

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

KETLYN BUSS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE *NEISSERIA*  
*GONORRHOEAE* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRANSPORTE E  
ARMAZENAMENTO**

FLORIANÓPOLIS

2020

KETLYN BUSS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE *NEISSERIA*  
*GONORRHOEAE* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRANSPORTE E  
ARMAZENAMENTO**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Bazzo  
Co-orientadora: MSc Hanalydia de Melo Machado

FLORIANÓPOLIS

2020

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo, por me dar a oportunidade de fazer parte da equipe do LBMMS e realizar este trabalho.

À minha co-orientadora, Msc Hanalydia de Melo Machado, por tornar a realização deste trabalho um processo cheio de ensinamentos.

Aos colegas do LBMMS, Fernando, Marcos, Manu, Renata, Guilherme e, em especial, à Jéssica por toda a ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão, que me deram suporte e fizeram ser possível que eu chegasse até aqui.

À Flora, minha companheira e minha amiga, por me fazer rir e me ensinar a encontrar beleza na simplicidade.

Ao Augusto e à Gabi, que já partiu, meus primeiros amigos em Florianópolis. Guardo os momentos vividos no apartamento 304 com imenso carinho e saudade.

Aos amigos que fiz na UFSC, Renata, Kamylla, Pâmela e Victor. E à Cláudia, que mesmo longe está sempre presente.

Por fim, agradeço aos meus amigos de quatro patas.

## RESUMO

**Introdução:** *Neisseria gonorrhoeae*, agente etiológico da gonorreia, é um patógeno humano obrigatório que acomete as mucosas do trato genital inferior, reto, orofaringe, conjuntiva e em casos raros, pode evoluir para artrite gonocócica e sepse. O gonococo é considerado uma ameaça à saúde pública devido ao surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos de todas as classes utilizadas para o tratamento da infecção gonocócica. Dessa forma, para conter o avanço da transmissão de cepas resistentes, é necessário que os países realizem vigilância das cepas circulantes, a fim de adequar os esquemas terapêuticos nacionais. O objetivo deste estudo foi otimizar duas etapas importantes nos estudos de vigilância, que consistem no armazenamento da amostra coletada até seu processamento e no tempo e temperatura de congelamento dos isolados recuperados até seu envio para o laboratório de referência, onde são realizados os testes de sensibilidade antimicrobiana. **Materiais e métodos:** 15 cepas do gonococo foram armazenadas em criotubos contendo caldo casoy e glicerol e mantidas a -20 °C e -80°C por longos períodos de tempo. 4 cepas foram mantidas em dois meios de transporte comerciais por diferentes períodos de tempo. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através de semeadura em ágar chocolate. **Resultados:** Após 30 dias, apenas 53% das cepas provenientes da suspensão em escala 1 de McFarland apresentaram viabilidade. Na concentração em escala 2 de McFarland, 80% das cepas permaneceram viáveis. As cepas armazenadas a -80°C se encontravam viáveis após 150 dias. No meio Amies com carvão (Copan®), observou-se viabilidade por um período mínimo de 24 h, e no meio ESwab – amies líquido (Copan®) por até 72 h. **Discussão:** A concentração bacteriana afetou a sobrevivência das cepas armazenadas a -20°C. O meio Amies com carvão manteve a viabilidade celular até 24 horas e o meio ESwab – amies líquido até 72 horas. O perfil fenotípico de resistência não influenciou o perfil de crescimento das cepas analisadas. **Conclusão:** Após 30 dias de armazenamento, grande parte das cepas armazenadas a -20°C perde a viabilidade, enquanto à temperatura de -80°C a viabilidade celular se mantém por 150 dias ou mais. O meio Amies com carvão manteve as cepas viáveis por 24 horas, e o meio ESwab - Amies líquido por 72 horas. A otimização destas etapas pode promover a participação de mais centros sentinelas nos estudos de vigilância, aumentando a representatividade das diferentes regiões do Brasil.

**Palavras-chave:** *Neisseria gonorrhoeae*. Vigilância. Armazenamento.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Neisseria gonorrhoea*, etiologic agent of gonorrhoea, is a human obligatory pathogen that affects the lower genital tract, rectum, oropharynx and ocular's mucosas, and in rare cases it can evolve into sepsis. The gonococcus is considered to be a threat to public health since there are cases of resistant strains to all classes of antimicrobials used for the treatment of gonococcal infection. Therefore, to stop the advance of resistant strains' transmission it is necessary that countries perform surveillance of the circulating strains, so it's possible to adequate the national therapeutic schemes. In the present study we have the aim to optimize two important steps of the surveillance studies, that consists in the collected sample storage until its processing and freezing of bacterial isolates recovered from samples until it is sent to reference laboratory, where the antimicrobial sensibility tests are performed. **Results:** After 30 days of storage, only 53 % of the strains from the bacterial suspension 1 McFarland remained viable. At concentration of 2 McFarland, 80 % of the strains remained viable. The strains stored at -80°C were viable after 150 days. At the Amies with charcoal (Copan®) medium it was observed viability for a minimum period of 24 hours, and at the ESwab- liquid Amies (Copan®) medium the maximum period was 72 hours. **Materials and methods:** 15 gonococcal strains were stored in cryotubes containing tryptic soy broth and glycerol e kept at -20 °C e -80°C for a long period of time. 4 strains were stored into two commercial transport mediums for different period of time. The cellular viability was evaluated through chocolate agar growth. **Discussion:** The bacterial concentration affected the survival of strains stored at -20°C. Amies with charcoal medium kept cellular viability for 24 hours and ESwab – liquid Amies for 72 hours. The resistance profile didn't influence the growth of the analysed strains. **Conclusion:** After 30 days of storage, a great part of the strains kept at -20°C loses viability. At -80°C, the strains can maintain their viability for 150 days or more. The Amies with charcoal medium is able to store the strains for at least 24 hours, and the ESwab – Amies liquid medium for 72 hours. The optimization can promote the participation of more sentinel sites, increasing the representation of different regions of Brazil in the surveillance studies.

**Keywords:** *Neisseria gonorrhoeae*. Surveillance. Storage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diplococos intracelulares, sugestivos de NG, corados com Gram (seta)...	17
Figura 2- Fatores de virulência associados à membrana externa de <i>N. gonorrhoeae</i>	18
Figura 3- Teste de disco-difusão de <i>N. gonorrhoeae</i> em meio GC.....	22
Figura 4- Meio Amies com carvão (Copan®).....	26
Figura 5- Meio ESwab – amies líquido (Copan®).....	27
Figura 6- Crescimento da cepa WHO W a -20 °C após 30 dias de armazenamento .	31
Figura 7- Crescimento da cepa WHO W a -20 °C após 30 dias de armazenamento .	31
Figura 8- Crescimento da cepa WHO W a -80 °C após 60 dias de armazenamento .	32
Figura 9- Crescimento das cepas de NG armazenadas a -80°C após 120 dias .....	34
Figura 10- Crescimento da WHO W após 150 dias à -80°C.....	34
Figura 11- Cepas WHO L e WHO V mantidas em meio Amies com carvão.....	35
Figura 12- Crescimento das cepas WHO F e WHO X após 48 h .....	36
Figura 13- Crescimento da cepa WHO L após 48 h.....	37
Figura 14- Crescimento de NG do meio Amies líquido após 24 h .....	40
Figura 15- Crescimento de NG do meio Amies líquido após 48 h .....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Testes bioquímicos para identificação de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	21
Tabela 2- Crescimento das cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> (após 0, 30, 60 e 90 dias) .....	28
Tabela 3- Crescimento das cepas <i>N. gonorrhoeae</i> a -80°C (após 120 e 150 dias).....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR do inglês *Antimicrobial Resistance*

BHI do inglês *Brain Heart Infusion*

CEACAM do inglês *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*

CLSI do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DCCI Departamento de doenças de condições crônicas e infecções sexualmente transmissíveis

DNA do inglês *deoxyribonucleic acid*

EUCAST do inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

g grama

HIV do inglês *Human immunodeficiency virus*

HSH homens que fazem sexo com homens

IM Intramuscular

ISTs Infecções sexualmente transmissíveis

LBMMS Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia

LOS do inglês *lipooligosaccharide*

mg miligrama

MIC do inglês *minimum inhibitory concentration*

mL mililitro

MS Ministério da Saúde

NAATs do inglês *Nucleic acid amplification tests*

NG *Neisseria gonorrhoeae*

OMS Organização Mundial da Saúde

PCDT Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas

RNA do inglês *Ribonucleic acid*

SVS Secretária de Vigilância em Saúde

Tfp do inglês *type four pili*

UFC Unidades Formadoras de Colônia

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

WHO do inglês *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
2.1	<i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i> .....	17
2.2	GONORREIA .....	18
2.3	EPIDEMIOLOGIA .....	19
2.4	DIAGNÓSTICO .....	20
2.5	TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	CEPAS DE <i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i> .....	25
4.2	PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA .....	25
4.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	25
4.4	MEIOS DE TRANSPORTE .....	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
5.1	VIABILIDADE CELULAR EM LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO .....	28
5.2	VIABILIDADE CELULAR EM DIFERENTES MEIOS DE TRANSPORTE ...	35
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
6.1	LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO .....	38
6.2	DIFERENTES MEIOS DE TRANSPORTE .....	39
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE A- FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA DAS CEPAS WHO</b>		

## 1 INTRODUÇÃO

*Neisseria gonorrhoeae* (NG), ou gonococo, é o agente etiológico da gonorreia, uma infecção sexualmente transmissível (IST) que permanece como um grande problema de saúde pública global. A vigilância realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em isolados clínicos do gonococo, tem identificado cepas resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, destacando a possibilidade iminente da transmissão de infecções gonocócicas intratáveis (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Em 2016, estimou-se 87 milhões de novos casos de gonorreia em um ano, os quais aconteceram, em sua maioria, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (ROWLEY et al., 2019).

O gonococo infecta mucosas humanas, as quais incluem uretra, endocérvice, faringe, conjuntiva e reto. Em alguns casos, principalmente em mulheres, a infecção gonocócica pode evoluir para quadros complicados, como salpingite, doença inflamatória pélvica e bacteremia. Se não tratada, ou tratada incorretamente, pode levar a esterilidade, gravidez ectópica, artrite séptica e morte (HILL; MASTERS; WACHTER, 2016).

Em 2016, as Nações Unidas apoiaram a estratégia global da OMS 2016-2021 no setor de saúde em infecções sexualmente transmissíveis. A principal meta dessa estratégia é a redução de 90% na incidência mundial de gonorreia mundialmente. Para alcançar esta meta, conhecer o perfil de resistência antimicrobiana do gonococo é um dos fatores importantes e precisa ser identificado, o que só é possível por meio do fortalecimento da rede de vigilância nos países, principalmente nos que possuem alta taxa de transmissão de HIV e outras ISTs (WI et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Desde 2015, o Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) atua como centro coordenador do projeto nacional de vigilância da resistência de *Neisseria gonorrhoeae* aos antimicrobianos no Brasil. Os resultados do primeiro estudo demonstraram mais de 50% de resistência ao ciprofloxacino nos isolados circulantes no país, medicamento utilizado para o tratamento da infecção gonocócica até 2017. Dessa forma, o Ministério da Saúde brasileiro atualizou o protocolo de tratamento levando em consideração os dados obtidos no estudo (BAZZO et al., 2018; BRASIL, 2017).

*N. gonorrhoeae* é caracterizada por ser fastidiosa e requintadamente adaptada ao seu nicho, as mucosas humanas. Dessa forma, sua capacidade bioquímica foi afetada, limitando sua fonte de carbono apenas à glicose. Além disso, o gonococo perdeu sua capacidade de sintetizar nutrientes que estão disponíveis nos tecidos infectados, o que reforça a necessidade de

suplementação nos meios de cultivo e armazenamento (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014). .

NG e Martin (2005) propuseram alguns métodos para transporte e armazenamento de culturas de *N. gonorrhoeae*. Para armazenamento das culturas congeladas, a recomendação proposta foi realizar uma suspensão bacteriana em caldo cérebro-coração (BHI) e 20% de glicerol e armazená-la em freezer -80°C ou nitrogênio líquido, e, quando necessário, o transporte deveria ser realizado em gelo seco. No caso de transporte à temperatura ambiente, os autores sugerem utilizar swabs comerciais em meio contendo ágar com ou sem carvão ativado para manter o gonococo viável durante 6 a 12 h (NG; MARTIN, 2005).

Os resultados deste estudo puderam otimizar etapas importantes dos estudos de vigilância dos isolados de NG, oferecendo respostas sobre o comportamento do gonococo em diferentes meios de transporte ou condições de armazenamento, diminuindo custos com o transporte e melhorando a manutenção das cepas no laboratório.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *NEISSERIA GONORRHOEAE*

*Neisseria gonorrhoeae* (NG), o gonococo, caracteriza-se por ser uma bactéria fastidiosa, diplococo gram-negativa e oxidase-positiva. É um patógeno humano obrigatório pertencente à família *Neisseriaceae*, que compreende o gênero *Neisseria* e ao menos outras 23 espécies, dentre as quais o patógeno oportunista *Neisseria meningitidis*. É o único patógeno verdadeiro do seu gênero (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014; UNEMO et al., 2019).

Figura 1- Diplococos intracelulares, sugestivos de NG, corados com Gram (seta)



Fonte: LBMMS, 2020.

Por ser adaptada aos nichos em que habita, NG teve a capacidade bioquímica afetada, o que restringiu sua fonte de carbono apenas à glicose e diminuiu a capacidade de sintetizar nutrientes prontamente disponíveis nos tecidos infectados, reforçando a necessidade de suplementação dos meios de cultivo e armazenamento (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

As proteínas Opa são nomeadas dessa forma devido a capacidade de conferir morfologia opaca às colônias de *Neisseria gonorrhoeae*. São responsáveis por promover aderência intercelular e adesão e invasão às células do hospedeiro. As proteínas Opa se ligam às moléculas

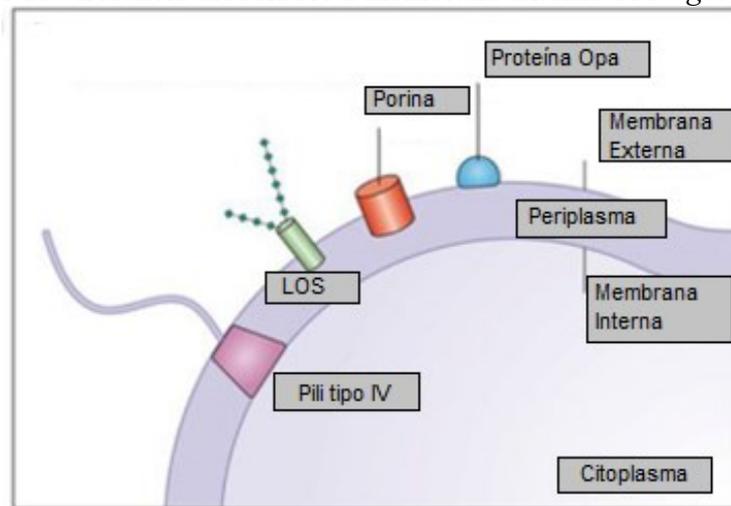
CEACAM (com especificidade às CEACAM das células humanas), e dão início ao processo de interiorização das bactérias às células do hospedeiro (ISLAM et al., 2018).

*Neisseria gonorrhoeae* possui duas classes de porinas: IA (PorB1A) e IB (PorB1B), cuja estrutura nativa é trimérica e formada por três polipeptídeos que conferem conformação de barril  $\beta$  pregueado à molécula. As porinas formam poros permitindo a troca de íons entre a bactéria e o ambiente em que se encontra. Além disso, as porinas do tipo PorB1A foram associadas ao aumento da capacidade de invasão bacteriana (MASSARI et al., 2003).

As moléculas LOS (lipooligossacarídeos) são um complexo glicolipídico que consiste em três cadeias oligossacarídicas. Através de sialyltransferases presentes no tecido infectado, o LOS pode sofrer sialilação, o que promove a inibição da ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento (SHAUGHNESSY; RAM; RICE, 2019).

O gonococo faz uso de diversos outros meios para sobreviver ao sistema de defesa do hospedeiro. Para evitar a opsonização por anticorpos, algumas estruturas responsáveis por causar a infecção, como pili tipo IV (Tfp) e LOS, sofrem alteração antigênica, enquanto PorB possui grande variação alélica. O gonococo também estimula a liberação de interleucina-10, que ajuda a suprimir a resposta imune mediada por células T (PALMER; CRISS, 2018).

Figura 2- Fatores de virulência associados à membrana externa de *N. gonorrhoeae*



Fonte: Adaptado de QUILIN e SEIFERT (2019).

## 2.2 GONORREIA

*Neisseria gonorrhoeae* é responsável por causar a gonorreia em humanos, uma infecção sexualmente transmissível. Esta bactéria infecta mucosas humanas, as quais incluem uretra, endocérvice, faringe, conjuntiva e reto. Em alguns casos, principalmente em mulheres, que são

um grupo majoritariamente assintomático, a infecção gonocócica pode evoluir para quadros complicados, como salpingite, doença inflamatória pélvica, artrite gonocócica e, em casos raros, bacteremia. Se não tratada, ou tratada incorretamente, pode levar a esterilidade, gravidez ectópica, artrite séptica e morte. Na gravidez há risco de transmissão vertical, que pode dar origem à infecção da mucosa ocular do neonato (HILL; MASTERS; WACHTER, 2016; UNEMO et al., 2019).

A sintomatologia clássica no sexo masculino é a uretrite aguda, que causa disúria e origina um exsudato purulento, que contém predominantemente neutrófilos polimorfonucleares e gonococos intracelulares. A infecção raramente irá ascender ao trato urogenital masculino (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014). Em mulheres, os principais sintomas são aumento ou mudanças na secreção vaginal, dor abdominal inferior e disúria (BIGNELL; UNEMO, 2013).

A transmissão de *N. gonorrhoeae* ocorre através de relações sexuais por via vaginal, anal ou oral sem proteção. O gonococo adere ao espermatozoide e é facilmente transmitido do homem às suas parceiras durante as relações sexuais. Para aderir ao epitélio uretral masculino, a superfície bacteriana precisa estar livre de ácido siálico e para isso necessita que o LOS seja dessializado. Estudos mostram que a microbiota cervicovaginal feminina secreta sialidases bacterianas, que garantem a transmissão eficiente (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

Após a associação com as células, as bactérias são internalizadas no interior de vacúolos na superfície apical das células epiteliais. No interior dos vacúolos, o gonococo replica e faz transcitose para a superfície basolateral das células, até o rompimento que os libera para o espaço subepitelial. Essa cascata de eventos resulta na indução do processo inflamatório e infecção de outras células epiteliais (SHAUGHNESSY; RAM; RICE, 2019).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

Em 2016, estimou-se 87 milhões de novos casos de gonorreia em um ano, os quais acontecem, majoritariamente, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 9 milhões de casos de gonorreia por ano entre pessoas de 15 a 49 anos (COSTA-LOURENÇO et al., 2017; ROWLEY et al., 2019).

A infecção pelo gonococo está associada à infecção por outras ISTs, como *Chlamydia trachomatis* (CREIGHTON, 2014), e estudos apontam que a infecção gonocócica aumenta as chances de transmissão do vírus HIV (GUVENC; KAUL; GRAY-OWEN, 2020).

A prevalência de gonorreia, além de ser maior em jovens adultos que vivem em países subdesenvolvidos, também é maior entre grupos minoritários, como a população de Homens que fazem sexo com homens (HSH), pessoas transgêneras, trabalhadores do sexo e comunidades indígenas (KIRKCALDY et al., 2019).

## 2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de gonorreia em homens é feito principalmente de forma sindrômica, já que a maioria das infecções apresentam sintomatologia clássica. No entanto, o esfregaço corado com a coloração de Gram também pode ser usado para auxiliar no diagnóstico. A grande maioria das mulheres são assintomáticas, ou desenvolvem sintomas inespecíficos. Além disso, apenas 40% a 60% dos esfregaços de secreções cervicais detectam a presença dos diplococos Gram negativos. Nestas situações, ou quando as infecções ocorrem em sítios extragenitais, necessita-se de outros métodos diagnósticos, como a cultura e testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), que detectam DNA ou RNA bacteriano (PCDT, 2020; UNEMO et al., 2019).

Em amostras do trato urogenital de homens sintomáticos, a cultura é altamente específica e sensível, mas amostras de sítios extragenitais como conjuntiva, reto e orofaringe necessitam de condições ideais para crescimento e, como os swabs de secreção vaginal e urina, raramente observa-se o crescimento do gonococo (MEYER; BUDER, 2020).

Para identificação e diferenciação das espécies de *Neisseria*, o teste da catalase pode ser utilizado. As cepas de NG produzem grande quantidade de catalase, e as colônias do gonococo produzem borbulhamento rápido e intenso quando em contato com uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (SAGINUR et al., 1982).

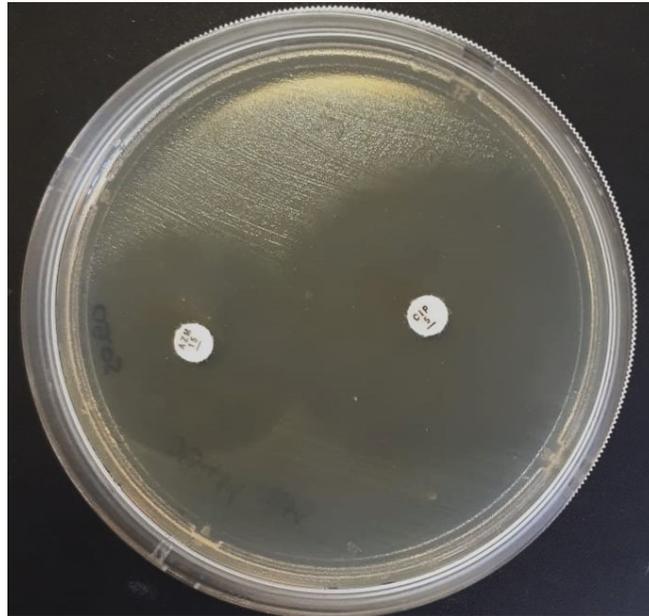
Tabela 1- Testes bioquímicos para identificação de *N. gonorrhoeae*

<b>Atividade enzimática</b>	<b>Resultado</b>	<b>Produção de ácido</b>	<b>Resultado</b>
Oxidase	+	Glicose	+
Catalase	+	Maltose	-
DNase	-	Lactose	-
Beta-galactosidase	-	Sucrose	-
<b>Metabolismo</b>	<b>Resultado</b>	<b>Sensibilidade antimicrobiana</b>	
Redução de nitrato	-	Colistina	Resistente
Produção de polissacarídeos	-	Vancomicina	Resistente
		Trimetoprima	Resistente

Fonte: Adaptado de *Molecular Medical Microbiology* (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014)

Devido à crescente AMR, faz-se cada vez mais necessária a realização de testes de sensibilidade para triagem de cepas com alta resistência. KING (2001) recomenda o método de disco-difusão (Figura 3) para triar as cepas, aliado à determinação do MIC ou outro método para confirmar a resistência, pois este teste oferece apenas um resultado aproximado da sensibilidade bacteriana (KING, 2001).

Figura 3- Teste de disco-difusão de *N. gonorrhoeae* em meio GC



Fonte: Martins, 2018.

A determinação do MIC pelo método de ágar diluição é padrão ouro para determinar a susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos. Os meios de cultura utilizados, como o GC, são meios à base de proteínas de carne ou leite, fontes de nitrogênio e aminoácidos, amido de milho, fosfato de potássio para tamponar o meio e cloreto de sódio e adição de ágar (SPENCE; WRIGHT; CLARK, 2008).

Disponíveis comercialmente, também se encontram fitas de gradiente de concentração para determinação de MIC, como o ETEST® da bioMérieux, que oferecem uma alternativa mais rápida ao método de ágar diluição. No entanto, são testes caros (JÖNSSON et al., 2018).

Apesar de ser um método confiável para determinar a concentração inibitória mínima, o método de ágar diluição é complexo e laborioso, o que faz com que esse método seja utilizado apenas para fins de pesquisa. Além disso, nem todos os antimicrobianos possuem ponto de corte definido pela EUCAST e CLSI.

As características fastidiosas de *N. gonorrhoeae* tornam seu cultivo um desafio e fazem com que na prática a determinação de sensibilidade não seja aplicável à rotina de um laboratório. Por mais que seja de extrema necessidade a triagem de cepas resistentes no atual cenário de resistência antimicrobiana, os testes de sensibilidade ainda precisam ser aprimorados, para que essa seja uma prática mais acessível e possibilite a ampla testagem das amostras clínicas, favorecendo os estudos de vigilância.

## 2.5 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Em países que não realizam vigilância de resistência antimicrobiana, a Organização Mundial da Saúde recomenda a terapia combinada de ceftriaxona 250 mg intramuscular (IM) dose única, mais azitromicina 1 g oral dose única (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). No Brasil, a recomendação é a administração combinada de ceftriaxona 500 mg IM, dose única, mais azitromicina 500 mg, dois comprimidos por via oral (PCDT, 2020). Uma vez que os estudos de vigilância permitem a adaptação dos protocolos de tratamento, a terapia de escolha pode variar de acordo com o perfil de sensibilidade apresentado pelas cepas que estão circulando em cada região.

A vigilância realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em isolados clínicos do gonococo, tem identificado cepas resistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis, destacando a possibilidade iminente da transmissão de infecções gonocócicas intratáveis (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Foram descritas cepas do gonococo resistentes a todas as classes de antimicrobianos, inclusive à ceftriaxona, que pertence à classe dos antimicrobianos de primeira linha usados no tratamento atualmente (OHNISHI et al., 2011; UNEMO; SHAFER, 2014).

O Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) atua desde 2015 como centro coordenador do projeto nacional de vigilância da resistência de *Neisseria gonorrhoeae* aos antimicrobianos, uma parceria da UFSC com o DCCI/SVS/MS (Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde). O objetivo do projeto é realizar vigilância das cepas de gonococo circulantes no Brasil, rastreando os casos de resistência antimicrobiana e traçando o perfil de sensibilidade de diferentes regiões do Brasil. No primeiro estudo, foram incluídos 550 isolados clínicos provenientes de amostras de secreção uretral masculina. Os isolados foram coletados em 7 centros sentinelas, que representam as 5 regiões brasileiras, e enviados ao LBMMS para realização dos testes de sensibilidade. Os resultados do primeiro estudo demonstraram mais de 50% de resistência ao ciprofloxacino nos isolados circulantes no país, medicamento utilizado para o tratamento da infecção gonocócica até então, o que resultou na mudança do protocolo de tratamento adotado pelo Ministério da Saúde brasileiro (BAZZO et al., 2018; BRASIL, 2017).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a viabilidade celular de *Neisseria gonorrhoeae* em diferentes temperaturas de armazenamento e diferentes meios de transporte.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar o tempo de viabilidade celular de NG em dois meios de transporte comerciais;

Comparar a viabilidade de cepas de NG armazenadas à -20°C e à -80°C;

Observar se os diferentes fenótipos de NG interferem no período de viabilidade celular das cepas armazenadas em diferentes temperaturas e diferentes meios de transporte;

Verificar a influência da concentração bacteriana nos meios de armazenamento.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CEPAS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE*

Foram utilizadas 14 cepas de referência da Organização Mundial da Saúde e 1 cepa ATCC (ATCC 49226®). O painel de cepas WHO foi escolhido por representar a diversidade espécie e ter os determinantes de resistência genotípicos e fenotípicos definidos.

### 4.2 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir do cultivo de cepas que estavam congeladas em freezer -80°C. As cepas foram semeadas em ágar chocolate (Laborclin®) e cultivadas em temperatura de 36±1°C + 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Para o experimento que avaliou o armazenamento das cepas, foram preparados inóculos em triplicata e para cada uma das cepas utilizadas, nas concentrações de 1 McFarland e 2 McFarland com o auxílio de um nefelômetro (DensiCHEK™ Plus Biomérieux®). Em seguida foram armazenados em criotubos contendo Casoy (Tryptic Soy Broth, Difco®) com 20% de glicerol (Sigma-Aldrich®).

Para avaliar o meio de transporte ESwab – amies líquido (Copan®) foram preparados inóculos bacterianos em salina (NaCl 0,9%) estéril na concentração de 2 McFarland, para as cepas WHO F, L, V e X e em triplicata. Os swabs foram mergulhados nos inóculos, devolvidos ao frasco contendo o meio de transporte e mantidos em temperatura ambiente até que o tempo necessário para análise fosse atingido. A avaliação do meio Amies com carvão (Copan®) foi feita a partir de inóculos das cepas WHO F, L, V e X na escala 0,5 McFarland, em solução de salina (NaCl 0,9%) estéril. Os swabs também foram mergulhados na solução contendo os inóculos e permaneceram em temperatura ambiente pelo período necessário até a análise.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular após o armazenamento das cepas de *N. gonorrhoeae* em temperatura de -20°C e -80°C foi feita a partir da semeadura dos inóculos mantidos nos criotubos em placas contendo ágar chocolate. Para garantir que as cepas se encontravam viáveis a partir do primeiro dia do preparo dos inóculos, foram realizadas semeaduras em ágar chocolate a partir dos criotubos antes do congelamento inicial. As placas de ágar chocolate foram incubadas em temperatura de 36±1°C + 5% CO<sub>2</sub> e, após 24 horas, foi realizada a visualização do crescimento bacteriano. Durante os próximos 5 meses subsequentes, foram

realizadas sementeiras sob as mesmas condições acima citadas, uma vez a cada 30 dias, para as 180 alíquotas armazenadas.

A avaliação dos inóculos mantidos nos meios de transporte foi feita através da sementeira, utilizando os swabs, em meio ágar chocolate e incubação em temperatura de  $36\pm 1^{\circ}\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ . Após 24 horas foi observado o crescimento bacteriano. Para o meio de transporte Amies com carvão (Copan®) foram realizadas sementeiras nos tempos de 0 h, 4 h, 8 h, 12 e 24 h, e para o meio ESwab – amies líquido (Copan®) foram realizadas sementeiras nos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 e 96h.

#### 4.4 MEIOS DE TRANSPORTE

Os meios ESwab – amies líquido (Copan®) e Amies com carvão (Copan®) são meios de transporte comerciais utilizados para manter a viabilidade celular de organismos aeróbios, anaeróbios e fastidiosos, como *N. gonorrhoeae*. A formulação é uma modificação do meio Amies (AMIES, 1967), e contém tampão fosfato, sais de cálcio e magnésio, cloreto de sódio e tioglicolato de sódio. O meio de transporte contendo carvão consiste em um tubo que contém, além do meio Amies, ágar na formulação, e um swab com ponta em Rayon®, que é utilizado para a coleta. O meio de transporte ESwab contém um tubo com 1 mL de meio Amies e acompanha um swab com ponta em nylon macio, cuja proposta é facilitar a absorção do conteúdo biológico no momento da coleta e favorecer a liberação do material coletado em meio de cultura para análise em laboratório.

Figura 4- Meio Amies com carvão (Copan®)



Fonte: <https://www.copanusa.com/sample-collection-transport-processing/transystem/> Acesso em 25/11/2020.

Figura 5- Meio ESwab – amies líquido (Copan®)



Fonte: <https://us.vwr.com/store/product/28969276/eswab-regular-flocked-swab-with-liquid-amies-medium-copan-diagnostics> Acesso em 25/11/2020.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VIABILIDADE CELULAR EM LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

Antes do início do armazenamento, as cepas foram semeadas para garantir que se encontravam viáveis. Após 24 horas, observou-se o crescimento de todas as cepas, e este foi denominado o dia zero (0) do experimento. Após 30 dias, o crescimento das cepas armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  na concentração 1 McFarland foi de apenas 53%, e para as suspensões de concentração 2 McFarland foi observado crescimento de 80%. Nos outros períodos avaliados, dias 60 e 90, não houve crescimento de nenhuma cepa armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , enquanto 100% das cepas em temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$  continuaram viáveis. Os resultados estão representados abaixo (Tabela 1).

Tabela 2- Crescimento das cepas de *N. gonorrhoeae* (após 0, 30, 60 e 90 dias)

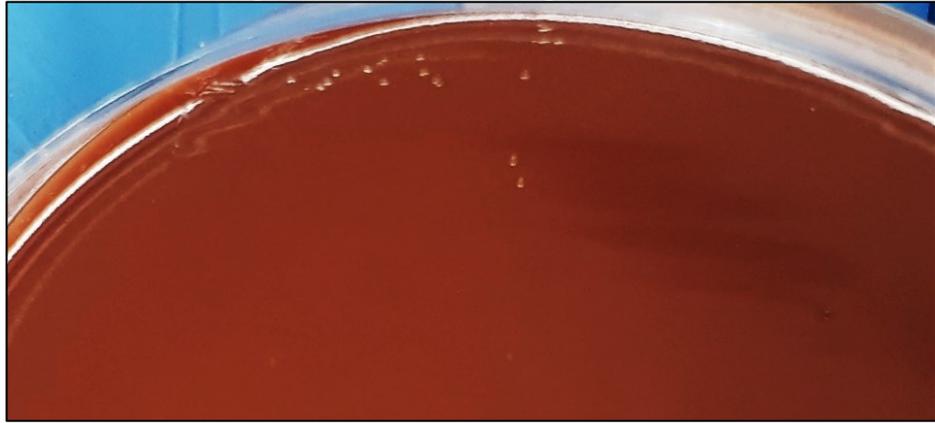
	<b>DIA 0</b>	<b>DIA 30</b>	<b>DIA 60</b>	<b>DIA 90</b>
WHO F (1McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO F (2 McFarland -20)	1	3	NHC	NHC
WHO F (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO F (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO G (1McFarland -20)	1	3	NHC	NHC
WHO G (2 McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO G (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO G (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO K (1McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO K (2 McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO K (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO K (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO L (1McFarland -20)	1	NHC	NHC	NHC
WHO L (2 McFarland -20)	1	4	NHC	NHC
WHO L (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1

WHO L (2 McFarland -80)	1	1	1	1
WHO M (1McFarland -20)	1	NHC	NHC	SNR
WHO M (2 McFarland -20)	1	NHC	NHC	SNR
WHO M (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO M (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO N (1McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO N (2 McFarland -20)	1	3	NHC	NHC
WHO N (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO N (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO O (1McFarland -20)	1	4	NHC	NHC
WHO O (2 McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO O (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO O (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO P (1McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO P (2 McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO P (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO P (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO U (1McFarland -20)	1	NHC	NHC	NR
WHO U (2 McFarland -20)	1	4	NHC	NHC
WHO U (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO U (2 Mcfarland -80)	1	1	1	NHC
WHO V (1McFarland -20)	1	NHC	NHC	SNR
WHO V (2 McFarland -20)	1	NHC	NHC	SNR
WHO V (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1

WHO V (2 McFarland -80)	1	1	1	1
WHO W (1 McFarland -20)	1	3	NHC	NHC
WHO W (2 McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO W (1 McFarland -80)	1	1	1	1
WHO W (1 McFarland -80)	1	1	1	1
WHO X (1McFarland -20)	1	NHC	NHC	NHC
WHO X (2 McFarland -20)	1	4	NHC	NHC
WHO X (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO X (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO Y (1McFarland -20)	1	NHC	NHC	SNR
WHO Y (2 McFarland -20)	1	NHC	NHC	SNR
WHO Y (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO Y (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO Z (1McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO Z (2 McFarland -20)	1	2	NHC	NHC
WHO Z (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
WHO Z (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1
ATCC (1 McFarland -20)	1	NHC	NHC	NHC
ATCC (2 McFarland -20)	1	3	NHC	NHC
ATCC (1 Mcfarland -80)	1	1	1	1
ATCC (2 Mcfarland -80)	1	1	1	1

Legenda: 1: Crescimento uniforme; 2: crescimento espaçado (> 20 colônias); 3: Poucas colônias (5 a 20 colônias); 4: Raras colônias (até 5); NHC: Não Houve Crescimento. SNR: Semeadura Não Realizada.

Figura 6- Crescimento da cepa WHO W a -20 °C após 30 dias de armazenamento



Legenda: Após 30 dias a cepa WHO W apresentou crescimento de poucas colônias na cultura proveniente da suspensão bacteriana de 1 McFarland.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Figura 7- Crescimento da cepa WHO W a -20 °C após 30 dias de armazenamento



Legenda: A cepa WHO W proveniente de suspensão bacteriana e 2 McFarland apresentou crescimento muito mais intenso em ágar chocolate, após 30 dias de armazenamento.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Figura 8- Crescimento da cepa WHO W a -80 °C após 60 dias de armazenamento



Legenda: Após 60 armazenadas em freezer -80°C, a cepa WHO W ainda apresentava crescimento abundante tanto na concentração 1 McFarland (à esquerda), quanto na concentração 2 McFarland (à direita).

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Nos dias 120 e 150, não sendo mais visualizado o crescimento das cepas armazenadas em temperatura -20°C, analisou-se apenas a viabilidade celular das cepas armazenadas em -80°C, cujos resultados estão representados na tabela 2. Após 120 dias, 100% das cepas ainda permaneciam viáveis. As cepas semeadas no dia 120 foram completamente descongeladas e mantidas em temperatura ambiente pelo período de 1 hora, e então novamente armazenadas a -80 °C. Após 30 dias (dia 150 do experimento), 67% das cepas provenientes da suspensão 1 McFarland apresentaram crescimento uniforme, e 33% crescimento espaçado, enquanto 80% das cepas de concentração 2 McFarland apresentaram crescimento uniforme e 20% crescimento espaçado, ou seja, quando há crescimento de mais de 20 colônias.

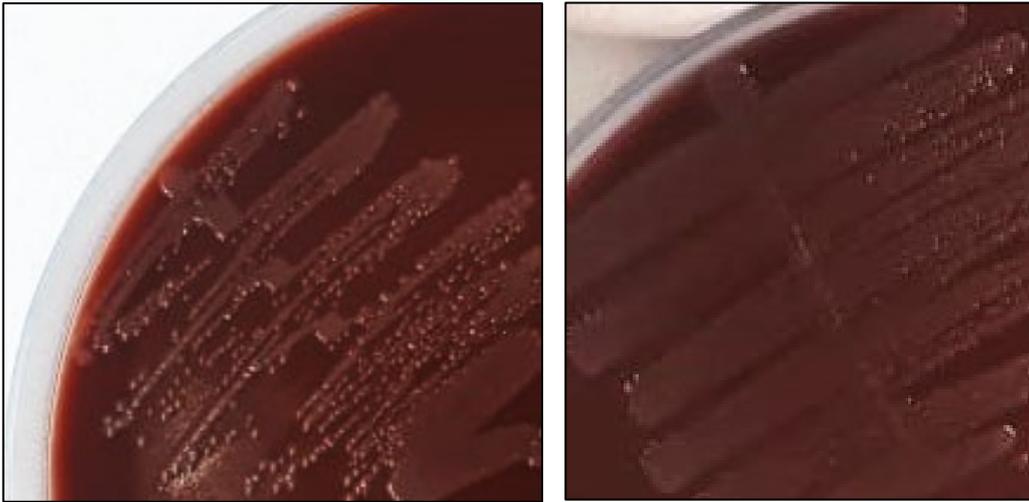
Tabela 3- Crescimento das cepas *N. gonorrhoeae* a -80°C (após 120 e 150 dias)

	DIA 120	DIA 150
WHO F (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO F (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO G (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO G (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO K (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO K (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO L (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO L (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO M (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO M (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO N (1 Mcfarland -80)	1	2
WHO N (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO O (1 Mcfarland -80)	1	2
WHO O (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO P (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO P (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO U (1 Mcfarland -80)	1	2
WHO U (2 Mcfarland -80)	1	2
WHO V (1 Mcfarland -80)	1	2
WHO V (2 Mcfarland -80)	1	2
WHO W (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO W (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO X (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO X (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO Y (1 Mcfarland -80)	1	1
WHO Y (2 Mcfarland -80)	1	1
WHO Z (1 Mcfarland -80)	1	1

WHO Z (2 Mcfarland -80)	1	1
ATCC (1 Mcfarland -80)	1	2
ATCC (2 Mcfarland -80)	1	2

Legenda: 1: Crescimento uniforme; 2: crescimento espaçado (> 20 colônias).

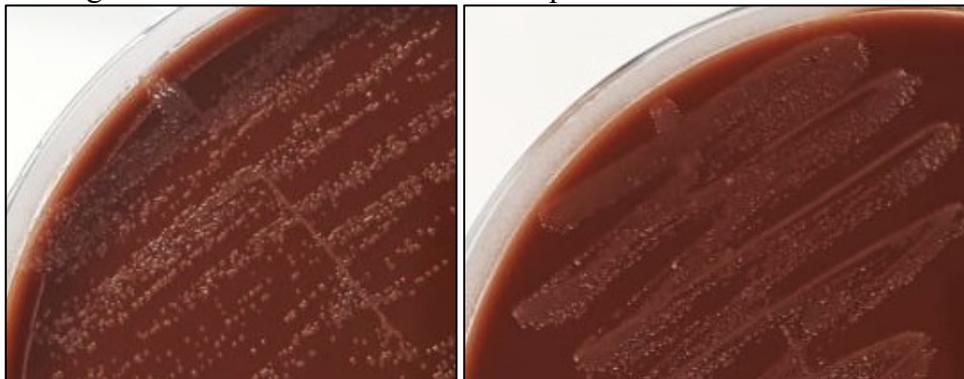
Figura 9- Crescimento das cepas de NG armazenadas a -80°C após 120 dias



Legenda: As cepas de NG mantidas a -80°C apresentaram crescimento uniforme e abundante após 120 dias de estoque (à esquerda cepa WHO F de concentração 1 McFarland; à direita cepa WHO F de concentração 2 McFarland).

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Figura 10- Crescimento da WHO W após 150 dias à -80°C



Legenda: A cepa WHO W após 150 dias em temperatura de -80°C e 30 dias após o descongelamento completo. Apesar de ambas as concentrações (1 McFarland à esquerda e 2 McFarland à direita) mostrarem crescimento uniforme, o crescimento da concentração 2 McFarland foi mais abundante.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

## 5.2 VIABILIDADE CELULAR EM DIFERENTES MEIOS DE TRANSPORTE

As 4 cepas armazenadas em meio Amies com carvão apresentaram crescimento em todos os períodos analisados, mantendo-se viáveis por, no mínimo, 24 horas. Apenas a cepa WHO V apresentou pouco crescimento após 24 h.

Tabela 3- Crescimento bacteriano em meio Amies com carvão

	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h
WHO F	+	+	+	+	+
WHO L	+	+	+	+	+
WHO V	+	+	+	+	PC
WHO X	+	+	+	+	+

Legenda: +: Crescimento uniforme; PC: Pouco Crescimento.

Figura 11- Cepas WHO L e WHO V mantidas em meio Amies com carvão



Legenda: Após 4 horas, as cepas WHO L (à esquerda) e WHO V (à direita) apresentaram crescimento abundante em meio ágar chocolate.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

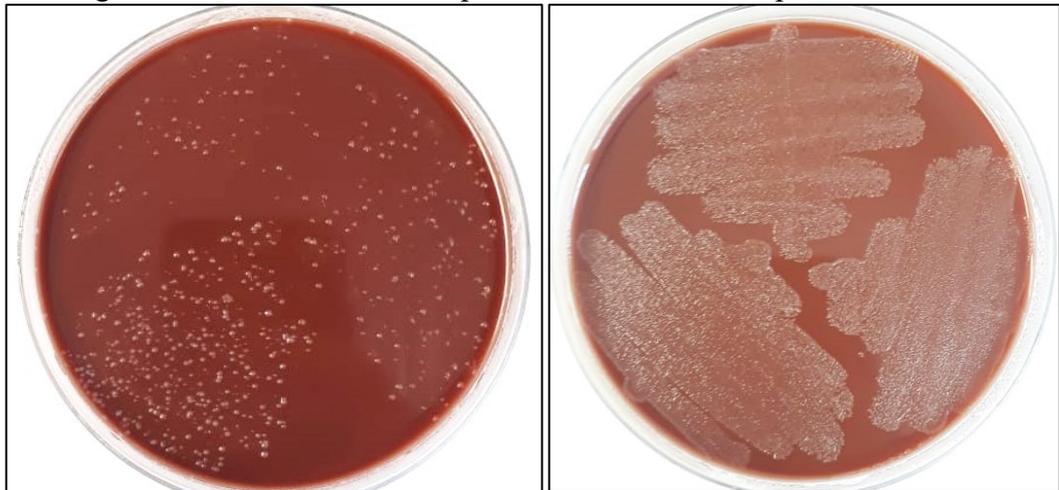
Após a incubação das cepas armazenadas em ESwab Amies Líquido, observou-se o crescimento bacteriano em ágar chocolate no período de 0 h, assim confirmando a viabilidade das cepas utilizadas, e também no período de 24 h. As cepas que foram mantidas nos meios de transporte que permaneceram em temperatura ambiente por 48 e 72 horas mostraram-se viáveis, mas o crescimento foi consideravelmente menor, e após 96 h não houve mais desenvolvimento bacteriano de nenhuma das 4 cepas WHO.

Tabela 4- Crescimento bacteriano em ESwab Amies Líquido

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
WHO F	+	+	+	PC	NHC
WHO L	+	+	PC	PC	NHC
WHO V	+	+	PC	PC	NHC
WHO X	+	+	+	PC	NHC

Legenda: +: Crescimento uniforme; PC: Pouco Crescimento; NHC: Não Houve Crescimento.

Figura 12- Crescimento das cepas WHO F e WHO X após 48 h



Legenda: Crescimento das cepas WHO F (esquerda) e WHO X (direita) após 48 horas, testadas no meio de transporte Amies líquido. Ambas as cepas cresceram de maneira uniforme, mas a WHO X apresentou crescimento mais abundante.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Figura 13- Crescimento da cepa WHO L após 48 h



Legenda: A cepa WHO L apresentou pouco crescimento quando mantida por 48 horas em meio Amies líquido.

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

Para o armazenamento das culturas congeladas, NG e Martin sugeriram realizar uma suspensão bacteriana em caldo cérebro-coração (BHI) e 20% de glicerol e armazená-la em freezer -80°C ou nitrogênio líquido, e, quando necessário, o transporte deveria ser realizado em gelo seco (NG; MARTIN, 2005).

Para analisar a preservação do gonococo à -20°C, HARBEC e TURCOTTE (1996) avaliaram três meios de armazenamento, sendo dois meios à base de gelatina e um meio contendo triptona de soja com 10% de glicerol. Após 12 meses de armazenamento todas as cepas permaneceram viáveis nos meios à base de gelatina, porém em apenas 4 meses a maioria das cepas armazenadas em triptona de soja teve a viabilidade celular drasticamente reduzida (HARBEC; TURCOTTE, 1996).

O armazenamento de culturas pelo método de liofilização também vem sendo utilizado há anos, principalmente para estoque de microrganismos há longo prazo (MORGAN et al., 2006). Para NG essa é uma forma eficiente de manter as culturas armazenadas a -20°C por um período de tempo maior, o que exclui a necessidade de um ultrafreezer no laboratório. ALEXANDER (1981) testou um método de liofilização de cepas de NG utilizando tubos capilares e observou que após 1 ano todas as cepas do gonococo armazenadas a -20°C permaneciam viáveis (ALEXANDER, 1981). Outro estudo também mostrou que a liofilização das culturas de NG pode manter a viabilidade das cepas por até mais de 10 anos (MEHAFFEY; COOK; GRIFFIN, 1984).

Para simplificar o armazenamento de microrganismos fastidiosos, VILLA *et al.* (2020) testaram a viabilidade de cepas de NG em swab de algodão e armazenaram em freezer -80°C. As cepas haviam sido previamente cultivadas em ágar chocolate e os swabs foram rolados sobre as placas para coletar as colônias, e em seguida inseridos em criotubos que foram imediatamente armazenados no freezer. Após cerca de 8 anos, 100% das cepas de NG permaneciam viáveis e ainda apresentavam o mesmo perfil de resistência na CIM, demonstrando que este método não altera as características fenotípicas de resistência do organismo (VILLA et al., 2020).

Neste estudo, as cepas armazenadas em temperatura de -20°C não sobreviveram até o período de 60 dias, e muitas delas perderam a viabilidade em apenas 30 dias. Por outro lado, a -80°C as cepas permaneceram viáveis por pelo menos 150 dias, mesmo depois de serem mantidas em temperatura ambiente por 1 hora e novamente congeladas.

Um achado muito importante deste estudo é a influência da concentração bacteriana na taxa de recuperação das cepas em ágar chocolate. Após 30 dias mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , houve 27% a mais de crescimento das cepas preparadas em suspensões de concentração 2 McFarland, em relação às cepas preparadas em concentração 1 McFarland. Observou-se também como a concentração bacteriana afetou o crescimento das cepas armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após 150 dias e um descongelamento total das alíquotas (os criotubos foram deixados à temperatura ambiente durante uma hora), 67 % das cepas proveniente das suspensões de concentração 1 McFarland apresentaram crescimento uniforme em ágar chocolate, enquanto 80% das provenientes das suspensões de 2 McFarland apresentaram crescimento uniforme. Portanto, o descongelamento que as cepas foram submetidas afetou menos o crescimento daquelas provenientes da suspensão com concentração maior de bactérias, que mantiveram o perfil de crescimento que apresentavam antes do descongelamento.

A viabilidade celular das cepas analisadas parece não sofrer influência do perfil fenotípico de resistência, do método e meio de armazenamento utilizados neste estudo, uma vez que não foi possível observar um padrão de crescimento relativo ao fenótipo das cepas.

Na cultura realizada após os primeiros 30 dias, a cepa WHO F de concentração 1 McFarland apresentou maior crescimento que a cepa WHO F de concentração 2 McFarland. O crescimento maior de uma cepa proveniente de uma suspensão com menor concentração pode ter sido resultante da sedimentação do inóculo e não reflete em um dado relevante para este estudo.

## 6.2 DIFERENTES MEIOS DE TRANSPORTE

Para o transporte de culturas de *N. gonorrhoeae* em temperatura ambiente, NG e Martin (2005) propuseram a utilização de swabs comerciais em meio contendo ágar com ou sem carvão para manter o gonococo viável durante 6 a 12 h (NG; MARTIN, 2005).

BARRY, FAY e SAUER (1972) sugeriram o uso de carvão nos meios de transporte com Amies para neutralizar substâncias tóxicas, como ácidos graxos, e melhorar a viabilidade e a recuperação *N. gonorrhoeae* em amostras clínicas (BARRY; FAY; SAUER, 1972). Estudos posteriores mostraram que meios de transporte com carvão em sua formulação obtiveram melhores resultados que meios sem carvão, mantendo viáveis cepas de NG por mais de 24 h (BARBER; LAWSON; GROVE, 1998) e melhorando a recuperação bacteriana após 48 h (WADE; GRAVER, 2003).

Um estudo de DRAKE *et al.*, realizado em 2005, comparou a viabilidade celular de cepas do gonococo em dois swabs comerciais (*Easy-Flow Copan Liquid Stuart's* e *Starplex Swab Transport Systems*) que continham o meio líquido Stuart, sem carvão, em sua formulação. Os resultados mostraram que após 6 horas a recuperação de *N. gonorrhoeae* diminuiu drasticamente quando comparada ao tempo 0 h, em ambos os meios de transporte, e foi nula quando transcorridas 48 horas. A recuperação bacteriana no tempo 0 h, porém, foi maior no meio da Copan, o que foi atribuído à capacidade do material do swab (swab Easy-Flow™, fabricado com fibras de rayon) desenvolvido por esse fabricante de liberar os microrganismos, uma vez que os inóculos iniciais eram os mesmos (DRAKE *et al.*, 2005).

Outro estudo comparou o ESwab com dois outros meios de transporte que possuem meio Amies e ágar na formulação e todos foram capazes de recuperar *N. gonorrhoeae* em meio de cultura, mas o desempenho do ESwab foi melhor quanto ao número de colônias que se desenvolveram (VAN HORN *et al.*, 2008), o que também foi demonstrado com os estudos de (TAN *et al.*, 2014) e (AVOLIO; CAMPORESE, 2015).

A cepa WHO F tem fenótipo de resistência sensível a vários antimicrobianos. Em 24 horas no meio Amies líquido, apresentou crescimento abundante e uniforme, e em 48 horas o crescimento ainda foi uniforme, mas o número de colônias significativamente reduzido. Observou-se, após 72 horas, pouco crescimento e não foram observadas colônias após 96 horas.

Figura 14- Crescimento de NG do meio Amies líquido após 24 h



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Figura 15- Crescimento de NG do meio Amies líquido após 48 h



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

As cepas L e V apresentam fenótipo de resistência semelhante, sendo ambas resistentes à penicilina, ao ciprofloxacino e a tetraciclina, e sensíveis à cefixima e espectinomicina. Estas cepas obtiveram o mesmo perfil de crescimento no meio ESwab Amies líquido, com o número de colônias diminuído em 48 e 72 horas, e nenhum crescimento em 96 horas. A WHO X é, dentre as 4 cepas testadas, a que apresenta maior resistência aos antimicrobianos, sendo altamente resistente às cefalosporinas (cefixima e ceftriaxona) e ao ciprofloxacino. Embora seja grande a diferença no perfil fenotípico das cepas WHO F e X, ambas cresceram nos mesmos períodos analisados, mas a cepa WHO apresentou maior número de colônias.

Um dos objetivos do estudo foi traçar uma relação entre o perfil fenotípico das cepas WHO. Para isso, foram escolhidas cepas com perfis de resistência variados, que abrangessem tanto cepas com baixa resistência aos antimicrobianos, quanto cepas altamente resistentes, como a WHO X. Porém, não foi encontrada relação entre o perfil fenotípico de resistência e a recuperação das cepas WHO mantidas em meio de transporte após a semeadura em ágar chocolate, uma vez que as cepas F e X apresentaram um perfil de crescimento semelhante.

Deve ser levado em consideração a presença de outros elementos da uretra masculina, como leucócitos polimorfonucleares e os microrganismos que fazem parte da microbiota da uretra (NELSON et al., 2010), e que podem estar presentes na amostra clínica. A presença de polimorfonucleares na suspensão bacteriana, por exemplo, poderia favorecer o crescimento das cepas de NG, pois mimetizaria as condições da infecção gonocócica *in vivo*, o que poderia refletir em um período maior de viabilidade celular utilizando o meio Amies líquido.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que armazenar as culturas de gonococo em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  em caldo casoy e glicerol não é eficiente para a maioria das cepas, principalmente se a concentração de bactéria utilizada for baixa, o que reforça a necessidade de novas pesquisas que auxiliem no desenvolvimento de um método barato e simples, a fim de proporcionar ampliação da vigilância de resistência de NG em locais nos quais não é possível dispor da infraestrutura de um ultrafreezer.

Como os resultados deste estudo não foram capazes de definir o período exato em que as cepas permanecem viáveis neste meio e a  $-20^{\circ}\text{C}$ , já que grande parte das cepas perderam a viabilidade antes do período de 30 dias definido com a primeira análise, um novo estudo utilizando as mesmas condições de armazenamento e avaliando um período menor seria importante para determinar a quantidade de dias em que ainda é possível obter 100% de viabilidade celular das cepas, o que poderia ser útil como uma opção para estoque rápido de cepas em uma situação em que não haja ultrafreezer disponível no laboratório.

Este estudo demonstrou que o meio Amies com carvão (Copan®) consegue manter a viabilidade celular de *N. gonorrhoeae* por um período mínimo de 24 horas e o meio ESwab – amies líquido (Copan®) por até 72 horas. Para ser possível a comparação entre os dois meios de transporte é necessária a continuação da análise de viabilidade em meio Amies com carvão por mais períodos de tempo, já que se observou crescimento bacteriano em todos os períodos analisados. Também seria importante que se estudasse a viabilidade celular de NG a partir de suspensões com leucócitos polimorfonucleares, para analisar se há influência deste fator sobre a sobrevivências das cepas.

A literatura indica que armazenar o meio ESwab – amies líquido a  $4^{\circ}\text{C}$  pode favorecer a sobrevivência do gonococo (SERRA-PLADEVALL et al., 2018). Portanto, supõe-se que se mantido nessas condições, o meio analisado poderia apresentar maior crescimento em 72 h ou até permanecer viável por um período maior.

A sobrevivência dos microrganismos entre a coleta e a análise no laboratório é fundamental para os estudos de vigilância. Diversas pesquisas comparando a eficiência de meios de transporte comerciais vêm sendo realizadas ao longo das últimas décadas, e elas mostram a importância da escolha adequada do meio para alcançar uma recuperação bacteriana eficiente a partir dos isolados clínicos. A formulação e a temperatura ideais dos meios de transporte são condições que podem favorecer a sobrevivência dos microrganismos após a coleta, em especial daqueles fastidiosos. O material com que é fabricado o swab de coleta

também tem um papel importante na recuperação bacteriana, uma vez que precisa garantir a absorção da amostra, sem inibir os organismos, e garantir uma eluição eficiente em meio de cultura.

Pesquisas como essa se fazem cada vez mais necessárias em um cenário em que os estudos de vigilância mostram um crescente aumento na resistência antimicrobiana por *Neisseria gonorrhoeae*. É fundamental que mais países possam ser incluídos nos estudos de vigilância, bem como que os países que já realizam os estudos possam ampliar cada vez mais a amostragem, para que se possa detectar os casos de resistência antimicrobiana. Para isso, os meios de transporte e armazenamento devem ter o menor custo possível e serem eficientes, garantindo a viabilidade celular dos isolados clínicos.

## 8 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, G. A. Improved lyophilization procedure for storage of reference cultures and clinical isolates. **Journal of clinical microbiology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 805–806, 1981. DOI: 10.1128/jcm.13.4.805-806.1981. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6785313/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

AMIES, C. R. A modified formula for the preparation of Stuart's Transport Medium. **Canadian Journal of Public Health**, [S. l.], v. 58, n. 7, p. 296–300, 1967. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4859908/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

AVOLIO, Manuela; CAMPORESE, Alessandro. Liquid based microbiological transport systems: Conformity assessment of two commercial devices. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 115, p. 42–44, 2015. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.05.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25957512/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

BARBER, S.; LAWSON, P. J.; GROVE, D. I. Evaluation of bacteriological transport swabs. **Pathology**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 179–182, 1998. DOI: 10.1080/00313029800169196. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9643502/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

BARRY, A. L.; FAY, G. D.; SAUER, R. L. Efficiency of a transport medium for the recovery of aerobic and anaerobic bacteria from applicator swabs. **Applied microbiology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 31–33, 1972. DOI: 10.1128/aem.24.1.31-33.1972. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1311111/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

BAZZO, M. L. et al. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015–16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 73, n. 7, p. 1854–1861, 2018. DOI: 10.1093/jac/dky090. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29635367/>. Acesso em: 16 out. 2020.

BIGNELL, C.; UNEMO, M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. **International Journal of STD and AIDS**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 85–92, 2013. DOI: 10.1177/0956462412472837. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24400344/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

BRASIL. **Nota Informativa n. 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS**, 2017. Disponível em: [http://www.aids.gov.br/pt-br/legislacao/nota-informativa-no-6-sei2017-covigcgvpdiahvsvsms#:~:text=DIAHV%2FSVS%2FMS,-Situação%3AvigenteData&text=Atualização da recomendação nacional do,colo do útero e reto\).](http://www.aids.gov.br/pt-br/legislacao/nota-informativa-no-6-sei2017-covigcgvpdiahvsvsms#:~:text=DIAHV%2FSVS%2FMS,-Situação%3AvigenteData&text=Atualização da recomendação nacional do,colo do útero e reto).)

COSTA-LOURENÇO, Ana Paula Ramalho Da; BARROS DOS SANTOS, Késia Thaís; MOREIRA, Beatriz Meurer; FRACALANZZA, Sergio Eduardo Longo; BONELLI, Raquel Regina. **Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat** *Brazilian Journal of Microbiology* Elsevier Editora Ltda, , 2017. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.06.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754299/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

CREIGHTON, Sarah. **Gonorrhoea** *BMJ clinical evidence*, 2014. DOI: 10.5005/jp/books/11611\_34.

DRAKE, Cheryl; BARENFANGER, Joan; LAWHORN, Jerry; VERHULST, Steven. Comparison of easy-flow Copan Liquid Stuart's and Starplex swab transport systems for recovery of fastidious aerobic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 1301–1303, 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.3.1301-1303.2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15750099/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

GUVENÇ, Furkan; KAUL, Rupert; GRAY-OWEN, Scott D. **Intimate Relations: Molecular and Immunologic Interactions Between Neisseria gonorrhoeae and HIV-1** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01299. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32582133/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

HARBEC, Pierre S.; TURCOTTE, Pierre. Preservation of Neisseria gonorrhoeae at -20°C. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 1143–1146, 1996. DOI: 10.1128/jcm.34.5.1143-1146.1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8727891/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

HILL, Stuart A.; MASTERS, Thao L.; WACHTER, Jenny. **Gonorrhea – An evolving disease of the new millennium** *Microbial Cell* Shared Science Publishers OG, , 2016. DOI: 10.15698/mic2016.09.524. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28357376/>. Acesso em: 16 out. 2020.

ISLAM, Epshita A. et al. Specific binding to differentially expressed human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules determines the outcome of Neisseria gonorrhoeae infections along the female reproductive tract. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 86, n. 8, 2018. DOI: 10.1128/IAI.00092-18. Disponível em: <https://doi.org/10>. Acesso em: 24 nov. 2020.

JÖNSSON, Agnez; JACOBSSON, Susanne; FOERSTER, Sunniva; COLE, Michelle J.; UNEMO, Magnus. Performance characteristics of newer MIC gradient strip tests compared with the Etest for antimicrobial susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae. **APMIS**, [S. l.], v. 126, n. 10, p. 822–827, 2018. DOI: 10.1111/apm.12887. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30191618/>. Acesso em: 25 nov. 2020.

KING, A. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 48, n. SUPPL. 1, p. 77–80, 2001. DOI: 10.1093/jac/48.suppl\_1.77. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11420340/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

KIRKCALDY, Robert D.; WESTON, Emily; SEGURADO, Aluisio C.; HUGHES, Gwenda. Epidemiology of Gonorrhea: A Global Perspective. [S. l.], 2019. DOI: 10.1071/SH19061.

MASSARI, Paola; RAM, Sanjay; MACLEOD, Heather; WETZLER, Lee M. **The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity** *Trends in Microbiology* Elsevier Ltd, , 2003. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)00037-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12598131/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

MCSHEFFREY, Gordon G.; GRAY-OWEN, Scott D. Neisseria gonorrhoeae. *In: Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2014. v. 3p. 1471–1485. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00082-2.

MEHAFFEY, M. A.; COOK, E. C.; GRIFFIN, C. W. Preparation and stability of freeze-dried *Neisseria gonorrhoeae* cultures used for external quality control. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 1126–1129, 1984. DOI: 10.1128/jcm.20.6.1126-1129.1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6440906/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

MEYER, Thomas; BUDER, Susanne. The Laboratory Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current Testing and Future Demands. **Pathogens**, [S. l.], 2020. DOI: 10.3390/pathogens9020091. Disponível em: [www.mdpi.com/journal/pathogens](http://www.mdpi.com/journal/pathogens). Acesso em: 25 nov. 2020.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. **Preservation of microorganisms by drying; A review** **Journal of Microbiological Methods** Elsevier, , 2006. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017.

NELSON, David E. et al. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 11, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0014116. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21124791/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

NG, Lai King; MARTIN, Irene E. **The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*** **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology** Pulsus Group Inc., , 2005. DOI: 10.1155/2005/323082. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18159523/>. Acesso em: 16 out. 2020.

OHNISHI, Makoto; GOLPARIAN, Daniel; SHIMUTA, Ken; SAIKA, Takeshi; HOSHINA, Shinji; IWASAKU, Kazuhiro; NAKAYAMA, Shu Ichi; KITAWAKI, Jo; UNEMO, Magnus. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 55, n. 7, p. 3538–3545, 2011. DOI: 10.1128/AAC.00325-11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21576437/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

PALMER, Allison; CRISS, Alison K. **Gonococcal Defenses against Antimicrobial Activities of Neutrophils** **Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2018. DOI: 10.1016/j.tim.2018.07.003. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6251743/?report=abstract](https://www.pmc/articles/PMC6251743/?report=abstract). Acesso em: 24 nov. 2020.

PCDT. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (Ministério da Saúde)** Brasília, 2020. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-atencao-integral-pessoas-com-infeccoes>.

QUILLIN, Sarah Jane; SEIFERT, H. Steven. ***Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.169. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6329377/?report=abstract](https://www.pmc/articles/PMC6329377/?report=abstract). Acesso em: 16 out. 2020.

ROWLEY, Jane et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, [S. l.], v. 97, n. 8, 2019. DOI: 10.2471/BLT.18.228486. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31384073/>. Acesso em: 16 out. 2020.

SAGINUR, R.; CLENER, B.; PORTNOY, J.; MENDELSON, J. Superoxol (Catalase) test for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 475–477, 1982. DOI: 10.1128/jcm.15.3.475-477.1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6804487/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

SERRA-PLADEVALL, Judit; GULIN BLANCO, Carlos; VILA OLMO, Neus; ARJONA CAMACHO, Pilar; ANDREU DOMINGO, Antonia. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae*: should swabs be refrigerated or not?: *Neisseria gonorrhoeae* preservation. **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 145, p. 37–39, 2018. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.12.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29292202/>. Acesso em: 25 nov. 2020.

SHAUGHNESSY, Jutamas; RAM, Sanjay; RICE, Peter A. Biology of the *Gonococcus*: Disease and Pathogenesis. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] : Humana Press Inc., 2019. v. 1997p. 1–27. DOI: 10.1007/978-1-4939-9496-0\_1. Disponível em: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9496-0\\_1](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9496-0_1). Acesso em: 24 nov. 2020.

SPENCE, Janice M.; WRIGHT, Lori; CLARK, Virginia L. Laboratory Maintenance of *Neisseria gonorrhoeae*. **Current Protocols in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 4A.1.1-4A.1.26, 2008. DOI: 10.1002/9780471729259.mc04a01s8. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780471729259.mc04a01s8>. Acesso em: 25 nov. 2020.

TAN, Thean Yen; NG, Lily Siew Yong; SIM, Diana Miao Fang; CHENG, Yvonne; MIN, Melissa Ong Hui. Evaluation of bacterial recovery and viability from three different swab transport systems. **Pathology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 230–233, 2014. DOI: 10.1097/PAT.0000000000000074. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24614721/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

UNEMO, Magnus et al. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: Phenotypic, genetic and reference genome characterization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 71, n. 11, p. 3096–3108, 2016. DOI: 10.1093/jac/dkw288. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27432602/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

UNEMO, Magnus; SEIFERT, H. Steven; HOOK, Edward W.; HAWKES, Sarah; NDOWA, Francis; DILLON, Jo Anne R. *Gonorrhoea*. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41572-019-0128-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31754194/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

UNEMO, Magnus; SHAFER, William M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 587–613, 2014. DOI: 10.1128/CMR.00010-14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24982323/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

VAN HORN, Kenneth G.; AUDETTE, Carol D.; SEBECK, Denise; TUCKER, Kelly A. Comparison of the copan ESwab system with two amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 1655–1658, 2008. DOI: 10.1128/JCM.02047-07. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18353935/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

VILLA, Laura; TORREBLANCA, Aurora; OTERO, Luis; CARREÑO, Francisco; CAMPO, Rainer; LÓPEZ-ESCOBAR, María; VAZQUEZ, Fernando. Long term storage of fastidious bacteria (*Neisseria* spp. and *Haemophilus* spp.) with swab preservation at  $-80^{\circ}\text{C}$ . **Journal of Microbiological Methods**, [S. l.], v. 175, 2020. DOI: 10.1016/j.mimet.2020.105969. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32512120/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

WADE, J. J.; GRAVER, M. A. Survival of Six Auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Transport Media. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 1720–1721, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.4.1720-1721.2003.

WI, Teodora; LAHRA, Monica M.; NDOWA, Francis; BALA, Manju; DILLON, Jo Anne R.; RAMON-PARDO, Pilar; EREMIN, Sergey R.; BOLAN, Gail; UNEMO, Magnus. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. **PLoS Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 7, 2017. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002344. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28686231/>. Acesso em: 16 out. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae***. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246114/9789241549691-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 24 nov. 2020.

APÊNDICE A – FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA DAS CEPAS WHO

	WHO F	WHO G	WHO K	WHO L	WHO M	WHO N	WHO O	WHO P	WHO U	WHO V	WHO W	WHO X	WHO Y	WHO Z
Azitromicina	S (0,125)	S (0,25)	S (0,25)	I (0,5)	S (0,25)	S (0,25)	S (0,25)	R (4)	R (4)	AR (>256)	I (0,5)	I (0,5)	R (1)	R (1)
Cefixima	S (<0,016)	S (<0,016)	BR (0,25)	S (0,125)	S (<0,016)	BR (0,25)	AR (4)	AR (2)	AR (2)					
Ceftriaxona	S (<0,002)	S (0,008)	S (0,064)	BR (0,25)	S (0,016)	S (0,004)	S (0,032)	S (0,004)	S (0,002)	S (0,064)	S (0,064)	AR (2)	AR (1)	BR (0,5)
Ciprofloxacino	S (0,004)	BR (0,125)	AR (>32)	AR (>32)	R (2)	R (4)	S (0,008)	S (0,004)	S (0,004)	AR (>32)	AR (>32)	AR (>32)	AR (>32)	AR (>32)
Espectinomicina	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	AR (>1024)	S (8)	S (8)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)
Gentamicina *	4	4	4	4	4	4	4	4	4	8	4	4	8	4
Penicilina G	S (0,032)	I (0,5)	RMC (2)	RMC (2)	NGPP (>32)	NGPP (>32)	NGPP (>32)	I (0,25)	I (0,125)	NGPP (>32)	RMC (4)	RMC (4)	I (1)	RMC (2)
Tetraciclina	S (0,25)	RMP (32)	R (2)	R (2)	R (2)	RMP (16)	R (2)	I (1)	I (1)	R (4)	R (4)	R (2)	R (4)	R (4)

Legenda: S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AR: Alta resistência; BR: Baixa resistência; RMC: Resistência mediada por cromossomo; NGPP: *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase; RMP: Resistência mediada por plasmídeos. \*Não há ponto de corte para gentamicina definido pela EUCAST.

Fonte: Adaptado de Unemo *et al.*, 2016. (UNEMO *et al.*, 2016)