuba⁷³, com 55,6%.

Fato relevante é que todas as amostras resistentes à penicilina eram produtoras de penicilinase, mediada por plasmídio, não sendo encontrada nenhuma amostra com resistência cromossômica, apesar de 76,5% apresentarem resistência intermediária a este antibiótico. De qualquer maneira, o comitê especialista da Organização

Mundial da Saúde não recomenda o uso de um antimicrobiano na ocorrência de 5% de resistência⁷⁴.

Resistência de alto nível mediada por plasmídio a tetraciclina é devida à aquisição do determinante tet M pelo plasmídio de transferência (24,5 Mda), resultando no plasmídio 25,2 Mda, com duas classes: tipo Dutch e tipo American⁷⁵. Na corrida eletroforética, torna-se muito difícil sua separação, necessitando confirmação de sua presença com o uso de técnica de hibridização ou PCR (*protein chain reaction*). O CIM das amostras contendo o plasmídio tet M é de pelo menos 16 μ g/mL. Então, o fenótipo TRNG foi presumivelmente detectado quando a CIM alcançava este valor.

No presente estudo, 33,9% das amostras eram resistentes à tetraciclina, sendo que 20% foram identificadas como TRNG. Estes dados são diferentes dos encontrados em Florianópolis-SC⁴⁵, onde aproximadamente 70% eram resistentes à tetraciclina, e de Manaus-AM⁴⁹, que refletiam uma alta porcentagem de TRNG, cerca de 76,5%, condição jamais observada nos países da América Latina e Caribe⁶⁹⁻⁷². Em Cuba³⁷ foram encontrados 48,3% de TRNG, ao passo que nos Estados Unidos, cerca de 7% de TRNG foram encontrados no período de 1988 a 1998, e aproximadamente 14% exibiam resistência mediada por cromossomo⁷⁶. No Canadá⁴⁹, em 1995, tal como em nossa região, foram encontrados 20% de TRNG.

A clínica de DST em que estas amostras foram coletadas utiliza o regime recomendado pelo PNDST/Aids⁷⁷, que lista ciprofloxacina, ofloxacina, azitromicina, ceftriaxona e tianfenicol como antimicrobianos de escolha para o tratamento da gonorréia. Os pacientes com gonorréia não-complicada são tratados com dose única de 500 mg de ciprofloxacina por via oral, e azitromicina ou doxiciclina para infecção por *Chlamydia trachomatis*. Encontramos aqui duas cepas com sensibilidade diminuída à ciprofloxacina e 20% das amostras com sensibilidade diminuída à azitromicina, situação semelhante àquela observada no estudo de Manaus⁴⁹. Por conta do uso aumentado de azitromicina para o tratamento de infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* e de outras infecções comunitárias, diversos autores de vários lugares do mundo têm demonstrado preocupação com que a resistência desenvolvida pela *Neisseria gonorrhoeae* venha limitar o pequeno número de antimicrobianos disponíveis para o tratamento da gonorréia^{59,78,79}.

A taxa de ocorrência de cepas resistentes ao cloranfenicol neste trabalho foi de 3,4%, com 12,2% de resistência intermediária. Resultado bem mais baixo do que foi encontrado em outros países, como na Indonésia³³, que registrou 76,2% de resistência entre as PPNG. Em outro estudo, realizado em Paris, com amostras coletadas em Kyrghystan³⁶, encontraram-se 51,7% de resistência ao cloranfenicol. Curiosamente, no Kenia⁸⁰, entre 1995 e 1996, 177 amostras analisadas foram sensíveis a este antimicrobiano. É possível que o uso excessivo do cloranfenicol para outras condições patológicas, como observado nos países em desenvolvimento, pressione a seleção de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes³⁶.

Comparando ainda nossos resultados com os encontrados em Manaus, observamos que em nossa região, o sorogrupo com presença marcante foi o I-B (90,4%) enquanto lá, cerca de 60% pertenciam ao sorogrupo I-B e 40% ao sorogrupo I-A. Entre as PPNG, 10,4% eram do sorogrupo I-A, diferente daqui, em que encontramos 40%. As nossas amostras TRNG, com exceção de uma, pertenciam ao sorogrupo I-B, enquanto entre eles, 25,9% pertenciam ao

sorogrupo I-A. O número absoluto 23 foi encontrado nos dois estudos que quantificaram *Neisseria gonorrhoeae* com sensibilidade diminuída à azitromicina, sendo que as desse estudo pertenciam ao sorogrupo I-B, mas no estudo comparado, estavam distribuídos quase uniformemente entre os sorogrupos I-A e I-B.

A resistência mediada por plasmídeo em cepas resistentes à penicilina é devida à presença de seis tipos de plasmídios, distinguidos com base no tamanho de seus pesos moleculares e denominados em função da região onde foram encontrados, a saber: Nova Zelândia (6,5 MDa), Ásia (4,4 MDa), Nimes (3,8 MDa), África (3,2 MDa), Toronto (3,05 MDa) e Rio (2,9 MDa). As amostras aqui isoladas abrigavam os plasmídios tipo África, tipo Ásia e tipo Toronto. Em Recife⁴⁰, as amostras PPNG carregavam o plasmídeo tipo África e, em Manaus⁴⁹, foram encontrados o tipo África e o tipo Toronto. Esses plasmídios produtores de β -lactamase estão espalhados por todo o mundo, e sua transmissão por conjugação entre os gonococos ou entre gêneros bacterianos distintos permite propagar a resistência por diversas regiões do Brasil e do mundo.

A análise genômica realizada por eletroforese em campo pulsado (PFGE), utilizada pela primeira vez em nosso país para *Neisseria gonorrhoeae*, possibilitou estabelecer uma base comparativa para futuros estudos epidemiológicos, mostrando uma grande variabilidade genética entre as cepas estudadas, confirmando sua origem não-clonal. Como ferramenta útil de largo poder discriminatório, para rastreamento e investigação, podemos concluir que nos quatro episódios de reinfecção encontrados neste trabalho, em três deles a cepa tinha o mesmo perfil de restrição do DNA, provavelmente a mesma fonte de origem.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados confirmam que a penicilina e a tetraciclina não devem ser usadas para o tratamento de gonorréia na região metropolitana do Rio de Janeiro e que a detecção de cepas, com diminuída sensibilidade a azitromicina e ciprofloxacina, deve servir de alerta para o seu uso e futuro monitoramento. A taxa de resistência encontrada para cloranfenicol, e que deve ser projetada para tianfenicol, está próxima daquela preconizada pela Organização Mundial da Saúde para sua contra-indicação. A ceftriaxona foi a droga que apresentou o melhor perfil de sensibilidade.

A análise fenotípica e genotípica das amostras estudadas poderá estabelecer, para nossa região, instrumentos comparativos para futuras pesquisas.

Finalmente, o perfil sociodemográfico dos pacientes portadores de gonorréia atendidos numa clínica de DST nesta região, é constituído de homens brancos, jovens, solteiros, heterossexuais, com múltiplas parceiras, com nível de escolaridade e renda familiar baixos, e expostos continuamente a riscos de adquirir uma doença de rota sexual.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a prestimosa colaboração da Prof^a Agnes Marie Sá Figueiredo na análise da PFGE e ao Prof. Cláudio César Cirne dos Santos na preparação das tabelas e digitação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HERIDA, M, SEDNAOUI, P, GOULET, V. Gonorrhoea surveillance system in France: 1986 – 2000. *Sex. Transm. Dis.* 31 (4): 209 – 214. 2004.
- Reuters Health Information. UK reports big increase in antibiotic-resistant. Disponível em: . Acesso em 29 de abril de 2003.
- ARREAZA, L, VAZQUEZ, F, ALCALÁ, B, OTERO, L, SALCEDO, C, VAZQUEZ JA. Emergence of gonococcal strains with resistance to azithromycin in Spain. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 51: 190 – 191. 2003.
- GREEN, MS, ANIS, E, GANDACU, D, GROTO, I. The fall and rise of gonorrhoea incidence in Israel: an international phenomenon? *Sex. Transm. Infect.* 79: 116 – 118. 2003.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Increases in fluoroquinolone – resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Hawaii and California, 2001; *MMWR.* 51 (46): 1041 – 1044. 2002.
- WHO - Western Pacific Region Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Surveillance of antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific Region, 2000. *Commun. Dis. Intell.* 25 : 274 – 277. 2001.
- GERBASE, AC, ROWLEY, JT, HEYMANN, DHL, BERKLEY, SFB, PIOT, P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex. Transm. Infect.* 74 (suppl.1) : S12 – S16. 1998.
- DAN, M. The use of fluoroquinolones in gonorrhoea: The increasing problem of resistance. *Expert. Opin. Pharmacother.* 5(3): 1 – 25. 2004.
- PASSOS, MRL, LOPES, PC, ALMEIDA, GL, GOUVÊA, TVD, Gonorréia. In: PASSOS, MRL. Doenças Sexualmente Transmissíveis. Rio de Janeiro, Cultura Médica 4^a ed. Cap. 8. 1995.
- FLEMING, DT, WASSERHEIT, JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex. Transm. Infect.* 75: 3 – 17. 1999.
- DUARTE, G, COSENTINO, LA, GUPTA, P, MIETZNER, TAE, LANDERS, DV. Aumento da replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 induzida por *Neisseria gonorrhoeae* na presença de leucócitos polimorfonucleares. *J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 15 (3): 5 – 9. 2003.
- ASHFORD, WA, GOLASH, RG, HEMMING, VG. Penicillinase – producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet.* ii: 656 – 657. 1976.
- MORSE, AS, JOHNSN, SR, BIDDLE, JW, ROBERTS, MC. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tet M determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 664 – 670. 1986.
- DILLON, JR, YEUNG, KH. β -lactamase plasmids and chromosomally mediated antibiotic resistance in pathogenic *Neisseria* species. *Clin. Microbiol.* 2: 125 – 133. 1989.
- SARAFIAN, SK, KNAPP, JS. Molecular epidemiology of gonorrhoea. *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (suppl.): S49 – S55. 1989.
- CATLIN, BW, Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J. Infect. Dis.* 128: 178 – 194. 1973.
- HENDRY, AT, STEWART, IO. Anxanographic grouping and typing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can. J. Microbiol.* 25: 512 – 521. 1979.
- TAM, MR, BUCHANAN, TM, et al. Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with monoclonal antibodies. *Infect. and Immun.* 36 (3): 1042 – 1053. 1982.
- KNAPP, JS, TAM, MR, NOWINSK, RC, HOLMES, KK, SHADSTRÖM, EG. Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with use of monoclonal antibodies to gonococcal outer membrane protein I. *J. Infect. Dis.* 154: 44 – 48. 1984.
- KNAPP, JS. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States. *Clinical Microbiology Newsletter.* 21 (1). 1999.
- CASTILLO, MC, SAAB, OA, et al. *In vitro* comparison of disk diffusion and agar dilution antibiotic susceptibility test methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93 (4): 517 – 522. 1998.
- ROBERTS, MC et al. Tet M and β -lactamase containing *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 158 – 160. 1988.
- DILLON, JR, LI, H et al. A PCR assay for discrimination *Neisseria gonorrhoeae* β -lactamase producing plasmids. *Molecular and Cellular Probes.* 13: 89 – 92. 1999.
- XIA, M, WHITTINGTON, WL, HOLMES, KK, PLUMMER, FA, ROBERTS, MC. Pulsed-field gel electrophoresis for genomic analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* 171: 455 – 458. 1995.

25. LOOVERN, M, VAN, ISON, CA *et al.* Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 37 (7): 2183 – 2188. 1999.
26. BRUNHAM, RC, PLUMMER, F. *et al.* Correlation of auxotype and protein I with expression of disease due *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* 152 : 339 – 343. 1985.
27. KLIGEREN, B, VAN, ANSINK-SCHIPPER, MC, *et al.* Relationship between auxotype, plasmid pattern and susceptibility to antibodies in PPNG. *J. Antimicrob. Chemother.* 16 : 143 – 147. 1984.
28. DILLON, JR, PAUZE, M. Relationship between plasmid content and auxotype in *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Infect. Immun.* 33 : 625 – 628. 1981.
29. HUGHES, G, ANDREWS, N, *et al.* Investigation of the increase incidence of gonorrhoea diagnosed in genitourinary medicine clinics in England, 1994 – 6. *Sex. Transm. Infect.* 76:18 – 24. 2000.
30. ZENILMAN, JM. Update on quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Current Infectious Disease Reports.* 4 : 144 – 147. 2002.
31. RADDADI, AA, ZIMO, SK, ABDULLAH, SA. *In vitro* activity of several antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae* in the western region of the Kingdom of Saudi Arabia. *Sex. Transm. Inf.* 74 : 294. 1998.
32. TEMMERMAN, M. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from men with urethritis in Kenya. *Sex. Transm. Inf.* 74 : 294 – 295. 1998.
33. LESMANA, M, *et al.* *In vitro* antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Jakarta, Indonesia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (1): 359 – 362. 2001.
34. TREES, DL, *et al.* Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* exhibiting decreased susceptibility and resistance to ciprofloxacin in Hawaii, 1991 – 1999. *Sex. Transm. Dis.* 28 (6): 309 – 314. 2001.
35. DILLON, JR, LI, H *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from three caribbean countries: Trinidad, Guyana and St. Vincent. *Sex. Transm. Dis.* 28 (9): 508 – 514. 2001.
36. DORLENCOURT, F, BOIREAUX, C, SEDNAOUI, P, DANILENKO, NV, LEGROS, D. *In vitro* susceptibility of 120 strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Kyrgyzstan. *Sex. Transm. Dis.* 29 (7) : 376 – 378. 2002.
37. LLANES, R, SOSA, J, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba (1995 – 1999) – Implications for treatment of gonorrhea. *Sex. Transm. Dis.* 30 (1): 10 – 14. 2003.
38. CENTERS FOR 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.* 53 (16): 335 – 338. 2004.
39. MAGALHÃES, M. Uretrite causada por *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase: relato de um caso. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 20 (4): 116 – 118. 1984.
40. MAGALHÃES, M. *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase no Recife, Brasil. *Rev. Microbiol.* 18 (3) : 229 – 234. 1987.
41. MAGALHÃES, M. Resistência cromossômica à penicilina em *Neisseria gonorrhoeae*. *Rev. Microbiol.* 18 (3): 219 – 223. 1987.
42. ANTUNES, GS, DAMASCENO, CAV, CISALPINO, EO. Perfil de suscetibilidade de *Neisseria gonorrhoeae* a antimicrobianos em Belo Horizonte, MG. *Rev. Microbiol.* 15 (4): 217 – 221. 1984.
43. LOMBARDI, C, SIQUEIRA, LGF, SANTOS JUNIOR, MFQ, FRANCISCO, N, BELDA, W. *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase. Primeira cepa isolada em São Paulo, SP (Brasil). *Rev. Saúde Pública.* 19 : 374 – 376. 1985.
44. SMÂNIA, A, *et al.* Resistência a agentes antimicrobianos de amostras de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas em Florianópolis – SC. *Rev. Microbiol.* 22 (4): 308 – 312. 1991.
45. SMÂNIA, A, SMÂNIA, EFA, GIL, ML. Decreased susceptibility to antibiotics among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Florianópolis – SC, Brasil. *Rev. Microbiol.* 26 (3): 236 – 238. 1995.
46. SIQUEIRA, LGF. Aspectos fenotípicos e epidemiológicos de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase isolados na cidade de São Paulo. Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da USP. 1993.
47. NITRINI, SMOO. Vigilância sentinela em *Neisseria gonorrhoeae* : características epidemiológicas na cidade de São Paulo e proposta de um modelo em nível nacional. Tese de Livre Docente. Faculdade de Saúde Pública da USP. 1995.
48. BARRETO, NA. Resistência dos gonococos: uma década perdida. *J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 12 (6): 5 – 7. 2000.
49. DILLON, JR, RUBABAZA, JA, *et al.* Reduced susceptibility to azithromycin and high percentages of penicillin and tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Manaus, Brazil, 1998. *Sex. Transm. Dis.* 28 (9) : 521 – 526. 2001.
50. FERREIRA, WA, SARDINHA, JCG, SCHETINI, APM, FERREIRA, CM, BENZAKEN, AS. Suscetibilidade de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aos antibióticos utilizados para o tratamento de uretrites e cervicites gonocócicas em ambulatório de DST de Manaus – Brasil. *J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 13 (6): 36 – 40. 2001.
51. EVANGELISTA, AT, BEILSTEIN, HR. Cumitech 4A. Laboratory diagnosis of gonorrhoea. Coordinating ed. Abramson, C. American Society for Microbiology, Washington. DC. 1993.
52. VAN DYCK, E, MAHEUS, AZ, PIOT, P. Laboratory diagnosis of Sexually Transmitted Diseases. WHO. Switzerland. p. 1 – 21. 1999.
53. O'CALLAGHAN, CH, MORRIS, A, KIRBY, SM, SHINGLER, AH. Novel method for detection of β -lactamase by using chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1 : 283 – 288. 1972.
54. VAN DYCK, E, SMET, H, PIOT, P. Comparison of E test with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 32 (6): 1586 – 1588. 1994.
55. MEHAFFEY, PC, PUNT, AM, SD, BARRET, MS, JONES, RN. Evaluation of *in vitro* spectra of activity of azithromycin, clarithromycin and erythromycin tested against strains of *Neisseria gonorrhoeae* by reference agar dilution, disk diffusion and E test methods. *J. Clin. Microbiol.* 34 (2): 479 – 481. 1996.
56. BIODENBACH, DJ, JONES, RN. Comparative assessment of E test for testing susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin, tetracycline, ceftriaxone, cefotaxime and ciprofloxacin: investigation using 510 (K) review criteria recommended by Food and Drug Administration. *J. Clin. Microbiol.* 34 (12): 3214 – 3217. 1996.
57. NORROD, P, WILLIAMS, RP. Stability and viability of *Neisseria gonorrhoeae* in various solutions and buffers. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (2): 293 – 297. 1979.
58. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Approved Standard M100-S13. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Thirteenth Informational Supplement. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003.
59. ZARANTONELLY, L, BORTHAGARAY, G, LEE, EH, SHAFER, WM. Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to mtr R mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 2468 – 2472. 1999.
60. GILL, MJ. Serotyping *Neisseria gonorrhoeae*: a report of the fourth international workshop. *Genitourin. Med.* 67: 53 – 57. 1991.
61. BIRBOIM, HC, DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.* 7 (6) : 1513 – 1523. 1979.
62. MACRINA, FL, KOPECKO, DJ, JONES, KR, AYRES, DJ, McCOWEN, SM. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strains: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid.* 1 (3): 417 – 420. 1978.
63. THERELLFALL, EJ, ROWE, B, FERGUNSON, JL, WARD, LR. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204C isolated in Britain. *J. Hyg. (London)* 97: 419 – 426. 1986.
64. GASCOYNE, DM, HERITAGE, J *et al.* Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmids carrying tet M found in *Neisseria gonorrhoeae* from different countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 28 : 173 – 183. 1991.
65. BIRREN, B, LAI, E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: a practical guide. San Diego, CA. Academic Press Inc. 1993.
66. POH, CL, LAU, QC. Subtyping of *Neisseria gonorrhoeae* auxotype – serovar groups by pulsed – field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* 38 : 366 – 370. 1993.
67. XIA, M, WHITTINGTON, WL, *et al.* Pulsed – field gel electrophoresis for genomic analysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* 171: 455 – 458. 1995.
68. TENOVER, FC, ARBEIT, RD, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by PFGE: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33 (9): 2233 – 2239. 1995.
69. KNNAP, JS, *et al.* Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Kingston, Jamaica: 1990 – 1991. *Sex. Transm. Dis.* 22: 155 – 159. 1995.
70. ENEGAS, VM, VILLAFRANCA, P, MADRID, JP, COSENZA, H, BOYGD-DEMAN, S. Gonorrhoea and urogenital chlamydial infection in female prostitutes in Tegucigalpa, Honduras. *Int. J. STD/AIDS.* 2: 195 – 199. 1991.

71. MARQUEZ, C. *et al.*. The first molecular characterization of tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* from Uruguay. *J. Antimicrob. Chemother.* 37: 839 – 841. 1996.
72. CASTRO, I, BERGERON, MG, CHAMBERLAND, S. Characterization of multiresistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Nicaragua. *Sex. Transm. Dis.* 20: 314 – 320. 1993.
73. LLANES, R, SOSA, J, MARTINEZ, I. Detection of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Cuba, 1995 – 1998. *Sex. Transm. Dis.* 76: 58 – 59. 2000.
74. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Management of sexually transmitted diseases. World Health Organization. WHO/UNAIDS; WHO/GPA/ 94.1. Rev.1.1997.
75. GASCOYNE, DM, HERITAGE, J, HAWKEY, PM. Nucleotide sequences of the tet(M) genes from the American and Dutch type tetracycline resistance plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 667 – 676. 1993.
76. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Gonorrhea – United States. *MMWR.* 49 (24): 538 – 542. 2000.
77. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Projetos Especiais de Saúde. Coordenação de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis. Brasília. Ministério da Saúde, 74p. 1999.
78. TAPSALL, JW, *et al.* Failure of azithromycin therapy in gonorrhea and correlation with Laboratory test parameter. *Sex. Transm. Dis.* 25: 505 – 508. 1998.
79. MCLEAN, CA, *et al.* The emergence of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to azithromycin in Kansas City, Missouri, 1999 a 2000. *Sex. Transm. Dis.* 31 (2): 73 – 78, 2004.

Endereço para correspondência:

NERO ARAÚJO BARRETO

Estrada Caetano Monteiro, 2301.

Pendotiba – Niterói – Rio de Janeiro. CEP:24320-570

E-mail: neronab@vm.uff.br

Recebido em: 26/05/04

Aprovado em: 20/09/04