Dandara Cassu Corsi

ANÁLISES GENÔMICAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* RESISTENTES A CIPROFLOXACINO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutora em Ciências

São Paulo
2022

Dandara Cassu Corsi

ANÁLISES GENÔMICAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* RESISTENTES A CIPROFLOXACINO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientador (a):
Profª. Drª. Ana Cristina Gales

Coorientador (a):
Drª. Fernanda Fernandes Santos

São Paulo
2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo, Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cassu-Corsi, Dandara
ANÁLISES GENÔMICAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE RESISTENTES A CIPROFLOXACINO / Dandara
Cassu-Corsi. - São Paulo, 2022.
xx, 102f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Genomic analysis of Neisseria gonorrhoeae Clinical Isolates resitant to Ciprofloxacin
.

1. Neisseria gonorrhoeae. 2. Ciprofloxacino. 3. Azitromicina. 4. Epidemiologia. 5. Sequenciamento do genoma completo. 6. Plasmídeos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

Chefe do Departamento de Medicina:

Prof. Dr. Alvaro Pacheco e Silva Filho

Coordenador (a) do Curso de Pós-Graduação:

Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

DANDARA CASSU CORSI

ANÁLISES GENÔMICAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* RESISTENTES A CIPROFLOXACINO

Presidente da banca:

Prof (a). Dr (a). Ana Cristina Gales

_____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

_____

Prof (a). Dra (a) Luciene Andrade da Rocha Minarini

_____

Prof (a). Dr (a). Marinês Dalla Valle Martino

_____

Prof (a). Dr (a). Raquel Regina Bonelli

_____

Prof (a) Dr (a) Raquel Girardello (suplente)

_____

Prof. Dr. Rodrigo Cayô da Silva (suplente)

_____

Data de aprovação: 29/03/2022

Dedicatória

Dedico este trabalho e essa minha conquista à minha mãe **Cida Cassu** (*in memorian*), a ternura, a generosidade e a memória que compunham o meu ser. Sou grata a vida pela oportunidade de ter nascido de uma mulher tão íntegra e de bom coração. Sei que a nossa separação é apenas física, e as nossas almas continuam ligadas. Sei também que seu colo sempre estará disponível, pois o essencial é invisível aos olhos e eu a vejo com o meu coração. Obrigada minha mãe, por sussurrar em meu ouvido, me dando força para continuar. Ao meu pai **Miguel Corsi,** meu alicerce. Como não agradecer esse meu pai. O homem que abdicou de tudo e lutou heroicamente ao lado da minha mãe durante meses, até o último momento. Minha mãe sempre expressava essa gratidão, e eu afirmo: Obrigada meu pai, sem você não teríamos conseguido!

Dedico também essa conquista ao meu parceiro de vida **Lucas Fraga Moreira Bertani**, que acompanha diariamente toda minha trajetória, que me encoraja, que "segura rojão" comigo e que me tranquiliza nos momentos de aflições. Um homem que se mostrou ser um pai maravilhoso, e que assume a paternidade com toda a responsabilidade que lhe cabe. Obrigada por tudo! Sua ajuda e companheirismo é essencial para nossas vidas!

Dedico toda a conquista da minha vida (essa, outras que já vieram e todas que ainda estão por vir) à minha filha **Helena Corsi Bertani**, meu maior presente, um presente que não foi esperado, mas que foi ao mesmo tempo absurdamente desejado. Que me ensinou que o significado da palavra maternar é cuidar, cuidar 100% com amor, um amor que não acaba, até mesmo no extremo do cansaço. Que trouxe luz e paz para o meu coração aflito. Que me trouxe de volta ao mundo e faz ter vontade de ser uma pessoa melhor diariamente. Obrigada, minha filha, por ter me escolhido e por me ensinar tanto. Eu também não desisti de nada por você! Quero ser para você exemplo de garra, luta e perseverança! Juntas caminharemos daqui até outras dimensões!

Agradecimentos

À minha orientadora **Profa. Dra. Ana Cristina Gales**, que nos incentiva pela sua busca constante pelo conhecimento. Que sempre admirei por ter uma excelente memória, inteligência e clareza de ideias. Agradeço também todos os conselhos, apoio, paciência, e respeito por todos os momentos que vivi. Obrigada de coração por toda confiança ao longo destes anos de convivência, obrigada por me permitir fazer parte do grupo Alerta, obrigada por me ajudar a não desistir e obrigada por nunca ter desistido de mim também!

À minha co-orientadora **Dra. Fernanda Fernandes Dos Santos**, que aceitou a missão de me co-orientar praticamente na reta final. uma pessoa maravilhosa, calma e paciente, que sempre passou seu conhecimento da forma mais tranquila e otimista possível, e que sem querer me ajudou a tornar todo esse processo mais leve. Aprendi muito com você, e te desejo o maior sucesso do mundo! Obrigada por tanto! Uma pessoa que levarei para sempre em meu coração!

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari** grande profissional na área da microbiologia, que adora nos ensinar e contar a história dos Laboratório LEMC/ALERTA na Unifesp. Obrigada por tudo e por me permitir fazer parte do grupo também.

Aos membros competentes da banca **Profa. Dra. Raquel Regina Bonelli**, **Prof. Dr. Jorge Luiz Melo Sampaio**, **Profa. Dra. Luciane Minarini**, **Prof. Dr. Rodrigo Cayô** e **Profa. Raquel Giradello** por terem aceitado o convite e por contribuírem com o trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cayô** por toda ajuda. Uma pessoa que admiro por possuir um grande conhecimento na área de resistência bacteriana, que é extremamente competente e criterioso no que faz. Obrigada por toda paciência e ajuda!

A todos os envolvidos no “Projeto Neisseria”. Ao **Rafael Affini** por contactar e conseguir as amostras de *N. gonorrhoeae* no CRT-Santa Cruz, e assim dar início ao

“Projeto Neisseria”. Ao **Dr. Roberto** José Carvalho da Silva e **à Dra. Roberta** Alessandra Lima Bocalon do CRT-AIDS Santa Cruz por nos cederem as amostras. À **Dra. Carolina Nodari** pela sua grande parceria na realização de diversos experimentos e na elaboração dos relatórios. À aluna de iniciação científica **Larissa Natsumeda** que também nos ajudou grandemente em diversos experimentos do projeto. Aos demais companheiros de laboratório envolvidos na preparação e leitura do teste de ágar diluição “**Dra. Lorena Cristina Correa Fehlberg**, **Prof. Dr. Rodrigo Cayô**, **Dra. Ana Carolina Ramos**, **Dra. Carolina Nodari**, **Dr. Willames Brasileiro** e a **Msc. Ana Clara Narciso**. Ao Dr. **André Mário Doi** pelo seu envolvimento e por dividir conosco experiências clínicas e laboratoriais nos momentos iniciais do projeto. À **Dra. Ana Carolina Ramos** pela ajuda na padronização incial do PFGE e à **Dra. Ana Paula Streling** pela ajuda na execução da técnica de PFGE. À **Profa. Dra. Raquel Girardello** que nos ajudou a montar as bibliotecas genômicas. Ao **Luiz e à Dra. Ana Tereza** do LNCC por montar e analisar os genomas. Ao **Prof. Dr. Willames Brasileiro** e a **Dra. Refath Farzana** por nos ajudar com o sequenciamento no MinIion na Universidade de Cardiff, no Reino Unido.

Aos meus companheiros de laboratório **Dra. Ana Streling, Msc. Ana Clara Narciso, Msc. Michael Lenzi, Msc. André Valêncio, Msc. Juliana Paulinho, Msc. Felipe Lei** e **Msc. Ingrid Nayara** por toda ajuda em diversos experimentos, pela troca de conhecimento, pelos risos nos momentos de descontração. Levarei todos esses momentos em minha lembrança. Torço demais pelo sucesso de vocês!

À equipe “**One Health”: Tiago Valiatti, Francisco Ozório, Ruanita Veiga, Ramon Giovanni**, e a todos os demais envolvidos no projeto, por toda parceria, paciência, troca de conhecimentos e ajuda no desenvolvimento inicial do projeto. Obrigada por tanto! Tenho certeza de que vocês desenvolveram o projeto com maestria!

Agradeço a todos os ex-integrantes e os atuais integrantes do Grupo Alerta**.** Agradeço a todos que tive o privilégio de conhecer, e alguns que devido a mudanças da minha vida, apenas acompanhei a distância. Muito obrigada por toda ajuda,

obrigada por me permitirem crescer pessoalmente e profissionalmente. Desejo, do fundo do meu coração, uma carreira brilhante a todos vocês!

Agradeço a todos os integrantes e ex-integrantes do grupo LEMC que também tive o privilégio de conviver. Todos foram extremamente importantes para minha formação! Obrigada grupo!

As minhas parceiras de estágio PAD, **Dra. Ana Paula Streling** e **Msc. Aghata Cardoso**. Aprendi demais com vocês. Adorei dividir com vocês tantos momentos de conhecimento. Essa etapa foi importante demais para mim!

Aos docentes responsáveis pela **UC de Microbiologia de Diadema, Profa. Dra. Luciene Minarini, Profa. Dra. Karen Spadari, e Prof. Dr. Wagner Luiz Batista** por nos aceitarem como estagiárias PAD, e por me permitir auxiliar os alunos em diversas atividades. Foi extremamente gratificante e importante para minha vida profissional e pessoal. Agradeço também aos alunos do curso de farmácia do noturno e do integral por depositarem em mim tanta confiança e por demonstrarem tanto respeito durante o desenvolvimento das atividades do semestre.

Agradeço à **Escola Paulista de Medicina - Universidade de São Paulo (EPM-UNIFESP)** por tantas oportunidades de crescimento. Meu sonho de universidade que se concretizou! Me sinto honrada em carregar o nome da Escola Paulista de Medicina na minha bagagem de vida!

Agradeço ao Secretário e Assistente em Administração da Disciplina de pós-graduação em Medicina Translacional **João Roberto de Freitas Carrasco** por toda orientação e suporte de dúvidas.

Agradeço meu amigo **Willames Brasileiro** por toda ajuda em experimentos, ideias, trocas de conhecimentos, e principalmente por sempre acreditar em mim. Obrigada também pelas visitas e momentos de suporte quando a minha pequena nasceu. Obrigada Will, alguns gestos por mais simples que sejam, possuem um valor imenso! Agradeço também minha amiga e companheira de laboratório **Ana Carolina**

Ramos por sempre me ajudar e dar palavras de incentivo. Também jamais vou esquecer que você e a **Thais Teles** me ajudaram com a Helena em um momento que tanto precisei. Vocês com certeza foram um pouquinho da minha família em São Paulo.

Agradeço o gesto inesquecível dos meus companheiros de laboratório **Prof. Dr. Rodrigo Cayô, Dra. Ana Paula Streling, Dra. Ana Carolina Ramos, Dra. Carolina Nodari e Msc. Ana Clara Narciso** por terem se locomovido de São Paulo à Itu, em um dia de semana, à noite, para me dar um abraço no dia mais difícil da minha vida. Nessa hora eu pude ver que poderia contar com vocês além da vida acadêmica! Muito obrigada pelo carinho, sensibilidade e consideração! Levarei esse gesto dentro do meu coração para sempre!

Agradeço à **Cidade de São Paulo**, que acolheu aquela menina que eu era, tão sonhadora, lá em 2012. Foi na terra da garoa que formei meu primeiro lar, e foi onde a nossa Helena nasceu. Jamais vou esquecer a minha tão amada Vila Clementino, os apartamentos que vivi na Av. Altino Arantes e na Rua 3 de Maio. Obrigada São Paulo, por me proporcionar tanta cultura, tantos desafios e tantos momentos inesquecíveis!

Agradeço à **Minha Itu**, cidade que nunca saiu do meu coração! Sinto muito por ter demorado tanto para perceber que as minhas raízes sempre falaram mais alto dentro do meu coração. Obrigada por receber minha família de volta 8 anos depois, em pleno caos da pandemia. Hoje me sinto feliz demais, muito realizada por ter voltado e por estar recomeçando a vida ao lado de tanta gente que eu amo! Certas coisas nessa vida não têm preço!

Agradeço mais uma vez meu pai **Miguel Corsi** por tanto apoio e parceria nesse meu retorno. Ver você sorrindo outra vez e brincando com a sua neta faz meu coração transbordar de amor!

Agradeço à minha sogra **Vera Lúcia Corvello Fraga Moreira** por todo suporte e por todos os momentos de alegria proporcionados à minha filha ao lado dos patos, gansos, lagos, e de muito mato! Amamos tudo isso!

Agradeço à Regiane, nossa querida **Tia Rê,** essa pessoa alto astral que ajuda a cuidar da Helena durante a semana, para que eu conseguisse chegar até aqui em meio a tantas mudanças na minha vida. **Obrigada Tia Rê!** Ainda bem que encontrei você! E que a sua carreira de pedagoga seja brilhante!

Agradeço à nossa sobrinha **Alice de Araújo Bertani,** que foi o nosso primeiro pontinho de luz, que veio ao mundo alguns meses antes da Helena.

Agradeço aos meus cunhados **Daniel Bertani** e **Camila Amanda Araújo**, proprietários do Bertani Hospital Veterinário da Cidade de Salto por depositarem tanta confiança e por me darem a oportunidade de recomeço. Temos ainda muito para crescer! Agradeço a veterinária **Érica Martins** pela ajuda com a realização dos exames nos momentos que precisei me ausentar para finalizar a tese. Agradeço a toda equipe do **Bertani Hospital Veterinário** pela confiança, troca de conhecimentos e parceria durante esses últimos meses. Trabalhar nessa área vem sendo algo muito desafiador e maravilhoso ao mesmo tempo.

Agradeço à minha **família,** aos nossos **amigos**, aos **amigos da minha mãe** que traziam comida, vitaminas, orações, palavras de conforto e que nos fizeram companhia durantes todos àqueles meses. Agradeço aos familiares e aos amigos que nos apoiam e nos incentivam até o dia hoje. Sim, eu acredito na bondade genuína e nas amizades verdadeiras, porque assim fui ensinada e assim são as pessoas que me cercam!

Por último, mas o mais importante de todos. Agradeço a **DEUS** por ter me dado saúde, força e perseverança. E principalmente, por ter me dado a oportunidade de carregar o título mais lindo e o mais importante de todos nessa minha vida, o título de MÃE.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Processo nº 88882.430768/2019-01 e foi financiado pela Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP), Processo nº 2016/01889-0

“Mesmo quando tudo parecer desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri que no caminho incerto da vida, o mais importante é o decidir”

(Cora Coralina)

Resumo

Objetivos: Este estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente os isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino coletados entre os anos de 2003 e 2015. **Metodologia:** Os isolados de *N. gonorrhoeae* foram recuperados do Centro de Referência de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis - AIDS (CRT- AIDS) localizado na região metropolitana da cidade de São Paulo. Ao todo foram sequenciados 13 genomas de *N. gonorrhoeae*. O sequenciamento completo do genoma (WGS) foi realizado na plataforma Illumina MiSeq 2500 2 x 300 bp paired-end. As análises de bioinformática foram realizadas utilizando as plataformas CGE, PATRIC e BLAST. Os plasmídeos foram montados utilizando os programas Newbler versão 3.0 e Spades 3.13.0. **Resultados:** A análise de Multilocus Sequence Typing (MLST) identificou sete STs, ST1580, ST1590, ST1901, ST1902, ST8161, ST9363 e ST15640. O NG-STAR ST90 foi observado em dois isolados resistentes a ciprofloxacino. Além disso, uma diversidade de mutações foi observada em MtrR/G45D-A39T, PIB/G120K-A121S e PBP1/L421P. Mutações em genes que codificam a resistência às sulfonamidas (DHPS/R228S) também foram detectadas, bem como determinantes de resistência à tetraciclina, RpsJ/V57M e TetM. Adicionalmente, foi possível observar a presença de três plasmídeos distintos entre os isolados, os plasmídeos crípticos, plasmídeos conjugativos e plasmídeos BlaTEM. **Conclusão:** Os resultados aqui apresentados contribuem para o entendimento da resistência aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae* e corroboram a importância dos estudos de vigilância para monitorar a evolução e o surgimento de isolados multirresistentes.

Abstract

Objectives: This study aims to genetically characterize ciprofloxacin resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated during a 12-year period (2003-2015). **Metodology:** Gonococci isolates were recovered from the Centro de Referência e Tramento de Doenças Sexualmente Transmissíveis (CRT-IDAS), located in the metropolitam region of the city of São Paulo. Thirteen *N. gonorrhoeae* genomes were sequenced in the study. The WGS was performed using Illumina MiSeq 2500 2x300 pb paired-end - platform. Bioinformatics analyzes were performed using CGE, PATRIC and BLAST plataforms. Plasmids were assembled using the programs Newbler version 3.0 and Spades version 3.13.0. **Results:** Multilocus Sequencng Typing (MLST) analysis identified seven STs, ST1580, ST1590, ST1901, ST1902, ST8161, ST9363, and ST15640. NG-STAR ST90 was observed in two ciprofloxacin-resistant isolates. In addition, distinct mutations were observed MtrR / G45D-A39T, PIB/G120K-A121S and PBP1/ L421P. Sulfonamide resitance-associated mutation (DHPS/R228S) were also detected, as well as tetracycline resistance determinants, RpsJ/V57M and TetM. Additionally, the presence of three different plasmids were detected in the isolates: the cryptic, conjugative and BlaTEM plasmids. **Conclusion:** Our results contributed to the understanding of the *N. gonorrhoeae* epidemiology in São Paulo city and emphasize the the importance of continuous surveillance to monitor the evolution, emergence and spread of resistant *Neisseria gonorrohoeae* isolates.

SUMÁRIO

Resumo....xiii
Abstract....xiv
Lista de figuras....xvii
Lista de tabelas....xviii
Lista de abreviaturas....xix

1. INTRODUÇÃO....1

2. OBJETIVOS....4

2.1. Objetivo Geral....4

2.2. Objetivos Específicos....4

3. REVISÃO DA LITERATURA....5

3.1. Epidemiologia Global dos Isolados Clínicos Multirresistentes *de N. gonorrhoeae* e os programas de vigilância distribuídos nos cinco continentes 6

3.2. Antimicrobianos Utilizados no Tratamento e Mecanismos de Resistência descritos em *N. gonorrhoeae*....17

3.2.1. Sulfonamidas....17

3.2.2. Penicilina....17

3.2.3. Tetraciclina....20

3.2.4. Espectinomicina....21

3.2.5. Fluoroquinolonas....21

3.2.6. Macrolídeos....23

3.2.7. Cefalosporinas....24

3.3. Elementos Genéticos Móveis em isolados de *N. gonorrhoeae* 25

3.3.1. Plasmídeos Crípticos (não conjugativos)....26

3.3.2. Plasmídeos Conjugativos....26

3.3.3. Plasmídeos BlaTEM....27

4. METODOLOGIA....29

4.1. Seleção dos isolados de *N. gonorrhoeae*....29

4.1.1. Sequenciamento do Genoma Total....31

4.1.2. Montagem e Anotação Automática dos Genomas 31

5. RESULTADOS..... 35

5.1. Sequenciamento do Genoma Total 35

5.1.1. Investigação dos Determinantes de Resistência 37

5.1.2. Determinação do "*Multi Locus Sequencing Typing*" MLST. 39

5.1.3. Análise Filogenética 47

5.2. Montagem dos Plasmídeos..... 49

5.2.1. Plasmídeos Crípticos (pCrípticos)..... 50

5.2.2. Plasmídeos Conjugativos (pConjugativos) 58

5.2.3. Plasmídeo BlaTEM (pBlaTEM) 64

6. DISCUSSÃO..... 70

7. CONCLUSÃO..... 79

8. REFERÊNCIAS..... 80

ANEXOS..... 98

Anexo 1 - Perfil clonal dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥0,06 mg/L para ciprofloxacino e ≥0,5 mg/L para azitromicina após a digestão do DNA utilizando SpeI. 98

Anexo 2 - Declaração de responsabilidade para projeto que não envolve humanos nem animais..... 99

Lista de figuras

Figura 1 Testes Laboratoriais empregados para o diagnóstico de gonorreia.....5
Figura 2 Porcentagem de resistência ao ciprofloxacino reportada pelos países participantes do Programa de Vigilância GASP (2018). 11
Figura 3 Porcentagem de resistência à azitromicina reportada pelos países participantes do Programa de Vigilância GASP (2018). 12
Figura 4 Porcentagem de resistência às cefalosporinas reportada pelos países participantes do Programa de Vigilância GASP (2018). 13
Figura 5 Relação entre a evolução do tratamento antimicrobiano da gonorreia ao longo dos anos e o relato dos principais mecanismos de resistência. 16
Figura 6 Mapa de distribuição dos plasmídeos pCríptico, pConjugativo e pBlaTEM ao redor do mundo. 28
Figura 7 Fluxograma representativo do critério empregado para a seleção dos isolados de *N. gonorrhoeae* submetidos ao sequenciamento do genoma total.....30
Figura 8. Análise filogenética de 41 isolados de *N. gonorrheae* baseada em algoritmos de máxima verossimilhança (RAxML) e editada pelo programa iTOL.. 48
Figura 9 Mapa físico do plasmídeo pCríptico detectado nos 13 isolados de *N. gonorrhoeae* avaliados nesse estudo.. 55
Figura 10 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos crípticos detectados no presente estudo (n=13).. 57
Figura 11 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos crípticos detectados em distintos países (n=41).....58
Figura 12 Mapa físico do plasmídeo pConjugativo detectado nos cinco isolados de *N. gonorrhoeae*.. 61
Figura 13 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos conjugativos detectados no estudo (n=5).. 62
Figura 14 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos conjugativos detectados em distintos países (n=30).....63
Figura 15 Mapa físico do plasmídeo pBlaTEM detectado no isolado de *N. gonorrhoeae* (NG140).. 68
Figura 16 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos pBlaTEM detectados no isolado NG140.. 69

Lista de tabelas

Tabela 1 Pontos de corte de resistência e/ou diminuição da sensibilidade para isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* frente aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica de acordo com os últimos boletins pulicados CLSI (2021), GISP (2018), NSP (2018), EUCAST (2021), Euro-GASP (2021) e AGSP (2020)..10

Tabela 2 Determinantes de resistência relatados em *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos recomendados para o tratamento da gonorreia desde a década de 70 (Adapatado de Unemo & Shafer, 2014; Eyre et al., 2017).....15

Tabela 3 Resumo dos dados genômicos dos isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* recuperados na cidade de São Paulo durante os anos de 2003 a 2015 36

Tabela 4. Características microbiológicas e genômicas de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total 40

Tabela 5 Distribuição dos plasmídeos identificados entre os isolados de *N. gonorrhoeae* obtidos por meio da análise do genoma completo de acordo com a plataforma Illumina 49

Tabela 6 Características gerais dos plasmídeos crípticos descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021.....51

Tabela 7 Características gerais dos plasmídeos conjugativos descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021.....59

Tabela 8 Características gerais dos plasmídeos pBlaTEM descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021.....65

Lista de abreviaturas

ATCC	*American Type Culture Collection*
AGSP	*Australian Gonococcal Suerveillance Programa*
CARD	*Antibiotic Resistance Database*
CDC	*Center for Disease Control and Prevation*
CGE	*Center of Genomic Epidemiology*
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CRT-AIDS	Centro de Referência de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmssíveis-AIDS
DHPS	Diidropteroasintetase
DSTs	Doenças Sexualmente Transmíssiveis
ESBL	β-lactamases de espectro ampliado
EUCAST	*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
EURO-GASP	*European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program*
GASP	*Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program*
GASP-LAC	*Antimicrobial Resistance Program - Lantin American and Caribean*
GISP	*Gonococcal Isolate Surveillance Program*
IM	Intra- muscular
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	*Insertion Sequence*
ISTs	Infeccções Sexualmente Transmissíveis
LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
MALDI	TOF MS *Matriz Assisted Laser Desorption Ionization Time of Fligth*
MLST	*Multilocus Sequence Typing*
NG	*Neisseria gonorrhoeae*
NG-MAST	*Neisseria gonorrhoeae Multi-atigen Sequence typing*
NG-STAR	*Neisseria gonorrhoeae Sequence Typing of Antimicrobial Resistance*
NML	*National Microbiology Laboratory*
ORF	*Open Reading Frame*
PABA	ácido para-aminobenzóico
PATRIC	*Pathosystem Resource Integration Center*

PBP	Protein Bindig Penicillin
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PFGE	*Pulsed Field Gel Electrophoresis*
QRDR	*Quinolone Resistant-Determining Region*
RNA	Ácido ribonucleico
ST	*Sequence Typing*
VO	Via oral
WGS	*Whole Genome Sequencing*
WHO	*World Health Organization*
XDR	*Extesensively Drug-Resistant*

1. INTRODUÇÃO

A gonorreia é uma infecção causada pelo agente *Neisseria gonorrhoeae*, uma espécie bacteriana gram-negativa fastidiosa descrita desde a Antiguidade, sendo inclusive relatada em passagens bíblicas (Velho Testamento; Leviticus 15:1-3). A gonorreia é considerada uma das principais infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) restritas à espécie humana. É responsável por causar uretrite em homens e mulheres, e cervicite em mulheres. Em homens, poucos casos são considerados assintomáticos (≤10%); entretanto, em mulheres, essa proporção aumenta em até 50%. O fato dessas infecções serem de difícil detecção, faz com que muitas vezes não sejam tratadas adequadamente, podendo causar endometrite, doença inflamatória pélvica, epididimite, e sequelas reprodutivas mais graves, como infertilidade, abortos espontâneos e gravidez ectópica. Além disso *N. gonorrhoeae* pode ser também o agente causador de infecções oculares, que em neonatos, podem evoluir para cegueira (WHO, 2012; Unemo & Shafer, 2014).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de 106 milhões de novos casos de gonorreia entre adultos em todo o mundo. Já em 2016, foram relatados 87 milhões de novos casos de gonorreia (WHO, 2018). Os índices de novos casos de gonorreia também foram publicados por países localizados em continentes distintos. No ano de 2018 foram reportados, por 28 países pertencentes à União Europeia, um total de 100.673 casos de gonorreia, aproximadamente 26,4 casos a cada 100.000 habitantes (ECDC, 2018). Na China, foi observado um total de 133.156 novos casos de gonorreia, uma incidência de 9,59 casos para cada 100. 000 habitantes (Yue et al., 2018).

Em locais com poucos recursos o número de casos relatados pode ser substancialmente menor do que o número real. Isso se deve aos subdiagnósticos, seja pela falta de métodos apropriados e/ou acesso aos testes; e/ou pela vigilância inadequada; e/ou subnotificação de casos (Unemo & Shafer, 2014). Estes problemas podem resultar na falta do reconhecimento da morbidade dessas infecções e nos custos ocultos para os sistemas de saúde de diversos países (Unemo & Shafer, 2014).

O diagnóstico da gonorreia é realizado pela detecção do agente *N. gonorrhoeae* em amostras de secreções por meio das técnicas de microscopia, cultura

e testes de amplificação de DNA (https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm. No caso de infecção uretral sintomática em homens, a microscopia continua sendo uma técnica útil, pois o microrganismo pode ser visto como um diplococo gram-negativo no interior de leucócitos polimorfonucleares à coloração de gram. Entretanto, a cultura apresenta maiores valores de sensibilidade (86,2%) e especificidade (100%), desde que a amostra seja coletada, transportada e semeada de maneira correta. Os testes de amplificação de DNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vêm sendo bastante utilizados devido à alta sensibilidade e à diminuição do tempo para liberação dos resultados (Bignell & Unemo, 2013; Unemo & Shafer, 2014; Serra-Pladevall et al., 2015).

O protocolo de tratamento com antimicrobianos das infecções causadas por *N. gonorrhoeae* vem sofrendo alterações desde o fim da década de 1970 devido ao surgimento de novos relatos de resistência ao redor do mundo (Costa-Lourenço, 2019). Foi observado que isolados de *N. gonorrhoeae* produtores de β-lactamases passaram a exibir altas taxas de resistência à penicilina, que fez com que fluoroquinolonas passassem a ser principal opção terapêutica para o tratamento destas infecções, pois esse grupo de composto apresentava potente atividade antimicrobiana em formulações orais com alta biodisponibilidade (Unemo & Shafer, 2014). Porém, diversos estudos reportaram o surgimento de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino (Unemo et al., 2016). As altas taxas de resistência a ciprofloxacino fizeram com que este composto deixasse de ser indicado como principal opção terapêutica em vários países, como Japão (desde 1990) e nos Estados Unidos e, mais recentemente, no Brasil. Baseado nestes fatos, foram preconizadas duas opções de tratamento da gonorreia: i)terapia combinada, utilizando ceftriaxona 250 mg intramuscular (IM) mais azitromicina (1g) VO (dose única), bem como uma única dose de azitromicina (1g) VO ou cefixima 400 mg VO (dose única) mais azitromicina (1g) VO (dose única); (ii) terapia única utilizando a ceftriaxona 250 mg IM (dose única); ou cefixima 400 mg VO (dose única); ou espectinomicina 2g IM (dose única). Todas as monoterapias devem seguir a epidemiologia local após a confirmação do perfil de resistência (WHO, 2016). No Brasil, de acordo com as recomendações mais atuais, a terapia combinada com azitromicina 1g (VO) mais ceftriaxona 500 mg IM (dose única) ainda é utilizada no tratamento da gonorreia (ANVISA, 2020). Entretanto, isolados clínicos resistentes à azitromicina, à cefixima e à ceftriaxona vêm sendo descritos em diversos países ao redor do mundo,

principalmente nos países da Ásia, da Europa e da América do Norte (Unemo & Shafer, 2014). A alteração no perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* também vêm sendo observados no Brasil (Ferreira et al., 2017; Costa-Lourenço et al., 2018; Bazzo et al., 2018; Martins et al., 2019).

O surgimento de clones resistentes aos antimicrobianos tem levado a mudanças na epidemiologia de infecções causadas por *N. gonorrhoea* (Młynarczyk-Bonikowska, 2019). As técnicas de tipagem molecular permitem a melhor compreensão da evolução e da disseminação dos isolados de *N. gonorrhoeae* em uma determinada região e em distintos países (Demczuk et al., 2017). De acordo com o sistema de tipagem molecular, do inglês *Neisseria gonorrohoeae multi-antigen sequecing typing* (NG-MAST)", os representantes do complexo clonal CC1 NG-MAST (G1407 GN-MAST) são os mais comumente encontrados (Demczuk et al., 2017). Além do NG-MAST, outras metodologias de tipagem também têm sido utilizadas, como a determinação do *Multi Loccus Sequencing Typing* (MLST), e do *Sequence Typing of Antimicrobial Resistance* (NG-STAR). De acordo com o NG-MAST, o genogrupo G1407, classificado como ST1407, é o ST mais frequentemente isolado na Europa. Este genogrupo engloba mais de 330 STs, entre eles estão os ST3128, ST3158, ST4120 e ST5332, os quais possuem relevâncias distintas de acordo com o país de origem (Jeverica et al., 2014; Endimiani et al., 2017). Já pela técnica de MLST, os STs mais prevalentes ao redor do mundo são o ST1901 e o ST90 (Demczuk et al., 2017). De acordo com um relato mais recente, os STs mais prevalentes no Brasil são: MLST ST1588 e ST1901, NG-MAST ST1407 e NG-STAR ST90 (Golparian et al., 2020).

O maior acesso ao sequenciamento do genoma total tem contribuído para a melhor compreensão da epidemiologia global de *N. gonorrhoeae*. No Brasil, a relação genética entre os isolados de *N. gonorrhoeae* foi estudada por Golparian e colaboradores (2020), com gonococos recuperados no ano de 2015 a 2016 de diferentes regiões brasileira e por Costa-Lourenço e colaboradores (2017) com cepas recuperadas entre os anos de 2006 a 2015 na cidade do Rio de Janeiro. Com o objetivo de contribuir para o delineamento da epidemiologia brasileira e para melhor caracterização dos mecanismos genéticos de resistência de isolados de *N. gonorrhoeae*, neste presente estudo foram avaliados os genomas de clones representativos de *N. gonorrhoeae* recuperados ao longo 12 anos, entre os anos de 2003 e 2015 da cidade mais populosa do Brasil, a cidade de São Paulo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

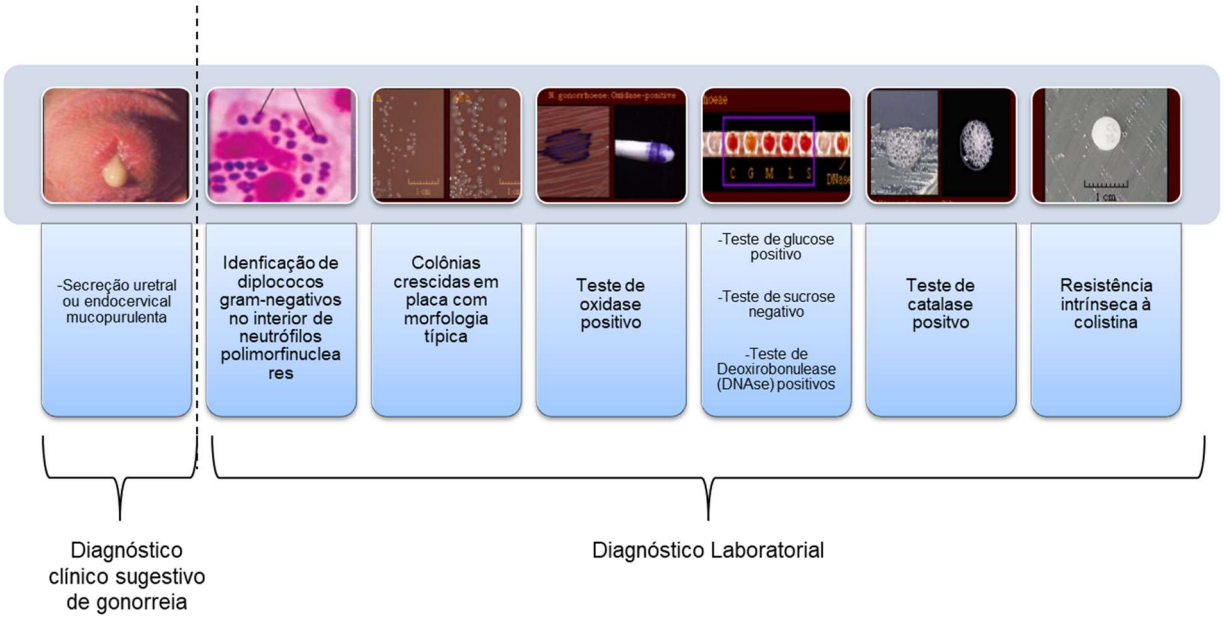
Caracterizar genotipicamente os isolados clínicos representativos de *N. gonorrhoeae* (n=13) que apresentaram Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) ≥ 0,06 mg/L e/ou ≥ 0,5 mg/L para ciprofloxacino e azitromicina, respectivamente, recuperados do Centro de Referência de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis - AIDS (CRT- AIDS) localizado na cidade de São Paulo, no período de 2003 a 2015.

2.2. Objetivos Específicos

- Sequenciar o genoma dos isolados de *N. gonorrhoeae* selecionados (n=13);
- Determinar o *Multi Locus Sequencing Typing* (MLST) dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* sequenciados.
- Estabelecer a relação filogenética entre os isolados de *N. gonorrhoeae* incluídas no estudo e os gonococos descritos ao redor do mundo.
- Determinar os mecanismos genéticos de resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica dos isolados de *N. gonorrhoeae*;
- Caracterizar e realizar a análise comparativa dos plasmídeos encontrados nos isolados de *N. gonorrhoeae*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A suspeita de gonorreia é feita a partir da história clínica e do exame físico, onde se observa a discarga de secreção muco-purulenta pela uretra ou pelo cérvix uterino em pessoas com atitudes sexuais de risco (https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm). O diagnóstico laboratorial de gonorreia é realizado pela detecção do agente *N. gonorrhoeae* em amostras de secreções por meio das técnicas de microscopia, cultura e testes de amplificação de DNA (Unemo & Shafer, 2014). No caso de infecção uretral sintomática em homens, a microscopia continua sendo uma técnica útil, pois o microrganismo pode ser visto como um diplococo gram-negativo no interior de leucócitos polimorfonucleares (https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm). Entretanto, a sensibilidade e especificidade da cultura são dependentes da coleta e do transporte adequados, e também da correta técnica de cultivo, podendo chegar a 100%. (Unemo & Shafer. 2014). A **Figura 1** ilustra os principais testes sugestivos e dependentes de cultura para identificação de *N. gonorrhoeae* utilizados pela clínica e por laboratórios de rotina (https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm).



Fonte e figuras: Adaptado de (https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm).

Figura 1 Testes Laboratoriais empregados para o diagnóstico de gonorreia.

3.1. Epidemiologia Global dos Isolados Clínicos Multirresistentes *de N. gonorrhoeae* e os programas de vigilância distribuídos nos cinco continentes

Os programas de vigilância, vinculados à *"*WHO- *Gonococcal Surveillance Program* (WHO-GASP)*"* foram implementados a fim de monitorar tendências de resistência a antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae*, identificar fenótipos emergentes e fornecer evidências para refinamento de diretrizes de tratamento e políticas de saúde pública globalmente (WHO, 2018). Embora a resistência antimicrobiana seja um fenômeno emergente envolvendo os isolados de *N. gonorrhoeae* ao redor do mundo, e mesmo havendo uma tedência de padronização nos critérios de sensibilidade e resistência, a interpretações das CIMs e a análise de dados é um grande desafio, pois os distintos centros vinculados ao WHO-GASP adotam distintos pontos de corte para os antimicrobianos preconizados (Costa-Lourenço et al., 2018). **Tabela 1.**

Nos EUA, o "*Gonococcal Isolate Surveillance Program* (GISP)" é responsável por realizar uma análise mensal de isolados de *N. gonorrhoeae* recuperados de homens com síndrome uretral provenientes de laboratórios situados em cinco regiões do país. No ano de 2014, dados do GISP mostraram que 30% dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* recuperados de secreções uretrais de homens que mantêm relações sexuais com homens, apresentaram CIMs >1 µg/mL para ciprofloxacino. Essa taxa de resistência foi superior àquela obtida no outro grupo de homens que mantêm relações sexuais com mulheres, no qual 12% dos isolados foram resistentes a ciprofloxacino. Ainda neste mesmo estudo, 0,7% e 2,5% dos gonococos recuperados de ambos os grupos, apresentaram uma diminuição da sensibilidade à cefixima (CIM ≥ 0,25 µg/mL) e à azitromicina (CIM ≥ 2,0 µg/mL), respectivamente (CDC, 2014). Entretanto, dados publicados mais recentemente pelo GISP, mostraram que entre os anos de 2014 e 2018, a taxa de resistência a ciprofloxacino entre o grupo de homens que mantêm relações sexuais com homens aumentou para 40%, enquanto para homens que mantêm relações sexuais com mulheres foi de 25,2%. Esses dados mostram um aumento significativo de resistência desde a última publicação em 2014. Foi possível observar também que houve um aumento nas taxas de resistência à azitromicina para 4,6% no ano de 2018. A taxa de sensibilidade dos isolados que

apresentaram sensibilidade à ceftriaxona se manteve baixa (0,2%) entre os anos de 2014 a 2018 (CDC, 2018). No Canadá*, o National Microbiology Laboratory* (NML)" é responsável por realizar os testes de sensibilidade dos isolados clínicos de *N. gonrrohoeae* provenientes de laboratórios públicos distribuídos no país. Dados publicados em 2014 mostraram que 2,5% dos gonococos apresentaram uma redução da sensibilidade às cefalosporinas e 3,4% foram resistentes à azitromicina (Canada PHA, 2014). De acordo com a última publicação do NML, a proporção de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* multirresistentes aumentou de 4,5% para 12,2% entre 2014 e 2017, e, em 2018, houve uma diminuição para 8,0%. Porém, em 2018 foi identificado o primeiro isolado canadense resistente à ceftriaxona (Canada PHA, 2018). Em relação ao ciprofloxacino, 53,3% dos isolados eram resistentes a esse antimicrobiano.

Em 2014 "*European Gonococcocal Antimicrobial Surveillance Program* (Euro-GASP)" contava com cerca de 21 países europeus, e seguindo os padrões estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) reportou que, em 2013, taxas de resistência ao ciprofloxacino e à azitromicina foram de 53% e 5%, respectivamente. As taxas de resistência à cefixima (1,4%) no ano de 2013 foram consideravelmente superiores àquelas reportadas nos EUA (ECDC, 2014). Além disso, três isolados de *N. gonorrhoeae* (0,1%), classificados como resistentes à ceftriaxona, foram detectados na Europa. Também foram observados aumentos das taxas de resistência à azitromicina (7,6%) e a ciprofloxacino (38%) (ECDC, 2018).

Recentemente, o "*Australian Gonococcal Surveillance Program* (AGSP)" publicou em seu último boletim, referente aos isolados recuperados no ano de 2020, que 0,9% dos gonococos apresentaram um perfil de sensibilidade reduzida às cefalosporinas. As taxas de resistência à azitromicina, ao ciprofloxacino e à penicilina foram de 3,9%, 36,4% e 26,6%, respectivamente (AGSP, 2021).

Em 2010, 11 dos 19 países asiáticos apresentaram taxas de resistência a ciprofloxacino superiores ou iguais a 90%, de acordo com o programa WHO-GASP. Neste mesmo estudo, as taxas de resistência à azitromicina variaram de 1% a 34%. A diminuição da sensibilidade para ceftriaxona variou de acordo com a região geográfica. As maiores taxas de redução da sensibilidade à ceftriaxona foram na China (55%), Coréia do Sul (29,3%), Japão (20,3%) e Índia (10,1%), enquanto a menor taxa foi detectada em Singapura (1%). De acordo com os dados mais recentes

publicados pela WHO, as taxas de resistência ao ciprofloxacino variaram de 71% a 100% na Ásia, enquanto para azitromicina e para as cefalosporinas, essas taxas de resistência variaram em até 30% **(Figuras 2 a 3)** (WHO, 2018). Na América Latina (GASP-LAC), as taxas de resistência ao ciprofloxacino também variaram de 71% a 100%. Além disso, foi reportada uma diminuição da sensibilidade às cefalosporinas (≤0,1%) na maioria dos países. As taxas de resistência à azitromicina também variaram entre os distintos países, sendo a maior taxa (70%) de resistência a esse antimicrobiano reportada no Peru (WHO, 2018) **(Figuras 2 a 3).**

No Brasil, estudos sobre o perfil de resistência em isolados de *N. gonorrhoeae* vem sendo publicados desde 2007 por Belda-Junior, em gonococos recuperados na cidade de São Paulo, que já apresentavam uma diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos preconizados naquela época, como penicilina, tetraciclina e espectinomicina. Novos estudos nessa área com dados de outros estados foram publicados somente em 2011. Em Manaus, cepas resistentes a ciprofloxacino foram avaliadas quanto às mutações na região *quinolone resistent-determining region (*QRDR) em um isolado que também apresentava um perfil de resistência à penicilina (Ferreira et al., 2011). Uehara e colaboradores (2011) mostraram um aumento de gonococos resistentes a ciprofloxacino, recuperados no estado do Rio de Janeiro entre 2006 e 2010, de 6,2% em 2006 para 33,3% em 2010. Neste mesmo estudo foi observado que 32% destes isolados eram resistentes à penicilina e à tetraciclina. Já em Minas Gerais, 100% das cepas clínicas de *N. gonorrhoeae* recuperadas entre os anos de 2011 e 2012 foram sensíveis à cefixima e à cefriaxona. Além disso, neste mesmo estudo, foram observadas as seguintes taxas de resistência a: penicilina (22,4%), tetraciclina (32,3%), ciprofloxacino (21,9%) e azitromicina (4,5%) (Costa et al., 2013). Com base na necessidade de se obter dados representativos de todo o país, foi criado o primeiro programa de vigilância antimicrobiana para *N. gonorrhoeae* no Brasil, o qual englobou as amostras recuperadas de centros de referência sentinelas, localizados nas cincos regiões brasileiras (Bazzo et al., 2018). Esses autores reportaram que, em geral, as taxas de resistência eram de 65,6%, 58% e 9,9% ao ciprofloxacino, à penicilina e à azitromicina, respectivamente. Entre os resultados obtidos, alguns dados chamam a atenção, como as altas taxas de resistência à tetraciclina (80%) em isolados recuperados na cidade de São Paulo. Em geral, os isolados de *N. gonorrhoeae* recuperados em São Paulo apresentaram taxas de

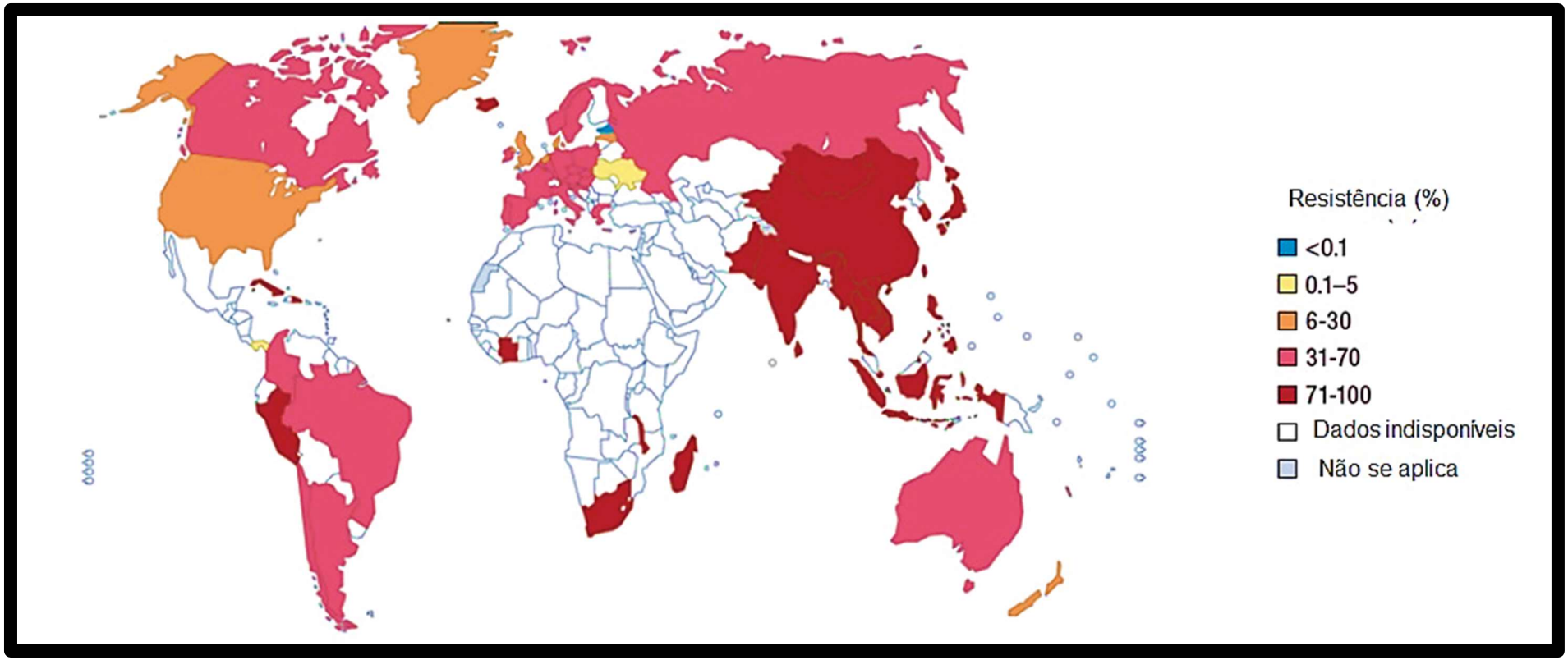
resistência à maioria dos antimicrobianos testados, superiores àquelas de isolados recuperados em outros estados (Bazzo et al., 2018).

Metodologias de tipagem (*Sequence Typing* – ST) são frequentemente utilizadas com a finalidade de se entender a disseminação e a evolução da resistência dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* em uma determinada localidade e em distintas regiões geográficas (Demczuk, 2017). A determinação do MLST é baseada nas variações alélicas entre os sete genes (*abcZ, adk, aroE, fimO, gdh, pdhC e pgm*) presentes no genoma de isolados de *N. gonorrhoae* (MLST). Já a determinação do *MultiAntigen-Sequence Typing* (NG-MAST) se baseia no sequenciamento e análise de fragmentos internos de dois dos mais variáveis genes de *N. gonorrhoeae, porB* (porina) e *tbpB* (proteína ligadora de transferrina), que codificam proteínas de membrana, e possui a finalidade de identificar a rápida variação genômica que pode ocorrer entre os isolados de *N. gonorrhoeae*. Outra metodologia utilizada para a tipagem de isolados de *N. gonorrhoeae* é a *Sequence Typing of Antimicrobial Resistance* (NG-STAR), que se baseia na classificação de setes genes que codificam resistência às cefaloporinas, às fluoroquinolonas e aos macrolídeos previamente caracterizados (*penA, mtrR, porB, ponA, gyrA, parC,* e *23S rRNA*) (Costa-Lourenço et al., 2017). De acordo com o MLST, NG-MAST e NG-STAR, é possível observar que os STs mais frequentemente associados com a disseminação e a evolução dos gonococos ao redor do mundo são os ST1901, ST1407 e ST90, respectivamente (Costa-Lourenço et al., 2018; Golparian et al., 2020). O sequenciamento de plasmídeos que carregam genes de resistência em isolados de *N. gonorrhoeae* também poderiam constituir uma ferramenta que auxiliaria na compreensão de como esses genes se disseminam entre a população de *N. gonorrhoeae*, auxiliando assim a compreensão da epidemiologia molecular (Cehovin & Lewis, 2017)

Tabela 1 Pontos de corte de resistência e/ou diminuição da sensibilidade para isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* frente aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica de acordo com os últimos boletins pulicados CLSI (2021), GISP (2018), NSP (2018), EUCAST (2021), Euro-GASP (2021) e AGSP (2020)

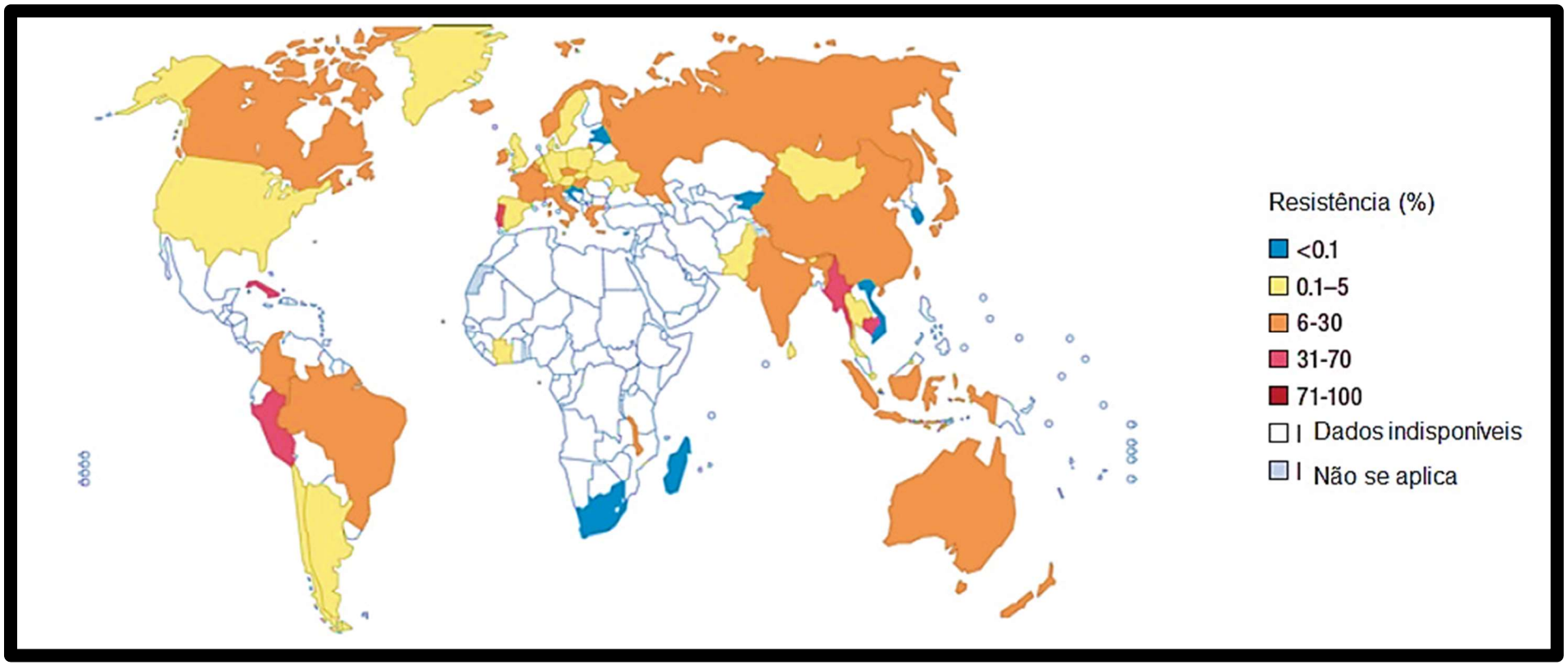
Antimicrobianos	Ponto de corte de Resistência (mg/L)[a]				
	CLSI	GISP	NSP[e]	EUCAST / Euro-GASP	AGSP
Penicilina	≥2,0	≥2,0	-	>1;0	≥1,0
Cefixima	≥0,25 *	≥0,25[b,c]	≥0,25	>0,125	-
Ceftriaxona	≥0,25 *	≥0,125[b,c]	≥0,25	>0,125	≥0,06[d]
Ciprofloxacino	≥1,0	≥1,0	≥1,0	>0,06	≥1,0
Azitromicina	≥2,0 *	≥2,0[b,c]	≥1,0	ECOFF 1,0	≥1,0

a. **Pontos de corte adotados como referência pelos programas de vigilância distribuídos nos distintos continentes.**
b. **De acordo com o GISP, tais CIMs para ceftriaxona e cefixima são classificadas como CIMs elevadas.**
c. **A maioria dos pontos de corte estabelecidos pelo GISP são baseados no CLSI. Até a elaboração do estudo em 2018, cefixima, ceftriaxona e azitromicina não tinham pontos de corte estabelecidos.**
d. **AGSP considera que isolados clínicos que apresentam CIM ≥ 0,06 para ceftriaxona são classificados como perfil da sensibilidade reduzida.**
e. **Pontos de corte do NSP (Canadá) foram baseados no trabalho publicado por Costa-Lourenço, et al., 2018.**



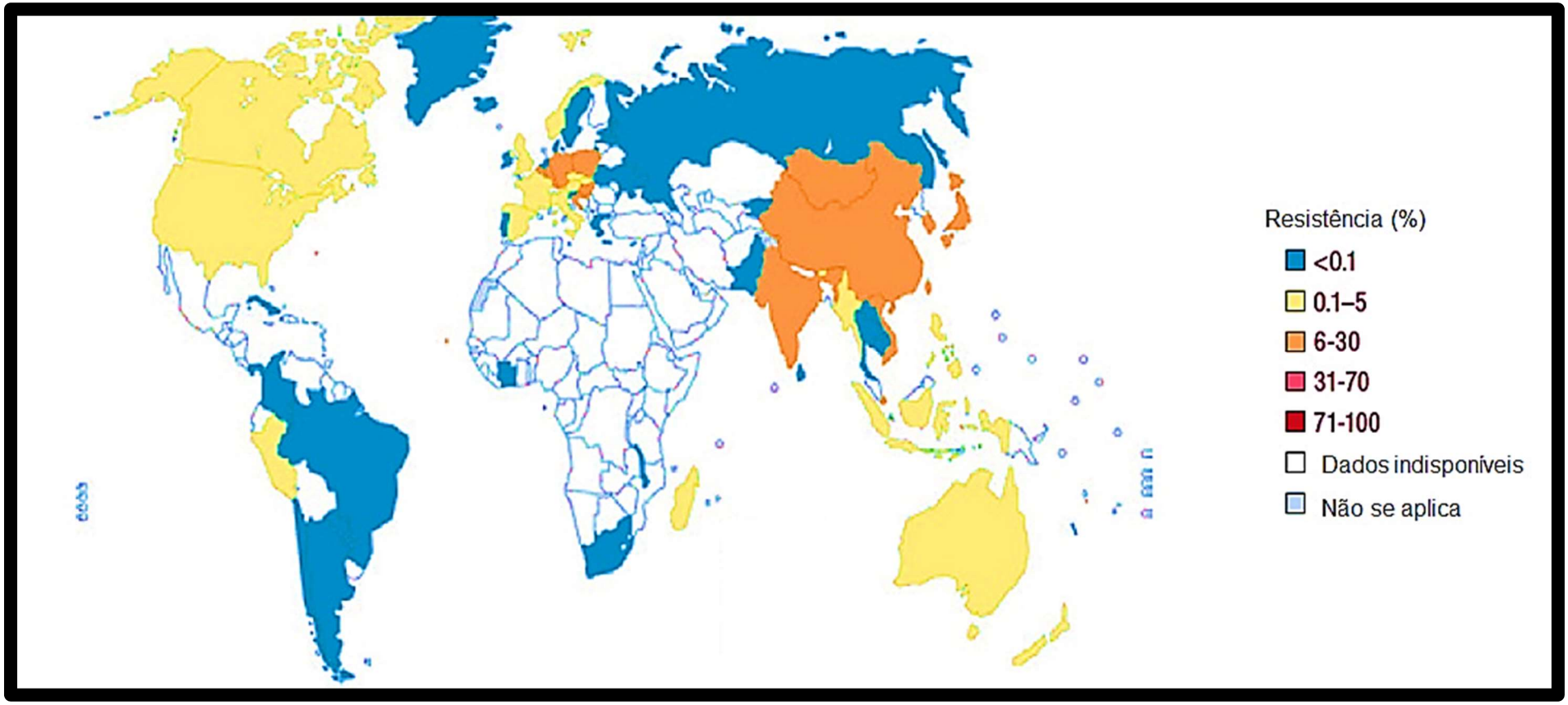
Fonte: (Adaptado de WHO-GASP, 2018)

Figura 2 Porcentagem de resistência ao ciprofloxacino reportada pelos países participantes do Programa de Vigilância GASP (2018).



Fonte: (Adaptado de WHO-GASP, 2018)

Figura 3 Porcentagem de resistência à azitromicina reportada pelos países participantes do Programa de Vigilância GASP (2018).



Fonte: (Adaptado de WHO-GASP, 2018)

Figura 4 Porcentagem de resistência às cefalosporinas reportada pelos países participantes do Programa de Vigilância GASP (2018).

Assim como para a maioria das bactérias, os mecanismos de resistência aos antimicrobianos relatados em isolados de *N. gonorrhoeae* podem ser intrínsecos ou adquiridos e são divididos em quatro grupos: inativação do antimicrobiano por ação enzimática; modificação do seu sítio de ação; alteração da permeabilidade de membrana e hiperexpressão dos sistemas de efluxo. Os genes responsáveis por codificar estes determinantes de resistência podem estar situados no cromossomo e/ou em plasmídeos (Ashford, et al., 1976; Phillips et al., 1976). Na **Tabela 2** encontram-se os mecanismos envolvidos na resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica descritos em isolados de *N. gonorrhoeae*.

O uso de antimicrobianos para o tratamento da gonorreia exerce pressão seletiva que favorece a seleção e a disseminação de isolados resistentes como pode ser observado na **Figura 5**. Essa situação é ainda mais agravada pela capacidade de isolados de *Neisseria s*pp. comensais, que habitam a orofaringe e/ou reto, poderem transferir determinantes genéticos de resistência por transformação para outros gonococos (Unemo & Shafer, 2014).

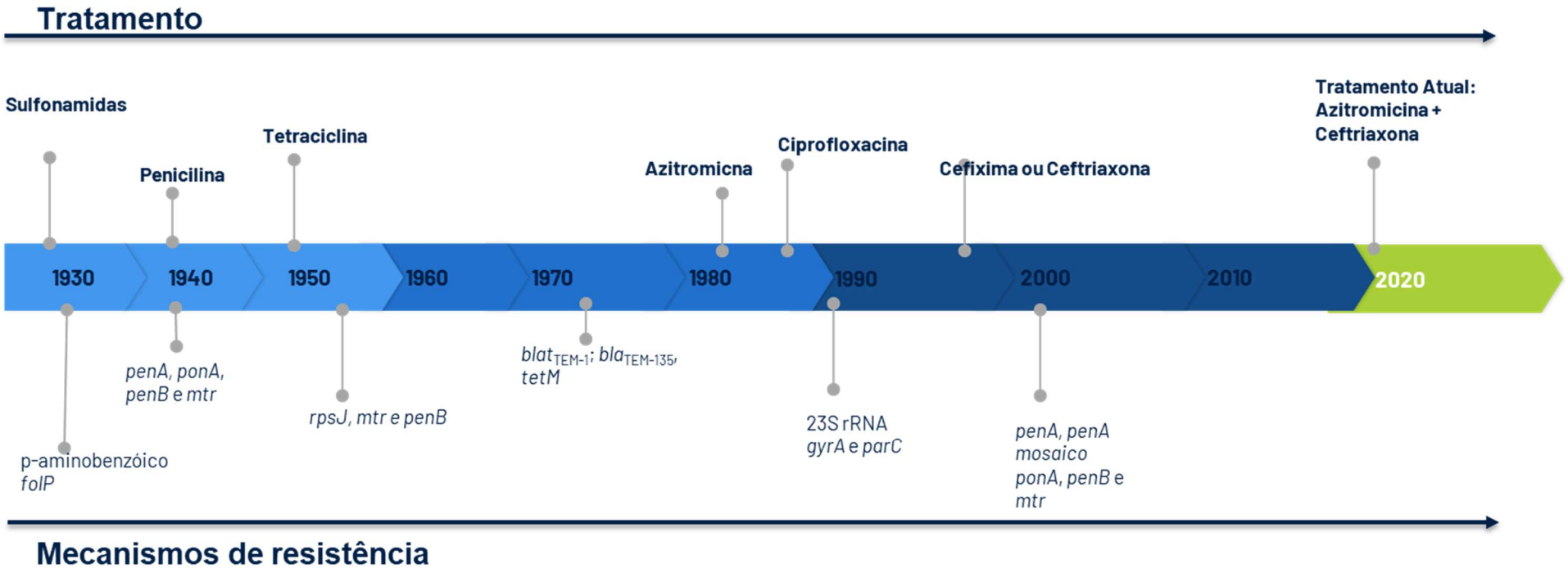
Tabela 2 Mecanismos de resistência (mutações e genes adquiridos) relatados em *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos recomendados para o tratamento da gonorreia desde a década de 70 (Adaptado de Unemo & Shafer, 2014; Eyre et al., 2017)

Determinantes	Principais alterações	Função	Antimicrobianos afetados					
			SUL	TET	PEN	CIP	AZT	CEF
-	↑umento da síntese de p-aminobenzoico	-	X					
folP	Sítio de ligação DHPS	Diminui a afinidade com o antimicrobiano	X					
Interrupção do promotor *mtR*	do A na repetição (-35A); A->na repetição (-38);	Hiper-expressão, aumento do efluxo e dimuição do influxo pelo sistema MtrCDE	X	X	X		X	X
mtrR	A39T; G45D		X	X	X		X	X
penA	/, I312V, V316T, V316P, T483S, A501V, N512Y, G545S, A501P, A501V, A501T, G542T, P551S, P551L F504L, A510V, A516G, H541N, P551L, P552V, K555Q, I556V, I566V, N573A, A574V, A311V, I312V, V316T, T483S, A501V, N512Y, G545S, A501P, A501T	Gene codificador de PBP2			X			X
penB	G120K; A121D/N	Gene codificador da porina PorB1b (diminuição da permeabilidade de membrana)			X		X	X
ponA	L421P	Gene codificador de PBP1			X			X
pilQ[a]	E666K	Componente da membrana externa, membro da família das proteínas secretinas e envolvido na formação do pílus tipo IV			X			X
Fator X[b]	Fator desconhecido	Determinantes de resistência desconhecidos têm sido referidos como "*Fator X"*			X			X
***bla*$_{TEM}$**[d]	*bla*$_{TEM-1}$; *bla*$_{TEM-135}$, *bla*$_{TEM-220}$	Genes codificadores de β-lactamases do tipo TEM presentes em elementos genéticos móveis			X			
tetM[e]	plasmídeos Americanos e Holandeses	Genes presentes em plasmídeos denominados TetM						X
23S rRNA	C2611T; A2059G	Diminui a ligação do antimicrobiano com a porção ribossômica 50S					X	
ermB, ermC, ermF	Metilase	Altera o sítio de ligação 23S RNA					X	
macA-macB[f]	Mutação no promotor	Genes codificadores das bombas efluxo MacAB					X	
mef[g]	-	Genes codificadores das bombas de efluxo Mef.					X	
ere(A), ere (B)	-	Esterase					X	
gyrA	S91F; S95N; S95G	Redução da ligação das quinlonas à DNA girase				X		
parC	D86N; S88P; E91K; S87R/I/W	Redução da ligação das quinolonas à topoisomerase IV				X		
norM	Mutação em promotor	Hiper-expressão do sistema de efluxo				X		
rpsJ	V57M	Reduz a afinidade da tetracilina pela porção ribossômica 30S		X				

Nota: SUL, sulfonamidas, TET, tetraciclinas; PEN, penicilina; CIP, ciprofloxacin; AZT, azitromicina; CEF, cefalosporinas

[a] PilQ e o pílus do tipo IV formam juntos um completo multimérico, que atua como um poro para antimicrobianos e pequenas moléculas. Mutações em PilQ podem dificultar a criação do complexo mulitimérico, rompendo o poro formado e, portanto, diminuindo o influxo de determinados antimicrobianos (Costa-Lourenço et al., 2017))

[b] Determinantes de resistência desconhecidos têm sido referidos como "*Fator X",* quando nos experimentos de transformação, os determinantes *penA*, *mtrR*e *penB* aumentam a resistência à penicilina ou às cefaloposrinas de espectro estendido, mas não conferem os níveis de resistência do doador no receptor (Unemo et al., 2012)



Fonte: Este estudo.

Figura 5 Relação entre a evolução do tratamento antimicrobiano da gonorreia ao longo dos anos e o relato dos principais mecanismos de resistência.

3.2. Antimicrobianos Utilizados no Tratamento e Mecanismos de Resistência descritos em *N. gonorrhoeae*

3.2.1. Sulfonamidas

As sulfonamidas foram os primeiros antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por *N. gonorrhoeae.* Elas foram consideradas eficazes em 80 a 90% dos casos por aproximadamente cinco anos. Relatos de falhas terapêuticas à essa classe de antimicrobianos, começaram a ser descritos entre o período de 1940 a 1941 (Cokkinis & McElligott, 1937; Unemo & Shafer, 2014). Em 1944, foi relatada alta taxa de falha terapêutica (75%) com a utilização de sulfatiazol e sulfapiridina durante a segunda guerra mundial entre os soldados italianos e sicilianos (Campbell, 1944). Os antimicrobianos pertencentes à classe das sulfonamidas são inibidores competitivos da enzima bacteriana diidropteroatosintetase (DHPS), responsável pela incorporação do ácido para-aminobenzóico (PABA) no ácido diidropteróico, precursor imediato do ácido fólico (ácido dihidrofólico) (Harrison & Maiden 2021). Em isolados de *N. gonorrhoeae,* a resistência a essa classe de antimicrobiano se dá pela hiperprodução de ácido para-aminobenzóico, que compete com o antimicrobiano, ou por mutações em *folP* (mutações pontuais ou presença de um gene mosaico contendo sequências de DNA de *Neisseria* spp. comensais) (Harrison & Maiden, 2021). Essas mutações alteram a DHPS, que é o alvo do antimicrobiano, resultando em uma diminuição da afinidade pela sulfonamida (Costa-Lourenço et al., 2018).

3.2.2. Penicilina

Proveniente dos fungos pertencentes ao gênero *Penicillium*, a penicilina foi assim nomeada após sua descoberta acidental, em 1928, por Alexander Flemming. As penicilinas, bem como as cefalosporinas, são pertencentes à classe dos β-lactâmicos, antimicrobianos responsáveis por inibir a síntese de peptideoglicano por meio da inativação das proteínas ligadoras de penicilina, as PBPs [PBP1 (transpeptidase / transglicosilase) e PBP2 (transpeptidade) (Mlynarckczyk-Bonikowska et al., 2019).

Em 1930, Cecil Paine utilizou o extrato bruto de fungos produtores de penicilina, o *Penicillium nonatum* para o tratamento de oftalmias em crianças (Wainwright & Swan, 1986). Entretanto, apenas em 1943 foi efetivamente documentado o tratamento de uretrites causadas por *N. gonorrhoeae* utilizando este composto. A partir dessa época, a penicilina passou a ser uma opção no tratamento das infecções que apresentavam falha terapêutica com as sulfonamidas (Van Slyke et al., 1943; Unemo & Shafer, 2014). Após esse fato, relatos com aumentos da CIM para penicilina passaram a ser cada vez mais frequentes, devido ao acúmulo de determinantes cromossômicos de resistência (Franks, 1946; Reyn et al., 1958; Amies, 1967; Martin et al., 1970; Lewis, 2010; Unemo & Shafer, 2014). Entretanto, hoje podemos dizer que a resistência à penicilina pode ser mediada por mecanismos cromossômicos ou plasmidiais (Unemo & Shafer, 2014). As mutações cromossômicas cumulativas podem estar relacionadas com genes responsáveis pela síntese de parede celular (*penA* e *ponA*), ou estruturas que alteram a concentração antimicrobiana no espaço periplasmático (*penB, penC e mtrR*) (Costa-Lourenço et al., 2018).

3.2.2.1. Resistência Cromossômica à Penicilina

O aumento nas CIMs, e consequentemente o aumento nas taxas de resistência à penicilina, podem englobar uma combinação de mutações (Harrisson & Maiden, 2021). Entre essas mutações estão: i) as alterações em *penA*, gene codificador de PBP2, o principal alvo dos β-lactâmicos (Powell et al., 2009). Essas mutações são comumente adquiridas de *Neisseria* spp. comensais por transformação, e na maioria das vezes possui uma inserção de um aspartato (Asp345a), já as mutações restantes encontram-se na região C-terminal da proteína (Powell et al., 2009; Fedarovich et al., 2014); ii) presença dos genes *penA* mosaicos. Estes genes mosaicos contêm de 60 a 70 nucleotídeos modificados quando comparados com o gene *penA* de uma cepa selvagem. Essas mutações podem resultar em resistência às penicilinas e às cefalosporinas de terceira geração (Tomberg et al., 2010); iii) alteração em *ponA* (L421P), gene codificador de PBP1. Esta única alteração possui a capacidade de diminuir a acilação com o β-lactâmico (Unemo & Shafer, 2014); iv) alterações que afetam a expressão de sistemas de efluxos da família MtrCDE (*mtrR*) (Hagman et al., 1995; Warner et al., 2008); v) alterações em *porB,* gene que codifica a porina PorB1b (Olesky et al., 2002; Olesky et al., 2006); vi) alterações específicas em *pilQ*, uma

secretina envolvida na formação do pílus tipo IV, importante componente da membrana externa, e essencial na patogenicidade gonocócica. Juntos, PilQ e pílus tipo IV, formam um complexo SDS-multimérico resistente, com uma característica semelhante a um poro para a entrada dos antimicrobianos e de pequenas moléculas. Entretanto, mutações em *pilQ*, prejudicam a formação de PilQ multimérico, diminuindo assim o influxo da penicilina (Zhao et al., 2005); vii) presença do *Fator X*, um fator desconhecido, utilizado para explicar aumento de CIMs em até 6 vezes, quando os demais mecanismos acima descritos não são encontrados (Unemo & Shafer, 2014)

3.2.2.2. Resistência Plasmidial às Penicilinas

CIMs mais altas (>4,0 mg/L) às penicilinas podem ser observadas em isolados que carreiam genes codificadores de β-lactamases, neste caso, o gene *bla*$_{\text{TEM-1}}$ é o mais comumente relatado. Adicionalmente, sabe-se que os plasmídeos encontrados nos gonococos foram provavelmente adquiridos através da conjugação com *Haemophilus parainfluenzae* (Elwell et al., 1977; Roberts et al., 1979). Logo em seguida das primeiras descrições de isolados de *N. gonorrhoeae* contendo plasmídeos carreadores de genes que codificam β-lactamases (Ashford, et al., 1976; Phillips et al., 1976), novos casos foram reportados ao redor do mundo. Os plasmídeos Asiáticos (7.426 pb) e os Africanos (5.599 pb são os mais comumente observados em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* e são considerados ancestrais dos demais plasmídeos mundialmente descritos, (Pagotto et al., 2000; Unemo & Shafer, 2014). Outros plasmídeos foram nomeados de acordo com as suas origens epidemiológicas, entre eles o plasmídeo Toronto (Dillon & Yeung, 1989) e o plasmídeo Rio (praticamente idêntico ao Toronto) (Van Embden et al., 1985), Nimes (Gouby et al., 1986), Nova Zelândia (Brett, 1989), e Johannesburgo (Muller et al., 2011. Embora, *bla*$_{\text{TEM-1b}}$ codifique a β-lactamase mais comumente observada entre os plasmídeos gonocócicos, o *bla*$_{\text{TEM-135}}$, que se difere por apenas um único nucleotídeo de *bla*$_{\text{TEM-1}}$ também já foi descrito (Ohnishi et al., 2010). Mais recentemente, isolados de *N. gonorrhoeae* que carreavam o plasmídeo Rio-Toronto recuperados na Argentina carreavam *bla*$_{\text{TEM-220}}$, que difere de *bla*$_{\text{TEM-135}}$ também por única substituição nucleotídica na posição 547 (G->A), resultando na substituição dos aminoácidos A185T (Gianecini et al., 2015). TEM-1, TEM-135 e TEM-220 são β-lactamases de espectro ampliado e conferem resistência somente às penicilinas.

3.2.3. Tetraciclina

A primeira tetraciclina, clortetraciclina, foi introduzida, em 1945, por Benjamin Minge Duggar e passou a ser utilizada no tratamento da gonorreia, principalmente em pacientes alérgicos à penicilina (Unemo & Shafer, 2014). Entretanto, as CIMs para tetraciclina começaram a aumentar consideravelmente ao longo do tempo, devido a mutações cromossômicas, assim como para penicilina (Costa-Lourenço et al., 2018). Os antimicrobianos pertencentes à essa classe de antimicrobiano são caracterizados por se ligarem a subunidade ribossômica 30S, interferindo a síntese proteica bacteriana (Chopra et al., 2005).

3.2.3.1. Resistência Cromossômica às Tetraciclinas

A resistência cromossômica às tetraciclinas ocorre por mutações, que modificam a estrutura alvo da proteína ribossômica, diminuindo assim a afinidade dessa classe de antimicrobiano ao ribossomo. Entretanto, mecanismos envolvidos com o aumento de efluxo e diminuição do influxo do antimicrobiano também já foram descritos (Unemo & Shafer. 2014). De acordo com o estudo de Sparling e colaboradores (1975), foi possível observar que alterações em *rpsJ*, *mtrR (*reprime a transcrição da bomba de efluxo codificada por *mtrCDE)* e *penB* (porina) estavam envolvidos no perfil de resistência à tetraciclina entre os isolados de *N. gonorrhoeae* avaliados. Alterações em um único aminoácido V57M na proteína ribossômica 10S (*rpsj*1) pode ser considerada o principal motivo do aumento da CIMs para tetraciclina entre os gonococos (Hu et al., 2005)

3.2.3.2. Resistência Plasmidial às Tetraciclinas

Os plasmídeos carreadores de *tetM* em isolados de *N. gonorrhoeae* são os principais elementos responsáveis pela disseminação deste mecanismo de resistência. De acordo com um estudo realizado por Morse e colaboradores (1986), foi possível observar que os gonococos carreadores de *tetM*, gene presente em plasmídeos conjugativos, apresentam altas CIMs (24-32 µg/mL) para tetraciclina. Este fato resultou na suspensão dessa classe de antimicrobiano para o tratamento da

gonorreia nos Estados Unidos e em diversos países ao redor do mundo (Roberts et al., 1988). Outros plasmídeos derivados, os plasmídeos nomeados como Uruguai e o América do Sul, carreadores de *tetM* também foram posteriormente identificados (Marquez et al., 2002; Chalkley et al., 1997). TetM é caracterizada por possuir a capacidade de se ligar ao ribossomo, causando a liberação da molécula de tetraciclina, permitindo assim a continuação da elongação da cadeia peptídica (Unemo & Shafer, 2021).

3.2.4. Espectinomicina

A espectinomcina se liga à subunidade 30S ribossômica, inibindo a tradução (Harrison et al., 2021). A resistência à espectomicina normalmente é mediada por alterações em *rpsE*, que codifica a proteína ribossômica S5, e pelas mutações T24P (mutação que pode resultar em baixos níveis de resistência a este composto). A deleção de Val25 e a alteração K26->E na proteína S5 da subunidade 30S ribossômica, também foram verificadas em isolados que apresentaram altas taxas de resistência à espectinomicina (Unemo & Shafer, 2014)

3.2.5. Fluoroquinolonas

As quinolonas têm como alvo de ação duas enzimas bacterianas, DNA girase e DNA topoisomerase IV, que pertencem ao grupo das toporisomerases do grupo II e são essenciais à sobrevivência bacteriana (Unemo & Shafer, 2014).

A DNA girase posssui duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB,* respectivamente. Já a toposiomerase IV é constituída por duas subunidades ParC e duas ParE, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente. A DNA girase atua no desenovelamento do DNA durante o processo de duplicação do DNA bacteriano, bem como no seu enovelamento. Enquanto que a toposiomerase IV tem a função de separar a nova cópia de DNA recém-formada, permitindo a divisão celular bacteriana. Ambas as enzimas alteram o estado topológico do DNA ao quebrar a fita dupla e passar as fitas de DNA por essa área de quebra e, a seguir, realizarem a restauração da área de quebra. A passagem da fita de DNA ocorre através de domínios localizados em GyrA e ParC, enquanto atividade ATPase, que é necessária para a catálise enzimática, ocorre através de domínios

localizados em GyrB e ParE (Jacoby, 2005; Hooper & Jacob, 2015). As quinolonas ligam-se reversivelmente aos complexos de DNA com girase e topoisomerase IV em a interface entre a proteína e o DNA próximo ao sítio ativo (Tyr122 para GyrA, Tyr120 para ParC na numeração de *Escherichia coli*), que é ligado covalentemente ao DNA durante passagem da fita de DNA, intercalando o DNA clivado (Hooper & Jacob, 2015).

As quinolonas inibem a função enzimática das topoisomerases ao bloquearem a restauração da área de quebra da fita dupla de DNA. Além disso, esse processo estabiliza um complexo covalente intermediário catalítico de enzima e DNA que serve como uma barreira para movimento do braço de replicação do DNA ou complexos de transcrição levando à quebra permanente da fita dupla de DNA. A quebra de fita de DNA desencadeia a resposta SOS de reparo do DNA bacteriano (Hiasa &Shea, 2000).

O ciprofloxacino foi desenvolvido em 1983, e em meados da década de 80 passou a ser utilizado no Reino Unido e nos Estados Unidos (Costa-Lourenço et al., 2018). Para o tratamento da gonorreia, foi preconizado incialmente a administração de uma única dose de 250 mg de ciprofloxacino. Entretanto, alguns anos depois, a diminuição da sensibilidade e, consequentemente, falhas terapêuticas começaram a ser relatadas (Jephcott & Turner, 1990; Gransden et al., 1990), sendo necessário o aumento da dose recomendada para o tratamento da gonorreia, que passou a ser de 500 mg (CDC, 1989). Mesmo com este aumento de dose para o tratamento dessas infecções, relatos de falhas terapêuticas continuaram a ser descritas durante a década de 90 (Birley et al., 1994; Tapsall et al., 1997). Os isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino costumam apresentar mutações na região determinante de resistência às quinolonas, QRDR, localizadas próximas ao sítio de ligação das topoisomerases. Os códons 87 e 91 são os mais comumente aleterados entre os gonococos (Giles et al., 2004).

Dados publicados mais recentemente mostram que as taxas de resistência a ciprofloxacino ainda se encontram em ascensão em diversos países de distintos continentes. Nos EUA, o GISP, mostrou que a taxa de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino, obtidos entre a população de homens que mantêm relações sexuais com homens era de 40%, uma porcentagem superior quando comparada ao grupo de homens que mantêm reações sexuais com mulheres (25,2%) (CDC, 2018). Já NML, no Canadá, mostrou que em 2018 a taxa de resistência a ciprofloxacino entre os gonococos foi de 53,3%. De acordo com o último relatório do

WHO-GASP (2018), altas taxas de gonococos resistentes a ciprofloxacino (71 a 100%) foram observados na Ásia e na América Latina. No Brasil, a taxa de resistência a ciprofloxacino foi de 65,6% (Bazzo et al., 2018).

3.2.6. Macrolídeos

O primeiro macrolídeo descrito foi a eritromicina (1952), isolado do *Streptomyces erythraeus*, atualmente conhecido como *Saccharopolyspora erythraea.* Apenas em 1980, a azitromicina, um derivado semissintético da eritromicina passou a ser o principal macrolídeo utilizado no tratamento das ISTs (Unemo & Shafer, 2014). Entretanto, já em meados da década de 1990, o aumento das taxas de resistência à azitromicina foi reportado na América Latina (Dilon et al., 2013). O primeiro relato de isolados de *N. gonorrhoeae* resistente à azitromicina ocorreu na Argentina no ano de 2001 (Galarza et al., 2009). Atualmente, é possível observar descrições de isolados de *N. gonorrhoeae* que apresentam altas CIMs para azitromicina (> 256 mg/L) em diversos países (Palmer et al., 2008; Chisholm et al., 2010; Galarza et al., 2010; Starnino et al., 2009; Katz et al., 2012; Unemo et al., 2014). Baseado nestes fatos, a azitromicina não é recomendada como monoterapia no tratamento da gonorreia (Unemo & Shafer, 2014).

Os macrolídeos são capazes de inibir a síntese proteica por se ligarem na subunidade ribossômica 50S, evitando a translocação do peptidil-tRNA. Essa ligação bloqueia a saída peptídica no sítio de saída da subunidade 50S pela interação com o 23S rRNA, causando uma elongação peptídica deficiente (Douthwaite & Champey, 2001).

Distintos mecanismos podem estar envolvidos na resistência à azitromicina entre os isolados de *N. gonorrhoeae*. Modificações no sítio de ligação do 23S rRNA causadas pela presença de metilases, no domínio 23S rRNA e hiperexpressão de bombas de efluxo podem causar as elevações das CIMs para azitromicina (Unemo & Shafer, 2014). A porção 23S do RNAr da sub-unidade 50S do ribossoma bacteriano constitui o sítio de ligação dos macrolídeos. A produção da enzima 23S RNA adenil-metilase codificadas pelos genes *erm*, leva à modificação estrutural deste sítio de ação, impedindo que os macrolídeos se liguem. A presença dos genes *erm (ermB, ermC e ermF),* que codificam rRNA metilases, não é frequentemente descrita em isolados de *N. gonorrhoeae* (Demczuck et al., 2016). Adicionalmente, mutações

pontuais no sítio de ligação do 23S RNA podem resultar em baixos níveis de resistência à azitromicina, como é o caso da mutação C2611T, ou podem levar a um aumento considerável da CIM para azitromicina (A2059G) (Chilshom et al., 2010; Galarza et al., 2010; Katz et al., 2012). Entretanto, as CIMs para os antimicrobianos da classe dos macrolídeos entre os gonococos estão relacionadas ao número de mutações encontradas nos quatro genes alélicos do 23S rRNA. A mutação A20591G em três ou quatro genes alélicos do 23S rRNA podem resultar em uma CIM para azitromicina de 256 μg/mL a 4096 μg/mL (Unemo et al., 2014).

A hiperexpressão da bomba de efluxo MacAB (Rouquette-Loughlin et al., 2005) e a presença da bomba de efluxo Mef também podem alterar as CIMs para azitromicina (Luna et al., 2000), porém assim como para as às penicilinas alterações na expressão das bombas de efluxo da família MtrCDE são as mais comumente associadas às CIMs elevadas para azitromicina (Unemo & Shafer, 2014; Costa-Lourenço et al., 2018)

3.2.7. Cefalosporinas

A primeira cefalosporina foi isolada a partir de culturas dos fungos *Cephalosporium acremonium* por Giuseppe Brotzu em 1948. Modificações químicas desse composto resultaram na primeira cefalosporina utilizada no tratamento das infecções, a cefalotina (1964) (Unemo & Shafer, 2014). As cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona e cefixima) foram incluídas no tratamento da gonorreia após as descrições de isolados resistentes às fluoroquinolonas (Newman et al., 2007; Bignel & Unemo, 2013;**)**. Entretanto, como a cefixima não é comercializada em todos os países, outras cefalosporinas foram incorporadas ao tratamento da gonorreia, como é o caso da cefditoren/cefdinir no Japão, da cefuroxima na Europa e da cefpodoxima nos Estados Unidos (Ison et al., 2004; Newman et al., 2007; Barry et al., 2009). No Brasil, Ferreira e colaboradores, no ano de 2017 observou um isolado de *N. gonorrhoeae*, recuperado em Manaus, com CIM de 0,064 mg/L (E-test) para ceftriaxona.

As cefalosporinas, assim como outros β-lactâmicos, são capazes de inibir a síntese de peptideoglicano por meio da inativação das proteínas ligadoras de penicilina, as PBPs (PBP1 e PBP2) (Unemo & Shafer, 2014), e assim como para as penicilinas a resistência às cefalosporinas se dá essencialmente pelas alterações nas PBPs (Powel et al., 2009). O primeiro isolado de *N. gonorrhoeae* resistentes às

cefalosporinas de amplo espectro apresentou alterações em *penA,* gene que codifica a PBP2 (Bary et al., 2009). A presença dos genes *penA* mosaicos (60 a 70 alterações de aminoácidos) é normalmente associada as altas CIMs para cefalosporinas (Unemo & Shafer, 2014). Entretanto, outras mutações podem resultar em diminuição da sensibilidade ou até mesmo na resistência à cefixima como é o caso das alterações G545S, I312M e V316T em *penA* (Takahata et al., 2006; Osaka et al., 2008). Tomberg e colaboradores (2010) observaram que as mutações N512Y e A501V nos alelos mosaicos de *pbp2* também estão associados à redução de sensibilidade às cefalosporinas. Posteriormente, foi comprovado que as mutações em A311V, V316P e T483S também poderiam alterar as CIMs para cefixima e ceftriaxona (Tomberg et al., 2013). Além disso, alterações em G542S, P551S e P551L estão associadas a altas MICs somente para ceftriaxona em isolados de *N gonorrhoeae* (Unemo & Shafer, 2014). Outros mecanismos, além das mutações no gene *penA*, também estão envolvidos na redução da sensibilidade às cefalosporinas, como a hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo e diminuição do influxo do antimicrobiano causado por alterações em *mtrR* e *penB,* respectivamente. Mutações em *penB* podem produzir alterações na Porina PorB1B, a principal porina de *N. gonorhoeae*, resultando em uma diminuição no influxo de antimicrobianos através dos canais da porina. É interessante que o aumento da resistência conferida por *penB* requer a presença de uma mutação em *mtrR* (Olesky, Hobbs & Nicholas, 2002; Olesky et al., 2006; Cristillo et al., 2019). Assim como para a penicilinas, o *Fator X* também pode influenciar na resistência às cefalosporinas. (Tomberg et al., 2010; Ohnishi et al., 2011; Unemo et al 2012b).

3.3. Elementos Genéticos Móveis em isolados de *N. gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae é considerada naturalmente competente, sendo capaz de adquirir e recombinar DNA em seu cromossomo durante todos os estágios de crescimento. Em *N. gonorrhoeae*, o sistema de secreção do tipo IV secreta para o meio externo fitas simples de DNA independente do contato facilitando a transferência de DNA por transformação (Callghan et al., 2017). Sabe-se também que o processo de conjugação é bastante importante para a mobilização de plasmídeos em *N. gonorrhoeae.* Três tipos de plasmídeos classificados e nomeados de acordo com seus respectivos contextos genéticos são comumente observados em *N. gonorrhoeae*, são eles: plasmídeos crípticos, plasmídeos conjugativos e plasmídeos carreadores de β-

lactamases (BlaTEM) (Cehovin & Levis, 2017). De acordo com as sequências plasmidiais depositadas no GeneBank, é possível observar que os três plasmídeos são encontrados em isolados distribuídos ao redor do mundo **(Figura 6).**

3.3.1. Plasmídeos Crípticos (não conjugativos)

O plasmídeo críptico (pJD1) foi o primeiro plasmídeo identificado em um isolado de *N. gonorrhoeae* (Engelkirk & Schoenhard, 1973). Os plasmídeos crípticos possuem em média um tamanho aproximado de 4,2 Kb e estão presentes em 96% dos isolados de *N. gonorrhoeae* descritos (Roberts et al., 1979). São compostos por ORFs que codificam uma replicase, um sistema toxina-antitoxina VapD/VapX, proteínas de mobilização, e proteínas hipotéticas (Korch et al., 1985; Sarandopoulos & Davies 1993, Cehovin & Levis, 2017). Este sistema VapD/VapX já foi relatado anteriormente entre os isolados de *Helicobacter pylori* e *Haemophilus influenzae,* tendo como função aumentar a sobrevivência desses microrganismos dentro de células epiteliais e endoteliais humanas (Daines et al., 2004).

3.3.2. Plasmídeos Conjugativos

Os plasmídeos conjugativos na maioria das vezes carreiam genes de replicação *(ssb e trfA*) e transferência conjugativa (*tra*). Entre os plasmídeos conjugativos gonocócicos dois tipos de sistema toxina-antitoxina foram reportados, o sistema Zeta/Epsilon e o sistema VapD (Pachulec &Van Der Does, 2010).

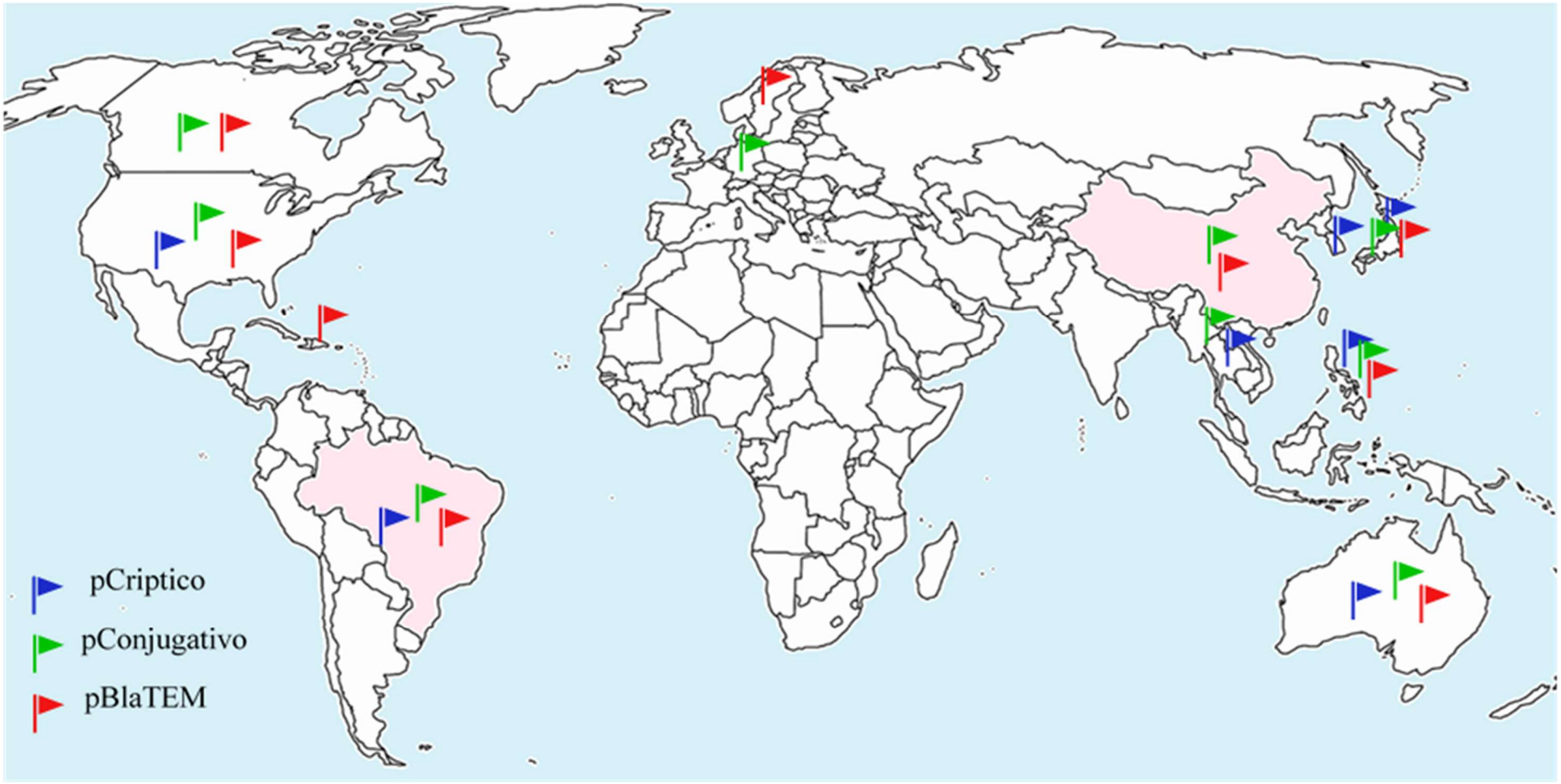
A toxina zeta tem a capacidade de interferir na síntese de peptideoglicano e tem sido mais frequentemente reportado em bactérias gram-positivas (Pachulec &Van Der Does, 2010). Em bactérias gram-negativas, a toxina VapD encontrada nestes plasmídeos não vem acompanhada da anti-toxina VapX (Pachulec &Van Der Does, 2010). Alguns estudos mostram que o VapX do plasmídeo críptico poderia funcionar como anti-toxina para VapD presente nos plasmídeos conjugativos (Cehovin & Lewis, 2017). Este fato poderia justificar a manutenção dos plasmídeos crípticos nos gonococos e a disseminação do plasmídeo conjugativo, incluindo os plasmídeos carreadores do gene *tetM* (Cehovin & Lewis, 2017). Três tipos de plasmídeos conjugativos foram identificados, o pLE2451 (~39Kb) e outros dois plasmídeos (~42

Kb) contendo o gene *tetM* (Knapp et al., 1987). De acordo com os países onde houveram os primeiros relatos, esses dois plasmídeos de 42 Kb foram nomeados, como Holandês e Americano.

3.3.3. Plasmídeos BlaTEM

Em isolados de *N. gonorrhoeae*, os plasmídeos carreadores de β-lactamases foram isolados pela primeira vez em 1976, quando altas taxas de resistência à penicilina começaram a ser observadas (Dillon & Yeung, 1989). Entre os isolados produtores de penicilinases, foram relatados vários plasmídeos BlaTEM ao redor do mundo: Ásia, África-pJD4, Nimes-pJD5, Nova Zelândia, Rio-Toronto, Joanesburgo e Austrália (Cehovin & Lewis, 2017). Todos eles possuem uma alta similaridade genética entre si.

O primeiro gene codificador de β-lactamase identificado em *N. gonorrhoeae* foi $bla_{\text{TEM-1}}$, entretanto, outras variantes já foram identificadas. Uma dessas variantes, o $bla_{\text{TEM-135,}}$ foi inclusive observada nos plasmídeos Rio-Toronto (Muhammad, 2014), que difere do $bla_{\text{TEM-1}}$ por apenas um nucleotídeo. Os plasmídeos BlaTEM não carreiam genes de conjugação, mas esses podem ser transferidos por mobilização. Interessantemente, nos plasmídeos Rio-Toronto essa região de mobilização é ausente e sua mobilização ocorre por co-integração com outros plasmídeos conjugativos (Scharbaai-Vasquez et al., 2007). Mais recentemente, o gene $bla_{\text{TEM-220}}$ foi também observado em isolados de *N. gonorrhoeae* que carreavam o plasmídeo Rio-Toronto recuperados na Argentina. Este gene também difere de $bla_{\text{TEM-1}}$ por única substituição nucleotídica na posição 547 (G->A), resultando na substituição dos aminoácidos A185T (Gianecini et al., 2015).



Fonte: (Este estudo).

Figura 6 Mapa de distribuição dos plasmídeos pCríptico, pConjugativo e pBlaTEM ao redor do mundo. Brasil (pCríptico e pConjugativo) e China (pBlaTEM) estão destacados devido ao grande número de descrições (depósitos no Genebank.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção dos isolados de *N. gonorrhoeae*

Os isolados incluídos no presente estudo foram selecionados a partir de um estudo anterior realizado por Martins e colaboradores (2019), no qual 124 isolados de *N. gonorrhoeae* foram coletados entre os anos de 2003 e 2015. Esses microrganismos foram recuperados a partir de secreções de pacientes ambulatoriais que buscaram o diagnóstico e o tratamento no Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS – CRT Santa Cruz, na cidade de São Paulo. Esses, foram previamente armazenados a -70°C no banco de microrganismos do CRT-Santa Cruz, cultivados em ágar chocolate (BioMerieux, Marcyl´Etoile, França), e enviados e armazenados a -70ºC no banco de microrganismo do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC/Alerta), pertencente à Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Para realização da reidentificação e do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, os isolados foram subcultivados em ágar chocolate, assegurando a pureza e a viabilidade das colônias de *N. gonorrhoeae* (Martins et al., 2019). As amostras foram crescidas em estufa de CO_2. A relação clonal entre esses isolados também foi estabelecida pela técnica de PFGE (Anexo 1) (Martins et al., 2019).

Ao todo 13 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* foram selecionados para à análise do genoma completo, seguindo os seguintes critérios: (i) viabilidade dos isolados, (ii) CIMs ≥ 0,06 mg/L e/ou ≥ 0,5 mg/L para ciprofloxacino e para azitromicina, respectivamente (seguindo os pontos de corte de resistência do EUCAST, 2015) (iii) perfil clonal e (iiii) ano de isolamento. De acordo com o EUCAST, 2015 o ponto de corte para se considerar redução de sensibilidade à azitromicina era >0,5 mg/L. Porém, com a intenção de avaliar as possíveis mutações presentes, os isolados que apresentaram CIM = 0,5 mg/L também foram incluídos no estudo. O fluxograma representativo do critério de seleção dos isolados de *N. gonorrhoeae* incluídos no presente estudo encontra-se abaixo **(Figura 7)**.

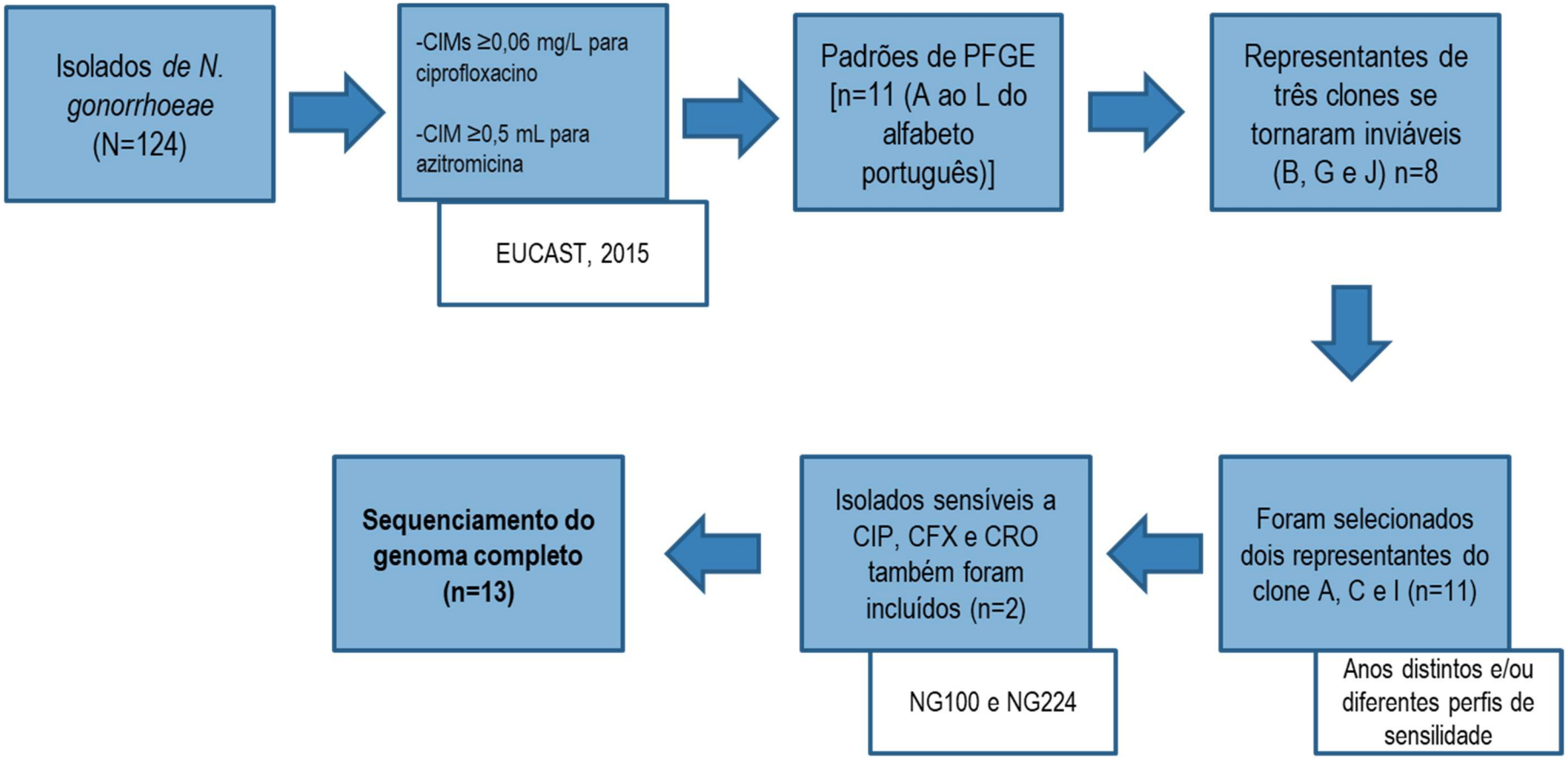


Figura 7 Fluxograma representativo do critério empregado para a seleção dos isolados de *N. gonorrhoeae* submetidos ao sequenciamento do genoma total.

4.1.1. Sequenciamento do Genoma Total

De acordo com os critérios de seleção descritos acima, foi realizado o sequenciamento do genoma total de 13 isolados de *N. gonorrhoeae*, sendo eles: NG97, NG100, NG136, NG140, NG221, NG222, NG224, NG251, NG266, NG277, NG 297, NG314, e NG326. A extração do DNA foi realizada pelo kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, German) de acordo com a recomendações do fabricante e suas concentrações foram determinadas utilizando o Qubit 2.0 Fluorometer (Termofisher), com o Kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, EUA). O DNA extraído de cada amostra foi então normalizado a uma concentração de 0,5 ηng/μL e então as bibliotecas foram construídas. As bibliotecas foram geradas utilizando o kit Nextera XTDNA Library Preparation Kit (Illumina Inc, USA). A amplificação das bibliotecas foi realizada após a adição do NPM (Nextera PCR Master Mix) e dos adaptadores (Index 1 e Index 2) nos DNAs fragmentados no passo anterior. A remoção de pequenos fragmentos de DNA das bibliotecas foi realizada utilizando-se o AMPure XP *bead,* de acordo com as recomendações do fabricante (Illumina Inc, USA).

A verificação do tamanho e da qualidade das bibliotecas geradas foram realizadas com auxílio do equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Termofisher). As diferentes bibliotecas tiveram suas concentrações normalizadas e sequenciadas utilizando o Illumina MiSeq, 2x300 pb paired-end. As sequências obtidas foram então compartilhadas com o Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC – Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) para a realização da montagem dos genomas.

4.1.2. **Montagem e Anotação Automática dos Genomas**

Após o sequenciamento, a montagem do genoma foi realizada utilizando o pipeline disponível no software *A5* (Coil et al., 2015) para montagem dos *reads* (fragmentos curtos de DNA), remoção dos adaptadores, filtragem de qualidade e correção de erros na geração dos *contigs* e *scaffolds*. Adicionalmente, utilizou-se o software *CAP3* (Hung & Madan,1999) para aprimorar a montagem dos *scaffolds*, revisando as regiões de baixa qualidade e corrigindo possíveis ligações errôneas entre os *contigs*. A anotação automática foi realizada utilizando a plataforma RAST (http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi).

4.1.2.1. Análise de Bioinformática

4.1.2.1.1. Curadoria da Anotação dos Genomas

Os *scaffolds* obtidos e previamente anotados pela plataforma RAST foram manualmente curados utilizando as ferramentas BlastN e BlastX disponíveis no NCBI e Uniprot.

4.1.2.1.2. Investigação dos Determinantes de Resistência

Os *scaffolds* obtidos de cada um dos isolados sequenciados foram submetidos a investigação de genes de resistência adquiridos e de mutações, nas plataformas "Center for Genomic Epidemiology (CGE) e Pathosystem Resource Integration Center (PATRIC), utilizando os programas Resfinder 4.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) (Zankari et al., 2017) e "Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)" (https://card.mcmaster.ca/) (Alcock et al., 2020), respectivamente.

A curadoria dos genes de resistência encontrados pelos programas acima mencionados foi realizada por meio do alinhamento local (BLASTn) utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os genes depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do gene identificado.

4.1.2.1.3. Determinação do Multi Locus Sequencing Typing MLST

Para determinar o "*Sequencing Typing"* (ST) de cada isolado clínico, os genomas foram submetidos ao MLSTFinder 2.0 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/) (Larsen et al., 2012). Para a verificação e atribuição de novos STs, os genomas de *N. gonorrhoeae* foram submetidos à plataforma PubMLST (https://pubmlst.org/organisms/neisseria-spp) (Jolley et al., 2018). Adicionalmente, os programas "*Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for

Antimicrobial Resistance" (NG-STAR- https://ngstar.canada.ca/pages/welcome?lang=en) e o "*Neisseria gonorrhoeae* Multi-Antigen Sequencing Typing" (NG-MAST- http://www.ng-mast.net) foram também utilizados.

4.1.2.1.4. Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada utilizando algoritmos baseados em máxima verossimilhança (RAxML) seguindo o pipeline da plataforma PATRIC e editado pelo programa iTOL. Para essa análise foram utilizados 41 genomas de *N. gonorrhoeae*, sendo (i) 13 genomas do presente estudo; (ii) 14 genomas de referência (Unemo et al., 2009; Unemo et al., 2016b), WHO-F/Canada (FLKW01000000); WHO-G/Tailândia (FLLG01000000); WHO-K/Japão (FLLD01000000); WHO-L/Asia (FLLA01000000); WHO-M/Filipinas (FLLJ01000000; WHO-N/Australia (FLKY01000000); WHO-O/Canada (FLLE01000000); WHO-P/USA (FLLC01000000); WHO-U/Suécia (FLKZ01000000); WHO-V/Suécia (FLLL01000000); WHO-W/Hong Kong (FLLF01000000); WHO-Y/França (FLKX01000000); WHO-Z/Australia (FLLI01000000); e FA1090 (AE004969) e; (iii) 13 genomas de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* brasileiros, selecionados randomicamente e previamente publicados no estudo de Golparian e colaboradores (2020), ERR3959379, ERR3959384, ERR3959404, ERR3959409, ERR3959414, ERR3959422, ERR3959432, ERR3959447, ERR3959551, ERR3959588, ERR3959623, ERR3959627 e ERR39596.

4.1.2.1.5. Montagem dos Plasmídeos

A análise e a separação das sequências de DNA plasmidial e DNA cromossômico bacteriano foram realizadas inicialmente no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). Os plasmídeos foram montados utilizando os programas Newbler versão 3.0 e Spades 3.13.0. As sequências dos plasmídeos encontrados nos isolados de *N. gonorrhoeae* foram inicialmente submetidas à anotação automática pela plataforma RAST (http://rast.nmpdr.org/), posteriormente cada "*Open Reading Frame* (ORF)" foi manualmente curada pelas ferramentas BlastN

e BlastX. Os plasmídeos foram circularizados com auxílio do programa *SnapGene*. Os genes de resistência presentes nos plasmídeos foram verificados pelo programa ResFinder 4.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) (Zankari et al., 2017). O alinhamento múltiplo entre eles foi realizado com auxílio da ferramenta BRIG. Sequências plasmidiais de *N. gonorrhoeae* depositadas no GeneBank até dezembro de 2021 foram também utilizadas na comparação.

5. RESULTADOS

5.1. Sequenciamento do Genoma Total

Os 13 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* selecionados para a realização do sequenciamento genômico pertenciam a oito grupos clonais diferentes (**Tabela 4)**. Foram incluídos para fins de comparação dois isolados sensíveis a ciprofloxacino, cefuroxima e ceftriaxona (NG100 e NG224).

Os genomas dos isolados de *N. gonorrhoeae* incluídos no estudo apresentaram um tamanho entre 2.036.577 pb até 2.149.734 pb. O conteúdo GC dos mesmos variaram entre 52,39% e 52,76%. Os demais dados genômicos dos isolados de *N. gonorrhoeae* estão apresentados na **Tabela 3.**

Tabela 3 Resumo dos dados genômicos dos isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* recuperados na cidade de São Paulo durante os anos de 2003 a 2015

Dados Genômicos[a]	Isolados												
	NG97	**NG100***	**NG136**	**NG140**	**NG221**	**NG222**	**NG224***	**NG251**	**NG266**	**NG277**	**NG297**	**NG314**	**NG326**
Contigs	91	106	88	96	82	90	91	86	85	83	88	80	85
Contig L50	14	21	15	17	12	13	16	15	13	12	16	14	15
Contig N50	46.608	34.020	41.767	38.270	53.336	49.972	41.282	40.856	46.629	54.919	46.079	42.004	48.805
Tamanho do Genoma (pb)	2.090.307	2.055.088	2.095.949	2.051.040	2.113.186	2.095.030	2.131.145	2.036.577	2.149.734	2.045.555	2.102.811	2.138.323	2.101.722
Conteúdo GC	52,50	52,57	52,45	52,76	52,44	52,45	52,46	52,68	52,39	52,67	52,55	52,46	52,47
CDS	2.475	2.416	2.468	2.401	2.510	2.479	2.506	2.376	2.541	2.406	2.474	2.533	2.494

Nota: [a]pb, pares de base, CDS, "*CoDing Sequence";* GC, guanina/citosina; *, cepas controles

5.1.1. Investigação dos Determinantes de Resistência

Assim como o esperado, a maioria dos isolados de *N. gonorrhoeae* foram classificados como resistentes à penicilina [(CIMs ≥4 mg/mL); n=7] (EUCAST, 2015) e apresentaram co-resistência a ciprofloxacino (CIMs variando entre 0,5 a >2 mg/mL); n=8] (EUCAST, 2015) **(Tabela 4).** Essa co-resistência foi observada entre os isolados recuperados entre os anos 2003 e 2013.

O fenótipo de resistência à penicilina pode ser relacionado às mutações em PBP1 (L421P), PBP2 (A510V, N512Y, A516G, H541N, I312N, V316T, D345A, G545S, P551S e I566V) e/ou PIB (G120K e A121S), enquanto que as mutações em GyrA (T91S, S e I516V) e ParC (S87R) foram resonsáveis pela resistência a ciprofloxacino **(Tabela 4).** Mutações específicas em *pilQ*, gene que codifica a secretina do pílus do tipo IV, podem ser encontradas em amostras que apresentaram co-resistência à penicilina devido às mutações em *penA*, *mrtR* e *penB*. As seguintes alterações em *pilQ* foram observadas neste presente estudo: Alelo 1 de *pilQ*, inserção QAATPAKQ na posição 180 (n=3), mutações no Alelo V de *pilQ*: D494N e N648S (n=1), mutações no Alelo VII de *pilQ*; S341N (n=2). Adicionalmente, a inserção na QAATPAKQ na posição 180 foi observada em dois isolados (N297 e NG314). Um único PPNG isolate (NG140) carreava *bla*$_{\text{TEM-1B}}$ (CIM para penicilina >4 mg/L), o qual pertencia ao ST1902.

De acordo com o CLSI (M100 – S21; http://em100.edaptivedics.net/), isolados que apresentaram CIMs ≤ 1 µg/mL foram considerados sensíveis para azitromicina. O EUCAST recomenda a utilização de um ECOFF de 1 mg/L para azitromicina (EUCAST 2021; http://www.eucast.org/). De fato, isolados incluídos no presente estudo que apresentaram CIMs de 0,5 mg/L para azitromicina (EUCAST, 2015), apresentaram, na maioria, mutações em G45D (n=4) e A39T (n=5), ou a deleção em -35A- na região do promotor *mtrR,* provavelmente relacionados com a hiperexpressão da bomba de efluxo MtrCDE, a qual é responsável por ejetar os macrolídeos e outros antimicrobianos pertencentes às outras classes, como os β-lactâmicos.

Interessantemente, três isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino (NG136, NG266 e NG314) não apresentaram mutações GyrA e ParC, sugerindo a presença de outros mecanismos de resistência, como a hiperexpressão

da bomba de efluxo NorM ou mutações em *mtrR* (Unemo & Shafer, 2014, Martins et al., 2019; Alcock et al., 2020).

Os isolados com CIMs de 0,5 mg/L para penicilina (NG100 e NG277), apresentaram mutações em *mtrR.* Adicionalmente, o isolado NG277 apresentou a substituição A121S em PIB. Outros dois isolados resistentes à penicilina (NG221 e NG222) recuperados no ano de 2013 apresentaram altas CIMs (8 mg/L) para cefuroxima. Ambos (NG221 e NG22) pertenciam ST 90/CC90 de acordo com o NG-STAR e apresentaram nove mutações distintas nos genes codificadores de PBP2. Estes mesmos isolados eram resistentes ao ciprofloxacino (CIMs >2mg/L) e apresentaram CIMs para azitromocina entre 0,5 e 1 mg/L. Um isolado de *N. gonorrhoeae* (NG136) apresentou uma diminuição da sensibilidade à ceftriaxona (CIM=0,06 mg/L) (Ferreira et al., 2013; EUCAST, 2015).

Todos os isolados apresentaram mutações em R228S na DHPS, codificado pelo gene *folP*, responsável pela resistência à sulfonamidas. Mesmo a tetraciclina não sendo testada no presente estudo, dois genes responsáveis por aumentos das CIMs para este antimicrobiano foram observados: mutações em *rpsJ*, resultando na alteração da proteína ribossômica S10 (V57M) e a presença de *tetM.* Os resultados foram obtidos por ágar diluição e a interpretação dos resultados seguiram os critérios estabelecidos pelo EUCAST, 2015. Com exceção da Cefuroxima, que foi interpretada de acordo com o CLSI, 2015

5.1.2. Determinação do "*Multi Locus Sequencing Typing*" MLST

Entre os 13 isolados de *N. gonorrhoeae* foi possível observar 7 "*sequence typing*" (STs) distintos, ST1580 (n=1), ST1590 (n=3), ST1901 (n=3), ST1902 (n=1), ST8161 (n=3), ST9363 (n=1), e um ST ainda não descrito ST15640 (n=1). Os isolados sensíveis aos antimicrobianos testados, incluídos no estudo para comparação, NG100 e NG224, pertenciam aos STs 1590 e 8161, respectivamente **(Tabela 4).** Doze STs foram identificados de acordo com a plataforma NG-MAST (ST16473, ST1812, ST16581, ST2198, ST1812, ST40, ST292, ST16602, ST6210, ST16494, ST5119), e dez STs segundo a plataforma NG-STAR (ST182, ST42, ST209, ST3533, ST3534, ST3535, ST90, ST1094, ST63, ST3536). Interessantemente, foi possível observar que dois isolados que pertenciam ao ST8161 (NG297 e NG314), pertenciam ao mesmo ST1812 e ao mesmo ST42 de acordo com as classificações NG-MAST e NG-STAR, respectivamente **(Tabela 4).**

Tabela 4. Características microbiológicas e genômicas de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total

Dados genômicos																	
													CIM (mg/L)				
Isolados	**Antimicrobianos**	**Mutações cromossômicas**				**Genes adquiridos (Plasmídeos)**	**PFGE**	**Ano**	**MLST**	**NG-MAST**	**NG-STAR**	**PEN**	**CFR**	**CRO**	**CIP**	**ATZ**
NG277	**Sulfonamidas**	**DHPS (*folP*)** P68S, R228S				–	I8	2003	ST1580	ST16473	ST182	0,5	≤0,06	≤0,001	≤0,00025	0,5
	Tetraciclina	**RpsJ (*rpsJ*)** V57M	**PIB (*porB*)** A121S	**MtrR (*mtrR*)** G45D												
	β-lactâmicos	**PBP2 (*penA*)** F504L, A510V, I515V, A516G	**PIB (*porB*)** A121S	**PilQ (*pilQ*)** S341N	**MtrR (*mtrR*)** G45D											
	Ciprofloxacino	**GyrA (*gyrA*)** T91S	**MtrR (*mtrR*)** G45D													
	Azitromicina	**MtrR (*mtrR*)** G45D														
NG297	**Sulfonamidas**	**DHPS (*folP*)** R228S				TetM [TetM]	C5	2003	ST8161	ST1812	ST42	4	0,5	0,002	0,5	0,125
	Tetraciclina	**RpsJ (*rpsJ*)** V57M	**PIB (*porB*)** A121S	**MtrR (*mtrR*)** A39T												
	β-lactâmicos	**PBP2 (*penA*)** F504L, A510V, F516G	**PilQ (*pilQ*)** QAATPAKQ inserção na posição 180	**MtrR (*mtrR*)** A39T												
	Ciprofloxacino	**GyrA (*gyrA*)** T91S	**MtrR (*mtrR*)** A39T													
	Azitromicina	**MtrR (*mtrR*)** A39T														

Tabela 4. (continuação) Características microbiológicas e genômicas de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total.

Dados genômicos															
Isolados	Antimicrobianos	Mutações cromossômicas			Genes adquiridos (Plasmídeos)	PFGE	Ano	MLST	NG-MAST	NG-STAR	CIM (mg/L)				
											PEN	CFR	CRO	CIP	ATZ
NG266	Sulfonamidas	DHPS (*folP*) R228S			TetM [TetM]	L1	2005	ST15640	ST16581	ST3532	4	0,5	0,002	>2	1
	Tetraciclina	RpsJ (*rpsJ*) V57M	MtrR (*mtrR*) A39T												
	β-lactâmicos	PBP2 (*penA*) F504L, A510V, F516G	MtrR (*mtrR*) A39T												
	Ciprofloxacino	GyrA (*gyrA*) T91S	MtrR (*mtrR*) A39T												
	Azitromicina	MtrR (*mtrR*) A39T													
NG97	Sulfonamidas	DHPS (*folP*) R228S			_	A3	2006	ST1901	ST2198	ST209	4	0,5	0,002	>2	0,06
	Tetraciclina	RpsJ (*rpsJ*) V57M	MtrR (*mtrR*) 35A - deleção												
	β-lactâmicos	PBP1 (*ponA*) L421P	PBP2 (*penA*) F504L, A510V, I515V, P551S	MtrR (*mtrR*) 35A - deleção											
	Ciprofloxacino	GyrA (*gyrA*) S91F, D95G	ParC (*parC*) S87R	MtrR (*mtrR*) 35A - deleção											
	Azitromicina	MtrR (*mtrR*) 35A - deleção													

Tabela 4. (continuação) Características microbiológicas e genômicas de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total

Dados genômicos							PFGE	Ano	MLST	NG-MAST	NG-STAR	CIM (mg/L)				
Isolados	Antimicrobianos	Mutações cromossômicas				Genes adquiridos (Plasmídeos)						PEN	CFR	CRO	CIP	ATZ
NG314	Sulfonamidas	**DHPS *(folP)*** R228S				–	F1	2006	ST8161	ST1812	ST42	>4	0,5	0,002	>2	1,0
	Tetraciclina	**RpsJ *(rpsJ)*** V57M	**MtrR (*mtrR*)** A39T													
	β-lactâmicos	**PBP2 (penA)** F504L, F510V, A516G, H541N	**PIB *(porB)*** A121S	**PilQ *(pilQ)*** QAATPAKQ inserção na posição 180	**MtrR *(mtrR)*** A39T											
	Ciprofloxacino	**GyrA *(gyrA)*** T91S	**MtrR (*mtrR*)** A39T													
	Azitromicina	**MtrR (*mtrR*)** A39T														
NG100*	Sulfonamidas	**DHPS *(folP)*** R228S				–	NA	2006	ST1590	ST40	ST3533	0,5	≤ 0,06	≤ 0,001	≤ 0,00025	0,5
	Tetraciclina	**MtrR (*mtrR*)** G45D														
	β-lactâmicos	**PBP2 (*penA*)** F504L, A510V, I515V, H541N, I566V, A561G	**MtrR *(mtrR)*** G45D													
	Ciprofloxacino	**MtrR (*mtrR*)** G45D														
	Azitromicina	**MtrR (*mtrR*)** G45D														

Tabela 4. (continuação) Características microbiológicas e genômicas de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total

Dados genômicos																
Isolados	Antimicrobianos	Mutações cromossômicas			Genes adquiridos (Plasmídeos)	PFGE	Ano	MLST	NG-MAST	NG-STAR	CIM (mg/L)				
											PEN	CFR	CRO	CIP	ATZ
NG136	Sulfonamidas	DHPS *(folP)*: R228S			–	C2	2008	ST1590	ST292	ST3534	>4	4	0,06	>2	0,5
	Tetraciclina	MtrR (*mtrR*): G45D													
	β-lactâmicos	PBP2 (penA): F504L, A510V, I515V, H541N, I566V, A516G	PIB (*porB*): A121S	MtrR *(mtrR)*: G45D											
	Ciprofloxacino	MtrR (*mtrR*): G45D													
	Azitromicina	MtrR (*mtrR*): G45D													
NG140	Sulfonamidas	DHPS *(folP)*: R228S			*bla*TEM-1B	H2	2008	ST1902	ST16602	ST3535	>4	0,5	0,002	0,004	0,5
	Tetraciclina	RpsJ *(rpsJ)*: V57M	MtrR (*mtrR*): A39T												
	β-lactâmicos	PBP1 *(ponA)*: L421P	PBP2 (*penA*): F504L, A510V, I515V, P551S, A516G	MtrR *(mtrR)*: A39T											
	Ciprofloxacina	GyrA *(gyrA)*: T91S	MtrR (*mtrR*): A39T												
	Azitromicina	MtrR (*mtrR*): A39T													

Tabela 4. (continuação) Características microbiológicas e genômicas dos de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total

Isolados	Dados genômicos				Genes adquiridos (Plasmídeos)	PFGE	Ano	MLST	NG-MAST	NG-STAR	CIM (mg/L)				
	Antimicrobianos	Mutações cromossômicas									PEN	CFR	CRO	CIP	ATZ
NG221	Sulfonamidas	DHPS (*folP*)			_	A1	2013	ST1901	ST6210	ST90	>4	8,0	0,015	>2	0,5
		R228S													
	Tetraciclina	RpsJ (*rpsJ*)	MtrR (*mtrR*)												
		V57M	-35A - deleção												
	β-lactâmicos	PBP1 (*ponA*)	PBP2 (*penA*)	PIB (*porB*)											
		L421P	I312M, V316T, D345A, F504L, A510V, N512Y, I515V, H541N, G545S,	G120K											
	Ciprofloxacino	GyrA (*gyrA*)	ParC (*parC*)												
		T91S, D95G	S87R												
	Azitromicina	MtrR (*mtrR*													
		-35A - deleção													
NG222	Sulfonamidas	DHPS (*folP*)			_	E5	2013	ST1901	ST6210	ST90	>4	8	0,03	>2	1
		R228S													
	Tetraciclina	RpsJ (*rpsJ*)	MtrR (*mtrR*)												
		V57M	-35A - deleção												
	β-lactâmicos	PBP1 (*ponA*)	PBP2 (*penA*)	PIB (*porB*)											
		L421P	I312M, V316T, D345A, F504L, A510V, N512Y, I515V, H541N, G545S,	G120K, A121N											
	Ciprofloxacino	GyrA (*gyrA*)	ParC (*parC*)												
		S91T, D95G	S87R												
	Azitromicina	MtrR (*mtrR*)													
		-35A - deleção													

Tabela 4. (continuação) Características microbiológicas e genômicas de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total

Dados genômicos															
Isolados	Antimicrobianos	Mutações cromossômicas			Genes adquiridos (Plasmídeos)	PFGE	Ano	MLST	NG-MAST	NG-STAR	CIM (mg/L)				
											PEN	CFR	CRO	CIP	ATZ
NG224*	Sulfonamidas	**DHPS (*folP*)** R228S			TetM [TetM]	NA	2013	ST8161	ST16494	ST1094	≤0,015	≤0,06	≤0,01	0,004	0,125
	Tetraciclina	**RpsJ (*rpsJ*)** V57M													
	β-lactâmicos	**PBP2 (*penA*)** F504L, A516G, A510V	**PilQ (*pilQ*)** QAATPAKQ inserção na posição 180												
	Ciprofloxacino	**GyrA (*gyrA*)** T91S													
NG251	Sulfonamidas	**DHPS (*folP*)** P68S, R228S			_	I7	2014	ST9363	ST5119	ST63	≤0,015	≤0,06	≤0,01	0,004	0,5
	Tetraciclina	**RpsJ (*rpsJ*)** V57M	**MtrR (*mtrR*)** A39T												
	β-lactâmicos	**PBP2 (penA)** F504L, A510V, I515V, A516G	**PilQ (*pilQ*)** S341N, D494N, N648S	**MtrR (*mtrR*)** A39T											
	Ciprofloxacino	**GyrA (*gyrA*)** T91S	**MtrR (*mtrR*)** A39T												
	Azitromicina	**MtrR (*mtrR*)** A39T													

Tabela 4. (continuação) Características microbiológicas e genômicas de isolados selecionados de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥ 0,06 para ciprofloxacino e ≥ 0,5 para azitromicina submetidos ao sequenciamento do genoma total

Dados genômicos										CIM (mg/L)				
Isolados	Antimicrobianos	Mutações cromossômicas		Genes adquiridos (Plasmídeos)	PFGE	Ano	MLST	NG-MAST	NG-STAR	PEN	CFR	CRO	CIP	ATZ
NG326	Sulfonamidas	DHPS *(folP)* R228S		_	D1	2015	ST1590	ST10	ST3536	0,5	≤0,06	0,04	>2	0,5
	Tetraciclina	MtrR (*mtrR)* G45D												
	β-lactâmicos	PBP2 (penA) F504L, A510V, A516G	MtrR (*mtrR)* G45D											
	Ciprofloxacino	GyrA *(gyrA)* D95G	MtrR (*mtrR)* G45D											
	Azitromicina	MtrR (*mtrR)* G45D												

Nota: [a]ATZ, azitromicina; CFR, cefuroxima; CIP, ciprofloxacino; CRO, ceftriaxona; NG-MAST, *N. gonorrhoeae Multi-Antigen Sequence Typing*; NG-STAR, *N. gonorrhoeae Sequence Typing for Antimicrobial Resistance*; NT, não testada; MLST, *Multi-Locus Sequence Typing*; CIM, Concentração Inibitória Mínima; PBP, *penicillin-binding protein*; PEN, penicilina.

NA: Não se aplica.

5.1.3. Análise Filogenética

Com base na árvore filogenética **(Figura 8),** os 41 genomas avaliados foram divididos em distintos *"clusters*". Dentre os 13 gonococos provenientes deste estudo, os isolados NG100, NG136, NG266 e NG326 foram geneticamente relacionados com a cepa WHO-W (Hong Kong), enquanto os isolados NG224, NG297 e NG314 foram relacionados com a cepa WHO-F (Canada). Entretanto, os isolados NG221 e NG222 foram estreitamente relacionados com cepa WHO-Y (França), os quais também pertenciam ao ST1901. Finalmente, os isolados NG277 e NG251 foram relacionados com a cepa WHO-P (EUA). A análise filogenética e de MLST demonstrou que os clones de *N. gonorrhoeae* recuperados de 2015 a 2016 no Brasil são estreitamente relacionados (100% a 70%) com os isolados recuperados entre 2003 a 2015.

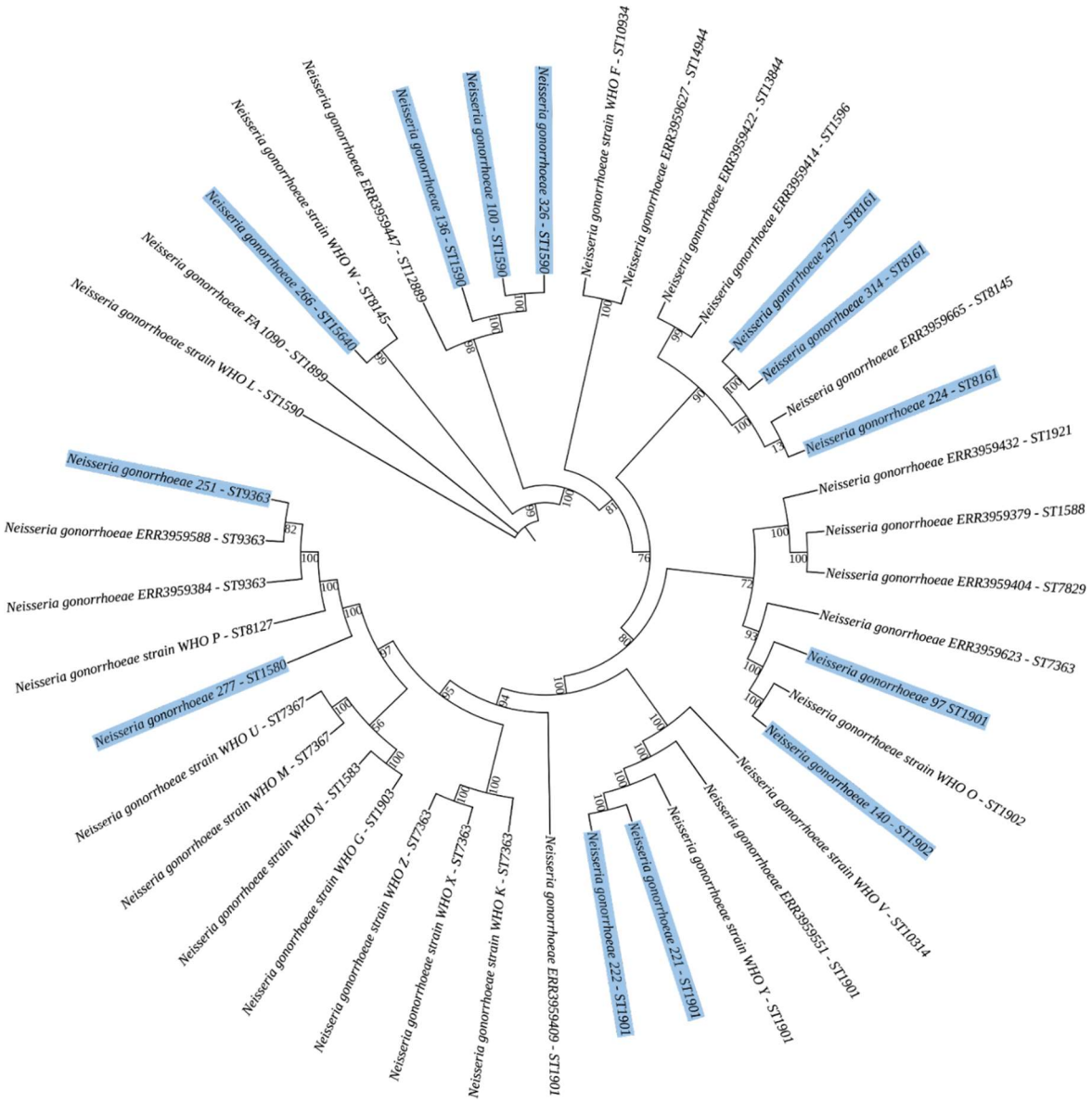


Figura 8. Análise filogenética de 41 isolados de *N. gonorrheae* baseada em algoritmos de máxima verossimilhança (RAxML) e editada pelo programa iTOL. Foram incluídos na análise os 13 genomas de *N. gonorrhoeae* selecionados para este estudo, além dos genomas de referência: WHO-F/Canada (FLKW01000000); WHO-G/Tailândia (FLLG01000000); WHO-K/Japão (FLLD01000000); WHO-L/Asia (FLLA01000000); WHO-M/Filipinas (FLLJ01000000; WHO-N/Australia (FLKY01000000); WHO-O/Canada (FLLE01000000); WHO-P/USA (FLLC01000000); WHO-U/Suécia (FLKZ01000000); WHO-V/Suécia (FLLL01000000); WHO-W/Hong Kong (FLLF01000000); WHO-Y/França (FLKX01000000); WHO-Z/Australia (FLLI01000000); e FA1090 (AE004969). Também foram incluídos 13 genomas de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* brasileiros do estudo de Golparian e colaboradores, 2020: ERR3959379, ERR3959384, ERR3959404, ERR3959409, ERR3959414, ERR3959422, ERR3959432, ERR3959447, ERR3959551, ERR3959588, ERR3959623, ERR3959627 e ERR3959665.

5.2. Montagem dos Plasmídeos

Baseado na análise dos genomas dos 13 isolados de *N. gonorrhoeae*, foi possível identificar e caracterizar a presença de três distintos plasmídeos. De acordo com as suas características genômicas, os plasmídeos foram nomeados como pCríptico, pConjugativo e pBlaTEM. A **Tabela 5** indica a distribuição dos plasmídeos entre os isolados bacterianos analisados.

Tabela 5 Distribuição dos plasmídeos identificados entre os isolados de *N. gonorrhoeae* obtidos por meio da análise do genoma completo de acordo com a plataforma Illumina

Isolados	Plasmídeos		
	pA (pCriptico)	pB (pConjugativo)	pC (pBLATEM)
NG97	X		
NG100	X		
NG136	X		
NG140	X	X	X
NG221	X		
NG221	X		
NG224	X	X	
NG251	X		
NG266	X	X	
NG277	X		
NG297	X	X	
NG314	X	X	
NG326	X		

A comparação das sequências do pCríptico, pConjugativo e pBlaTEM carreados pelos diferentes isolados do presente estudo apontou uma pequena variação nucleotídica entre eles, resultado da deleção e inserção de nucleotídeos em regiões não codificantes. Essas variações não alteraram o conteúdo gênico dos plasmídeos analisados. Para a ilustração, foi utilizado como referência o isolado NG140, por ser o único isolado incluído no estudo a carrear os três plasmídeos. Abaixo, encontram-se os mapas físicos dos três plasmídeos.

5.2.1. Plasmídeos Crípticos (pCrípticos)

O pCríptico apresentou um tamanho de ~4,2 kb e um conteúdo GC de ~52% **(Tabela 6).** Basicamente, o plasmídeo carreia genes envolvidos na replicação e mobilização plasmidial (aparato básico), juntamente a genes de origem desconhecida. Um dos poucos genes com conhecida funcionalidade em isolados de *N. gonorrhoeae*, o gene *vapD*, tem sido relacionado tanto como uma proteína associada à virulência de isolados de *N. gonorrhoeae*, tanto quanto relacionado a um sistema de toxina-antitoxina responsável pela manutenção do plasmídeo na célula bacteriana (Cehovin & Levis, 2017). Este plasmídeo já foi reportado em outros isolados de *N. gonorrhoeae*, sendo descrito como um plasmídeo críptico, justamente por não apresentar função conhecida (Unemo et al., 2016) **(Figura 9).** Todos os plasmídeos crípticos identificados no presente estudo apresentam uma alta similaridade entre si, e uma alta similaridade com outros plasmídeos crípticos descritos ao redor do mundo.

Tabela 6 Características gerais dos plasmídeos crípticos descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021

Plasmídeo Críptico	Tamanho dos Plasmídeos (pb)	Conteúdo GC (%)	Determinantes de Resistência Adquiridos	País	Ano	Número de acesso no GeneBank
pCríptico 97	4.228	52%	_	Brasil[a]	2006	MT296556
pCríptico 100	4.153	51%	_	Brasil[a]	2006	MT296557
pCríptico 136	4.207	51%	_	Brasil[a]	2008	MT296558
pCríptico 140	4.153	50%	_	Brasil[a]	2008	MT296559
pCríptico 221	4.153	51%	_	Brasil[a]	2013	MT296562
pCríptico 222	4.153	51%	_	Brasil[a]	2013	MT296563
pCríptico 224	4.153	52%	_	Brasil[a]	2013	MT296564
pCríptico 251	4.207	52%	_	Brasil[a]	2014	MT296566
pCríptico 266	4.207	51%	_	Brasil[a]	2005	MT296567
pCríptico 277	4.157	50%	_	Brasil[a]	2003	MT296569
pCríptico 297	4.153	52%	_	Brasil[a]	2003	MT296570
pCríptico 314	4.157	51%	_	Brasil[a]	2006	MT296572
pCríptico 326	4.153	52%	_	Brasil[a]	2015	MT296577

Nota: * O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do plasmídeo. [a.]Este estudo

Tabela 6 (continuação) Características gerais dos plasmídeos crípticos descritos neste estudo e no mundo dezembro de 2021

Plasmídeo Críptico						
Plasmídeo Críptico	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**País**	**Ano**	**Número de acesso no GeneBank**
FC428	4.153	52%	_	Japão	2015-2016	AP018379
FC460	4.207	52%	_	Japão	2015-2016	AP018383
FC498	4.207	40%	_	Japão	2015-2016	AP018387
NCCP11945	4.153	51%	_	Coréia do Sul	_	CP001051
MS11	4.153	52%	_	USA	_	CP003910
FQ36	4.228	52%	_	USA	2014	CP034023
FQ35	4.207	52%	_	USA	2014	CP034025
FQ01	4.207	52%	_	USA	2014	CP034034
pJD1	4.207	52%	_	Suécia	Before 1983	M10316
WHO G	4.207	52%	_	Tailândia	1997	LT591900
WHO L	4.207	52%	_	Ásia	1996	LT591903
WHO M	4.153	52%	_	Filipinas	1992	LT591907
WHO K	4.153	52%	_	Japão	2003	LT591909
WHO N	4.207	52%	_	Austrália	2001	LT591913
WHO O	4.207	52%	_	Canadá	1991	LT592149
WHO P	4.207	52%	_	USA	-	LT592158

Nota: * O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do plasmídeo.

Tabela 6 (continuação) Características gerais dos plasmídeos crípticos descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021

Plasmídeo Críptico						
Plasmídeo Críptico	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**País**	**Ano**	**Número de acesso no GeneBank**
WHO Y	4.153	51%	_	França	2010	LT592162
NG 251 plasmídeo p3	4.207	52%	_	Tailândia	_	CP043819
NG 196 plasmídeo p3	4.207	52%	_	Tailândia	_	CP043874
Pausmdu00010541_02	4.197	52%	_	Austrália	_	CP045834
SS3160 Plasmid pCryptic	4.207	52%	-	Japão	2020	AP019855
TUM 19853 plasmid pMTY19853	4.207	52%	-	Japão	2013	AP023068
TUM 19854 plasmid pMTY19854	4.153	52%	-	Japão	2013	AP023070
TUM 15748 plasmid pMTY15748	4.207	52%	-	Japão	2013	AP023072
TUM 15753 plasmid pMTY15753	4.207	52%	-	Japão	2013	AP023074
TUM 19855 plasmid pMTY19855	4.153	52%	-	Japão	2013	AP024156
pTFGB2	4.305	52%	-	Austrália	-	CP032428
NG290 plasmid p3	4.207	52%	-	Tailândia	2009-2011	CP043815
NG250 plasmid p3	4.207	52%	-	Tailândia	-	CP045710
SRRSH240 plasmid unnamed2	4.207	52%	-	China	2019	CP048895
SRRSH229 plasmid unnamed2	4.207	52%	-	China	2019	CP048898
SRRSH214 plasmid unnamed2	4.207	52%	-	China	2019	CP048901
SRRSH207 plasmid unnamed2	4.207	52%	-	China	2019	CP048904

Nota: * O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do plasmídeo.

Tabela 6 (continuação) Características gerais dos plasmídeos crípticos descritos neste estudo e no mundo até dezembro 2021.

Plasmídeo Críptico						
Plasmídeo Críptico	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**País**	**Ano**	**Número de acesso no GeneBank**
SRRSH205 plasmid unnamed2	4.207	52%	-	China	2019	CP048907
CT213 plasmid unnamed3	4.207	52%	-	Tailândia	-	CP048932
20181204 plasmid unnamed3	4.207	52%	-	Austrália	2018	CP068764
pCmGFP	6.062	49%	-	Austrália	2009	FJ172221

Nota: * O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do plasmídeo.

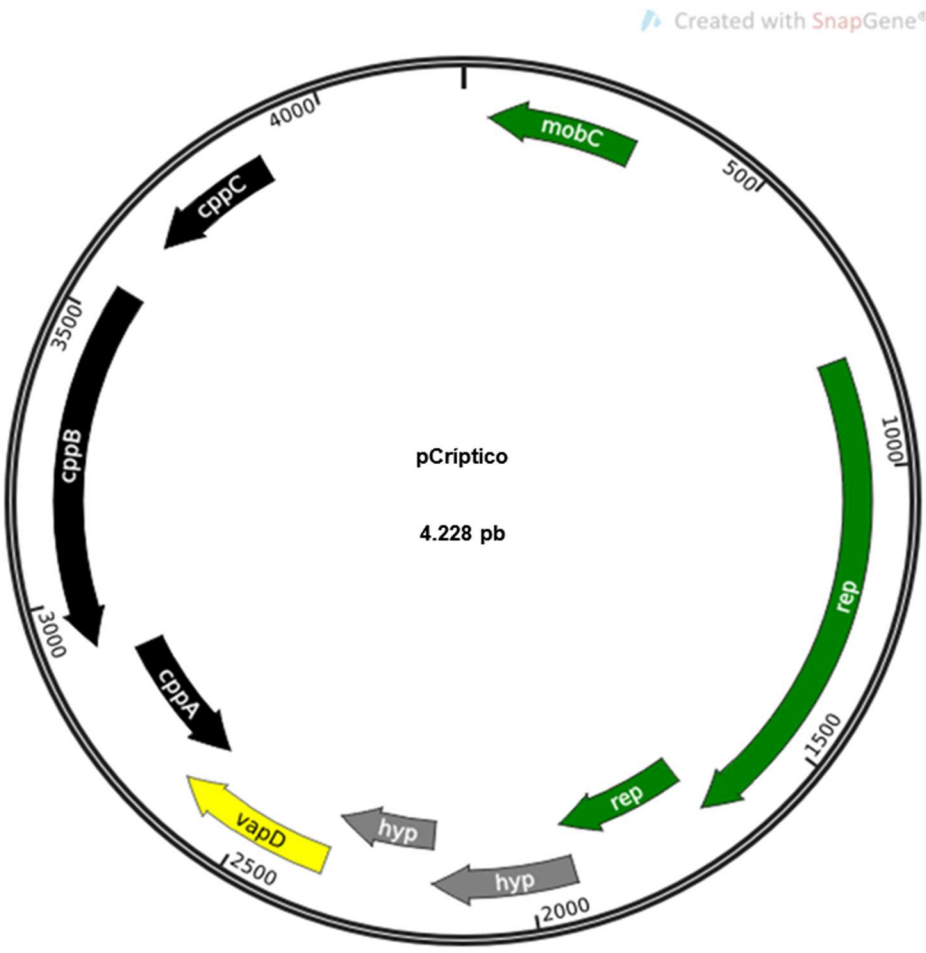


Figura 9 Mapa físico do plasmídeo pCríptico detectado nos 13 isolados de *N. gonorrhoeae* avaliados nesse estudo. O plasmídeo foi inicialmente submetido à anotação automática pelo RAST e posteriormente cada ORF foi manualmente confirmada pelas ferramentas BlastN e BlastX.

Os plasmídeos crípticos caracterizados neste estudo, apresentaram alta similaridade nucleotídica entre si e com outros plasmídeos crípticos (n=30) descritos ao redor do mundo, com os 17 *best-hits* obtidos por meio da ferramenta BlastN na plataforma do GenBank. O plasmídeo pCríptico apresenta uma notória conservação genética em sua estrutura **(Figura 10 e 11).** Esse dado demonstra-se geneticamente relevante, uma vez que apesar de não apresentar sua função bem determinada até o presente momento, este plasmídeo pode fornecer alguma vantagem seletiva aos isolados de *N. gonorrhoeae* (Cehovin and Lewis, 2017), uma vez que o mesmo vem sendo detectado em isolados de diferentes partes do mundo.

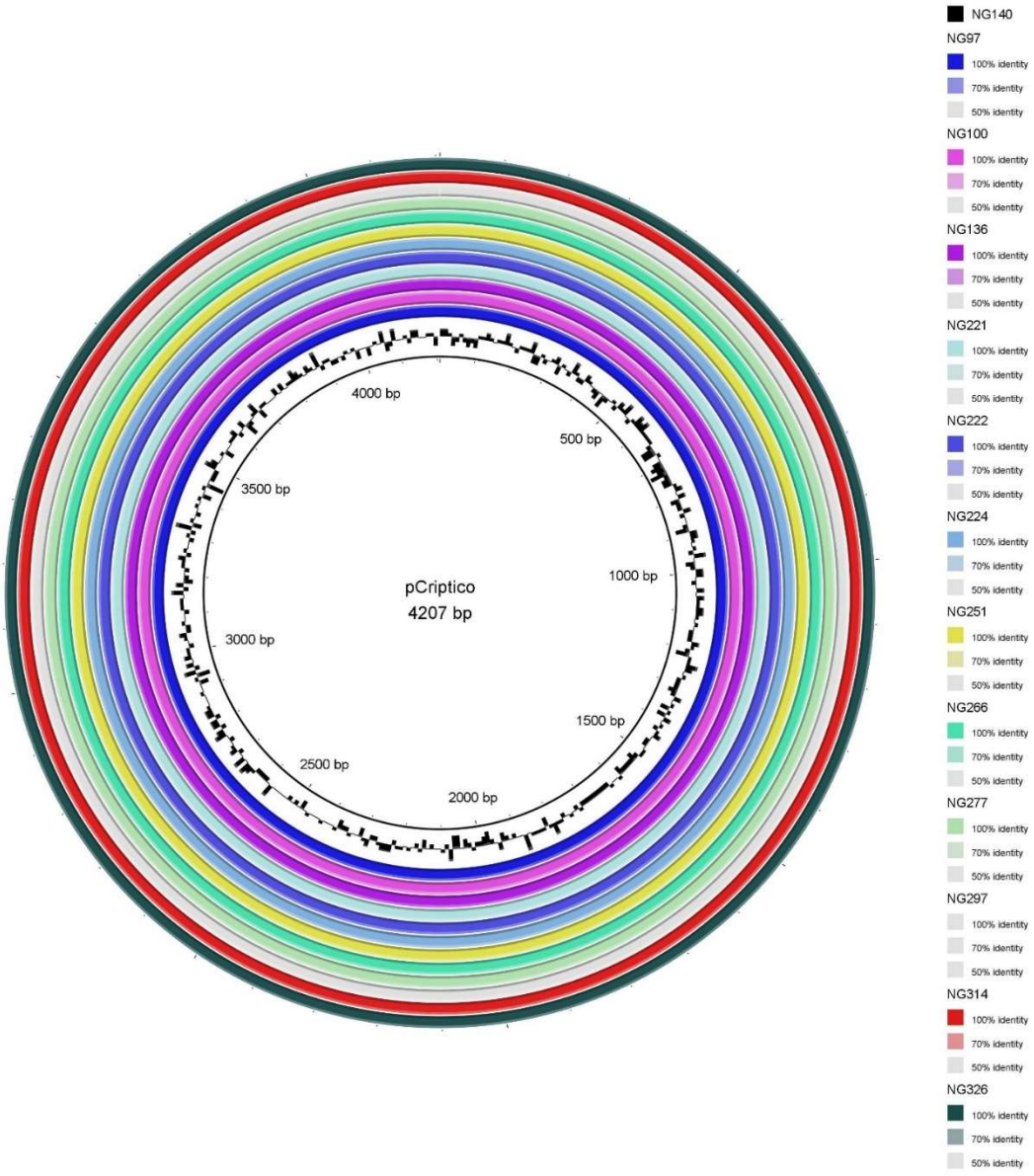


Figura 10 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos crípticos detectados no presente estudo (n=13). A figura foi gerada por meio da ferramenta BRIG, onde foram utilizados parâmetros de similaridade superior a 90% de identidade nucleotídica.

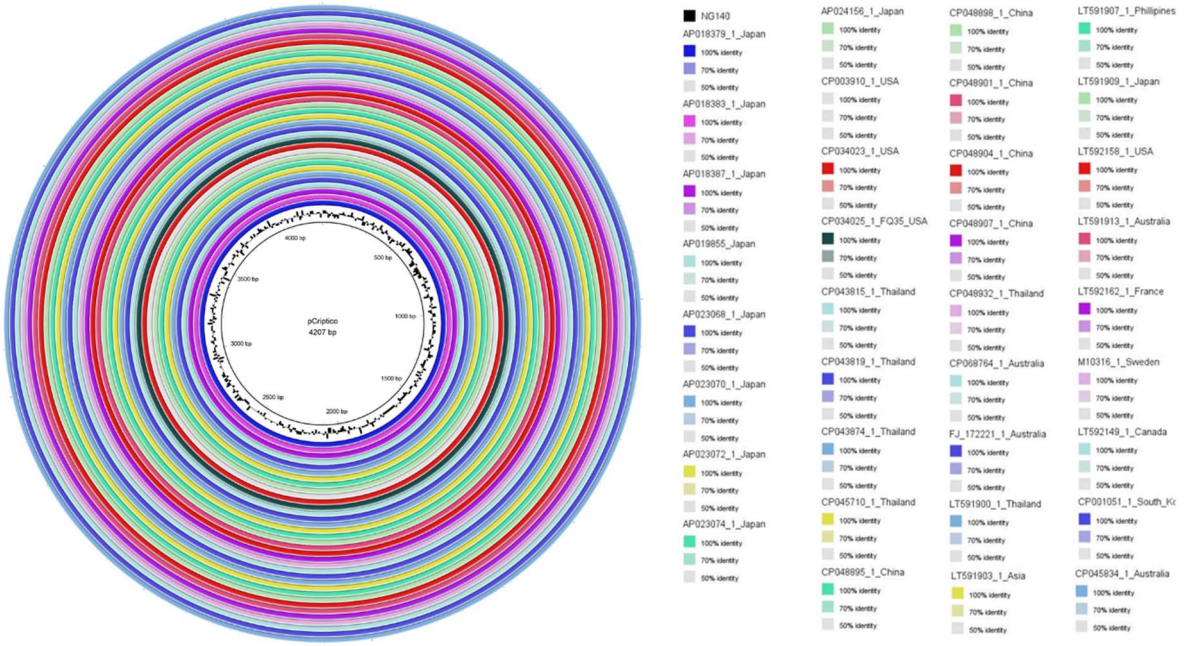


Figura 11 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos crípticos detectados em distintos países (n=41). A figura foi gerada por meio da ferramenta BRIG, onde foram utilizados parâmetros de similaridade superior a 90% de identidade nucleotídica.

5.2.2. Plasmídeos Conjugativos (pConjugativos)

O plasmídeo pConjugativo apresentou uma variação de tamanho de 30 a 43 Kb, e conteúdo GC de ~48%, sendo detectado em apenas três genomas bacterianos incluídos neste estudo **(Tabela 7).** Diferente do plasmídeo pCríptico, o pConjugativo apresentou características conjugativas pela presença do operon *tra* e *trb*. O conjunto de genes *tra* e *trb* ocupam cerca de 80% da estrutura plasmidial, evidenciando a característica conjugativa deste plasmídeo. Outra diferença em relação ao pCríptico, é que o plasmídeo pConjugativo apresentou um sistema de manutenção plasmidial mais complexo. O sistema toxina-antitoxina epsilon-zeta também foi identificado. Assim como o plasmídeo pCríptico, o pConjugativo carreava o gene *vapD* **(Figura 12)**.

Tabela 7 Características gerais dos plasmídeos conjugativos descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021

Plasmídeos Conjugativos								
Plasmídeos Conjugativos	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**Posição (contig)**	**Fenótipo de Resistência**	**País**	**Ano**	**Número de Acesso-GeneBank**
pConjugativo 140	39.054	49%	_	_	_	Brasil[a]	2008	MT296560
pConjugativo 224	42.003	48%				Brasil[a]	2013	MT296565
pConjugativo 266	42.004	49%	*tet*M	6.730 a 8.649	Tetraciclina	Brasil[a]	2005	MT296568
pConjugativo 297	42.005	48%				Brasil[a]	2003	MT296571
pConjugativo 314	42.004	48%	*tet*M	6.730 a 8.649	Tetraciclina	Brasil[a]	2006	MT296573
FC428	39.058	49%	_	_	_	Japão	2015-2016	AP018378
FC460	39.058	49%	_	_	_	Japão	2015-2016	AP018382
FC498	39.058	49%	_	_	_	Japão	2015-2016	AP018386
pNGTCDC08107	39.054	49%	_	_	_	Taiwan	2008	CP002441
FDAARGOS_205	39.053	49%	_	_	_	USA	_	CP020416
FQ01	39.053	49%	_	_	_	USA	2014	CP034033
pEP5289	42.004	48%	*tet*M	11.617 a 13.596	Tetraciclina	Alemanha	_	GU479466
WHO G	42.004	48%	*tet*M	6.730 a 8.649	Tetraciclina	Tailândia	1997	LT591899
WHO L plasmid 2	39.054	49%	_	_	_	Ásia	1996	LT591902
WHO M	39.015	49%	_	_	_	Filipinas	1992	LT591906
WHO N plasmid 3	42.004	48%	_	_	_	Australia	2001	LT591912
WHO O	30.015	49%	_	_	_	Reino Unido	1991	LT592148

Nota: *O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do plasmíd. [a]. Este estudo

Tabela 7 (continuação) Características gerais dos plasmídeos conjugativos descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021

Plasmídeos Conjugativos								
Plasmídeos Conjugativos	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**Posição (contig)**	**Fenótipo de Resistência**	**País**	**Ano**	**Número de Acesso-GeneBank**
WHO W	39.054	49%	-	-	-	Hong Kong	2007	LT592164
NG290 Plasmid 1	41.357	48%	*tet*M	1 a 1.487	Tetraciclina	Tailândia	-	CP043813
NG196 Plasmid 1	41.355	48%	*tet*M	31.837 a 33.756	Tetraciclina	Tailândia	-	CP043872
NG251 Plasmid 1	41.356	48%	*tet*M	11.677 a 13.596	Tetraciclina	Tailândia	-	CP043817
SRRSH214 plasmid unnamed1	39.597	49%	-	-	-	China	2019	CP048900
NG250 Plasmid p1	42.907	48%	*tet*M	8146 a 10062	Tetraciclina	Tailândia	-	CP045708
Pausmdu00010541_01	41.998	48%	*tet*M	19509 a 21425	Tetraciclina	Austrália	-	CP045833
SRRSH240 plasmid unnamed1	39.059	49%	-	-	-	China	2019	CP048894
SRRSR229 plasmid unnamed1	39.366	49%	-	-	-	China	2019	CP048897
SRRSR207 plasmid unnamed1	39.059	49%	-	-	-	China	2019	CP048903
SRRSR205 plasmid unnamed1	39.059	49%	-	-	-	China	2019	CP048906
SRRSR203 plasmid unnamed1	39.059	49%	-	-	-	China	2019	CP048909
SRRSR204 plasmid unnamed1	39.059	49%	-	-	-	China	2019	CP048912
CT213 plasmid unnamed1	41.999	48%	*tet*M	24838 a 26754	Tetraciclina	Tailândia	-	CP048930
20181204 plasmid unnamed1	42.033	48%	*tet*M	3 a 1829	Tetraciclina	Austrália	2018	CP068762
SS3160	30.057	49%	-	-	-	Japão	_	AP019854

Nota: *O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho plasmídeo.

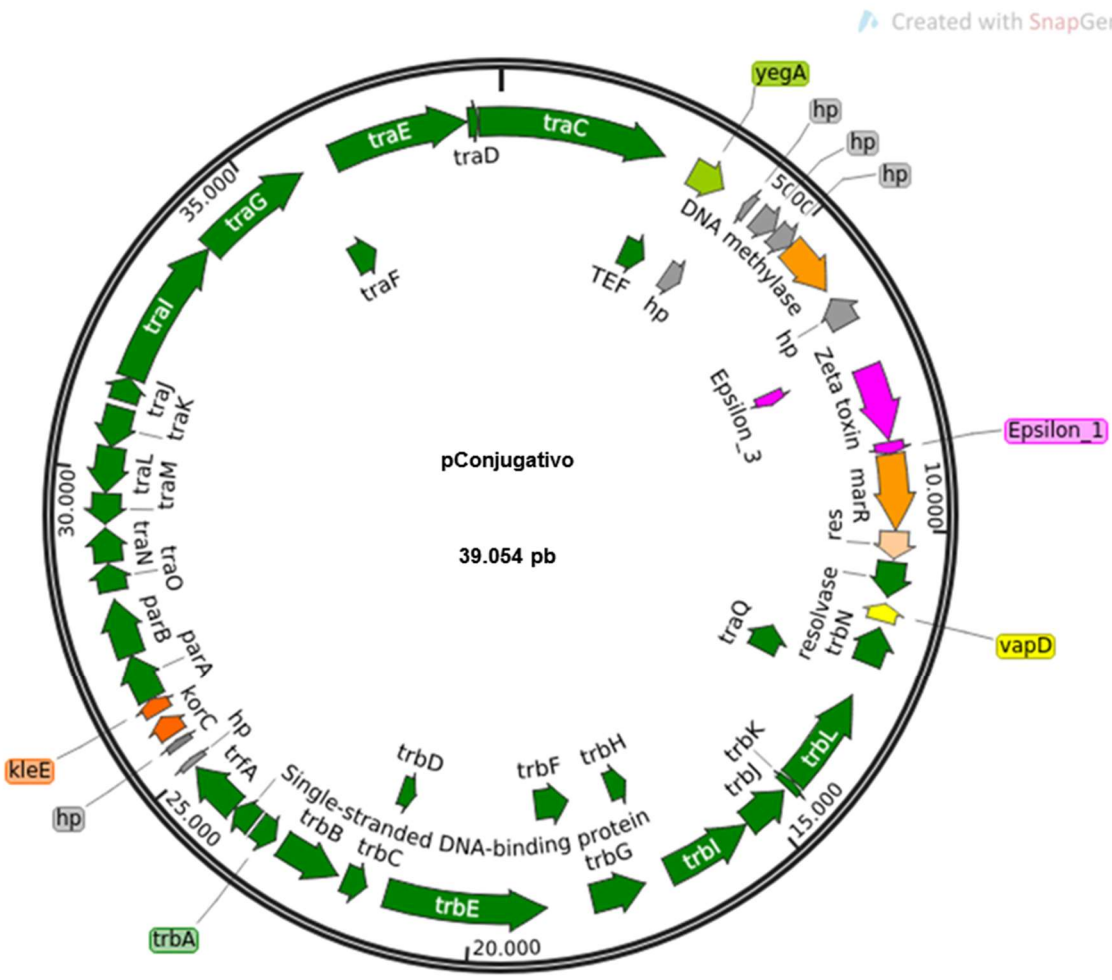


Figura 12 Mapa físico do plasmídeo pConjugativo detectado nos cinco isolados de *N. gonorrhoeae.* O plasmídeo foi inicialmente submetido à anotação automática pelo RAST e posteriormente cada ORF foi manualmente confirmada pelas ferramentas BlastN e BlastX.

Ao realizar a comparação entre os três plasmídeos obtidos no estudo, também verificamos um alto nível de conservação gênica entre a maioria dos isolados. Basicamente, o plasmídeo pConjugativo carreava o gene de resistência às tetraciclinas *tetM* em 5 isolados dos isolados analisados, com exceção do isolado NG140 **(Figura 13 e Figura 14)**. O motivo para a aquisição ou perda do gene *tetM* ainda é desconhecido uma vez que elementos transponíveis ou cicatrizes de transposição não foram verificadas entorno do gene *tetM.*

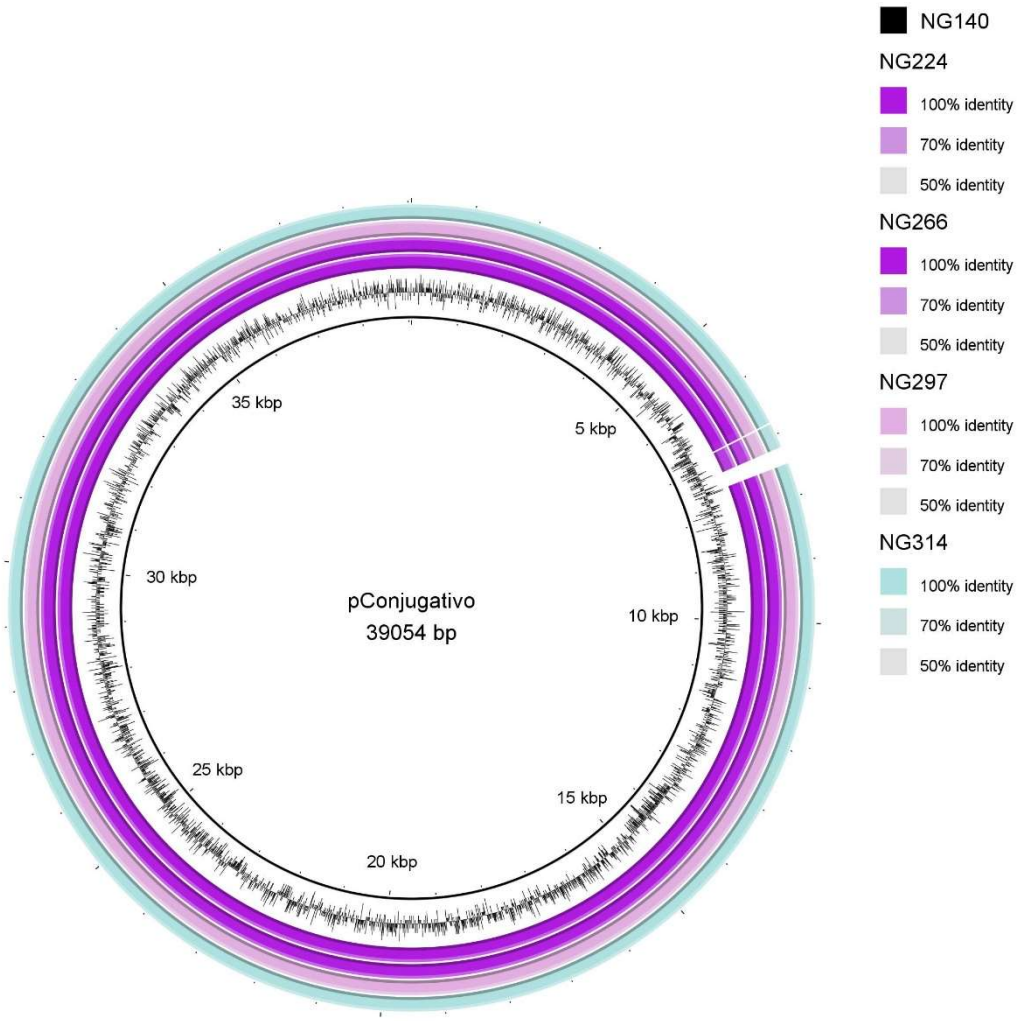


Figura 13 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos conjugativos detectados no estudo (n=5). A figura foi gerada por meio da ferramenta BRIG, onde foram utilizados parâmetros de similaridade superior a 90% de identidade nucleotídica.

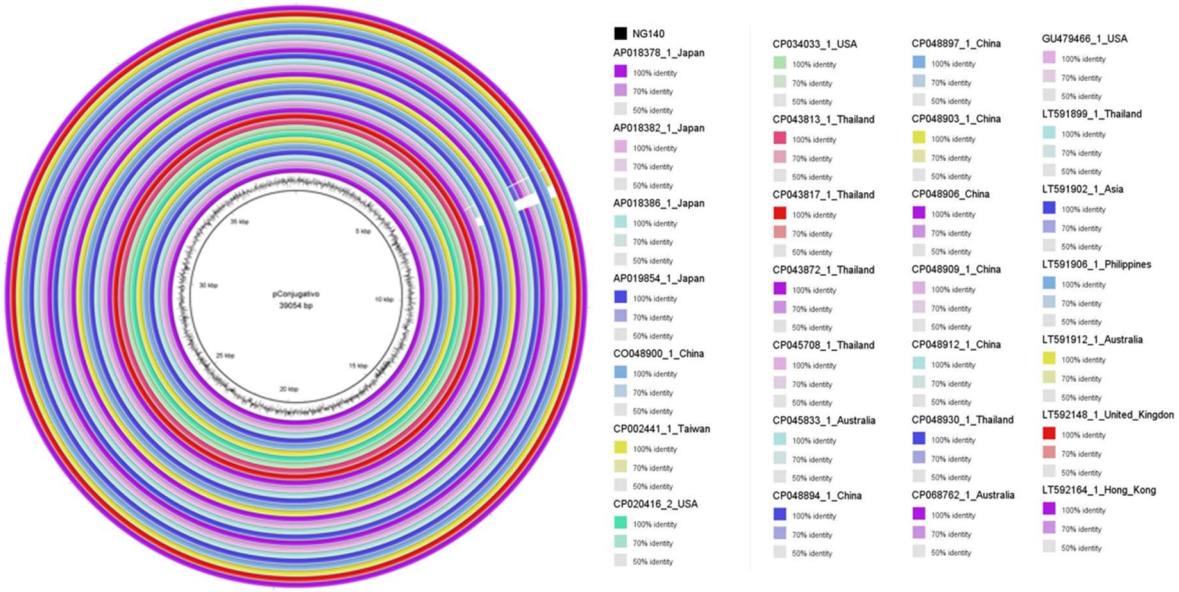


Figura 14 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos conjugativos detectados em distintos países (n=30). A figura foi gerada através de um BlastN realizado através da ferramenta BRIG, onde foram utilizados parâmetros de similaridade superior a 90% de identidade nucleotídica.

5.2.3. Plasmídeo BlaTEM (pBlaTEM)

O plasmídeo pBlaTEM apresentou características de um pequeno plasmídeo mobilizável (presença do operon *mob*) que apresentava a importante função de carrear a β-lactamase *bla*$_{\text{TEM-1b}}$. O gene *bla*$_{\text{TEM-1b}}$ codifica a enzima TEM-1 que apresenta atividade de β-lactamase de espectro ampliado apresentando atividade contra as penicilinas, cefaloridina, cefazolina e cefalotina (Bush, 2018). A presença dos genes *bla*$_{\text{TEM-1b}}$:ΔtnpR pode ser uma característica que indica que um transposon da família Tn*3* compunha esse plasmídeo em algum momento e que o mesmo foi perdido durante a evolução deste plasmídeo **(Figura 15)** (Martins et al., 2017). Diferentemente dos demais isolados, o plasmídeo pBlaTEM foi detectado apenas no isolado NG140. Ao realizar a comparação dos plasmídeos obtidos em nosso estudo com outros plasmídeos carreadores de *bla*$_{\text{TEM-1b}}$ em *N. gonorrhoeae*, uma alta similaridade nucleotídica foi observada, assim como nos outros plasmídeos analisados **(Tabela 8 e Figura 16)**.

Tabela 8 Características gerais dos plasmídeos pBlaTEM descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021

Plasmídeos BlaTEM								
Plasmídeo BlaTEM	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**Posiçao (Contig)**	**Fenótipo de Resistência**	**País**	**Ano**	**Número de Acesso-GeneBank**
pblaTEM 140	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	4.541 a 5.401	β-lactâmicos	Brasil[a]	2008	MT296561
pblaTEM FC460	5.598	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	1.186 a 2.046	β-lactâmicos	Japão	2015-2016	AP018384
pSJ7.4	3.212	39%	_	_	_	Porto Rico	2004	AY221996
pblaTEM FDAARGOS_205	7.450	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	725 a 1.585	β-lactâmicos	USA	-	CP020417
pblaTEM WHO M	5.597	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	1.186 a 2.046	β-lactâmicos	Filipinas	1992	LT591905
pblaTEM WHO N	7.449	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	1.186 a 2.046	β-lactâmicos	Austrália	2001	LT591911
pblaTEM WHO O	5.598	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	1.186 a 2.046	β-lactâmicos	Canadá	1991	LT592147
pblaTEM WHO V	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	1.186 a 2.046	β-lactâmicos	Suécia	2012	LT592151
pJRD20	5.591	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	4.532 a 5.390	β-lactâmicos	Canadá	_	MH140434
pNG GC-159 plasmid JD5	5.597	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	4.532 a 5.390	β-lactâmicos	Canadá	_	MH140435
African TEM-1-MIC 8 plasmid PJD5	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973085
African TEM-1-MIC 16 plasmid PJD5	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	5.060 a 5.600	β-lactâmicos	China	_	MK973084
African TEM-1-MIC 64 plasmid PJD5	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973083

Nota: *O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do plasmídeo. [a.] Este estudo

Tabela 8 (Continuação) Características gerais dos plasmídeos pBlaTEM descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021

Plasmídeos BlaTEM								
Plasmídeo BlaTEM	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**Posiçao (Contig)**	**Fenótipo de Resistência**	**País**	**Ano**	**Número de Acesso-GeneBank**
African TEM-1-MIC 128 plasmid PJD5	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973086
African TEM-1-MIC32 plasmid PJD5	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973082
NG 290 Plasmid p2	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	1.422 a 2.282	β-lactâmicos	Tailândia	_	CP043814
NG 196 plasmid p2	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	1933 a 2793	β-lactâmicos	Tailândia	_	CP043873
Asian TEM-1 MIC-32 plasmid PJD4	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973077
pJD4	7.426	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.886 a 7.426	β-lactâmicos	Ásia	_	U20374
Asian TEM-135- MIC-64 plasmid PJD4	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.865 a 7.405	β-lactâmicos	China	_	MK973079
Asian TEM-135- MIC-16 plasmid PJD4	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973073
Asian TEM-135- MIC-256 plasmid PJD4	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973072
Asian TEM-135- MIC-512 plasmid PJD4	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973081

Nota: *O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do plasmídeo.

Tabela 8 (continuação) Características gerais dos plasmídeos pBlaTEM descritos neste estudo e no mundo até dezembro de 2021

Plasmídeos BlaTEM								
Plasmídeo BlaTEM	**Tamanho dos Plasmídeos (pb)**	**Conteúdo GC (%)**	**Determinantes de Resistência Adquiridos**	**Posiçao (Contig)**	**Fenótipo de Resistência**	**País**	**Ano**	**Número de Acesso-GeneBank**
Asian TEM-1- MIC-256 plasmid PJD4	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973074
Asian TEM-135- MIC-512 plasmid PJD4	7.427	38%	*bla*$_{TEM-1B}$	6.887 a 7.427	β-lactâmicos	China	_	MK973080
NG251 Plasmídeo p2	5.600	40%	*bla*$_{TEM-1B}$	3.063 a 3.923	β-lactâmicos	Tailândia	_	CP043818

Nota: *O alinhamento local (BLASTn) foi realizado utilizando-se parâmetros de similaridade de no mínimo 90% com os plasmídeos depositados no banco de dados do NCBI e com uma cobertura mínima de 90% do tamanho do gene identificado

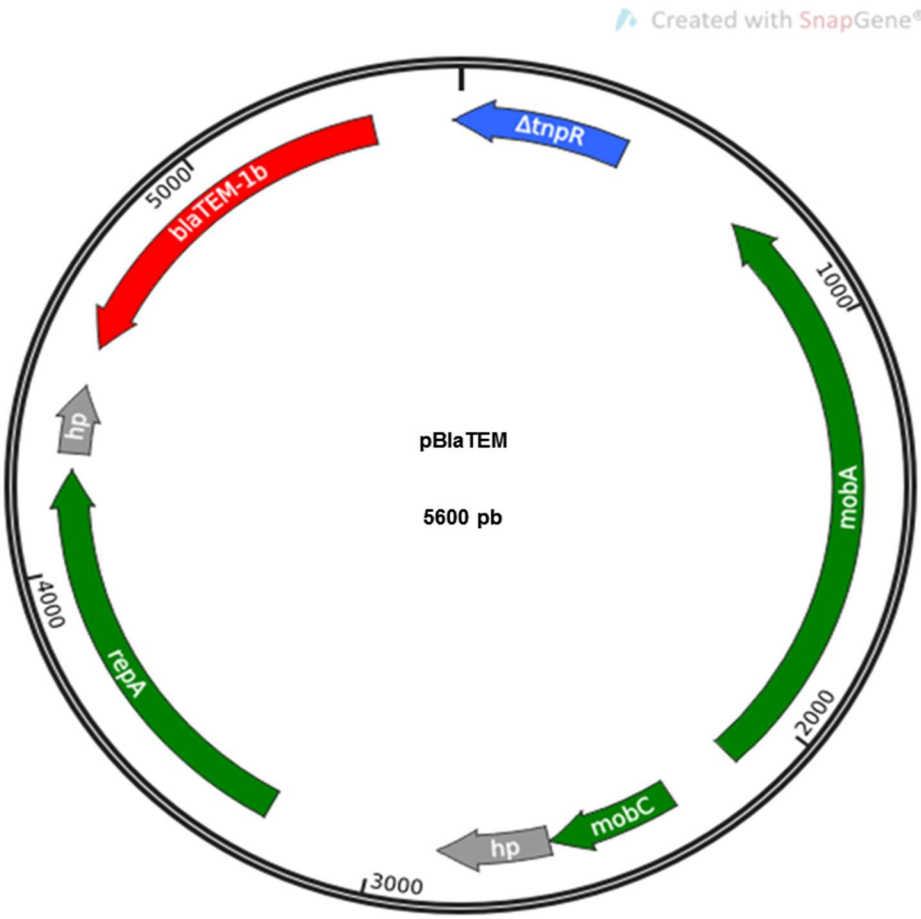


Figura 15 Mapa físico do plasmídeo pBlaTEM detectado no isolado de *N. gonorrhoeae* (NG140). O plasmídeo foi inicialmente submetido à anotação automática pelo RAST e posteriormente cada ORF foi manualmente confirmada pelas ferramentas BlastN e BlastX.

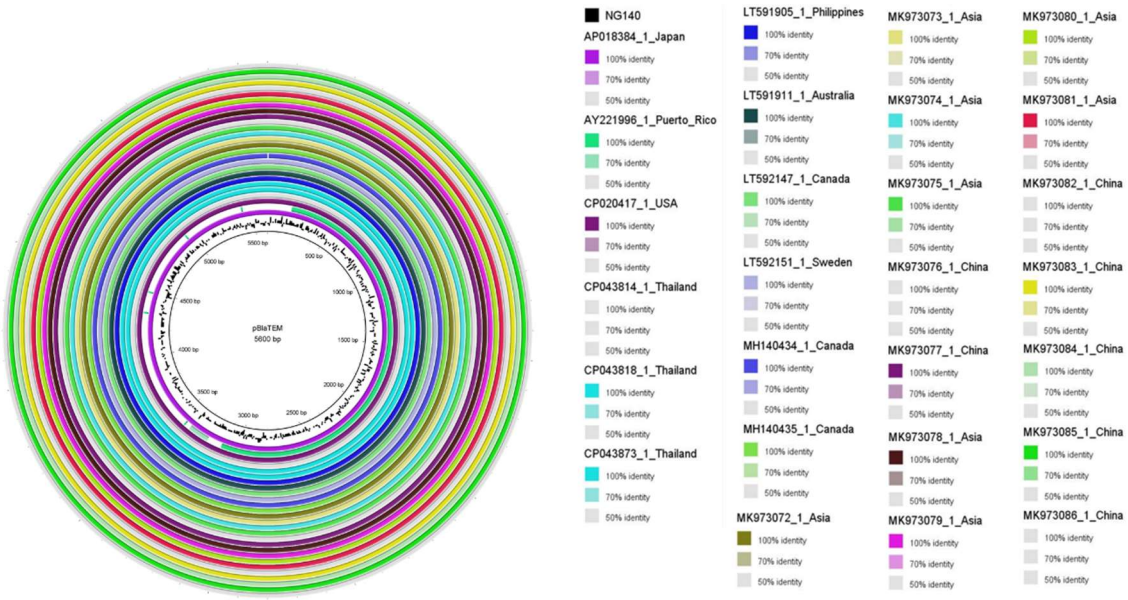


Figura 16 Alinhamento múltiplo dos plasmídeos pBlaTEM detectados no isolado NG140. A figura foi gerada por meio da ferramenta BRIG, onde foram utilizados parâmetros de similaridade superior a 90% de identidade nucleotídica. Os isolados foram comparados com o plasmídeo identificado no isolado NG140. Os demais plasmídeos foram obtidos do banco de dados do GenBank.

6. DISCUSSÃO

A gonorreia é uma IST que apesar de ter sido descrita desde a antiguidade, ainda permanece como um grande problema de saúde pública mundial (Quillin & Seifert, 2018). Neste estudo foram avaliados os genomas de *N. gonorrhoeae* recuperados ao longo 12 anos (2003-2015) na cidade de São Paulo, com o objetivo de contribuir para o delineamento da epidemiologia molecular brasileira e melhor caracterização dos mecanismos genéticos de resistência desses isolados.

O tratamento dessa doença vem se modificando ao longo das décadas devido ao surgimento de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes às distintas classes de antimicrobianos. Atualmente, ele é realizado no Brasil com azitromicina e ceftriaxona e, portanto, a diminuição da sensibilidade a estes dois compostos gera grande preocupação (Costa-Lourenço et al., 2017). Segundo o Ministério da Saúde, a utilização do ciprofloxacino e da azitromicina no tratamento empírico de outras DSTs, como as infecções causadas por C*hlamydia trachomatis*, por exemplo, pode ser também responsável pela seleção e disseminação dos gonococos resistentes.

Assim como em nosso estudo, as resistências às penicilinas são as mais comumente descritas no mundo, inclusive no Brasil, seguida pela resistência a ciprofloxacino (Unemo & Shafer, 2014). Costa e colaboradores (2013), reportaram taxas de resistência em isolados de *N. gonorrhoeae* para penicilina, ciprofloxacino, azitromicina e cefixima de 93,5%, 25,4%, 22,4% e 0,016%, respectivamente, em isolados recuperados em 2011 e 2012, na cidade de Belo Horizonte, MG. Ainda na região Sudeste, Uehara e colaboradores (2001) mostraram que nos isolados de *N. gonorrhoeae* recuperados do Estado do Rio de Janeiro (n=65), houve um aumento da resistência a ciprofloxacino de 6,2% para 33,3% entre os anos de 2003 e 2010, respectivamente. Dentre esses isolados resistentes a ciprofloxacino, 44% apresentaram resistência à penicilina, desses, 32% carreavam determinantes cromossômicos de resistência e 12% plasmidiais. Mais recentemente, Costa-Lourenço e colaboradores, no ano de 2018, mostraram que entre os isolados de *N. gonorrhoeae* recuperados na cidade no Rio de Janeiro, as taxas de resistência para penicilina e ciprofloxacino, chegaram a 99% e 67%, respectivamente. Estes dados demostram a dinâmica evolutiva dos isolados de *N. gonorrhoeae* em relação ao

tratamento com penicilina e ciprofloxacino e o consequente aumento das taxas de resistência a esses antimicrobianos descritas ao redor do mundo (Unemo & Shafer, 2014; WHO,2018).

Foi possível observar que em 2013, entre 120 isolados de *N. gonorrhoeae* recuperados na cidade de Manaus, 16,7%, e 1,7% foram classificados como resistentes à penicilina e a ciprofloxacino, respectivamente. Neste estudo, não foram observados isolados resistentes à azitromicina e à cetriaxona (Ferreira, 2013). Posteriormente, também em Manaus, Ferreira e colaboradores (2017) mostraram que um único isolado de *N. gonorrhoeae* apresentava uma diminuição do perfil de sensibilidade à ceftriaxona (CIM de 0,064 mg/L) pela técnica de E-test. Em nosso estudo, realizado na cidade de São Paulo, um isolado (NG136) com CIM de 0,06 mg/L para ceftriaxona foi observado no ano de 2008. Os isolados de Manaus e de São Paulo com CIMs reduzidas para ceftriaxona, apesentavam mutações distintas em *penA.* Na literatura, as alterações em F504L, A510K, I515V, H541N, I566V e A516G foram associadas à redução da sensibilidade à penicilina e às cefalosporinas.

Apesar de isolados clínicos resistentes à azitromicina e à ceftriaxona terem sido descritos em países da Ásia, da Europa e da América do Norte (Unemo & Shafer, 2014), no Brasil, as taxas de resistência a esses antimicrobianos ainda é considerada baixa (Costa-Lourenço et al., 2017; Ferreira et al., 2017; Costa-Lourenço et al., 2018; Bazzo et al., 2018; Martins et al., 2019). Esses dados sugerem que a preconização da terapia combinada com azitromicina e ceftriaxona parece ser adequada no tratamento da gonorreia em território brasileiro.

Com a finalidade de monitoramento dos perfis de resistência, e a manutenção do tratamento atual da gonorreia, não só no Brasil como em todo mundo, diversos centros sentinelas de referência pertencentes ao WHO-GASP publicam estudos reportando as taxas de resistência aos antimicrobianos (WHO, 2018). Entretanto, há uma variação nos pontos de corte utilizados para a classificação de resistência, que são basedos em documentos distintos, de acordo com a localização de cada centro referência (Costa - Lourenço, et al 2017). Esse fato faz com que seja difícil a comparação das taxas de resistência obtidas pelos diferentes estudos. Além disso, podem existir variações em relação às diferentes metodologias empregadas, como a determinação da CIM pelo método de gradiente de concentração ou por ágar diluição, por exemplo (McAuliffe et al., 2019).

Entre os 13 isolados de *N. gonorrhoeae* selecionados para o presente estudo, foi possível observar que a maioria deles eram resistentes à penicilina e ao ciprofloxacino. A resistência à penicilina entre os isolados analisados, deve-se principalmente às alterações em PBP1, *ponA* (L421P) e em PBP2, *penA* (Unemo & Saher, 2014). Todos os isolados apresentaram alterações em PBP2*,* sendo as substituições F504L, A510V e A515V as mais frequentemente encontradas. Entretanto, os isolados NG221 e NG222 apresentaram um maior número de mutações em PBP2 (n=12). Entre os gonococos que apresentaram CIMs ≥ 4 mg/L para penicilina, também estavam presentes às mutações em *porB* (G120k e A121S) e *mtrR* (A39T e G45D). Estas mesmas mutações foram observadas e associadas às taxas de resistência à penicilina em outros estudos publicados em território brasileiro (Unemo & Shafer; Lan et al., 2020; Golparian et al., 2020).

Embora PilQ seja uma secretina envolvida na formação do sistema de secreção tipo IV e relacionada com a patogenicidade de isolados de *N. gonorrhoeae,* estudos *in vitro* mostraram que mutações específicas nessa proteína podem levar a um aumento da CIM para penicilina. Zhao e colaboradores (2005) mostraram que os gonococos que apresentam alterações em *pilQ*, juntamente com as alterações em *penA*, *penB* e *mtrR* apresentavam CIMs elevadas para penicilina. Esse mesmo fenômeno foi observado no isolado NG297 (CIM = 4 mg/L para penicilina) incluído no presente estudo.

Adicionalmente, o gene de resistência adquirido $bla_{TEM\text{-}1}$ foi identificado em único isolado (NG140), assim como em outro estudo brasileiro de Costa-Lourenço e colaboradores (2018), o qual também associou as CIMs ≥ 4 mg/L para penicilina à presença deste gene. O isolado carreador de $bla_{TEM\text{-}1}$ do presente estudo pertencia ao ST1902, contrastando com o estudo anterior realizado na cidade do Rio de Janeiro, no qual a maioria dos isolados carreadores $bla_{TEM\text{-}1}$ pertenciam ao ST1588 (Costa-Lourenço, 2018). Foi evidenciado ainda no estudo conduzido por Costa-Lourenço, (2018), altas taxas de resistência à azitromicina (CIMs de 2 a 16 mg/L) devido a mutações C2611T em *rrl*, que codifica o rRNA 23S. Esses achados não foram observados entre os isolados recuperados na cidade de São Paulo e avaliados no nosso estudo. No estudo realizado por Ng e colaboradores (2002) a presença de alterações em *mtrR* foi observada nos isolados que apresentavam CIMs ≥1,0 mg/L para azitromicina. Entretanto, em nosso estudo, isolados de *N. gonorrhoeae* que

apresentaram CIMs ≥ 0,5 mg/L para azitromicina também apresentavam essas alterações em *mtrR.*

As mutações em *gyrA* (S91F e D95G) observadas em nossas análises são também as mais comumente descritas em outros estudos (Ferreira et al., 2013; Harrison et al., 2021). Altas CIMs para ciprofloxacino são comumente associadas às mutações concomitantemente em *gyrA e parC*, (Unemo & Shafer, 2014), como observado no isolado NG97 desse estudo. Entretanto, mutações em *gyrA* associadas a outros mecanismos de resistência, como é o caso das alterações em *mtrR, também* foram observadas em outros isolados de *N. gonorrhoeae* com CIMs ≥ 2 mg/L para ciprofloxacino.

Mutações responsáveis pelo fenótipo de resistência às sulfonamidas (alterações em *folP*) e às tetraciclinas foram observadas entre os isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*. Entretanto, testes de sensibilidade as sulfonamidas e as tetraciclinas não foram empregados por não serem mais recomendadas no tratamento da gonorreia (WHO, 2018). Interessantemente, a análise do genoma total mostrou a presença de plasmídeos carreadores de *tetM* entre os isolados de *N. gonorrhoeae* (n=4). Os isolados carreadores de *tetM* pertenciam a distintos clones [C5 (ST8161), L1 (ST15640), F1 (ST8161)] que foram recuperados em diferentes anos (2003, 2004, 2005). De acordo com a literatura, a presença do gene *tetM* é responsável por altos níveis de resistência às tetraciclinas em *N. gonorrhoeae* (Morse et al., 1986).

Na Argentina e em Manaus (Cobo et al., 1998, Dilon et al., 2001) já foram reportados relatos da circulação do plasmídeo Holandês. No estudo mais recente realizado com isolados de *N. gonorrhoeae* recuperados da cidade do Rio Janeiro, foi reportado além da circulação do plasmídeo tipo Holandês, a circulação do plasmídeo Americano (Costa-Lourenço, et al.,2017). Estes resultados demostram que esses plasmídeos circulam há mais de duas décadas no continente Sul-Americano.

A compreensão da relação clonal entre os isolados de *N. gonorrhoeae* importante para compreender como os clones são selecionados e se disseminam (Costa-Lourenço et al., 2018). Além do sequenciamento completo dos genomas, advento que vem auxiliando a obtenção de dados microbiológicos mais detalhados, outros métodos de tipagem são frequentemente empregados na tipagem de *N. gonorrhoeae*, como por exemplo, o NG-MAST (www.ng-mast.net//), método que avalia dois loci variáveis de *porB* e *tbpB.* Esse método é empregado para a avaliação de estudo microepidemiológicos devido ao seu caráter discriminatório, pois avalia a

variabilidade genética de uma determinada população, com a finalidade de acompanhar a disseminação dessas infecções (Lina et al., 2010). A determinação do MLST (www.pubmlst.org/neisseria/), pela caracterização dos setes genes conservados entre os isolados de *N. gonorrhoeae,* também possui a capacidade de avaliar e rastrear a disseminação de clones de *N. gonorrhoeae*. Já o NG-STAR (www.ng.star.canada.ca/) é aplicado para avaliar a disseminação exclusivamente de isolados de *N. gonorrhoeae* multirresistentes, baseado na avaliação dos genes de resistência mais frequentemente descritos entre os gonococos (Demczuk et al., 2017).

No presente estudo, ao analisarmos os STs dos isolados resistentes, observamos que um único isolado (NG140) pertencia ao ST1902. Este mesmo ST também foi identificado por Ferreira e colaboradores no ano de 2008 em isolados de *N. gonorrhoeae* produtores de β-lactamases recuperados em Manaus, AM. Recentemente, Golparian e colaboradores (2020) caracterizaram 548 isolados de *N. gonorrhoeae* provenientes das cinco regiões brasileiras e da Argentina, sendo o ST1901 e o ST8161 os mais frequentes em todo o território brasileiro. Na cidade de São Paulo os STs mais observados foram NG-MAST (ST338 e ST1407), MLST (ST1901 e ST158), e NG-STAR (ST90 e ST2217). Em nosso estudo, os isolados NG297 e NG314 pertenciam ao ST8161, ST1812 e ST42. Já os isolados NG221 e NG222 pertenciam ao ST1901, ST6210 e ST90, de acordo com as plataformas MLST, NG-MAST e NG-STAR, respectivamente. Interessantemente, estes quatro isolados apresentaram perfis distintos pela técnica de PFGE.

A variedade de STs encontrada entre os isolados de *N. gonorrhoeae*, incluindo os relatados no presente estudo, pode ser devida a variação temporal da obtenção desses isolados. Entretanto, o fato de encontramos em nossas análises isolados pertencentes ao NG-STAR (ST90), sugere o sucesso da disseminação desse ST nesta região, pois Golparian e colaboradores (2018) observaram a permanência desse ST em isolados de *N. gonorrhoeae* coletados posteriormente a data do nosso estudo.

Entre os isolados de *N. gonorrhoeae* recuperados no período de 2003 a 2015, foi possível observar que os pertencentes ao ST1901 eram resistentes a todos os antimicrobianos testados (penicilina, tetraciclina e azitromicina), e apresentavam redução da sensibilidade à cefixime (Costa-Lourenço et al., 2018). Em relação às cefalosporinas testadas em nosso estudo, optamos por testar uma cefalosporina de segunda geração, cefuroxima (CLSI, 2015), e uma de terceira geração, a ceftriaxona,

ambas utilizadas no tratamento da gonorreia. Podemos observar, que os isolados NG136 e NG222 foram classificadas como resistentes à cefuroxima (CIMs de 4,0 mg/L e 8,0) enquanto todos os isolados foram sensíveis à ceftriaxona.

A análise filogenética de 41 genomas de *N. gonorrhoeae*, provenientes do banco de dados ENA (Brazilian - GASP publicado por Golparian e colaboradores em 2020), NCBI (genomas de referência WHO-GASP) e os 13 genomas do presente estudo, mostrou que os isolados NG100, NG136, NG266 e NG326 estão geneticamente relacionados ao isolado WHO-W (Hong Kong), enquanto os isolados NG224, NG297 e NG314 estão relacionados ao isolado WHO-F (Canadá). Os isolados NG97 e NG140 foram agrupados com o isolado WHO-O (Canadá). Além disso, os isolados NG221 e NG222 estavam intimamente relacionados ao isolado WHO-Y (França), todos pertencentes ao ST1901. Finalmente, os isolados NG277 e NG251 foram relacionados ao isolado WHO-P (EUA). Esses dados aliados à tipagem por MLST demonstraram que os clones de *N. gonorrhoeae* recuperados em 2015 e 2016 no Brasil estavam intimamente relacionados aos que circulavam entre 2003 e 2015, além de estarem relacionados com clones internacionais.

Os plasmídeos são elementos genéticos responsáveis pela transferência horizontal de material genético, incluindo determinantes de resistência, e possuem a capacidade de se disseminar rapidamente em uma população. Sabe-se que nos isolados de *N. gonorrhoeae,* os plasmídeos contribuíram para disseminação de isolados altamente resistentes à penicilina e à tetraciclina (Roberts, 1989).

Com a intenção de caracterizar e comparar os plasmídeos obtidos durante a análise genômica dos gonococos, um isolado representativo (NG140) foi selecionado por carrear os três plasmídeos (pCríptico, pConjuativo e pBlaTEM) descritos na literatura em isolados de *N. gonorrhoeae*. Em nosso estudo, os plasmídeos encontrados nos gonococos variaram entre 4 a 9 Kb, com exceção dos plasmídeos conjugativos que variaram de 39 a 42 Kb. Um dos plasmídeos com as sequências mais conservadas e o mais relatados em isolados de *N. gonorrhoeae*, é o plasmídeo Críptico. Esse plasmídeo estava presente em todos os isolados incluídos no estudo, e se mostrou altamente semelhantes aos plasmídeos descritos ao redor do mundo. Em um estudo anterior publicado em 1979 por Roberts, Piot & Falkow, foi reportado que esse tipo de plasmídeo circula entre os gonococos desde 1949. A alta ocorrência deste plasmídeo também foi encontrada por Roberts, Piot & Falkow, em 1979, que o observou em 96% dos gonococos ao redor do mundo. Assim como relatado na

literatura, o pCríptico encontrado no presente estudo apresentou replicases, genes *rep,* gene de mobilização, *mobC*, um sistema toxina/antitoxina (sistema VapD/VapX) e proteínas hipotéticas. De acordo com a literatura, os pCrípticos carreiam quatro proteínas hipotéticas, em nosso estudo encontramos apenas duas proteínas hipotéticas e três proteínas crípticas plasmidiais (*ccpA*, *ccpB, ccpC*). Estes genes codificadores de proteínas criptícas plamidiais são classificadas como "*open reading frames"* específicas, nomeadas como *ccpA*, *ccpB, ccpC* (Sarandopulos & Davies, 1993). De acordo com o estudo publicado por Sarandopulos & Davies, 1993, na região de mobilização há dois promotores responsáveis pela transcrição de *ccpA* e *ccpB*, que podem transcrever a inativação dessa região de mobilização. Entretanto, nos plasmídeos analisados no presente estudo tais promotores não foram encontrados, o que sugere que eles estão presentes em plasmídeos precursores, o qual a região de mobilização foi separada. Sarandopoulos & Davies defenderam a ideia de que a inserção orginal ocorreu após a fusão do final 5´, equivalente ao gene *mobB*, com a região 3´equivalente ao gene precursor críptico (*ccpB*). Os autores também sugeriram que os genes envolvidos nessa fusão seriam expressos quando o gonococo fosse exposto às condições ambientais, havendo a possibilidade de que a transcrição do gene *ccpB* fosse controlada de acordo com altas concentração de ferro. Além disso, as análises com outros pCrípticos sugerem que a presença dos genes acima relatados, aparentemente sem funções tão significativas, pode ser importante para a sobrevivência dos gonococos quando em contato com determinadas condições ambientais.

Em um estudo com *H. influenzae* foi possível observar que *vapD* possui uma importante função de ribonuclease capaz de clivar o RNAm, aumentando desta forma a sobrevivência do *H. influenzae in vivo* (Daines, Jarshch, Smith, 2004). Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar se a presença deste gene faria com que os isolados de *N. gonorroheae* se comportassem da mesma maneira (Cehovin & Lewis, 2017). De acordo com Roberts, 1989, esse plasmídeo mesmo sendo altamente disseminado, não apresentam nenhum fenótipo ou gene de virulência em seu arcabouço genético.

Já os plasmídeos conjugativos são maiores (~42kb). De acordo com o conteúdo genético, os plasmídeos conjugativos incluídos no estudo puderam ser comparados com o plasmídeo IncP1, encontrados em outros isolados gram-negativos. O IncP1 geralmente carreia genes de replicação (*ssb* e *trfA*), de transferência (tra) e de

formação de *mating-pair* (*trb*) (Cehovin & Lewis, 2017). Um Sistema Toxina-Antitoxina (TA): Zeta/Epsilon, que possui a finalidade de interromper a síntese de peptideoglicano, também foi observado em plasmídeos conjugativos e pode ser responsável por sua manutenção (Pachulec & van der Does, 2010; Mutschler & Meinhart, 2013). Devido essa função, os plasmídeos que carreiam o TA Zeta/Epsilon são comumente encontrados em gram-positivos. (Cehovin & Lewis, 2017). Assim como nos pCrípticos, e corroborando com as características dos plasmídeos brasileiros, o gene *vapD* também relatado nos pConjugativos, entretanto possui uma similaridade de apenas 30% com um plasmídeo críptico conhecido internacionalmente, o pJDI (Daines, Jarisch & Smith, 2004; Pachulec and van der Does, 2010). O *vapX* (antitoxina) não foi observado em plasmídeos conjugativos de *N. gonorrhoeae.* Da mesma forma que os plasmídeos conjugativos disseminados nos distintos continentes, o *tetM*, gene de resistência à tetraciclina, foi detectado na maioria dos plasmídeos conjugativos brasileiros, com exceção do isolado NG140. O motivo da aquisição ou perda do *tetM* ainda é desconhecido, pois as sequências de transposição não haviam sido observadas flanqueando o *tetM* (Pachulec & van der Does, 2010)

Interessantemente, assim como em quatro pConjugativos de *N. gonorrhoeae* incluídos no presente estudo, o gene *tetM* faz parte da constituição destes plasmídeos e são associados com altas CIMs para tetraciclina (Knapp et al., 1998). Sabe-se que há dois tipos de plasmídeos que carreia *tetM,* o Holandês e o Americano, que diferem por uma IS, *Tn*916, a qual é localizada "*upstream"* de *TetM* (Gascoyne et al., 1991).

Embora os plasmídeos carreadores de genes codificadores de β-lactamases tenham sido reportados desde 1976, e frequentes em isolados de gonococos resistentes à penicilina (Dilon &Yeung, 1989), o plasmídeo BlaTEM, foi identificado em apenas uma isolado de *N. gonorrhoeae* (NG140), o qual apresentou CIM >4mg/ L para penicilina. Apesar de tais plasmídeos produtores de β-lactamases em sua grande maioria serem derivados do plasmídeo Asiático (pJD4) (Pagotto et al., 200), geralmente, têm sido nomeados de acordo com as suas origens epidemiológicas, entre eles o plasmídeo Toronto (Dillon & Yeung, 1989) e o plasmídeo Rio (praticamente idêntico ao Toronto) (Van Embden et al., 1985), Nimes (Gouby et al., 1986), Nova Zelândia (Brett, 1989), e Johannesburgo (Muller et al., 2011. O primeiro gene de β-lactamase identificado em gonococos foi $bla_{\text{TEM-1}}$, e antes disso mais de 220 alelos bla_{TEM} foram identificados (NCBI 2016). Os plasmídeos pBlaTEM carreiam

gene de conjugação, mas se transferem por um processo chamado mobilização. De acordo com Dillon & Yeung, 1989, pBlaTEM é transferido para outra *Neisseria* spp. na ausência de pressão antimicrobiana. Rodrigues-Bonano & Torres (2004) mostraram que a mobilização necessita de proteína de mobilização MobA. Os plasmídeos Rio-Toronto, não carreiam a região de mobilização, e tal evento ocorre pela co-integração com um plasmídeo críptico (Scharbaai-Vazquez, Candelas & Torres-Bauza 2007). Adicionalmente, o NG140 possui um gene *tnprR* truncado.

Desta forma, podemos observar que o pConjugatico e o pBlaTEM, contribuíram para a disseminação de genes de resistência à tetraciclina e penicilina. A maioria dos gonococos descritos em todo o mundo abriga os mesmos três tipos de plasmídeos conservados, que também foram observados nos treze isolados brasileiros. Desta forma, concluímos que os plasmídeos pCrítptico, pConjugativo e pBlaTEM são encontrados em isolados de *N. gonorrhoeae* em todo mundo, com alta similaridade entre eles, sugerindo sua contribuição para a disseminação e evolução de *N. gonorrhoeae.*

De acordo com as análises filogenéticas e de MLST realizadas no presente estudo, demonstramos que os clones de *N. gonorrhoeae* recuperados em 2015 e 2016 em São Paulo (Golparian et al., 2018) estavam intimamente relacionados com aqueles que circulavam entre 2003 e 2015 (Martins et al, 2019) na mesma região geográfica. Além disso, observamos que o clone NG-STAR ST90 já havia surgido em 2013, o que pode sugerir o seu sucesso no estabelecimento e disseminação no Brasil. Além disso, fornecemos acesso público aos 13 genomas dos isolados de *N. gonorrhoeae* e seus metadados associados, o que pode contribuir para o conhecimento das cepas de *N. gonorrhoeae* que circulam em São Paulo. Sugerimos também que isolados que exibem CIMs de cefuroxima de 4 mg/L e 8 mg/L devam ser objetos de futuras investigações para os esclarecimentos dos mecanismos subjacentes que justifiquem a sua resistência aos β-lactâmicos.

7. CONCLUSÃO

- Foram avaliados os resistomas de 13 isolados de *N. gonorrhoeae* entre os anos de 2003 a 2015;
- O clone ST90/CC90 foi observado em São Paulo em um isolado recuperado no ano de 2013;
- Foram detectados genes e mutações de resistência a cinco classes de antimicrobianos distintos;
- De acordo com os nossos resultafos, um ECOFF de 0,25 mg/L para azitromicina seria mais adequado para discriminar as mutações possivelmente presentes nestes isolados;
- A maioria dos gonococos descritos em todo o mundo abriga os mesmos três tipos de plasmídeos conservados, que também foram observados nos treze isolados brasileiros.

8. REFERÊNCIAS

AGSP. Australian Gonococcal Surveillance Program. Communicable Diseases Intelligence. 2021. Volume 45. Available from : https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/5C71FABF639650F6CA2586520081286B/$File/australian_gonococcal_surveillance_programme_annual_report_2020.pdf

Alcock BP, et al., 2020. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res. 48(D1): D517-D525.

Amies CR. Development of resistance of gonococci to penicillin: an eight-year study. Can Med Assoc J. 1967;7;96(1):33-5. PM.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapeuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). Nº 9/2020/CGIST/DCCI/SVS/MS/. 2020. Available from: http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-atencao-integral-pessoas-com-infeccoes

Ashford WA, Golash RG, Hemming VG. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet. 1976; 25; 2(7987):657-8.

Bailey AL, Potter RF, Wallace MA, Johnson C, Dantas G, Burnham CA. Genotypic and Phenotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: a Cross-Sectional Study of Isolates Recovered from Routine Urine Cultures in a High-Incidence Setting. mSphere. 2019; 24;4(4): e00373-19

Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhea: the impending problem of resistance. Expert Opin Pharmacother. 2009;10(4):555-77.

Bazzo ML, Golfetto L, Gaspar PC, Pires AF, Ramos MC, Franchini M, Ferreira WA, Unemo M, Benzaken AS; Brazilian-GASP Network. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015-16. J Antimicrob Chemother. 2018; 1;73(7):1854-1861.

Belda Junior W, Velho PE, Fagundes LJ, Arnone M. Evaluation of the in vitro activity of six antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007;49(1):55-8.

Bignell C, Unemo M; European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoeae in adults. Int J STD AIDS.2013; 24(2):85-92.

Birley H, McDonald P, Carey P, Fletcher J. High level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Genitourin Med. 1994 Aug;70(4):292-3.

Brett M. A novel gonococcal beta-lactamase plasmid. J Antimicrob Chemother. 1989;23(4):653-4.

Bush K. Past and Present Perspectives on β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2018; 24;62(10):e01076-18.

Callaghan MM, Heilers JH, van der Does C, Dillard JP. Secretion of Chromosomal DNA by the *Neisseria gonorrhoeae* Type IV Secretion System. Curr Top Microbiol Immunol. 2017; 413:323-345.

Campbell DJ. Gonorrhoea in N. Africa and Central Mediterranean. Br Med J. 1944 Jul 8;2(4357):44.

Canada PHA of, Canada PHA od National Surveillance of Antimicrobial Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* – Anual Summary, 2014. Available from: https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/national-surveillance-antimicrobial-susceptibilities-neisseria-gonorrhoeae-annual-summary-2014.html.

Canada PHA of, Canada PHA od National Surveillance of Antimicrobial Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* – Anual Summary, 2018. https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/national-surveillance-antimicrobial-susceptibilities-neisseria-gonorrhoeae-annual-summary-2018.html.

CDC. Gonococcal Isolates Surveillance Project Profiles; 2014. http://www.cdc.gov/std/gisp2014/gisp-2014-text-fig-tables.pdf.

CDC. Sexually Transmited Diseases Treatment Guidelines, 1989. https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001459.htm

CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2018: Gonococcal Isolate Surveillance Program Project (GISP). Supllement and Profiles. https://www.cdc.gov/std/stats18/GISP2018/docs/gisp_2018_supplement_final_2020.pdf

.

Cehovin A, Lewis SB. Mobile genetic elements in *Neisseria gonorrhoeae:* movement for change. Pathog Dis. 2017; 31;75(6).

Chalkley LJ, Janse van Rensburg MN, Matthee PC, Ison CA, Botha PL. Plasmid analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates and dissemination of *tetM* genes in southern Africa 1993-1995. J Antimicrob Chemother. 1997;40(6):817-22.

Chisholm SA, Dave J, Ison CA. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(9):3812-6.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001;65(2):232-60

CLSI, 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth. Internacional Supplement/ Cnilinal Laboratory Standards Institute document M100-S25. Wayne, PA.

CLSI, 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Third one. Internacional Supplement/ Cnilinal Laboratory Standards Institute document M100-S25. Wayne, PA. http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED31:2021&scope=user

Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. Bioinformatics. 2015;31(4):587-9.

Cokkinis AJ. Sulphanilamide in Gonorrhoea. Br Med J. 1937 Nov 6;2(4009):905-9.
Costa LM, Pedroso ER, Vieira Neto V, Souza VC, Teixeira MJ. 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. 2013;46(3):304-9.

Costa-Lourenço APR, Abrams JA, Barros Dos Santos KT, Coelho-Souza T, Moreira BM, Fracalanzza SEL, Trees DL, Bonelli RR. Reduced susceptibility to cefixime but not ceftriaxone: an uncertain perspective for the treatment of gonorrhoea in Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2017;49(4):515-516.

Costa-Lourenço APRD, Abrams AJ, Dos Santos KTB, Argentino ICV, Coelho-Souza T, Caniné MCA, Ferreira ALP, Moreira BM, Fracalanzza SEL, Trees DL, Bonelli RR. Phylogeny and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. Infect Genet Evol. 2018; 58:157-163

Costa-Lourenço APRD, et al., Phylogeny and antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. Infect Genet Evol. 2018; 58:157-163.

Cristillo AD, Bristow CC, Torrone E, Dillon JA, Kirkcaldy RD, Dong H, Grad YH, Nicholas RA, Rice PA, Lawrence K, Oldach D, Shafer WM, Zhou P, Wi TE, Morris SR,

Klausner JD. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Proceedings of the STAR Sexually Transmitted Infection-Clinical Trial Group Programmatic Meeting. Sex Transm Dis. 2019;46(3):e18-e25.

Daines DA, Jarisch J, Smith AL. Identification and characterization of a nontypeable Haemophilus influenzae putative toxin-antitoxin locus. BMC Microbiol. 2004; 26;4:30.

Demczuk W, Sidhu S, Unemo M, Whiley DM, Allen VG, Dillon JR, Cole M, Seah C, Trembizki E, Trees DL, Kersh EN, Abrams AJ, de Vries HJC, van Dam AP, Medina I, Bharat A, Mulvey MR, Van Domselaar G, 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. 2017;55(5):1454-1468.

Dillon JA, Yeung KH. Beta-lactamase plasmids and chromosomally mediated antibiotic resistance in pathogenic *Neisseria* species. Clin Microbiol Rev. 1989; 2 Suppl(Suppl):S125-33.

Douthwaite S, Champney WS. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. J Antimicrob Chemother. 2001;48 Suppl T1:1-8.

ECDC. Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance inEurope 2014. Stockholm: ECDC; 2016 http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2014.pdf.

ECDC. Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance inEurope 2014. Stockholm: ECDC; 2016 http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2014.pdf.

ECDC. Gonococcal Antimicrobial Susceptibitility Survaillence in Europe. 2018. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-Euro-GASP-2018.pdf.

ECDC: Annual Epidemiological Report for 2018 – Gonorrheae. European Centre for Disease Prevention and Control;2018. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2018

Elwell LP, Roberts M, Mayer LW, Falkow S. Plasmid-mediated beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother. 1977;11(3):528-33.

Endimiani A, Guilarte YN, Tinguely R, Hirzberger L, Selvini S, Lupo A, Hauser C, Furrer H. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Switzerland (1998-2012): emergence of multidrug-resistant clones less susceptible to cephalosporins. BMC Infect Dis. 2014; 25; 14: 106.

Engelkirk PG, Schoenhard DE. Physical evidence of a plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. J Infect Dis. 1973;127(2):197-200.

Fedarovich A, Cook E, Tomberg J, Nicholas RA, Davies C. Structural effect of the Asp345a insertion in penicillin-binding protein 2 from penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Biochemistry. 2014; 9;53(48):7596-603.

Ferreira WA. Caracterização Genotípica e Fenotípica de Isolados de *Neisseria gonorrhoeae* Resistentes a Antibióticos em Ambulatório de Doenças Sexualmente Transmissíveis em Manaus [tese]. Manaus. Universidade do Estado do Amazonas, 2013.

Ferreira WA, et al., 2013. Molecular epidemiology of β-lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Manaus, AM, Brazil. Sex Transm Dis. 40(6):469-472.

Ferreira WA, Ferreira CM, Naveca FG, Almeida NC, Vasconcelos Wde S, Gomes Jde S, Silva Mde F, Alecrim Md. Genotyping of two *Neisseria gonorrhoeae* fluroquinolone-

resistant strains in the Brazilian Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(5):629-31

Ferreira WA, Vasconcelos WS, Gomes JS, Silva MFPS, Naveca FG, Ferreira MC. Genotypind of the Resistance Determinant of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to ceftriaxone in Manaus -AM- Brazil. SOJ Microbilogy & Infectious Diseases. 2017. 5 (3):1-3.

Franks AG. Successful combined treatment of penicillin-resistant gonorrhea. Am J Med Sci. 1946; 211:553-5.

Galarza PG, Alcalá B, Salcedo C, Canigia LF, Buscemi L, Pagano I, Oviedo C, Vázquez JA. Emergence of high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain isolated in Argentina. Sex Transm Dis. 2009;36(12):787-8.

Gascoyne DM, Heritage J, Hawkey PM, Turner A, van Klingeren B. Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmids carrying TetM found in *Neisseria gonorrhoeae* from different countries. J Antimicrob Chemother. 1991;28(2):173-83.

Gianecini R, Oviedo C, Guantay C, Piccoli L, Stafforini G, Galarza P. Prevalence of bla TEM-220 gene in Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying Toronto/Rio plasmid in Argentina, 2002 - 2011. BMC Infect Dis. 2015; 16; 15:571.

Giles JA, Falconio J, Yuenger JD, Zenilman JM, Dan M, Bash MC. Quinolone resistance-determining region mutations and por type of *Neisseria gonorrhoeae* isolates: resistance surveillance and typing by molecular methodologies. J Infect Dis. 2004 Jun 1;189(11):2085-93.

Golparian D, Bazzo ML, Golfetto L, Gaspar PC, Schörner MA, Schwartz Benzaken A, Ramos MC, Ferreira WA, Alonso Neto JB, Mendes Pereira GF, Unemo M; Brazilian-GASP Network. Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* elucidating the gonococcal antimicrobial resistance and lineages/sublineages across Brazil, 2015-16. J Antimicrob Chemother. 2020; 1;75(11):3163-3172.

Gouby A, Bourg G, Ramuz M. Previously undescribed 6.6-kilobase R plasmid in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother. 1986;29(6):1095-7.

Gransden WR, Warren CA, Phillips I, Hodges M, Barlow D. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. Lancet. 1990 Jan 6;335(8680):5

Hagman KE, Pan W, Spratt BG, Balthazar JT, Judd RC, Shafer WM. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system. Microbiology (Reading). 1995;141 (Pt 3):611-22.

Hagman KE, Shafer WM. Transcriptional control of the mtr efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. 1995;177(14):4162-5.

Harrison OB, Maiden MC. Recent advances in understanding and combatting *Neisseria gonorrhoeae*: a genomic perspective. Fac Rev. 2021 Aug 27;10:65.

Hiasa H, Shea ME. DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. J Biol Chem. 2000 Nov 3;275(44):34780-6.

Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 ;1;6(9):a025320.

Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas RA. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rpsJ* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(10):4327-34.

Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res. 1999; 9(9):868-77.

Ison CA, Mouton JW, Jones K, Fenton KA, Livermore DM; North Thames Audit Group. Which cephalosporin for gonorrhoea? Sex Transm Infect. 2004;80(5):386-8.

Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. 2005 Jul 15;41 Suppl 2:S120-6.

Jephcott AE, Turner A. Ciprofloxacin resistance in gonococci. Lancet. 1990; 20;335(8682):165.

Jeverica S, Golparian D, Matičič M, Potočnik M, Mlakar B, Unemo M. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006-12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? J Antimicrob Chemother. 2014;69(6):1517-25.

Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb

Katz AR, Komeya AY, Soge OO, Kiaha MI, Lee MV, Wasserman GM, Maningas EV, Whelen AC, Kirkcaldy RD, Shapiro SJ, Bolan GA, Holmes KK. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin: case report of the first isolate identified in the United States. Clin Infect Dis. 2012;54(6):841-3.

Knapp JS, Zenilman JM, Biddle JW, Perkins GH, DeWitt WE, Thomas ML, Johnson SR, Morse SA. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline. J Infect Dis. 1987;155(4):819-22.

Korch C, Hagblom P, Ohman H, Göransson M, Normark S. Cryptic plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*: complete nucleotide sequence and genetic organization. J Bacteriol. 1985;163(2):430-8.

Lan PT, Golparian D, Ringlander J, Van Hung L, Van Thuong N, Unemo M. Genomic analysis and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Vietnam in 2011 and 2015-16. J Antimicrob Chemother. 2020;1;75(6):1432-143

Larsen MV, et al., 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J ClinMicrobiol. 50(4):1355-1361.

Lewis DA. The Gonococcus fights back: is this time a knock out? Sex Transm Infect. 2010;86(6):415-21.

lina EN, Oparina NY, Shitikov EA, Borovskaya AD, Govorun VM. Molecular surveillance of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. J Clin Microbiol. 2010;48(10):3681-9.

Luna VA, Cousin S Jr, Whittington WL, Roberts MC. Identification of the conjugative mef gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(9):2503-6.

Marquez CM, Dillon JA, Rodriguez V, Borthagaray G. Detection of a novel Tet M determinant in tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* from Uruguay, 1996-1999. Sex Transm Dis. 2002;29(12):792-7.

Martins WMBS, Gales AC. Frequent Tn2 Misannotation in the Genetic Background of rmtB. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 25;61(8):e00811-17.

Martins RA, Cassu-Corsi D, Nodari CS, Cayô R, Natsumeda L, Streling AP, Doi AM, da Silva RJC, Bocalon RAL, Gales AC, Pignatari ACC. Temporal evolution of antimicrobial resistance among *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates in the most populated South American Metropolitan Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2019. 114:e190079.

McAuliffe GN, Smith M, Cooper G, Forster RF, Roberts SA. Variability in Azithromycin Susceptibility Results for *Neisseria gonorrhoeae* Obtained Using Gradient MIC Strip and Agar Dilution Techniques. J Clin Microbiol. 2019 Nov 22;57(12):e01353-19.

Ministério da Saúde. Estimativas de incidência das DST no Brasil. Número 1. Ministério da Saúde/SPS/PN DST e AIDS Cadernos de DST, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

Młynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. Med Microbiol Immunol. 2020;209(2):95-108.

Morel F, Jacquier H, Desroches M, Fihman V, Kumanski S, Cambau E, Decousser JW, Berçot B. Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of Neisseria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 ;37(12):2273-2277.

Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. Antimicrob Agents Chemother. 1986;30(5):664-70

Muhammad I, Golparian D, Dillon JA, Johansson A, Ohnishi M, Sethi S, Chen SC, Nakayama S, Sundqvist M, Bala M, Unemo M. Characterisation of *bla*$_{TEM}$ genes and types of β-lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* - the prevalent and conserved *bla*$_{TEM-135}$ has not recently evolved and existed in the Toronto plasmid from the origin. BMC Infect Dis. 2014; 22;14:454.

Müller EE, Fayemiwo SA, Lewis DA. Characterization of a novel β-lactamase-producing plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*: sequence analysis and molecular typing of host gonococci. J Antimicrob Chemother. 2011;66(7):1514-7

Newman LM, Moran JS, Workowski KA. Update on the management of gonorrhea in adults in the United States. Clin Infect Dis. 2007; 1;44 Suppl 3:S84-101.

Ng LK, Martin I, Liu G, Bryden L. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Sep;46(9):3020-5

Ohneck EA, Zalucki YM, Johnson PJ, Dhulipala V, Golparian D, Unemo M, Jerse AE, Shafer WM. A novel mechanism of high-level, broad-spectrum antibiotic resistance caused by a single base pair change in *Neisseria gonorrhoeae*. mBio. 2011;20;2(5):e00187-11.

Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(7):3538-45.

Ohnishi M, Ono E, Shimuta K, Watanabe H, Okamura N. Identification of TEM-135 beta-lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(7):3021-3.

Olesky M, Hobbs M, Nicholas RA. Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:2811-2820.

Olesky M, Zhao S, Rosenberg RL, Nicholas RA. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. J Bacteriol. 2006; 188:2300-2308.

Osaka K, Takakura T, Narukawa K, Takahata M, Endo K, Kiyota H, Onodera S. Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone. J Infect Chemother. 2008;14(3):195-203.

Pachulec E, van der Does C. Conjugative plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. PLoS One. 2010 Apr 1;5(4):e9962

Pagotto F, Aman AT, Ng LK, Yeung KH, Brett M, Dillon JA. Sequence analysis of the family of penicillinase-producing plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. Plasmid. 2000;43(1):24-34.

Palmer HM, Young H, Winter A, Dave J. Emergence and spread of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Scotland. J Antimicrob Chemother. 2008;62(3):490-4.

Phillips I. Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. Lancet. 1976; 25;2(7987):656-7

Powell AJ, Tomberg J, Deacon AM, Nicholas RA, Davies C. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. J Biol Chem. 2009 ;284(2):1202-12.

Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2018;16(4):226-240.

Reyn A, Korner B, Bentzon MW. Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. Br J Vener Dis. 1958 Dec;34(4):227-39.

Roberts M, Elwell LP, Falkow S. Molecular characterization of two beta-lactamase-specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. 1977;131(2):557-63.

Roberts M, Piot P, Falkow S. The ecology of gonococcal plasmids. J Gen Microbiol. 1979;114(2):491-4.

Roberts MC, Wagenvoort JH, van Klingeren B, Knapp JS. tetM- and beta-lactamase-containing *Neisseria gonorrhoeae* (tetracycline resistant and penicillinase producing) in The Netherlands. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32(1):158.

Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(3):769-77.

Rouquette-Loughlin CE, Balthazar JT, Shafer WM. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 2005 ;56(5):856-60.

Sarandopoulos S, Davies JK. Genetic organization and evolution of the cryptic plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. Plasmid. 1993;29(3):206-21.

Scharbaai-Vázquez R, Candelas T, Torres-Bauzá LJ. Mobilization of the gonococcal 5.2 kb beta-lactamase plasmid pSJ5.2 into *Escherichia coli* by cointegration with several gram-conjugative plasmids. Plasmid. 2007;57(2):156-64.

Serra-Pladevall J, Caballero E, Roig G, Juvé R, Barbera MJ, Andreu A. Comparison between conventional culture and NAATs for the microbiologicaldiagnosis in gonococcal infection. DiagnMicrobiol Infect Dis. 2015; S0732-8893(15)00294-1.

Sparling PF, Sarubbi FA Jr, Blackman E. Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. 1975;124(2):740-9.

Starnino S, Stefanelli P; *Neisseria gonorrhoeae* Italian Study Group. Azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains recently isolated in Italy. J Antimicrob Chemother. 2009;63(6):1200-4.

Takahata S, Senju N, Osaki Y, Yoshida T, Ida T. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(11):3638-45.

Tapsall JW, Limnios EA, Thacker C, Donovan B, Lynch SD, Kirby LJ, Wise KA, Carmody CJ. High-level quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: a report of two cases. Sex Transm Dis. 1995 Sep-Oct;22(5):310-1.

Tomberg J, Temple B, Fedarovich A, Davies C, Nicholas RA. A highly conserved interaction involving the middle residue of the SXN active-site motif is crucial for

function of class B penicillin-binding proteins: mutational and computational analysis of PBP 2 from *N. gonorrhoeae.* Biochemistry. 2012; 3;51(13):2775-84.

Tomberg J, Unemo M, Davies C, Nicholas RA. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. Biochemistry. 2010; 21;49(37):8062-70

Tomberg J, Unemo M, Ohnishi M, Davies C, Nicholas RA. Identification of amino acids conferring high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins in the *penA* gene from *Neisseria gonorrhoeae* strain H041. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(7):3029-36.

Uehara AA, Amorin EL, Ferreira Mde F, Andrade CF, Clementino MB, de Filippis I, Neves FP, Pinto Tde C, Teixeira LM, Giambiagi-Demarval M, Fracalanzza SE. Molecular characterization of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Brazil. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4208-12.

Unemo M, Del Rio C, Shafer WM. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. 2016; *Microbiol Spectr*. 4(3).

Unemo M, Fasth O, Fredlund H, Limnios A, Tapsall J. Phenotypic and genetic characterization of the 2008 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strain panel intended for global quality assurance and quality control of gonococcal antimicrobial resistance surveillance for public health purposes. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(6):1142-1151.

Unemo M, Golparian D, Hellmark B. First three *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high-level resistance to azithromycin in Sweden: a threat to currently available dual-antimicrobial regimens for treatment of gonorrhea? Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(1):624-5.

Unemo M, Golparian D, Nicholas R, Ohnishi M, Gallay A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(3):1273-80.

Unemo M, Golparian D, Potočnik M, Jeverica S. Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. Euro Surveill. 2012b; 21;17(25):20200.

Unemo M, Golparian D, Sánchez-Busó L, Grad Y, Jacobsson S, Ohnishi M, Lahra MM, Limnios A, Sikora AE, Wi T, Harris SR. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. J Antimicrob Chemother. 2016b;71(11):3096-3108.

Unemo M, Golparian D, Skogen V, Olsen AO, Moi H, Syversen G, Hjelmevoll SO. *Neisseria gonorrhoeae* strain with high-level resistance to spectinomycin due to a novel resistance mechanism (mutated ribosomal protein S5) verified in Norway. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(2):1057-61.

Unemo M, Lahra MM, Cole M, Galarza P, Ndowa F, Martin I, Dillon JR, Ramon-Pardo P, Bolan G, Wi T. World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. Sex Health. 2019 Sep;16(5):412-425.

Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. ClinMicrobiolRev. 2014; 27(3):587-613.

Van Embden JD, Dessens-Kroon M, Van Klingeren B. A new beta-lactamase plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. J Antimicrob Chemother. 1985 Feb;15(2):247-50.

Van Slyke CJ, Arnold RC, Buchholtz M. Penicillin Therapy in Sulfonamide-Resistant Gonorrhea in Men. Am J Public Health Nations Health. 1943 Dec;33(12):1392-4

Wainwright M, Swan HT. C.G. Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy. Med Hist. 1986;30(1):42-56.

Warner DM, Shafer WM, Jerse AE. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness

WHO. The Gonococcal Survaillance Program (GASP). 2018. https://www.who.int/reproductivehealth/topics/rtis/gonococcal_resistance/en/

WHO. World Health Organization. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*; Switzerland, 2012.

WHO. World Health Organization. Report on Global sexually transmitted infection surveillance 2018:54. ISBN 978 92 4 156569 1. Geneva. Switzerland. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277258/9789241565691-eng.pdf?ua=1

WHO. World Health Organization. WHO Guidelines for treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. 2016. ISBN 978 924 154 969 1. Geneva. Switzerland. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246114/9789241549691-eng.pdf;jsessionid=CCC52557EB6FC467555A4613ACBF86AD?sequence=1).

WHO. World Health Organization. WHO Guidelines for treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. 2016. ISBN 978 924 154 969 1. Geneva. Switzerland. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246114/9789241549691-eng.pdf;jsessionid=CCC52557EB6FC467555A4613ACBF86AD?sequence=1).

Whord Health Organization.Baseline Report on Global Sexually Transmitted Infection Surveillance 2012. ISBN 978 92 4 150589 5 Geneva. Switzerland. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85376/9789241505895_eng.pdf?sequence=1

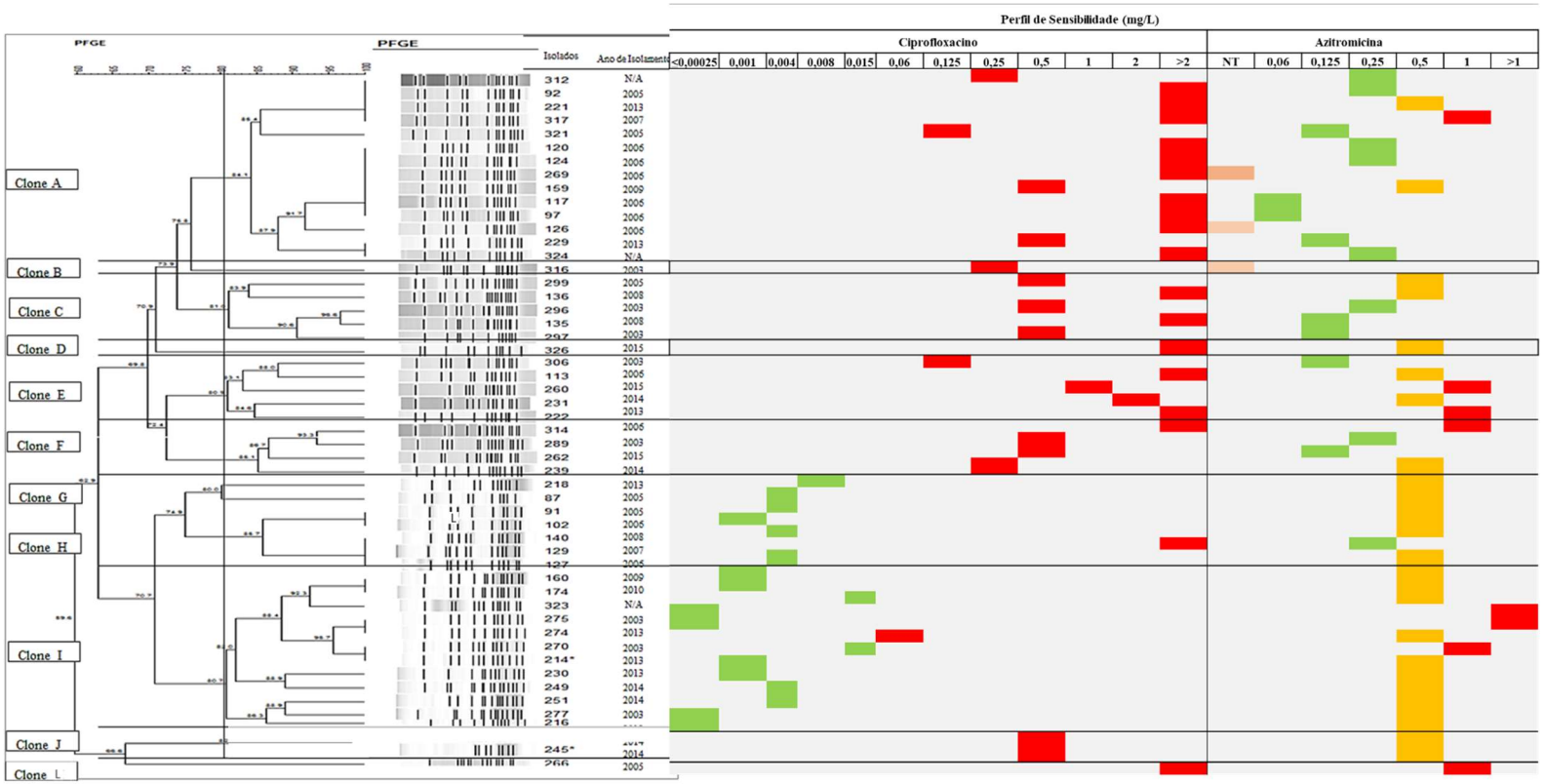
Yue XL, GonG XD, Li Jeng, Wang YJ, Gu He. Gonorrhoeae in China, 2018. Int. J. Dermatology and Venereoly. 2019; 2 (2): 65-9.

Zankari E, et al., PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. J Antimicrob Chemother.2017; 72(10):2764-2768.

Zhao S, Tobiason DM, Hu M, Seifert HS, Nicholas RA. The penC mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. Mol Microbiol. 2005 Sep;57(5):1238-51.

ANEXOS

Anexo 1 - Perfil clonal dos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* que apresentaram CIMs ≥0,06 mg/L para ciprofloxacino e ≥0,5 mg/L para 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. NA, dados indisponíveis; NT, não testados. As amostras foram selecionas de acordo os pontos de cortes estabelecidos pelo EUCAST, 2015. Verde = sensível aos antimicrobianos testados; amarelo = intermediário; vermelho = resistente e rosa = não testado.

Anexo 2 - Declaração de responsabilidade para projeto que não envolve humanos nem animais

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE

Título do Projeto de Pesquisa: "Análises Genômicas de Isolados Clínicos de *Neisseria gonorrhoeae* Resistentes à

Ciprofloxacino"

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Ana Cristina Gales

Campus UNIFESP/ Departamento: Campus São Paulo/ Departamento de Medicina

Objetivo acadêmico: Caracterizar genotipicamente os isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* recuperados do Centro de Referência de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis - AIDS (CRT- AIDS) localizado na região metropolitana da cidade de São Paulo, no período de 2006 a 2015.

Equipe de Pesquisa: Dandara Cassu Corsi, Fernanda Fernandes dos Santos e Ana Cristina Gales.

Local onde será realizada a pesquisa: Laboratório LEMC/ALERTA

E-mail para contato: ana.gales@unifesp.br

Eu, pesquisador responsável pelo projeto acima especificado, declaro que:

1. O projeto de pesquisa não incluirá participantes de pesquisa, nem utilizará materiais obtidos diretamente de seres humanos (por exemplo células, sangue periférico, tecidos, entre outros), nem utilizará imagem/som/questionários/entrevistas/grupo focal que permitam sua identificação individual, dados de prontuários de assistência do paciente, fichas de cadastros pessoais e/ou fichas escolares;

2. O projeto de pesquisa não utilizará animais vertebrados não humanos nem materiais obtidos diretamente de animais vertebrados não humanos (por exemplo células, sangue periférico, tecidos, entre outros);

3. Estou ciente de que se nesta pesquisa houver manipulação genética (organismos geneticamente modificados), será necessário obter carta de aprovação da Comissão Interna de Biossegurança da Unifesp (CIBio), e que é minha responsabilidade obtê-la antes do início da pesquisa (Lei n? 11.105/2005

http://www2.unifesp.br/reitoria/orgaos/comissoes/cibio/index.php?cod=apresenta);

-

2 [2] -

4. Estou ciente de que caso a pesquisa envolva acesso a patrimônio genético brasileiro e/ou conhecimento tradicional, o projeto deverá ser cadastrado no sistema auto declaratório SisGen, conforme Lei ne 13.123/2015, antes da sua publicação elou comercialização do produto, sendo de minha responsabilidade realizar e manter este cadastro atualizado (https://sisgen.gov.br/);

5. Estou ciente de que caso os dados utilizados nesta pesquisa não forem de acesso público elou se a pesquisa não for realizada em local público, será necessário obter o documento de autorização emitido pela instituição em que será realizada a pesquisa elou detentora dos dados a serem utilizados, onde deverá conter as atividades que serão desenvolvidas e assinatura do dirigente institucional ou pessoa por ele delegada, com identificação de cargo/função e respectiva assinatura, antes do início da pesquisa (Lei no 12.527/2011);

6. Estou ciente de que se houver coleta de exemplares biológicos e/ou se a pesquisa for realizada em unidades de conservação federais ou em cavidade natural subterrânea, será necessário obter documento de autorização do Ministério do Meio Ambiente, conforme Instrução Normativa n? 03/2014 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, e é de minha responsabilidade obter este documento antes do início da pesquisa
(https://www.icmbio.gov.br/sisbio/);

7. Estou ciente de que se o projeto tiver a possibilidade de gerar conhecimento passível de proteção intelectual (patentes, direito autoral, novos tratamentos, marcas, softwares, cultivares, segredo industrial), é minha responsabilidade entrar em contato com a Agência de Inovação Tecnológica e Social (Agits);

8. Estou ciente de que se houver uso do Hospital São Paulo ou algum de seus ambulatórios ou setores será necessário anexar autorização expedida pelo Comitê de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital São Paulo (CoEPE/HSP), e é minha responsabilidade obter este ofício antes do início da pesquisa (email: coep@huhsp.org.br);

9, Estou ciente de que se houver o uso de agentes radioativos, será necessário obter documento de autorização do Núcleo de Proteção Radiológica (NPR) e é minha responsabilidade obter este documento antes do início da pesquisa (para maiores informações sobre o NRP, contato: npr@unifesp.br; VOIP:2882);

10. O referido projeto cumpre as normas legais vigentes relacionadas à proteção intelectual, boas práticas e ética em pesquisa e que será minha responsabilidade zelar pela correta condução do projeto de pesquisa;

11. Comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados e gerados pela pesquisa bem como manter a privacidade de seus conteúdos. Também é minha

a responsabilidade não repassar os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, a pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa;

12. Declaro a precisão de todas as informações acima fornecidas e comprometo-me a informar todos os demais pesquisadores envolvidos no projeto sobre elas.

São Paulo, 20 de agosto de 2021

Profa. Dra. Ana Cristina Gales

Pesquisadora responsável

De acordo,

Prof. Dr. Álvaro Pacheco e Silva Filho

Chefe do Departamento de Medicina -
EPM/UNIFESP