LUIZ FERNANDO DE GÓES SIQUEIRA

φ

**ASPECTOS FENOTÍPICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE CEPAS
DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* PRODUTORA DE PENICILI-
NASE (NGPP) ISOLADAS NA CIDADE DE SÃO PAULO**

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR.
DEPARTAMENTO: PRÁTICA DE SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SERVIÇO DE SAÚDE PÚBLICA
ORIENTADOR: PROF. DR. SANDRA MARIA OTTATI DE
OLIVEIRA NITRINI

SÃO PAULO

1993

A

Edna Maria Matos de Góes Siqueira

Luiz Fernando Matos de Góes Siqueira

José de Matos de Góes Siqueira

Ao Professor Doutor Walter Belda

Mestre e amigo, a quem tive o privilégio de ter acompanhado e desfrutado de sua sabedoria existencial e científica.

Perdemos sua liderança, mas não perdemos nossos sentidos, pois decididamente construistes em bases sólidas.

Humildade, fidelidade e senso de hierarquia científica caracterizam a "filosofia Walter Belda", perpetuada em sua pureza.

in memoriam

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini.

Aos Professores François Catalan e Alexander Milovanovic (Institut Alfred Fournier), amigos e incansáveis pesquisadores.

A meus amigos, incontável número de companheiros de todos os dias, que com trabalho direto, palavras de apoio e infinita paciência, desempenharam grande participação nesta obra.

A todos os funcionários da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

À Seção de Coleção de Cultura do Instituto Adolfo Lutz.

À NHO Teleinformática Ltda.

RESUMO

A gonorréia permanece até os dias atuais como um problema de saúde pública.

A resistência plasmidial à penicilina, em cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, constitui um problema crescente, preocupando autoridades sanitárias em todo o mundo. O conhecimento das características epidemiológicas e da dinâmica destas cepas na população é imperativo, para o sucesso de intervenções de combate e controle da gonorréia no Brasil e no mundo. Os fenômenos de instalação, manutenção e propagação da *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase são ainda pouco conhecidos.

Este trabalho estudou as características fenotípicas (comportamento de sensibilidade às drogas antimicrobianas, características do plasmídio de resistência, auxotipo e sorotipo), da *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), objetivando fornecer conhecimentos quanto aos fenômenos de instalação, manutenção e propagação destas cepas, de forma a contribuir com o programa de combate e controle da gonorréia na cidade de São Paulo e no Brasil. Foram estudadas 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP) e 50 de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora penicilinase (não NGPP), isolados no serviço de Doenças

Sexualmente Transmissíveis (DST) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, no período de abril de 1985 a abril de 1990.

Com uma incidência de 3,11% de cepas de NGPP, os resultados permitiram colaborar para formação de perfil epidemiológico das cepas produtoras de penicilinase na cidade de São Paulo. Quanto as características de sensibilidade aos antimicrobianos, foram observados altos níveis de resistência a tetraciclina. As demais características fenotípicas, plasmídios, auxotipo e sorotipo, demonstram que a cidade de São Paulo é uma região geográfica "aberta" ao fenômeno de "importação", tendo sido observadas características epidemiológicas descritas em várias outras localidades no mundo.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade da instalação de um programa de vigilância epidemiológica, visando manter sob controle a dinâmica da *Neisseria gonorrhoeae*, colaborando com o programa de combate e controle da gonorréia na cidade de São Paulo e no Brasil.

SUMMARY

Gonorrhoea has been considered as a public health problem up to these days.

The plasmid penicilin resistance, in *Neisseria gonorrhoeae* strains, is an increasing problem which concerns authorities from the whole world. The Knowledge on the epidemiological characteristics and on the dynamics of these strains in the populations is extremely important for the success of interventions and gonorrhoea control programmes in Brazil and in the world. The onset phenomena, maintenance and proliferation of the penicilin producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) are not well known yet.

This study presents the phenotype characteristics (sensibility to antimicrobial drugs, plasmid resistance characteristics, auxotype and serotype) of the PPNG. The objectives of the study are to contribute to the knowledge related to the onset phenomena, maintenance and proliferation of these strains, so that we can contribute to the gonorrhoea control programme in the city of São Paulo and in Brazil.

We studied 15 strains of penicilin producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) and 50 of non penicilin producing *Neisseria gonorrhoeae* (non PPNG),

SUMMARY

which were isolated in the Sexually Transmitted Disease Service of the Faculty of Public Health of the University of São Paulo, from April 1985 to April 1990.

With an incidence rate of 3.11% of *Neisseria gonorrhoeae*, the results allowed us to design an epidemiological profile of the penicilin producing strains in São Paulo. Regarding the antimicrobial sensibility characteristics, we observed high levels of resistance to tetracycline. The other phenotype characteristics (plasmid, auxotype, and serotype) show that the city of São Paulo is a geographic region open to "importation" phenomenon, since we have observed epidemiologic characteristics described in several places in the world.

The results of this reinforce the necessity of setting up an epidemiological surveillance programme with the objective of controlling the *Neisseria gonorrhoeae* dynamics and, in this way, to collaborate with the gonorrhoea control programme in the city of São Paulo and in Brazil.

GLOSSÁRIO

ABREVIATURAS:

ADN	- ácido desoxirribonucleico
CIM	- concentração inibitória mínima
DSS	- dodecilsulfato de sódio
DST	- doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	- etilenodiaminotetracético
ELISA	- enzyme linked immunosorbent assay
IgA	- imunoglobulina A
NGPP	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase
não NGPP	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase
NGTR	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> tetraciclina resistente
PBS	- phosphate buffer solution (tampão fosfato de sódio)
PI	- proteína I da membrana externa
PII	- proteína II da membrana externa
PIII	- proteína III da membrana externa
SIDA	- síndrome da imunodeficiência adquirida
TetM	- plasmídeo de resistência à tetraciclina (25,2 Mda)
TE	- tampão tris-HCl / EDTA
TMm	- Thayer Martin modificado (meio de cultura)
TnA	- transposon A

SIGLAS:

ATCC	- American Type Culture Collection
CDC	- Center for Diseases Control
EUA	- Estados Unidos da América
IAF	- Institut Alfred Fournier
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
NCTC	- National Collection of Type Cultures
OMS	- Organização Mundial de Saúde
UK	- United Kindown (Inglaterra)
WDCCM	- World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms

UNIDADES DE MEDIDA:

C	- grau Celsius
cm	- centímetro
g	- grama
kb	- kilobase
M	- Molar
mA	- miliampere
Mda	- Megadalton
ml	- mililitro
mm	- milímetro
mM	- milimolar
N	- Normal
rpm	- rotações por minuto
ufc	- unidades formadoras de colônia
μ l	- microlitro
V	- volt

FÓRMULAS:

CO ₂	- dióxido de carbono
HCl	- ácido clorídrico

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	3
1.2 Estratégias de Combate e Controle	9
1.3 Aspectos epidemiológicos	10
1.3.1 Pressão seletiva	11
1.3.2 Fenômeno de "importação"	12
1.3.3 Prostituição	13
1.4 Aspectos fenotípicos	13
1.4.1 Susceptibilidade a antimicrobianos	14
1.4.2 Plasmídios	14
1.4.3 Auxotipo	18
1.4.4 Sorotipo	19
1.5 Situação atual	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Casuística.....	26
3.2 Material	28
3.2.1 Conservação, estoque e transporte de cepas	29
3.2.2 Registro das cepas em coleções de cultura.....	29
3.2.3 Ativação das cepas.....	30

3.3 Metodologia	31
3.3.1 Prova de sensibilidade	31
3.3.1.1 Meio de cultura.....	31
3.3.1.2 Drogas testadas	32
3.3.1.3 Inóculo	33
3.3.1.4 Incubação e leitura dos resultados.....	34
3.3.2 Plasmidiograma	36
3.3.2.1 Isolamento do plasmídio	36
3.3.2.2 Preparo do gel de Agarose	38
3.3.2.3 Migração	38
3.3.2.4 Coloração e descoloração do gel de Agarose	39
3.3.3 Auxotipagem.....	39
3.3.3.1 Meio de cultivo	39
3.3.3.2 Inóculo	42
3.3.3.3 Incubação e leitura dos resultados.....	43
3.3.4 Sorotipagem	45
3.3.4.1 Preparação do reagente monoclonal	45
3.3.4.2 Pannel dos anticorpos monoclonais.....	46
3.3.4.3 Preparação da suspensão de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	46
3.3.4.4 Procedimento e interpretação da sorotipagem	47
4 RESULTADOS.....	49
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	84
7 PERSPECTIVA.....	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1 - Distribuição da variação percentual de isolamento de cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase (NGPP), em países que comunicaram seus níveis de ocorrência, entre 1976 e 1991.	8
TABELA 2 - Distribuição absoluta e percentual de cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , isoladas por ano de pesquisa (abril de 1985 a março de 1990) na cidade de São Paulo, segundo presença ou ausência do plasmídeo de resistência.....	27
TABELA 3 - Interpretação dos resultados da prova de sensibilidade aos antimicrobianos, para <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	35
TABELA 4 - Componentes do meio definido (NEDA)*	40
TABELA 5 - Distribuição dos 14 meios definidos, utilizados como padrão para auxotipagem de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , segundo omissão e adição de requerimento nutricional.	41
TABELA 6 - Distribuição das cepas padrão, utilizadas para controle de qualidade dos meios de cultivo definidos, segundo auxotipo, requerimento nutricional e seus números correspondentes em coleções de cultura.	42
TABELA 7 - Pannel para interpretação e determinação do auxotipo de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , segundo requerimento nutricional.	44
TABELA 8 - Distribuição absoluta e percentual das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , não produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas pesquisadas.....	54

TABELA 9 - Distribuição absoluta e percentual das 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas pesquisadas.....	55
TABELA 10 - Distribuição dos dados estatísticos entre as 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e as 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo as drogas antimicrobianas estudadas.....	61
TABELA 11 - Distribuição absoluta e percentual das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e das 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo sua categoria ¹ quanto a sensibilidade às drogas antimicrobianas testadas.	62
TABELA 12 - Distribuição das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e das 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo auxotipo.	63
TABELA 13 - Distribuição das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e das 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo sorotipo.....	64

TABELA 14 - Distribuição das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo a classificação duplas A/S (auxotipo/sorotipo).	65
TABELA 15 - Distribuição das 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo a classificação dupla A/S (auxotipo/soro).	66
TABELA 16 - Distribuição das 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo conteúdo genético extra cromossomal.	67
GRÁFICO 1 - Distribuição do número de casos de gonorréia diagnosticados nos EUA, segundo ano, entre 1977 e 1988.	5
GRÁFICO 2 - Distribuição do número de casos de gonorréia causados por cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, diagnosticados nos EUA, segundo ano, entre 1976 e 1987.	6
GRÁFICO 3 - Distribuição percentual das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à penicilina.	56

GRÁFICO 4 - Distribuição percentual das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à cefoxitina.	57
GRÁFICO 5 - Distribuição percentual das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à Tetraciclina.	58
GRÁFICO 6 - Distribuição percentual das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) a Tianfenicol.	59
GRÁFICO 7 - Distribuição percentual das 50 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> não produtora de penicilinase e 15 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à Espectinomicina.....	60

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

- QUADRO 1 - Painel para interpretação e classificação da sorovariedade, segundo reatividade dos epitopos imunogênicos das proteínas da principal membrana externa da *Neisseria gonorrhoeae*.48
- QUADRO 2 - Resultado das pesquisas realizadas nas 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, quanto a Concentração Inibitória Mínima, auxotipo e sorotipo.52
- QUADRO 3 - Resultado das pesquisas realizadas nas 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, quanto a Concentração Inibitória Mínima, auxotipo e sorotipo.53
- QUADRO 4 - Resultados das pesquisas realizadas nas 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, quanto à característica de seus plasmídios (pesos moleculares).68
- Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose demonstrando a distribuição plasmidial das cepas estudadas.....69
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose demonstrando a distribuição plasmidial das cepas estudadas.....70

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO.

Em 1976, a história da gonorréia, bem como do comportamento de sensibilidade da *Neisseria gonorrhoeae* aos antimicrobianos, assumiu novos rumos com a descoberta simultânea, na Inglaterra^{177,179} e nos Estados Unidos⁷, das primeiras cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, produtora de penicilinase (NGPP). Este mecanismo de resistência apresentava-se de forma dramática, diferindo totalmente dos até então conhecidos. Resultante da aquisição de um gen extra cromossômico^{56,149}, na forma de um plasmídio mediador da produção de uma enzima, a beta-lactamase (ou penicilinase), a bactéria adquiria a capacidade de inativar a penicilina, decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico, rompendo-o e produzindo ácido penicilínico⁷⁶.

A descoberta do plasmídio de resistência à penicilina (PcR) em gonococos provocou inicialmente preocupação generalizada^{13,152,172,265}, de um lado pela falta de conhecimento quanto aos fenômenos de instalação, manutenção e propagação deste novo elemento genético, por outro lado, pelo obscuro horizonte quando associados às variáveis comportamentais e culturais como fatores de risco, facilitadores do grave problema de saúde pública que já constituíam as Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST)^{13,41}. Autoridades sanitárias em todo o mundo alarmaram-se pelo temor de seus países tornarem-se prevalentes em cepas resistentes^{15,25,166}, agravando sobremaneira o problema já instalado da gonorréia no mundo^{9,11,102,156,169,265}. Com o risco da perda de controle, a gonorréia assumiria proporções epidêmicas, aumentando

dramaticamente não só os custos de tratamento, como os recursos necessários para combate e controle desta doença na população²⁴⁵.

1.1. Histórico.

Apesar da afirmativa de alguns autores de que a incidência da gonorréia aumenta rapidamente em muitos países do mundo, sendo considerada problema de saúde pública em alguns^{9,13,41,105,156,169,247,265}, observamos em países desenvolvidos, a exemplo dos Estados Unidos da América (EUA), um decréscimo nos níveis de ocorrência da gonorréia após o surgimento da NGPP, que diminuiu de 1 milhão de casos em 1978 para 700 mil casos em 1988^{43,45} (gráfico 1). Este fato começou a ser sentido no Brasil e em outros países ditos "em desenvolvimento" a partir de 1986*. Ironicamente, não houve nenhuma relação com os programas de combate e controle desta morbidade, e sim com temor popular frente a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que emergia de forma sombria e devastadora. O que inicialmente simulava um novo período no combate à gonorréia, com a redução dos níveis de ocorrência, emerge como um "iceberg", escondendo um problema de saúde pública, muitas vezes maior do que os nossos olhos podem ver. Iniciávamos na verdade, um novo momento epidemiológico, onde se evidenciava uma redução quantitativa das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* na

* Informações não publicadas nos serviços de DST-Rio de Janeiro, Recife, Brasília e São Paulo.

população, acompanhada de um aumento dramático de cepas qualitativamente diferenciadas, representadas pelo crescente número de cepas NGPP (gráfico 2). Isto é, um processo seletivo onde menor número de cepas eram encontradas na população e entre estas, a resistência plasmidial à penicilina, tornava-se cada vez mais frequente⁵⁰.

Na primeira metade da década de 80, a situação agravou-se com o ressurgimento da resistência cromossômica^{24,44,82,111,113}, a qual se mantém cíclica para algumas drogas específicas²²⁴. Entretanto, em 1985 surge na história da resistência antimicrobiana da *Neisseria gonorrhoeae* um novo rumo, quando na Filadelfia, EUA⁵¹ foi descrito um novo plasmídio de grande peso molecular, conhecido por (Tet M), mediador de resistência para tetraciclina. A *Neisseria gonorrhoeae* tetraciclina resistente (NGTR), além do seu fenômeno de resistência, carrega consigo a capacidade, até então desconhecida, de capturar e transferir plasmídios⁵¹. Logo surge, com perspectivas sombrias, a projeção epidemiológica de que a NGPP teria um quadro alarmante no mundo, como consequência do crescimento da NGTR.

O aparecimento da NGTR, vem sendo relatado em várias partes do mundo^{22,129,154,206,207,243}, despertando preocupações às autoridades sanitárias, tendo sido correlacionadas a fenômenos de "importação" e pressões seletivas^{197,227}.

Gráfico 1 - Distribuição do número de casos de gonorréia diagnosticados nos EUA, segundo ano, entre 1977 e 1988.

Nº DE CASOS

ANO

Fonte: CENTER FOR DISEASE CONTROL (C.D.C.). Sentinel surveillance system for antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep., 36:585, 1987.

Gráfico 2 - Distribuição do número de casos de gonorréia causados por cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, diagnosticados nos EUA, segundo ano, entre 1976 e 1987.

Fonte: CENTER FOR DISEASE CONTROL (C.D.C.). Sentinel surveillance system for antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep., 36:585, 1987.

Recentemente, confirmando estas preocupações, vem se observando progressivo crescimento na prevalência das cepas de NGTR, as quais têm sido responsabilizadas pelo aumento do número de cepas de NGPP^{35,193}.

Nos últimos dez anos, notificações do encontro de cepas de NGPP têm sido observadas em vários países, apesar da inexistência de programas de vigilância epidemiológica entre a maioria. Muitos destes países e/ou localidades têm procurado determinar os níveis de ocorrência destas cepas (tabela 1), com o objetivo de alertar autoridades sanitárias.

TABELA 1 - Distribuição da variação percentual de isolamento de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), em países que comunicaram seus níveis de ocorrência, entre 1976 e 1991.

CONTINENTE	PAÍS	PERCENTUAL DE ISOLAMENTO (1976 e 91)	REFERÊNCIA
ÁFRICA	Africa do Sul	1,9 - 5,0	58,61,214
	Gabão	13,0	264
	Gambia	14,6	14
	Madagascar	1,3	99
	Niger	35,0	260
	Nigéria	12,4 - 87,0	118,165,166,171,172
	Rwanda	51,9	20
	Senegal	5,3 - 12,5	29
	Zanibia	3,2 - 54,0	64,184
	Zimbabue	10,0 - 11,1	135,144
AMÉRICA	Brasil	0,9 - 8,3	86,139,140,142
	Canadá	0,1 - 1,7	12,13,210,253,256
	Chile	1,7 - 3,0	89,90
	Curacão	1,8	77
	Jamaica	4,3	68
	Panamá	22,5	12
	USA	0,1 - 59,0	8,43,46,47,48,49,107,116,266
	Cuba	16,6	101
EUROPA	Espanha	9,7	238
	França	0,6 - 5,3	133,186
	Grécia	5,3	213
	Holanda	10,0 - 18,0	5,19,236
	Inglaterra	0,1 - 9,4	3,95,114,150,212,228
	Itália	1,2 - 4,5	34,158
ÁSIA	India	0,8 - 12,1	244,251
	Indonésia	13,5 - 25,0	119,205
	Malásia	25,0 - 51,0	93,120
	Singapura	0,2 - 33,5	183,218,252,254
	Tailândia	8,0 - 40,0	52,62
	R.F.China	32,0 - 43,0	88,249
	Filipinas	59 - 40,0	170,231,232,162
	Japão	05 - 5,7	141
	Coréia	46,0	181
OCEANIA	Austrália	3,5 - 8,3	229,250,255,257,258
ORIENTE MÉDIO	Arabia Saudita	12,0	53
	Israel	42,0 - 45,0	208,222

1.2. Estratégias de Combate e Controle.

Sendo a penicilina a primeira droga de escolha no tratamento da gonorréia, em quase todos os países do mundo^{9,121,152}, a situação se agrava diante da classificação epidemiológica feita pelo "Center for Disease Control" (CDC) e suas indicações para mudança da primeira opção terapêutica. O CDC classifica áreas geográficas com níveis de ocorrência menores que 1%, como áreas não endêmicas, de 1% a 3% como áreas endêmicas e superiores a 3%, como áreas hiperendêmicas. Este órgão de vigilância epidemiológica preconiza como estratégia de combate e controle, a atenção redobrada em áreas endêmicas e troca imediata da penicilina, como primeira droga de escolha, em áreas hiperendêmicas⁴². Uma boa estratégia de combate e controle de uma determinada morbidade bacteriana, prevê um programa de vigilância epidemiológica, estadiando o comportamento de sensibilidade dos agentes etiológicos, entre outros procedimentos. A exemplo dos EUA, o "Programa de Vigilância Sentinela", no qual a sensibilidade da *Neisseria gonorrhoeae* é vigiada, se faz de maneira contínua, com base referencial mensal⁵⁰.

No Brasil, os programas de saúde vigentes não contam com estratégias de combate e controle, fundamentada na vigilância epidemiológica, quer pelo comportamento de sensibilidade, quer pela simples detecção da presença de determinantes genéticos de resistência. Agravando ainda mais a situação de saúde no Brasil, o procedimento oficial das autoridades sanitárias é de estabelecer normas de conduta terapêutica, que se caracterizam por uma

escolha intempestiva com bases em normatizações de outros países, ignorando a necessidade de programas de vigilância sentinela.

1.3. Aspectos epidemiológicos.

Do ponto de vista epidemiológico, hipoteticamente três fatores estariam ligados ao fenômeno de instalação, manutenção e propagação de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP):

1. Pressão seletiva e constante de agentes antimicrobianos, favorecendo a troca de elementos genéticos extra cromossômicos (plasmídios) decorrente de conjugação entre elementos bacterianos da mesma espécie ou de espécies diferentes entre si^{71,74,75,92,174,178,223}.
2. O fenômeno de "importação" oriundo das várias modalidades de viagens, disseminando as NGPP através do mundo, entre as quais figuram as viagens comerciais, os trabalhadores emigrados, marinheiros, militares, estudantes e turistas^{41,73,108,178,206,237}.
3. A prostituição como maior grupo de risco e principal reservatório das NGPP^{15,56,63,80,98}.

Apesar de incerto o mecanismo de perpetuação da resistência plasmidial, é clara a interrelação a vários outros fatores de predisponência direta

ou indireta. Entre estes, diferenças geográficas, as quais apresentam níveis distintos de ocorrência de cepas com resistência aumentada⁶. Por sua vez, ligadas a estas diferenças geográficas, figuram os fatores demográficos (raça, sexo), bem como alguns índices epidemiológicos (fator de masculinidade) e características comportamentais (preferência sexual e antecedentes venéreos)⁶.

Desta forma, cepas de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas de pacientes negros, demonstram maior resistência que as isoladas de pacientes brancos^{104,128,163}, por este motivo, algumas localidades predominantemente negras tendem a um maior nível de ocorrência de cepas resistentes, como é encontrado na África. Da mesma forma, cepas isoladas de homossexuais, apresentam-se mais resistentes do que as isoladas de heterossexuais^{104,159}.

Além destes fatores predisponentes, os três postulados acima, completam a característica multifatorial da tríade "instalação, manutenção e propagação" das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase.

1.3.1. Pressão seletiva.

Sabemos hoje que os aspectos culturais vigentes nos fragmentos populacionais determinam capital importância no fenômeno de pressão seletiva^{96,178,223}.

Entre estes aspectos culturais destacam-se: o uso indiscriminado de antibióticos, que segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estão por sua vez ligados a pressões sociais, decorrentes do estigma que acompanha as DST, e da preocupação do paciente consigo e com sua família¹⁶⁸; a automedicação; a indicação leiga, feita por amigos e curandeiros (medicina de Folk)^{17,96,221}; e ao atendimento em balcões de farmácia, responsável por 90% das primeiras consultas de DST^{16,17,18,141}. Finalmente, corroborando com os aspectos culturais na preservação do fenômeno de pressão seletiva, aparece com igual importância a ação intempestiva dos médicos, fomentando o uso excessivo de antimicrobianos, quer na clínica privada, quer sob recomendações oficiais em programas de saúde¹⁶⁸.

1.3.2. Fenômeno de "importação".

O fenômeno de "importação" de cepas resistentes, como fator favorecedor dos postulados citados anteriormente, embora de difícil estabelecimento, parece claro e importante em quase todo o mundo^{3,53,63,69,73,81,116,140,141,178,222,250,259,266}, onde uma vez em seu novo habitat, estas cepas se favorecem dos aspectos culturais locais para sua perpetuação^{96,205}.

1.3.3. Prostituição.

Por fim a prostituição, como em qualquer parte do mundo, não só funciona como maior grupo de risco e reservatório de NGPP^{15,56,63,80,98}, como também se entrelaça com os dois outros postulados, servindo de principal receptora de cepas "importadas", as quais são selecionadas frente ao fenômeno de pressão seletiva pelo uso profilático de drogas antimicrobianas, que estes profissionais o fazem rotineiramente, no exercício de sua "profissão"^{96,205}.

1.4. Aspectos fenotípicos.

A caracterização fenotípica, através das técnicas de auxotipagem, sorotipagem e "plasmídiograma" têm sido utilizadas isoladamente, associadas entre si, ou ainda, em conjunto com testes de susceptibilidade a antimicrobianos para caracterizar cepas de *Neisseria gonorrhoeae*. A caracterização das cepas isoladas, tem colaborado com cientistas epidemiólogos, tornando-os capazes de compreender o grau de diversidade entre as linhagens, permitindo não só correlacionar determinadas cepas de *Neisseria gonorrhoeae* com algumas síndromes graves (a ex. da infecção gonocócica disseminada), como entender os fenômenos de distribuição nos diferentes fragmentos populacionais e áreas geográficas, comportamentos temporais de sensibilidade e mecanismos

progressivos de resistência, embora ainda apresentem algumas limitações como marcadores epidemiológicos^{59,110}.

1.4.1. Susceptibilidade a antimicrobianos.

Antes do desenvolvimento das demais técnicas de fenotipagem, o comportamento de sensibilidade, era entre outras, coisas usado para caracterizar as cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, correlacionando este comportamento às patologias graves, bem como às diversas áreas geográficas²⁴⁶; entretanto o aparecimento de novas técnicas facilitou este trabalho. Não obstante permaneceu até a atualidade, como a melhor ferramenta para programas de vigilância epidemiológica, desempenhando o papel de marcador epidemiológico do comportamento de sensibilidade a antimicrobianos¹²⁶. A metodologia mais moderna e de maior precisão é representada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM)¹²⁶.

1.4.2. Plasmídios.

O plasmídio tem sido usado como marcador epidemiológico de resistência e caracteriza-se por uma estrutura, expressa em megadaltons (Mda)

ou Kilobases (kb). São fragmentos de ácido desoxirribonucléico (ADN) em elementos localizados fora do cromossomo bacteriano com habilidade para sintetizar enzimas capazes de inativar antibióticos^{56,76}. No caso particular das NGPP a enzima denominada beta-lactamase ou penicilinase, inativa penicilinas, ampicilinas e as cefalosporinas de primeira geração⁷⁶. Esta sequência de bases nitrogenadas (oligonucleotídeos) é ainda capaz de penetrar em outras bactérias, através do mecanismo de conjugação e transferir ao receptor sua característica de resistência¹⁴⁹. Vários plasmídios distintos podem mediar a produção de uma mesma enzima e diferindo quanto seu peso molecular.

O modo como o gonococo adquiriu seus plasmídios de resistência é confuso e controverso. Sabe-se apenas que os tipos de plasmídios encontrados entre as *Neisserias* são geneticamente relacionados entre si e apresentam aproximadamente 40% da sequência transponível de TnA, um transposon que inclui o gene *bla*, responsável pela produção da enzima beta-lactamase^{33,188}. Este transposon já foi observado em várias espécies de enterobactérias, e dos gêneros *Haemophilus* e *Neisserias*^{149,190,230}.

Alguns dos plasmídios comumente encontrados em *Neisseria gonorrhoeae* apresentam funções distintas dos plasmídios de resistência. O mais comum é um plasmídio de peso molecular de 2,6 Mda, chamado de críptico, encontrado em todas as cepas de *Neisseria gonorrhoeae*¹⁰³.

Um outro plasmídio críptico é o de peso molecular de 7,8 Mda, este menos comum, aparecendo em algumas poucas cepas¹⁰³. O plasmídio críptico não está ligado à virulência da cepa por nenhuma das características

usuais de virulência (produção de pili; proteína do pili; proteína de membrana externa PI, PII e PIII; protease IgA1; proteína reguladora de ferro e proteínas reguladoras de sidero derivados)^{1,103}, tendo até hoje função desconhecida¹³². Outro plasmídio sem função de resistência é o de peso molecular de 24,5 Mda, denominado plasmídio intrínscio de transferência, assim chamado por sua função específica de transferir informações genéticas^{74,189}. Este plasmídio tem sido encontrado em aproximadamente 50% das cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, aumentando sobremaneira o risco de crescimento de cepas NGPP, na população em várias áreas geográficas do mundo¹²⁰.

Entre os plasmídios de resistência, dois tipos distintos foram inicialmente identificados, recebendo suas denominações, segundo as áreas geográficas que os originaram⁷⁵. Desta forma, o plasmídio de peso molecular de 4,4 Mda, passou a ser denominado de "Asiático" e o plasmídio de peso molecular de 3,2 Mda, de "Africano", ambos mediando a produção de beta-lactamase^{75,109}.

Ao final do ano de 1983, um novo plasmídio foi relatado por Van Embden²³⁴ (Holanda), isolado de uma *Neisseria gonorrhoeae*, oriunda do continente africano. Este plasmídio foi descrito como tendo peso molecular de 2,9 Mda, e também capaz de sintetizar uma beta-lactamase. No ano seguinte, em Amsterdam (Holanda), este mesmo plasmídio foi observado em uma cepa proveniente do Brasil, e passou a chamar-se "Rio", na forma de uma gentil homenagem do pesquisador, por ter sido esta cepa isolada de um piloto da empresa KLM de aviação, que a contraiu na cidade do Rio de Janeiro^{40,234}. No mesmo ano, foi isolado em Toronto (Canadá), um outro plasmídio com as

mesmas características para promoção de resistência à penicilina, este com um peso molecular de 3,05 Mda, que passou a ser denominado de "Toronto"²⁶¹. Em 1985, agravando a situação, em Nime (França), foi descoberto um novo plasmídio de resistência, também produtor de beta-lactamase, que possuía um peso molecular de 4,0 Mda e passou a chamar-se "Nimes"⁹⁷. No mesmo ano com a descoberta de um plasmídio de grande peso molecular (25,2 Mda), agrava-se ainda mais a história da resistência plasmidial no mundo⁵¹. Tratava-se de um plasmidio mediador da resistência à tetraciclina, que além de sua peculiaridade, como plasmídio de resistência, possuía ilimitada capacidade de mobilização de outros plasmídios de menor peso molecular, transferindo-os para elementos do mesmo gênero ou de diferentes gêneros bacterianos, além da capacidade de conjugação e transferência de si mesmo^{23,125,191,192,193,194,195,196}.

Esta capacidade foi descoberta através de estudos biomoleculares, os quais demonstraram que o determinante Tet M é encontrado em um transposon conjugativo, que codifica ambos, transferência e transposição^{30,87,106}.

1.4.3 Auxotipo.

A auxotipagem é um sistema de classificação para microrganismos e entre eles o gonococos, determinado pelo requerimento nutricional em meios quimicamente definidos por aminoácidos, vitaminas e pirimidinas^{155,261}.

O requerimento para cisteína é representativo de todas as cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, sendo considerado um controle, entretanto algumas cepas possuem requerimentos específicos para um ou mais compostos, os quais incluem: prolina, metionina, histidina, lisina, arginina, hipoxantina, uracil e tiamina pirofosfato^{36,40,134}. Não obstante, a isoleucina, leucina, valina e serina podem também estimular ou serem requeridas para o crescimento da *Neisseria gonorrhoeae*. Cada requerimento nutricional, indica que a cepa bacteriana é inábil a produzir, por ação enzimática, um determinado substrato, em sua marcha biossintetizadora, sendo designada auxotipicamente pelo nome ou inicial da substância à qual apresenta deficiência de biossíntese⁴⁰.

Desta forma, cepas que não possuem requerimentos são chamadas de não requerentes, Zero, Prototrófica ou Proto e ocorrem mais frequentemente que as demais, seguida das cepas requerentes de prolina (PRO) ou arginina (ARG). Cepas com múltiplos requerimentos, a exemplo das requerentes de arginina, hipoxantina e uracil (AHU) e as requerentes de prolina, arginina e uracil (PAU), têm ocorrido frequentemente em áreas geográficas limitadas^{26,110,128}.

1.4.4. Sorotipo.

O sistema de sorotipagem é baseado na diversidade dos epitopos imunogênicos da principal proteína da membrana externa da *Neisseria gonorrhoeae*, designada de proteína I (PI). Este sistema tem sido utilizado para proposições epidemiológicas^{20,241}.

O primeiro estudo de sorotipagem através da técnica de microimunofluorescência, dividiu os gonococos em três sorogrupos A,B e C²⁴¹. Posteriormente, SANDSTRON, E.G.; DANIELSON, D. (1980)²⁰⁰, dividiram-nos também em três grupos WI, WII e WIII, que correspondiam aos sorogrupos A, B e C respectivamente. Sucedendo os estudos de classificação por sorotipagem, BUCHANAN, T.M.; HILDEBRANDT, F.J. (1981)²⁸, reagruparam os gonococos segundo a principal proteína da membrana externa, em nove sorotipos, utilizando o método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Os sorotipos de 1 a 3 correspondiam ao sorogrupo WI, os sorotipos de 4 a 8 correspondiam ao sorogrupo WII e o sorotipo 9, correspondia ao sorogrupo WIII²⁰³. Estudos de mapeamento bidimensional mostraram que os sorogrupos WII e WIII, partilhavam de peptídios comuns na produção da molécula de proteína I, que passou a se designar PIB, enquanto a produzida por bactérias pertencentes ao sorogrupo WI, apresentava uma molécula diferente e passou a denominar-se de PIA²⁰².

No início dos anos 80, anticorpos monoclonais produzidos contra epitopos das proteínas IA e IB²²⁶, começaram a ser usados em técnicas de

coaglutinação e Imunofluorescência para identificação da infecção gonocócica¹⁵⁵. Subsequentemente, vários sistemas de classificação sorológica, foram desenvolvidos como proposições na pesquisa da sorotipagem gonocócica^{32,127,201}. Cada sistema usou um diferente painel, assinalando-os segundo sorovariedade ou sorotipo, entretanto suas nomenclaturas não eram intercambiáveis^{22,32,123,127}.

KNAPP e col. (1984) desenvolveu um sistema, o mais utilizado hoje em dia, que assinala sorovariedades designando um perfil de IA ou IB, que indica qual molécula de PI foi produzida pela cepa, seguido de um número, que segundo um painel, descreve quais anticorpos específicos àquela proteína é capaz de reagir. Por exemplo, uma proteína IB reagindo especificamente com 3C8, 1F5, 2D6 e 2H1, pertence a sorovariedade IB-1. Este sistema determina 24 sorovariedades para proteína IA (IA1 até IA24) e 31 sorovariedades para proteína IB (IB1 até IB31) abrindo a possibilidade para inserção de novas sorovariedades, desde que novos painéis de reatividade sejam detectados¹²⁷.

1.5. Situação atual.

O mundo tem as NGPP na atualidade, como grave problema de saúde pública, impondo riscos crescentes às cidades brasileiras que satisfazem plenamente os três postulados para o fenômeno de instalação, manutenção e propagação destas cepas resistentes.

De forma sinérgica o problema torna-se mais preocupante, por quanto em nosso país a vigilância epidemiológica se faz completamente ausente.

A NGPP na cidade de São Paulo, impõe a condição de área hiperendêmica, segundo a classificação do CDC.⁴², apresentando níveis de ocorrência acima de 3%²¹⁵. Esta tendência crescente de cepas NGPP em nosso meio, poderá em futuro próximo, ter como principal aliado, o plasmídeo Tet M (25,2 Mda), atuando sinergicamente com os demais fatores predisponentes¹⁹³.

A característica paulistana de metrópole brasileira, centro de convergência nacional e internacional, cidade núcleo de grandes conglomerados executivos (industriais, comerciais e administrativos), reúne em torno de si qualidades perigosas no que diz respeito à perda de controle sobre a gonorréia e a NGPP. Os aspectos culturais de todas as regiões brasileiras encontram-se reunidos nesta megalópole e quando associados ao fluxo intenso de pessoas, entrando e saindo da cidade e dos núcleos de prostituição, hoje já estratificados segundo características socio-econômicas, fazem desta cidade uma importante área geográfica, com riscos ilimitados à disseminação de agentes infecto-contagiosos.

Estas características constituem justificativas suficientes para que se implante em caráter de urgência, programas de vigilância epidemiológica, bem como projetos que estudem as características fenotípicas, correlacionando-as às características epidemiológicas. Estes estudos facilitarão a compreensão sobre a dinâmica das cepas de NGPP e consequentemente ajudarão a implementar os programas de combate e controle da gonorréia. Este estudo propõe caracterizar estas cepas na cidade de São Paulo, colaborando com as decisões na política de saúde no Brasil.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo Geral.

Caracterizar fenotipicamente as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), isoladas na cidade de São Paulo, para facilitar a compreensão das hipóteses de instalação, manutenção, e propagação destas cepas.

2.2. Objetivos específicos.

2.2.1. Caracterizar as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), isoladas na cidade de São Paulo, segundo susceptibilidade aos antibióticos (Penicilina, cefoxitina, tetraciclina, tianfenicol e espectinomicina), comumente utilizados no tratamento da gonorréia.

2.2.2. Caracterizar as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), isoladas na cidade de São Paulo, segundo requerimentos nutricionais (auxotipagem).

-
- 2.2.3. Caracterizar as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), isoladas na cidade de São Paulo, segundo os epitopos imunogênicos da proteína da principal membrana externa (sorotipagem).
- 2.2.4. Caracterizar as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), isoladas na cidade de São Paulo, segundo estudo biomolecular do plasmídio de resistência ("plasmidiograma").
- 2.2.5. Correlacionar as características fenotípicas das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP), isoladas na cidade de São Paulo com outras áreas geográficas (dinâmica da gonorréia).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. Casuística.

Este estudo foi realizado em pacientes portadores de gonorréia aguda não complicada, com ou sem sintomas, de ambos os sexos, atendidos no Serviço de Doenças Sexualmente Transmissíveis da área de Dermatologia Sanitária do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Foram isoladas 482 cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, no período de abril de 1985 à abril de 1990, cuja ocorrência anual pode ser observada na tabela 2.

Na população estudada foram isoladas 15 cepas NGPP, indicando um nível de ocorrência de 3,11%, sendo sua distribuição anual expressa na tabela 2.

O estudo foi realizado nas 15 cepas de NGPP isoladas. Foram ainda estudadas 50 cepas não produtoras de penicilinase (não NGPP), como população controle. Estas foram tomadas aleatoriamente, sendo incluídas no

estudo, 10 cepas a cada grupo de 100 cepas, excetuando o último grupo que teve 10 cepas estudadas em 82 cepas isoladas.

TABELA 2 - Distribuição absoluta e percentual de cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, isoladas por ano de pesquisa (abril de 1985 a março de 1990) na cidade de São Paulo, segundo presença ou ausência do plasmídeo de resistência.

ANO (abril a março)	Cepas isoladas				Total
	não NGPP		NGPP		
	Nº	%	Nº	%	
85 —86	107	99,08	1	0,92	108
86 —87	136	96,46	5	3,54	141
87 —88	58	96,67	2	3,33	60
88 —89	73	96,06	3	3,94	76
89 —90	93	95,88	4	4,12	97
Total	467	96,89	15	3,11	482

3.2. Material.

As cepas foram isoladas em meio de Thayer Martin modificado (TMm)¹⁸⁵, em condições apropriadas. Um sistema fechado composto por uma jarra e incubado em estufa, proporcionava uma temperatura entre 35,5 e 36,5^o C, 3% a 7% de atmosfera de CO₂, obtidos pelo sistema da vela ou pelo comprimido efervescente, respectivamente, umidade promovida pelos meios recentemente preparados e um algodão umidecido^{143,216,217}.

Uma vez isoladas, as cepas foram identificadas através da característica colonial, bacterioscopia da colônia após coloração de Gram, reação para observação da enzima citocromo oxidase e reação de acidificação dos açúcares (glicose, maltose, sacarose, lactose e frutose)^{37,67,136, 209,216}.

Devidamente identificadas as cepas foram submetidas a prova de cefalosporina cromogênica^{157,164,219,220,240} (3-[2,4-dinitrostyryl]-[6R,7R]-7-7-[2-thinylacetamida]-ceph-3-en-4-carboxilic acid) conhecido comercialmente como Nitrocefim (Oxoid-Hampshire, UK), para a pesquisa da enzima beta-lactamase. Em seguida, as cepas NGPP foram submetidas a um crescimento de 18 horas, em meios adequados e condições apropriadas^{143,185,216,217}, e suspensas em meio de conservação.

3.2.1. Conservação, estoque e transporte de cepas.

Todas as cepas foram conservadas em meio específico composto por proteose peptona nº 3 (6,75g), difosfato de potássio (0,45g), monofosfato de potássio (1,8g), cloreto de sódio (2,25g), glicerina (45ml) e 450 ml de água (formulação cedida pelo National Institute of Public Health and Environmental Hygiene - Bilthoven, Netherlands), e mantidas a - 70°C por um período de 15 dias. Posteriormente foram reativadas em meio de Thayer Martin modificado (TMm)¹⁸⁵, obedecendo critérios apropriados de incubação²¹⁶ e liofilizadas em duplicatas utilizando-se um meio líquido, composto por 10% de leite desnatado e 5% de glutamato de sódio, através de um liofilizador Virtis, modelo 10-010 (Virtis Co., Inc. - Gardner, New York), preparadas desta forma para serem transportadas para o Instituto Alfred Fournier- Paris (IAF), onde foram realizadas provas de análise do plasmídeo, auxotipagem e sorotipagem, além de registradas e estocadas, para posteriores experimentos, em coleção de cultura oficial no Brasil.

3.2.2. Registro das cepas em coleções de cultura.

Todas as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase (NGPP) foram liofilizadas e registradas na coleção de culturas do

Instituto Adolfo Lutz (IAL). Coleção de cultura oficial no território brasileiro e filiadas a "World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms" (WDCCM). As quinze cepas estudadas receberam os seguintes números de estoque: IAL1818; IAL1824; IAL1825; IAL1842; IAL1843; IAL1844; IAL1856; IAL1880; IAL1881; IAL1882; IAL1884; IAL1889, IAL1962; IAL1963 e IAL1964.

3.2.3. Ativação das cepas.

Um frasco ampola de cada cepa foi rehidratado com 1 ml de Tryptic soy broth (Difco) e o conteúdo semeado em meio de Thayer Martin modificado (TMm)¹⁸⁵ e incubado por 24 horas aproximadamente, em condições apropriadas^{143,185,216,217}, quando então foram submetidas a prova de sensibilidade aos antibióticos.

3.3. Metodologia.

3.3.1. Prova de sensibilidade.

Todas as cepas foram submetidas ao teste de susceptibilidade através da técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo método de diluição em agar, segundo as especificações técnicas descritas abaixo:

3.3.1.1. Meio de cultura.

Na realização desta prova, foi utilizado um meio preparado segundo especificação do fabricante, composto por GC Agar base (Gonococcus Agar base - Difco), adicionado de 1% de hemolisado de sangue total de cavalo (esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 micra), 1% de isovitalex (BBL)^{138,160,161,162,242} e a droga testada, em concentrações adequadas. Os meios recentemente preparados, foram distribuídos em placas descartáveis de 90 mm de diâmetro, requerendo 30 ml de meio por placa, para proporcionar uma espessura de 5 a 6 mm¹³⁸. Para cada lote de meio de cultura produzido foram realizados controles de qualidade, utilizando-se cepas de referência de *Neisseria gonorrhoeae* (cepas: F-18, F-28, 76-061782 e F-45),

fornecida pelo Instituto Alfred Fournier (IAF) e a cepa de referência ATCC 49226 da American Type Culture Collection (ATCC).

3.3.1.2. Drogas testadas.

Foram utilizadas no teste de sensibilidade aos antimicrobianos as cinco drogas mais utilizadas no tratamento da gonorréia em todo o mundo: penicilina, cefoxitina, tetraciclina, tianfenicol e espectinomicina.

As drogas antimicrobianas foram solubilizadas e diluídas em soluções adequadas, segundo suas características de solubilidade^{4,85}, para preparação de soluções "mãe", as quais foram esterilizadas por filtração em filtros Millipore de 0,22 micra, e estocadas a -20° C¹³⁸.

Quando da preparação das placas, as drogas foram diluídas em solução salina estéril^{4,85} e incorporadas aos meios de cultura e resfriados a uma temperatura de 56° C, de forma a obter as seguintes concentrações finais¹³⁸:

penicilina: 0,125 0,25 0,5 1,0 2,0 4,0 8,0 µg/ml

cefoxitina: 0,125 0,25 0,5 1,0 2,0 4,0 8,0 µg/ml

tetraciclina: 0,25 0,5 1,0 2,0 4,0 8,0 16,0 µg/ml

tianfenicol: 0,25 0,5 1,0 2,0 4,0 8,0 16,0 µg/ml

espectinomicina: 7,5 10,0 12,5 15,0 17,5 20,0 32,0 64,0 128,0 µg/ml

Foram utilizados como sais básicos para preparação das soluções antibióticas; penicilina G (Squibb), cefoxitina (Merck Sharp-Dhome), hidrocloreto de tetraciclina (Pfizer), tianfenicol (Zambon) e espectinomicina (UpJohn)

3.3.1.3. Inóculo.

Os inóculos foram preparados a partir de um subcultivo de cada *Neisseria gonorrhoeae*, com 18 a 24 horas de crescimento em meio e condições apropriadas^{185,216}, suspensa em solução salina e homogeneizada em mixer elétrico (Fanen). A turbidez da suspensão foi ajustada para a escala nº 0,5 de McFarland, correspondendo aproximadamente a $1,5 \cdot 10^8$ ufc/ml^{185,162}. Em seguida a suspensão era diluída a 1:10 em caldo Muller-Hinton (Difco), de modo a se obter 10^7 ufc/ml. Os inóculos foram aplicados nos meios de cultura através de um replicador de Steers²²⁵. Este instrumento coloca 0,001-0,005 ml da suspensão bacteriana na superfície do meio, isto 10^4 ufc/ml.

3.3.1.4. Incubação e leitura dos resultados.

Após secagem dos inóculos, as placas foram invertidas e incubadas a 36,0°C em uma atmosfera contendo entre 3% a 7% de CO₂, por 24 horas^{185,216}.

Inicialmente foram lidas as placas controle sem antibióticos, nas quais confirmavam-se a viabilidade e o adequado crescimento das cepas.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi lida pela mais baixa concentração de cada droga requerida para a inibição total do crescimento bacteriano, excetuando o crescimento de uma única colônia, a qual era ignorada¹³⁸.

A interpretação dos resultados foi feita segundo indicações do "National Commitee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS)¹⁶⁰, vista no anexo 1 e sumarizadas na tabela 3.

TABELA 3 - Interpretação dos resultados da prova de sensibilidade aos antimicrobianos, para *Neisseria gonorrhoeae*.

DROGA ¹	RESULTADO ($\mu\text{g/ml}$)			
	SENSÍVEL	MODERADAMENTE SENSÍVEL ²	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
penicilina	$\leq 0,06$	0,12 - 1	-	≥ 2
cefoxitina	≤ 2	-	4	≥ 8
tetraciclina	$\leq 0,25$	0,5 - 1	-	≥ 2
tianfenicol ³	≤ 2	-	4	≥ 8
espectinomicina	≤ 32	-	64	≥ 128

1-São listadas apenas as drogas utilizadas no ensaio

2-Organismos com taxa de cura clínica entre 85-95%

3-Droga não listada pelo NCCLS - Informações fornecidas pelo fabricante

Fonte: NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 1987.
Performance standards antimicrobial susceptibility testing: second informational supplement. M-100, 52. Villa Nova. PA.

3.3.2. Plasmidiograma.

3.3.2.1. Isolamento do plasmídio.

Para o isolamento do ácido desoxirribonucléico (ADN) plasmídico, foi utilizado o método rápido do detergente alcalino¹⁰⁰. A partir de uma cultura recente de 12 a 18 horas em meio enriquecido (TMm)¹⁸⁵, foi tomada uma alçada de células bacterianas da superfície do meio e suspensas em 0,5 ml de tampão tris-HCl com edta (TE), pH 7,5 a 8,0, contido em um microtubo de centrífuga, do tipo "Ependorf", com capacidade para 1,5 ml. Em seguida homogeneizada com auxílio de um mixer elétrico.

A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos, a 4°C, e o sobrenadante retirado com o auxílio de uma pipeta "Pasteur" e desprezado. O precipitado foi então ressuspenso em 25 ml TE e homogeneizado em mixer elétrico, com velocidade máxima, sendo logo após adicionado 0,4 ml de TE, pH 7,5 a 8,0, contendo 1,5% de dodecilsulfato de sódio (DSS) e misturado à suspensão resultante por inversão, pelo menos seis vezes, para ocorrer mudança na viscosidade.

Esta mistura de lise permaneceu em repouso por 60 minutos a 56°C. Os tubos foram agitados sempre na metade do período de repouso.

A mistura de lise foi então neutralizada pela adição de 60 μ l de tris-HCl 2M, pH 7,4 e misturadas por inversão por 12 vezes (pH final aproximadamente 8,7). A esta última mistura foi adicionado 60 μ l de cloreto de sódio 5N de forma a obter uma concentração final em torno de 3%, e então misturadas lentamente (6 inversões) e em seguida incubadas a 4°C pelo período mínimo de uma hora. Decorrido este período a solução turva foi extraída com adição de 0,5 ml de uma solução de fenol saturado e cloreto de sódio a 3%, invertendo-se os tubos pelo menos 10 vezes. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 4°C, em uma rotação de 10.000 rpm, afim de se obter uma boa separação das camadas. A fase aquosa superior, foi então retirada com uma pipeta "Pasteur" e colocada em um tubo de centrífuga do tipo "Ependorf". Esta fase foi ajustada pela adição de 0,3M de acetato de sódio (concentração final) e misturada por inversão. A cada tubo foi adicionado 1,0 ml de etanol gelado, misturado lentamente e colocado a - 20°C por 12 horas, para que o ADN fosse reprecipitado.

A solução foi centrifugada por 10 minutos a uma rotação de 10.000 rpm, à temperatura de 4°C para que fosse redepositado o ADN. O sobrenadante foi então retirado e os tubos ficaram expostos ao ar, à temperatura ambiente, para secagem. Finalmente o ADN era ressuspensão em um tampão tris-HCl (30 a 60 μ l).

3.3.2.2. Preparo do gel de Agarose.

O gel de agarose foi preparado a partir de uma solução de 0,7% de agarose (ultra pura Bio-Rad) em tampão tris-HCl. A uma temperatura de 56°C, este gel foi distribuído em superfície plana, formando uma placa com espessura de 3 mm, e mantido em repouso à temperatura ambiente até a completa solidificação¹⁵³.

3.3.2.3. Migração.

Após ajustada a câmara de eletroforese (modelo HE da "Hoefer"), foi adicionado 790 ml de tampão à câmara e utilizado um pequeno suporte (15 x 15 cm) para o gel de agarose, o qual foi imerso lenta e cuidadosamente. Em seguida foi adicionado 10 a 25 µl de cada amostra em cada poço.

A câmara de eletroforese era então coberta e ligada à fonte de energia (Modelo PS 500X da "Hoefer") e ajustada à voltagem de 75 V para uma amperagem inicial de 36 a 45 mA e final de 39 a 52 mA, para a migração do ADN da *Neisseria gonorrhoeae*.

O tempo de migração teve duração de 3 horas e a distância percorrida pelas amostras, foi de 6,0 cm para o suporte de 15 x 15 cm.

3.3.2.4. Coloração e descoloração do gel de agarose.

Adicionou-se em um litro de água destilada contida em um recipiente plástico, 100 μ l de uma solução de brometo de etídio a 10 mg/ml. Depositou-se o suporte contendo gel de agarose dentro do banho e cobriu-se com papel alumínio, no qual permaneceu por 15 minutos.

Após a coloração, lavou-se o gel de Agarose em água destilada (por imersão), seguido de novo banho em água destilada, no qual permaneceu por 15 minutos.

Após a descoloração o gel foi imediatamente fotografado.

3.3.3. Auxotipagem.

3.3.3.1. Meio de cultivo:

Para a determinação do auxotipo foi utilizado o meio químicamente definido NEDA (Neisseria Defined Agar)³⁹, o qual tem seus componentes listados na tabela 4. A intrincada forma de preparação de seus componentes, foi conduzida segundo indicações técnicas feitas por CATLIN, B.W. (1978)³⁹, tendo sido utilizado o meio NEDA completo como referencial de crescimento (controle) e suas variáveis, onde cada variável foi definida pela ausência de um requerimento nutricional, para determinação do auxotipo, como observado na tabela 5.

TABELA 4 - Componentes do meio definido (NEDA)*

SOLUÇÃO	VOLUME (ml) para 1 litro
Solução 1: ácido L-glutâmico, ácido L-asparico, etilenediaminotetracetato, de sódio, NaCl, K ₂ SO ₄ , MgCl ₂ , 6H ₂ O, NH ₄ Cl	100,0
Solução 2a: hidrócloro de L-arginina, oficina, L-serina	10,0
Solução 2b: L-leucina, L-isoleucina, L-avalina	10,0
Solução 3: lactato de sódio, glicerol, álcool polivinil, Tween 80	5,0
Solução 4a: uracil, 17,8mM	4,0
Solução 4b: hipoxantina, 5,88mM	200,0
Solução 5: K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄	6,0
L-Tirosina, solução 0,05M	3,5
L-Cisteína: HCl-H ₂ O, solução 0,1M	3,5
L-Cistina, 0,05M	3,0
cis-ácido oxaloacético, solução 15,2mM	100,0
NaOH, solução 5N suficiente para pH 7,1	2,0
Solução 8: L-triptofano, L-treonina, L-alamina, hidrócloro de L-lisina, L-prolina	
Solução 9: L-fenilalamina, monoidrato de L-asparagina	5,0
L-glutamina, solução 0,068M	5,0
L-metronina, 0,1M	1,0
Tetrahidrócloro de espermina, solução 0,05M	5,0
Bicarbonato de Sódio, solução 1,0M	0,5
Dextrose, solução 20%	25,0
Acetato de Sódio, solução 2,5M	10,0
Solução 6: hemina, L-histidina, 2,2',2"-nitrilotrietanol	2,0
Solução 7: nicotinamida adenina dinuclotídeo, hidrócloro de tiamina, pantotenato de Cálcio	0,2
Solução 10: cloreto de colina, mio-inositol	0,2
(+) solução de biotina	1,0
Cloreto de tiamina pirofosfato, saolução 0,01M	0,1
NaOH, 1N solução suficiente para pH 7,4 ± 0,05	
Molten agar, 2º	500,0
CaCl ₂ 2H ₂ O; solução 0,25M	1,0
Fe(NO ₂) ₂ 9H ₂ O, solução 0,01M	1,0

* Colocar em ordem de adição a partir de soluções estéreis.

Fonte: CATLIN, B.W. Characteristics and auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae*. In: BERGAN, T. & MORRIS, J.R. (eds) *Methods in microbiology*. vol 10. chapter XIII. Academic Press ed. 1978 p.346-80.

TABELA 5 - Distribuição dos 14 meios definidos, utilizados como padrão para auxotipagem de *Neisseria gonorrhoeae*, segundo omissão e adição de requerimento nutricional.

Designação	Componente emitido do NEDA	Componente adicionado ao meio
NEDA completo	Nenhum	Nenhum
CIS	L-Cisteína HCl-H ₂ O, L-Cistina	Nenhum
PRO	L-Prolina	Nenhum
ARG	L-Arginina-HCl	Nenhum
MET	L-Metionina	Nenhum
HIS	L-Histidina, solução 6	Nenhum
LIS	L-Lisina-HCl	Nenhum
LEU	L-Leucina	Nenhum
HIP	Hipoxantina	Nenhum
URA	Uracil	Nenhum
V	mistura*V	Nenhum
V + TIA	mistura V	Tiamina HCl (0,006mM)
V + TIAP	mistura V	Cloreto de tiamina pirofosfato (0,001mM)
ARG + ORN	L-Arginina	L-Ornitina HCl (0,7mM)

* cloreto de tiamina pirofosfato, biotina e soluções 6, 7 e 10 (Tabela 4)

Fonte: CATLIN, B.W. Characteristics and auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae*. In: BERGAN, T. & MORRIS, J.R. (eds) *Methods In microbiology*. vol 10. chapter XIII. Academic Press ed. 1978 p.346-80.

Todos os meios foram devidamente testados com bactérias padrões (tabela 6), com requerimento nutricional conhecido, para controle de qualidade das partidas de meios.

TABELA 6 - Distribuição das cepas padrão, utilizadas para controle de qualidade dos meios de cultivo definidos, segundo auxotipo, requerimento nutricional e seus números correspondentes em coleções de cultura.

DENOMINAÇÃO DA		REQUERIMENTO NUTRICIONAL	Nº DE REFERÊNCIA EM COLEÇÃO DE CULTURA	
CEPA	AUXOTIPO		ATCC*	NCTC**
ODH 2915	1	Zero	27628	10928
MHD 340	5	Tia	27629	10929
MHD 361	9	Pro, Hip	27630	10930
SS 7764/45	22	Pro, Met, Tiap	27631	10931
MCH 3317/70	12	Arg, Met	27632	10932
MHD 446	16	Arg, Hip, Ura	27633	10933

* American Type Culture Collection

** National Collection of Type Cultures

Fonte: CATLIN, B.W. Characteristics and auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae*. In: BERGAN, T. & MORRIS, J.R. (eds) *Methods in microbiology*. vol 10. chapter XIII. Academic Press ed. 1978 p.346-80.

3.3.3.2. Inóculo.

Os inóculos foram preparados a partir de um subcultivo de cada *Neisseria gonorrhoeae*, com 18 a 24 horas de crescimento em meio e condições

apropriadas^{185,216}, suspensa em solução salina e homogeneizada em mixer elétrico. A turbidez da suspensão foi ajustada para a escala nº 1 de McFarland, correspondendo aproximadamente a $3,0 \cdot 10^8$ ufc/ml³⁹. Em seguida a suspensão era diluída a 1:10 em solução salina. Os inóculos foram aplicados nos meios de cultura através de um replicador de Steers²²⁵.

3.3.3.3. Incubação e leitura dos resultados.

Após secagem dos inóculos, as placas foram invertidas e incubadas a 36°C, em uma atmosfera contendo entre 3% a 7% de CO₂ por 48 horas^{185,216}.

A leitura dos resultados foi feita observando-se presença e ausência de crescimento de cada cepa testada nos meios definidos, e a interpretação feita através da tabela 7.

TABELA 7 - Painel para interpretação e determinação do auxotipo de *Neisseria gonorrhoeae*, segundo requerimento nutricional.

AUXOTIPO	REQUERIMENTO									V		ARG
	PRO	ARG	MET	HIS	LIS	LEU	HIP	URA	V	+TIA	+TIAP	+ORN
1 Zero	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
2 Pro	0	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
3 Arg	+	0	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
4 Met	+	+	0	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
5 Tia	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	NT
6 Tiap	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	NT
7 Pro, Arg	0	0	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
8 Pro, Met	0	+	0	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
9 Pro, Hip	0	+	+	+	+	+	0	+	+	NT	NT	NT
10 Pro, Hip, Tia	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	NT
11 Pro, Arg, Hip, Ura	0	0	+	+	+	+	0	0	+	NT	NT	+
12 Arg, Met	+	0	0	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
13 Arg, Hip	+	0	+	+	+	+	0	+	+	NT	NT	+
14 Arg, Hip, Ura	+	0	+	+	+	+	0	0	+	NT	NT	+
15 Arg, Met, Hip, Ura		0	0	+	+	+	0	0	+	NT	NT	+
16 Arg ⁰ , Hip, Ura	+	0	+	+	+	+	0	0	+	NT	NT	+
17 Arg ⁰ , Met, Hip, Ura	+	0	0	+	+	+	0	0	+	NT	NT	0
18 Arg ⁰ , Hip, Ura, Tiap	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0
19 Arg, Hip, Ura, Tiap	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+
20 Arg, Hip, Ura, Tia	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+
21 Pro, Tia	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	NT
22 Pro, Met, Tiap	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	NT
23 Pro, Tia	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	NT
24 Arg, Tia	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+
25 Lis	+	+	+	+	0	+	+	+	+	NT	NT	NT
26 His	+	+	+	0	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
27 Arg, His	+	0	+	0	+	+	+	+	+	NT	NT	+
28 Arg, His, Hip, Ura	+	0	+	0	+	+	0	0	+	NT	NT	+
29 Arg ⁰ , His, Hip, Ura	+	0	+	0	+	+	0	0	+	NT	NT	0
30 Arg, Leu, Hip, Ura	+	0	+	+	+	0	0	0	+	NT	NT	+
31 Arg ⁰ , Leu, Hip, Ura	+	0	+	+	+	0	0	0	+	NT	NT	0
32 Arg ⁰ , Leu, Hip, Ura, Tiap	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0
33 Pro, Arg ⁰ , Met, Hip, Ura	0	0	0	+	+	+	0	0	+	NT	NT	0
34 Pro, Arg ⁰ , Met, Leu, Hip, Ura	0	0	0	+	+	0	0	0	+	NT	NT	0
35 Pro, Arg, Hip, Ura, Tiap	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+

Todas as cepas típicas (crescem (+) no meio NEDA completo e não crescem (0) no meio CYS.

(⁰) fenótipo do Auxotipo é designado pelo nome (ou iniciais) dos nutrientes requeridos pela bactéria para crescimento.
NT - Não testado.

Fonte: CATLIN, B.W. Characteristics and auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae*. In: BERGAN, T. & MORRIS, J.R. (eds) *Methods in microbiology*. vol 10. chapter XIII. Academic Press ed. 1978 p.346-80.

3.3.4. Sorotipagem.

3.3.4.1. Preparação do reagente monoclonal.

Foram centrifugados 13 ml da solução padrão de proteína A (células de *Staphylococcus aureus* - Pansorbin - Calbiochem Co.), 10% p/v a uma rotação de 4000 rpm por 15 minutos. Em seguida, ressuspensa as células precipitadas com 13 ml de tampão PBS pH 7,2 e recentrifugado. O procedimento foi repetido 3 vezes, para lavagem das células e finalmente ressuspensa em 13 ml de tampão PBS e homogenizada²²⁶.

Os anticorpos foram então descongelados, aos quais foram adicionados 1 ml da suspensão das células lavadas, a cada anticorpo monoclonal (Genetic Systems Corporation, Seattle-USA). Incubados a temperatura ambiente, por 15 minutos (a adsorção dos anticorpos pelas células de *Staphylococcus aureus* ocorre imediatamente). Foi então, adicionado 9 ml de tampão PBS a cada anticorpo e centrifugado para deposição das células, lavadas 3 vezes, decantadas e ressuspensas em 10 ml de tampão PBS²²⁶. Esta suspensão tem a possibilidade de ser estocada a 4°C, pelo período máximo de 2 semanas.

3.3.4.2. Painel dos anticorpos monoclonais.

Proteína IA (WI): 4A 12, 4G 5, 2F 12, 6D 9, 5G 9, 5D 1

Proteína IB (WII/WIII): 3C 8, 1F 5, 2D 6, 2G 2, 2D 4 e 2H 1

3.3.4.3. Preparação da suspensão de *Neisseria gonorrhoeae*.

As suspensões foram preparadas a partir de um cultivo de 18 horas em meio GC Agar base (Gonococcus Agar base - Difco), suplementado com 1% de isovitalax (BBL), desprovido de antibióticos. Suspensa em 2ml de tampão PBS 0,15 M, a uma densidade aproximadamente igual a densidade óptica dos reagentes de coaglutinação (escala 5 de McFarland). As suspensões foram aquecidas através de banho em ebulição, por 10 minutos e resfriadas a temperatura ambiente antes do teste. Esta suspensão tem a possibilidade de ser estocada a 4°C ou a temperatura ambiente por vários dias²²⁶.

3.3.4.4. Procedimento e interpretação da sorotipagem.

Foi adicionada uma gota de cada anticorpo em uma lâmina limpa, em seguida adicionada uma gota da suspensão da bactéria a ser sorotipada. O material foi então, homogeneizado através de movimentos rotativos por dois minutos e lidos imediatamente, sob uma fonte luminosa incidindo obliquamente²²⁶.

As reatividades dos anticorpos específicos das proteínas IA e IB, foram interpretadas no painel de sorovariedades (quadro 1) e finalmente tipadas.

QUADRO 1 - Painel para interpretação e classificação da sorovariedade, segundo reatividade dos epitopos imunogênicos das proteínas da principal membrana externa da *Neisseria gonorrhoeae*.

PIA - ANTICORPOS
MONOCLONAIS
ESPECÍFICOS

PIB - ANTICORPOS
MONOCLONAIS
ESPECÍFICOS

Fonte: SANDSTRON, E.G.; CHEN, K.C.B.; BUCHANAN, T.M. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: Coagglutination serogroups WI e WII/WIII correspond to different outer membrane protein/molecular. *Infect. Immun.* 38:462-70, 1982.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

Os resultados de sensibilidade frente às drogas antimicrobianas testadas, auxotipo e sorotipo das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase são apresentados no quadro 2, e de forma idêntica, os resultados das 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase são apresentados no quadro 3.

A distribuição dos níveis de CIM para as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase frente às drogas testadas (penicilina, cefoxitina, tetraciclina, tianfenicol e espectinomicina) pode ser observada na tabela 8. Esta mesma distribuição para as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase pode ser observada na tabela 9.

Nos gráficos 3, 4, 5, 6 e 7 pode-se visualizar com maior clareza a variação dos níveis de Concentração Inibitória Mínima (CIM), por drogas estudadas e comparativamente às duas populações (não NGPP e NGPP). As tabelas 8 e 9, mostram a distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), frente a penicilina, cefoxitina, tetraciclina, tianfenicol e espectinomicina, por população (não NGPP e NGPP).

A tabela 10 apresenta a variação da CIM, a média e a moda desta variação, bem como, a CIM aos níveis de 50% e 90% das cepas estudadas em ambas as populações (não NGPP e NGPP), segundo as drogas testadas.

Este trabalho detectou níveis de resistência cromossômica à tetraciclina em ambas as populações estudadas (não NGPP e NGPP), como visto na tabela 11.

A tabela 12 apresenta a distribuição dos auxotipos das cepas testadas em ambas as populações (não NGPP e NGPP), sendo prevalentes as cepas prototróficas e as PRO⁻, respectivamente.

A tabela 13 apresenta a distribuição dos sorotipos das cepas estudadas nas duas populações (não NGPP e NGPP), sendo observada a predominância da sorovariedade IB, em ambas as populações.

As tabelas 14 e 15 mostram a distribuição dos fenótipos classificados segundo o sistema duplo A/S (auxotipo/sorotipo.)

As cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, quando submetidas ao estudo de biologia molecular através do plasmidiograma, revelaram variação quanto ao peso molecular dos plasmídios (quadro 4 e figuras 1 e 2). Foram detectados plasmídios do tipo "Africano", "Asiático" e "Toronto", sendo o plasmídio "Asiático" responsável por 60% da resistência plasmidial em *Neisseria gonorrhoeae* em estudo.

A distribuição destes plasmídios, pode ser observada na tabela 16, bem como a frequência dos plasmídios críptico e de transferência, associados a estas cepas. Este último apareceu em 46,6% das cepas de NGPP isoladas em São Paulo.

QUADRO 2 - Resultado das pesquisas realizadas nas 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, quanto a Concentração Inibitória Mínima, auxotipo e sorotipo.

CEPA	Penicilina μg/ml	Cefoxitina μg/ml	Tetraciclina μg/ml	Tianfenicol μg/ml	Espectingomina μg/ml	Auxotipo	Sorotipo
01	0,25	1,00	1,0	4,0	20,0	+	IB28
07	0,5	4,0	4,0	4,0	20,0	PRO-	IA4
16	0,25	1,0	2,0	4,0	15,0	+	IB1
25	0,25	2,0	2,0	4,0	17,5	+	IB19
31	0,25	1,0	2,0	1,0	20,0	+	IA1
42	0,125	0,5	1,0	1,0	15,0	PRO-/MET-	IA2
57	0,25	1,0	2,0	1,0	20,0	PRO-	IA6
64	0,25	1,0	2,0	1,0	15,0	PRO-	IB4
81	0,5	2,0	2,0	1,0	20,0	+	IA1
92	0,25	1,0	1,0	1,0	20,0	+	IB4
109	0,5	1,0	1,0	4,0	20,0	+	IA1
115	0,25	1,0	2,0	4,0	20,0	PRO-/MET-	IA6
122	0,5	1,0	2,0	1,0	20,0	PRO-	IB4
136	0,25	2,0	1,0	1,0	20,0	+	IB6
142	1,0	1,0	2,0	4,0	17,5	PRO-	IB2
159	0,25	1,0	1,0	1,0	20,0	PRO-/ARG-	IA6
167	0,125	0,125	0,25	0,25	7,5	+	IB1
172	0,125	0,125	0,5	0,5	15,0	+	IA4
183	0,25	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IB3
195	0,125	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IA4
207	0,125	0,125	0,5	1,0	20,0	PRO-	IA4
219	0,5	0,125	0,25	0,5	20,0	+	IA4
223	0,125	0,125	0,5	0,5	20,0	PRO-	IB4
235	0,125	0,125	0,25	0,25	15,0	+	IA1
242	0,5	0,125	1,0	0,5	20,0	PRO-	IB2
259	0,25	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IB12
263	0,25	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IB3
271	0,5	0,125	1,0	2,0	20,0	PRO-/URA-	IB2
288	0,5	0,125	0,5	2,0	20,0	+	IB2
292	0,25	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IB6
301	0,5	0,125	0,5	1,0	15,0	+	IB1
317	0,25	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IB22
322	0,125	0,125	0,5	2,0	20,0	PRO-/ARG-	IB28
335	0,25	0,125	0,5	4,0	20,0	PRO-	IB28
343	0,125	0,125	0,5	4,0	15,0	+	IB21
358	0,125	0,125	0,5	0,5	20,0	PRO-	IB29
362	0,125	0,125	0,5	1,0	20,0	PRO-	IB28
374	0,125	0,125	0,5	1,0	20,0	PRO-	IB28
389	0,125	0,125	0,5	1,0	20,0	+	IB12
395	0,125	0,125	0,5	4,0	15,0	+	IB26
407	0,125	0,125	0,5	0,5	15,0	+	IB22
412	0,25	0,125	0,5	2,0	20,0	PRO-	IB5
427	0,5	0,125	2,0	4,0	20,0	+	IB2
434	0,125	0,125	0,5	1,0	15,0	PRO-/ARG-	IB12
442	0,125	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IB28
459	0,125	0,125	0,5	0,5	20,0	+	IB10
463	0,5	0,125	2,0	4,0	20,0	PRO-	IB1
469	0,25	0,125	0,25	0,5	20,0	+	IB12
475	0,5	0,125	2,0	2,0	20,0	PRO-	IB2
480	0,125	0,125	0,25	0,25	20,0	ARG-	IB2

QUADRO 3 - Resultado das pesquisas realizadas nas 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, quanto a Concentração Inibitória Mínima, auxotipo e sorotipo.

Cepa	Penicilina μg/ml	Cefoxitina μg/ml	Tetraciclina μg/ml	Tianfenicol μg/ml	Espectino micina μg/ml	Auxo tipo	sorotipo
1825	> 8,0	2,0	2,0	4,0	20,0	PRO-	IB3
1884	> 8,0	2,0	2,0	4,0	20,0	PRO-	IB2
1884	> 8,0	2,0	0,5	2,0	7,5	PRO-	IB7
1824	> 8,0	1,0	1,0	0,5	17,5	+	IB2
1818	> 8,0	2,0	2,0	4,0	12,5	PRO-	IB2
1881	> 8,0	2,0	1,0	2,0	15,0	+	IB1
1843	> 8,0	2,0	2,0	4,0	20,0	PRO-	IB2
1880	> 8,0	1,0	0,5	0,25	7,5	PRO-	IB2
1856	> 8,0	1,0	1,0	4,0	12,5	PRO-	IB3
1842	> 8,0	2,0	2,0	4,0	12,5	PRO- HIP-	IB2
1889	> 8,0	1,0	0,5	2,0	7,5	+	IB1
1882	> 8,0	1,0	0,25	2,0	7,5	HIP-	IB1
1962	8,0	1,0	0,5	0,5	64,0	PRO-	IA5
1963	4,0	1,0	0,5	0,5	20,0	PRO-	IA5
1964	> 8,0	1,0	0,5	2,0	64,0	PRO-	IB2

TABELA 8 - Distribuição absoluta e percentual das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, não produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas pesquisadas.

DROGAS	CIM $\mu\text{g/ml}$															
	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	7,5	8,0	10,0	12,5	15,0	16,0	17,5	20,0	32,0	64,0 128,0
PENICILINA	Nº 19 % (38,0)	18 (36,0)	12 (24,0)	1 (2,0)												
CEFOXITINA	Nº 34 % (68,0)		1 (2,0)	11 (22,0)	3 (6,0)	1 (2,0)										
TETRACICLINA	Nº %	5 (10,0)	24 (48,0)	8 (16,0)	12 (24,0)	1 (2,0)										
TIANFENICOL	Nº %	3 (6,0)	15 (30,0)	15 (30,0)	5 (10,0)	12 (24,0)										
ESPECTINOMICINA	Nº %								1 (2,0)	10 (20,0)			2 (4,0)	37 (74,0)		

TABELA 9 - Distribuição absoluta e percentual das 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas pesquisadas.

DROGAS		CIM $\mu\text{g/ml}$																	
		0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	7,5	8,0	>8,0	10,0	12,5	15,0	16,0	17,5	20,0	32,0	64,0	128,0
PENICILINA	Nº %						1 (6,7)		1 (6,7)	13 (86,6)									
CEFOXITINA	Nº %				8 (53,3)	7 (46,7)													
TETRACICLINA	Nº %		1 (6,7)	6 (40,)	3 (20,0)	5 (33,3)													
TIANFENICOL	Nº %		1 (6,7)	3 (20,0)		5 (33,3)	6 (40,0)												
ESPECTINOMICINA	Nº %						4 (26,6)				3 (20,0)	1 (6,7)		1 (6,7)	4 (26,6)		2 (13,4)		

GRÁFICO 3 - Distribuição percentual das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à penicilina.

GRÁFICO 4 - Distribuição percentual das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à cefoxitina.

GRÁFICO 5 - Distribuição percentual das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à Tetraciclina.

GRÁFICO 6 - Distribuição percentual das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) a Tianfenicol.

GRÁFICO 7 - Distribuição percentual das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo Concentração Inibitória Mínima (CIM) à Espectinomicina.

TABELA 10 - Distribuição dos dados estatísticos entre as 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e as 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo as drogas antimicrobianas estudadas.

ESPECIFICAÇÕES		PEN μg/ml	CEF μg/ml	TET μg/ml	TIA μg/ml	ESP μg/ml
não NGPP	VARIAÇÃO	0,125 -1,0	0,125 -4,0	0,25 -4,0	0,25 -4,0	12,5 -20,0
	MÉDIA	0,277	0,515	0,985	1,625	18,750
	MODA	0,125	0,125	0,5	0,5 e 1,0	20,0
	MIC50 ¹	0,1666	0,0919	0,4583	0,7333	18,3108
	MIC90 ²	0,4166	0,9545	1,6666	3,1666	19,6621
NGPP	VARIAÇÃO	4,0 - >8,0	1,0 - 2,0	0,25 - 2,0	0,25 - 4,0	7,5 - 64,0
	MÉDIA	>8,0	1,467	1,084	2,384	19,533
	MODA	>8,0	1,0	0,5	4,0	7,5 e 20,0
	MIC50 ¹	>8,0	0,9687	0,5833	1,7000	13,7500
	MIC90 ²	>8,0	1,7857	1,7000	3,5000	31,0000

PEN - penicilina; CEF - cefoxitina; TET - tetraciclina; TIA - tianfenicol; ESP - espectinomina

1 - Concentração Inibitória Mínima a nível de 50% dos cepas estudadas

2 - Concentração Inibitória Mínima a nível de 90% das cepas estudadas.

TABELA 11 - Distribuição absoluta e percentual das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e das 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo sua categoria¹ quanto a sensibilidade às drogas antimicrobianas testadas.

DROGAS	não NGPP				NGPP			
	SENSÍVEL		RESISTENTE ²		SENSÍVEL		RESISTENTE ²	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Penicilina	50	100,0	-	-	*	*	*	*
Cefoxitina	50	100,0	-	-	15	100,0	-	-
Tetraciclina ³	37	74,0	13	26,0	10	66,7	5	33,3
Tianfenicol	50	100,0	-	-	15	100,0	-	-
Espectinomicina	50	100,0	-	-	15	100,0	-	-

*Ignorado em função da resistência plasmidial

1 - Anexo I

2 - Resistência cromossômica

3 - Segundo critério do C.D.C.⁴² (Resistente $\geq 1,0$): 58,0% sensível e 42,0% resistente entre as não NGPP e 46,7% sensível e 53,3% resistente entre as NGPP.

TABELA 12 - Distribuição das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e das 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo auxotipo.

AUXOTIPO	não NGPP		·NGPP	
	Nº	%	Nº	%
IND	28	56,0	3	20,0
PRO	15	30,0	10	66,6
ARG	1	2,0	-	-
HIP	-	-	1	6,7
PRO,ARG	3	6,0	-	-
PRO,HIP	-	-	1	6,7
PRO,URA	1	2,0	-	-
PRO,MET	2	4,0	-	-

IND - indiferente (Prototrófica); PRO - prolina; ARG - arginina; HIP - hipoxantina; URA - uracil; MET - metionina

TABELA 13 - Distribuição das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase e das 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo sorotipo.

SOROTIPO	não NGPP		NGPP	
	Nº de cepas	%	Nº de cepas	%
IA1	4	8,0	-	-
IA2	1	2,0	-	-
IA4	5	10,0	-	-
IA5	-	-	2	13,3
IA6	3	6,0	-	-
IB1	4	8,0	3	20,0
IB2	7	14,0	7	46,7
IB3	2	4,0	2	13,3
IB4	4	8,0	-	-
IB5	1	2,0	-	-
IB6	2	4,0	-	-
IB7	-	-	1	6,7
IB10	1	2,0	-	-
IB12	4	8,0	-	-
IB19	1	2,0	-	-
IB21	1	2,0	-	-
IB22	2	4,0	-	-
IB26	1	2,0	-	-
IB28	6	12,0	-	-
IB29	1	2,0	-	-

Sorovariedade IA: 26,0% das não NGPP e 13,3% das NGPP.

Sorovariedade IB: 74,0% das não NGPP e 86,7% das NGPP.

TABELA 14 - Distribuição das 50 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo a classificação duplas A/S (auxotipo/sorotipo).

SOROTIPO	AUXOTIPO					
	IND	PRO ⁻	ARG ⁻	PRO ⁻ ,ARG ⁻	PRO ⁻ ,URA ⁻	PRO ⁻ MET ⁻
IA1	4 (8,0%)					
IA2						1 (2,0%)
IA4	3 (6,0%)	2 (4,0%)				
IA6		1 (2,0%)		1 (2,0%)		1 (2,0%)
IB1	3 (6,0%)	1 (2,0%)				
IB2	2 (4,0%)	3 (6,0%)	1 (2,0%)		1 (2,0%)	
IB3	2 (4,0%)					
IB4	1 (2,0%)	3 (6,0%)				
IB5		1 (2,0%)				
IB6	2 (4,0%)					
IB10	1 (2,0%)					
IB12	3 (6,0%)			1 (2,0%)		
IB19	1 (2,0%)					
IB21	1 (2,0%)					
IB22	2 (4,0%)					
IB26	1 (2,0%)					
IB28	2 (4,0%)	3 (6,0%)		1 (2,0%)		
IB29		1 (2,0%)				

TABELA 15 - Distribuição das 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo a classificação dupla A/S (auxotipo/soro).

SOROTIPO	AUXOTIPO			
	IND	PRO ⁻	HIP ⁻	PRO ⁻ , HIP
IA5	-	2 (13,3%)	-	-
IB1	2 (13,3%)	-	1 (6,7%)	-
IB2	1 (6,7%)	5 (33,3%)	-	1 (6,7%)
IB3	-	2 (13,3%)	-	-
IB7	-	1 (6,7%)	-	-

TABELA 16 - Distribuição das 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, segundo conteúdo genético extra cromossomal.

CONTEÚDO GENÉTICO (Mda)	Nº de cepas	%	DENOMINAÇÃO
3,2	1	6,7	Africano
4,5	7	46,7	Asiático
3,05+24,5 ¹	2	13,3	Toronto + transferência
3,2 + 24,5 ¹	3	20,0	Africano + transferência
4,5 + 24,5 ¹	2	13,3	Asiático + transferência

1 - 07 cepas (46,7%) portadoras do plasmídio de transferência de 24,5 Mda

QUADRO 4 - Resultados das pesquisas realizadas nas 15 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, isoladas entre abril de 1985 e março de 1990 na cidade de São Paulo, quanto à característica de seus plasmídeos (pesos moleculares).

CEPA	PESO MOLECULAR (Mda)						
	2,6	2,9	3,05	3,2	4,0	4,5	24,5
1818	X					X	
1824	X			X			
1825	X					X	
1842	X					X	
1843	X					X	
1844	X					X	
1856	X					X	
1880	X					X	X
1881	X		X				X
1882	X		X				X
1884	X					X	
1889	X			X			X
1962	X			X			X
1963	X			X			X
1964	X					X	X

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose demonstrando a distribuição plasmidial das cepas estudadas.

IAF = Cepas de referência do Instituto Alfred Fournier.

LSPQ = Cepas de referência de coleção de cultura oficial.

IAL = Instituto Adolfo Lutz

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO.

Os níveis de Concentração Inibitória Mínima (CIM) observados nas tabelas 8 e 9, apresentaram diferenças marcantes, embora para a maioria das drogas os níveis de resistência permanecessem constantes.

Estas oscilações são notadamente observadas nos gráficos, onde são comparadas as duas populações pesquisadas (não NGPP e NGPP), frente a uma determinada droga. O gráfico 3, mostra um comportamento inteiramente oposto, porém sem significado, pois a resistência para a penicilina apresentada por estas bactérias, são do tipo plasmidial. O mesmo fenômeno é observado na tabela 10, onde para a NGPP todos os valores encontram-se acima dos pontos limites de sensibilidade. Vários outros pesquisadores nas diversas áreas geográficas do mundo, têm procurado registrar este comportamento de sensibilidade de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora e não de penicilinase, frente a penicilina. Nossas observações concordam com os achados de ROMANOWSKI, B.; SUTHERLAND, R. e AMAND, C.M. (1982)¹⁹⁹ e SHTIBEL, R. (1979)²¹¹, no Canadá, que obtiveram a CIM₅₀ e a CIM₉₀ para NGPP $\geq 128,0 \mu\text{g/ml}$, com FEKETE, T. e col (1989)⁸³, na Filadelfia - EUA, que obtiveram a CIM₅₀ de $0,12 \mu\text{g/ml}$ para não NGPP, embora a CIM₉₀ para o mesmo grupo tenha sido $1,0 \mu\text{g/ml}$, que são bem mais altos que os nossos. Entre as NGPP, estes valores foram $\geq 8,0 \mu\text{g/ml}$, concordando com as nossas

observações, da mesma forma que nos EUA, entre as não NGPP, HOOK III, E.W. e col (1987)¹¹¹ observaram a CIM₅₀ e a CIM₉₀ de 0,35 µg/ml e 0,5 µg/ml, respectivamente, e também concordantes. Ainda, entre os valores coincidentes observados neste trabalho destacam-se: MONAYAR, H.K. e col (1987)¹⁵⁶ na Espanha obtiveram a CIM₉₀ de 0,5 µg/ml entre as não NGPP; LEFEVRE, J.C. e col (1988)¹³⁷ na França obtiveram CIM₅₀ ≥ 32,0 µg/ml entre NGPP. Entretanto, alguns pesquisadores encontraram níveis mais altos de tolerância à penicilina, a despeito de VAN DYCK, E. e col (1992)²³³, que observaram na região da África Central uma CIM₉₀ de 2,0 µg/ml entre não NGPP, além de MASON, P.R. e col (1989)¹⁴⁶ no Zimbábue, encontraram uma CIM₉₀ de 1,25 µg/ml e RIOU, J.Y. e col (1987)¹⁸⁷, que obtiveram uma CIM₉₀ de 2,0 µg/ml entre não NGPP na região de Paris - França.

Frente a cefoxitina (gráfico 4), as não NGPP apresentaram seu maior nível de Concentração Inibitória Mínima em 0,125 µg/ml, enquanto as NGPP demonstraram uma maior tolerância a esta droga, sendo sua maior Concentração Inibitória Mínima em 1,0 µg/ml seguida por 2,0 µg/ml. A tabela 10, mostra uma homogeneidade no comportamento de sensibilidade das cepas NGPP, as quais apresentaram uma variação menor que as não NGPP, porém com níveis de tolerância à cefoxitina maior que as não NGPP. Este fenômeno é nitidamente observado com o desvio nos valores da média e da moda. Entre as não NGPP a média foi de 0,515 µg/ml e a moda 0,125 µg/ml, passando as NGPP a apresentar uma média de 1,467 µg/ml e uma moda de 1,0 µg/ml. O mesmo ocorre com a CIM₅₀, que passa de 0,0919 µg/ml entre as não NGPP, para 0,9687 µg/ml entre as NGPP e a CIM₉₀, que repete o fenômeno passando

de 0,9545 $\mu\text{g/ml}$ para 1,7857 $\mu\text{g/ml}$, entre as não NGPP e as NGPP, respectivamente. Analisando os dados obtidos por PEETERS, M. e col (1987)¹⁷⁶, a hipótese de um processo crescente de tolerância entre as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* é preocupante. Os pesquisadores encontraram na África uma CIM₉₀ para a cefoxitina, nos anos de 81, 84 e 85, os valores de 0,008 $\mu\text{g/ml}$, 0,008 $\mu\text{g/ml}$ e 0,016 $\mu\text{g/ml}$ entre as NGPP e 0,004 $\mu\text{g/ml}$, 0,002 $\mu\text{g/ml}$ e 0,008 $\mu\text{g/ml}$, entre as não NGPP, respectivamente. Esta hipótese é reforçada pelo trabalho de FEKETE, T. e col (1989)⁸³, que observaram nos EUA em cepas não NGPP, uma CIM₅₀ de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e uma CIM₉₀ de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ para a cefoxitina e finalmente, alarmante é a situação do Japão, onde OSATO, K. e col (1986)¹⁷⁰ observaram em seu estudo epidemiológico, que mais de 50% das cepas pesquisadas entre NGPP e não NGPP foram resistentes a cefoxitina, atingindo Concentrações Inibitórias Mínimas semelhantes aos da penicilina.

Em relação a tetraciclina (gráfico 5), observamos neste trabalho uma variação maior entre as não NGPP, a qual não foi observada entre as NGPP. Estas concentravam-se predominantemente entre dois níveis, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Apesar da moda para as duas populações serem iguais, a média (0,985 $\mu\text{g/ml}$), a CIM₅₀ (0,4583 $\mu\text{g/ml}$) e a CIM₉₀ (1,6666 $\mu\text{g/ml}$) observadas entre as não NGPP, quando comparadas com as NGPP, obtiveram seus valores aumentados, com uma média de 1,084 $\mu\text{g/ml}$, uma CIM₅₀ de 0,5833 $\mu\text{g/ml}$ e uma CIM₉₀ de 1,757 $\mu\text{g/ml}$ (tabela 10). Alguns pesquisadores têm observado níveis elevados de CIM₉₀ para a tetraciclina, em outras áreas geográficas, a exemplo de HOOK III, E.W. e col (1987)¹¹¹ e FEKETE, T. e col (1989)⁸³, que encontraram 2,0 $\mu\text{g/ml}$, nos EUA. CONDE-GLEZ, C.J. e col (1988)⁵⁷, que

observaram no México uma CIM₉₀ de 8,0 µg/ml e finalmente GEDEBOU, M.; TASSEW, A. (1987)⁹¹, que observaram na Etiópia 16% das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtoras e não de penicilinase com CIM para a tetraciclina $\geq$ 4,0 µg/ml, ou seja, valor superior ao "cut off" para a categoria de resistente a esta droga.

Ainda, no que diz respeito ao comportamento de sensibilidade aos antimicrobianos (tabelas 8 e 9), este trabalho permitiu detectar, além das variações existentes entre as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase e as não produtora de penicilinase, um ponto comum e de extrema importância, que são os altos índices de resistência a tetraciclina (tabela 11). Observamos neste trabalho, apenas a resistência cromossômica para a tetraciclina, decorrente de transformação gênica no cromossomo bacteriano, onde segundo os parâmetros de análises do "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS)¹⁶⁰, 26,0% das cepas não NGPP e 33,3% das cepas NGPP foram resistentes.

Altos índices de resistência à tetraciclina foram observados por PIOT, P. e col (1979)¹⁸⁰ em cepas isoladas na Belgica, Suíça, Rwanda e Zaire, sendo 43,84% e 35,71% resistentes a esta droga, entre as cepas não NGPP e NGPP, respectivamente. Da mesma forma, vários outros pesquisadores observaram uma crescente tendência de resistência à tetraciclina em cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, a despeito de: MASSHOOR, K. e col (1980)¹⁴⁸, que observaram 19,8% na Índia; OTTH, L.; WILSON, G.; ZAROR, L. (1983)¹⁷³, que observaram 77,5% no Chile; CARMONA, O. e col (1983)³⁸, que observaram 16,0% na Venezuela; RODRIGUEZ, J. e col (1983)¹⁹⁸, que observaram 76,0% em

Porto Rico; KING, S.D.; BRATHWAITE, A.R.; DILLON, J.R. (1987)¹²², que observaram 65,0% na Jamaica; CHU, M-L. e col (1987)⁵⁵, que observaram 93,09% em NGPP e 96,7% em não NGPP em Formosa; ABECK, D. e col (1988)², que observaram 7% na Alemanha e WAGHORN, D.J.; AZADIAN, B.S.; TALBOYS, C. (1986)²³⁹, que observaram 0,89% em não NGPP e 1,8% em NGPP na Inglaterra. Este comportamento parece manter relação com os níveis de desenvolvimento de cada área geográfica²²⁴, permitindo-nos acreditar que possua uma estreita relação com os hábitos culturais e, conseqüentemente resulte de um fenômeno de pressão seletiva.

Quanto ao comportamento de sensibilidade frente ao tianfenicol, as duas populações estudadas (não NGPP e NGPP), apresentaram uma variação homogênea. A média (1,625 $\mu\text{g/ml}$) e a moda com valores bimodais (0,5 $\mu\text{g/ml}$ e 1,0 $\mu\text{g/ml}$) observados nas cepas não NGPP, são representados por 2,384 $\mu\text{g/ml}$ e 4,0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, entre as cepas NGPP (tabela 10). Os valores de CIM₅₀ para o tianfenicol repetem o comportamento, 0,7333 $\mu\text{g/ml}$ entre as não NGPP e 1,7 $\mu\text{g/ml}$ entre as NGPP, porém em relação a CIM₉₀ para o tianfenicol, as alterações observadas são desprezíveis, sendo 3,1666 $\mu\text{g/ml}$ nas cepas não NGPP e 3,5 $\mu\text{g/ml}$ na cepas NGPP (tabela 10). Em relação a esta droga, nenhuma cepa apresentou resistência, em quaisquer dos fragmentos populacionais estudados (tabela 11). O tianfenicol, embora muito eficiente no tratamento da gonorréia, tem pouca difusão comercial no mundo e portanto, pouca experiência tem sido demonstrada. Entre os autores que a estudaram, destacamos MONAYAR, H.K. e col (1987)¹⁵⁶, que observaram uma variação da CIM entre 0,25 $\mu\text{g/ml}$ e 1,0 $\mu\text{g/ml}$ desta droga frente a *Neisseria*

gonorrhoeae não produtora de penicilinase, isoladas em Cordoba - Argentina. E no continente africano, VAN DICK, E. e col (1992)²³³ e MASON, P.R. e col (1989)¹⁴⁶, obtiveram uma CIM₉₀ para o tianfenicol de 2,0 µg/ml para cepas NGPP, tendo os últimos pesquisadores, encontrado ainda, uma CIM₉₀ para o tianfenicol de 4,0 µg/ml entre cepas não NGPP.

Finalmente em relação a espectinomicina (quadro 7) a variação observada entre cepas NGPP foi maior que a observada entre as cepas não NGPP. Embora a média e a CIM₉₀ tenham aumentado (tabela 10), a CIM₅₀ foi menor entre as NGPP. Apesar de alguns autores terem relatado resistência cromossômica à espectinomicina entre cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, não observamos a ocorrência deste fenômeno neste trabalho (tabela 11). A CIM₉₀ para a espectinomicina observado, 31,0 µg/ml entre as cepas NGPP e 19,6621 µg/ml entre as não NGPP, são coincidentes com os valores observados por PEETERS, M. e col (1989)¹⁷⁶ na África, FEKETE, T. e col (1989)⁸³ nos USA e finalmente MASON, P.R. e col (1989)¹⁴⁶ e VAN DYCK, E. e col (1992)²³³ na África, porém discordantes quando comparados com os trabalhos de CONDEGLEZ, C.J. e col (1988)⁵⁷, que obtiveram na cidade do Mexico uma CIM₉₀ de 8,0 µg/ml, para esta mesma droga. Ainda mais discordantes, são os dados de OSOBA, A.O. e col (1987)¹⁷¹, que obteve na Nigéria - África, mais de 95% das cepas NGPP resistentes à espectinomicina, com CIM superiores a 500,0 µg/ml.

Quanto ao auxotipo das cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, observamos uma inversão das características, entre as populações estudadas (NGPP e não NGPP). Entre as cepas não NGPP o auxotipo mais prevalente foi prototrófico, com 56,0% (tabela 12), enquanto entre as NGPP foi auxotipo PRO⁻

(66,6%). O auxotipo com múltiplos requerimentos foi mais frequente entre as não NGPP (12,0%), tendo aparecido as associações PRO⁻,ARG⁻ (6,0%), PRO⁻,MET⁻ (4,0%) e PRO⁻,URA⁻ (2,0%), enquanto entre as NGPP só foi observado o requerimento múltiplo em uma cepa (PRO⁻,HIP⁻). Os auxotipos mais frequentemente observados no mundo são os Prototrófico e o PRO⁻, seguidos do ARG⁻. Os resultados observados neste trabalho são concordantes, entre cepas NGPP e cepas não NGPP, com os obtidos por COPLEY, C.G.; GOUCH, K.; EGGLESTONE, S.I. (1985)⁶⁰ na Inglaterra, BOHNHOFF, M.; MORELLO, J.A.; LERNER, S.A. (1986)²¹ e GIVAN, K.F.; JAEGER, R. (1986)⁹⁴ nos EUA e DILLON, J.R.; BYGDEMAN, S.M.; SANDSTROM, E.G. (1987)⁶⁶ no Canadá. Entretanto são discordantes dos achados por DUTILH, B. e col (1987)⁷², que observou em Paris, entre cepas NGPP, uma predominância do auxotipo ARG⁻ e KOHL et al (1986)¹³¹, que observaram na Alemanha altos níveis de ocorrência do auxotipo ARG⁻,HIP⁻,URA⁻ entre cepas não NGPP. Os auxotipos prevalentes em nossas cepas, quer entre as NGPP ou entre as não NGPP, são os auxotipos que caracteristicamente se difundem no mundo. Entre as cepas com auxotipo de múltiplos requerimentos encontrados neste trabalho, observamos arranjos simples, sugerindo mutação entre as cepas circulantes no país, diferindo entretanto, das cepas que possuem sítios geográficos bem definidos, tais como: ARG⁻,HIP⁻,URA⁻ e PRO⁻,ARG⁻,URA⁻ ³¹.

Quanto à classificação sorológica, as sorovariedades mais frequentes foram as do grupo IB, particularmente os sorotipos B2, tanto entre as cepas NGPP (46,7%) como entre as não NGPP (14,0%), tabela 13. A variação de sorotipos entre as não NGPP é extremamente grande, ao contrário da NGPP

com poucos sorotipos. O sorotipo IA5, o qual foi observado em duas cepas entre as NGPP, tem sido frequentemente encontrado em cepas isoladas em certas áreas geográficas bem definidas nos EUA e na África Ocidental¹²⁴, da mesma forma que o sorotipo IB7 observado neste trabalho apenas entre as NGPP, tem sido isolado no extremo leste^{130,204}. Nossos achados são concordantes com as observações feitas por BRUNHAM, R.C. e col (195)²⁶ no Canadá, YOUNG, H. e col (1990)²⁶³ na Escócia e FENOLL, A.; BERRÓN, S.; VÂZQUEZ, J.A. (1987)⁸⁴ na Espanha. Entretanto, são discordantes do ponto de vista epidemiológico, as cepas observadas na África, a exemplo dos resultados de MASON, P.R. e col (1990)¹⁴⁷, obtidos no Zimbábue. O sorotipo IB5 tem sido correlacionado com cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes às penicilinas e às cefalosporinas^{112,248}, entretanto estes dados não coincidem com os nossos achados, onde a cepa encontrada neste trabalho, com este sorotipo, pertence ao fragmento populacional das não NGPP e apresenta-se sensível a ambos os antibióticos, concordando com os resultados de ZENILMAN, J.M. e col (1987)²⁶⁷, que obtiveram nos EUA este mesmo sorotipo sensível a vários antibióticos.

Segundo a classificação dupla A/S (auxotipo/sorotipo), visto nas tabelas 14 e 15, o fenótipo mais comum, observado neste trabalho entre as não NGPP foi o IND/IA1 e entre as NGPP foi o PRO⁻/IB2. O fenótipo PRO⁻/IB1 foi o mais prevalente nos EUA no período entre 1985 e 1986, sendo neste trabalho observados 3 casos (6,0%), deste mesmo sorotipo entre as não NGPP²⁶⁷. Entre as NGPP a cepa IB5 citada anteriormente como sensível, tem o mesmo fenótipo observado por ZENILMAN et al (1987)²⁶⁷ nos EUA, ou seja, PRO⁻/IB5.

Quanto a fenotipagem e a sensibilidade aos antimicrobianos, vários autores têm referido que um grande número de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* não produtora de penicilinase, PRO⁻/IB1 isoladas nos EUA, são resistentes a penicilina, tetraciclina e cefoxitina, através de resistência cromossômica, apresentando comportamento pleotrópico⁸². Em nosso trabalho foi encontrada apenas uma cepa (2,0%), com este fenótipo e, de forma concordante, esta cepa apresentava resistência à tetraciclina, embora sensível às demais drogas, apresentando entretanto, níveis de CIM aumentados em relação às demais cepas.

Através da biologia molecular, foram analisados os plasmídios, PcR de resistência, das cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, para a caracterização epidemiológica em função de seu peso molecular (figuras 1 e 2). Na tabela 16, observamos que entre as 15 cepas NGPP estudadas, foram detectados três plasmídios epidemiologicamente distintos entre si. Dos plasmídios isolados o mais prevalente foi o de peso molecular de 4,5 Mda, denominado de "Asiático", com 60,0% das cepas, seguido pelo "Africano" com peso molecular de 3,2 Mda, com 26,7% das cepas e por último o "Toronto" de peso molecular de 3,05 Mda, com 13,3% das cepas. O plasmídio "Africano" é considerado como o tipo caracteristicamente difundido na Europa, enquanto o "Asiático" foi responsável pela epidemia ocorrida na América do Norte¹⁵¹. Os resultados observados neste trabalho são concordantes com o perfil epidemiológico determinado por FALK, E.S. e col (1985)⁷⁹ na Noruega, por VAN EMBDEN, J.D.A. e col (1980)²³⁵ na Holanda, por ISON, C.A.; EASMON, C.S.F. (1989)¹¹⁵ na Inglaterra, por ODUGBEMI, T.O. e col

(1983)¹⁶⁷ na Coréia, por MASON, P.R.; GWANZURA, L. (1988)¹⁴⁵ no Zimbábue (África Oriental), por CHU, M-L. e col (1992)⁵⁴ em Formosa (China Ocidental) e por DILLON, J.R.; PAUZÊ, M.; YEUNG, K-H (1986)⁷⁰ no Canadá. Embora estes dados sejam contraditórios, tem sido observada a prevalência do plasmídeo "Asiático" em algumas áreas geográficas bem definidas na Europa, como é o caso da Inglaterra, Holanda e Noruega. Ainda contraditória é a situação da América do Norte que possui uma peculiaridade epidemiológica, apresentando-se de forma cíclica, alternando a predominância plasmidial, como demonstra ZENILMAN, J.M. e col (1988)²⁶⁸, que observaram na região da Flórida predominância de plasmídeo "Africano" em 1983, passando a ser mais prevalente o plasmídeo "Asiático" em 1984 e, retomando às características iniciais em 1986. Ao contrário do observado neste trabalho, tem sido constatado absoluta predominância, entre cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, do plasmídeo "Africano", no continente que lhe concedeu este nome, a despeito dos trabalhos de FALK et al (1988)⁷⁸ e JOHNSON, A.P. e col (1987)¹¹⁷. Esta característica epidemiológica, da predominância do plasmídeo "Africano", foi ainda observada em algumas áreas geográficas definidas, como demonstraram BARÓ, T. e col (1989)¹⁰ na Espanha e DILLON, J.R. e col (1987)⁶⁸ na Jamaica, diferenciando-se do comportamento cíclico observado nos EUA.

As cepas de *Neisseria gonorrhoeae* portadoras do plasmídeo de 4,5 Mda, têm sido classificadas auxotipicamente, como prototróficas ou PRO⁺ e consideradas resistentes a vários antibióticos²⁷. Estas observações coincidem com nossos achados, quando analisados isoladamente pelas características auxotípicas das cepas de NGPP estudadas, entretanto, quando analisadas do

ponto de vista de sensibilidade aos antimicrobianos, esta afirmativa não é inteiramente concordante, pois, a resistência a várias drogas não foi observada, apesar dos altos níveis de resistência a tetraciclina (60,0%).

Neste trabalho foram isolados e identificados 2 (13,3%) plasmídios com peso molecular de 3,05 Mda (tabela 16), denominado de "Toronto". Este plasmídio foi identificado pela primeira vez no Canadá⁷⁰, o qual, além desta localidade, tem estado limitado a determinadas áreas geográficas, especificamente, EUA, Japão, Filipinas e China Ocidental^{54,262}. Estas áreas apresentam como característica comum, o grande fluxo de pessoas a negócios e/ou a turismo, além de possuírem importantes bases militares, com um grande contingente flutuante. O isolamento destas cepas, sugerem a veracidade da hipótese de ser a cidade de São Paulo uma área geográfica susceptível à fenômenos de "importação". O encontro de 3 (20,0%) cepas NGPP com o plasmídio de 3,2 Mda (Africano) reforça esta hipótese. Os plasmídios "Nimes" e "Rio" não foram encontrados em nosso trabalho, entretanto plasmídios com tais características de peso molecular, não foram observados fora das áreas de origem e épocas de seu relato¹⁷⁵.

Em nosso trabalho foram observadas 7 (46,7%) cepas de NGPP portadoras de plasmídio de transferência (24,5 Mda), que podem representar uma situação de alerta na cidade de São Paulo, pois, a presença deste plasmídio em cepas não NGPP, com características selvagens, pode justificar o aumento de cepas NGPP na referida cidade, nos últimos cinco anos⁷⁰.

Algumas limitações nos estudos epidemiológicos têm sido observadas, quanto à dinâmica das populações das cepas de *Neisseria gonorrhoeae*. Entre estas, as limitações mais comuns são a possibilidade de mutação genética, proporcionando uma variação no auxotipo ou a rotação dos epitopos imunogênicos mudando os resultados da sorotipagem⁵⁹. Sabe-se hoje, que as populações de *Neisseria gonorrhoeae* são dinâmicas e, cerca de 50 a 60 fenótipos circulam simultaneamente¹²⁴, entretanto poucos fenótipos permanecem por períodos prolongados em uma comunidade⁶⁵, podendo ser transferida entre fragmentos populacionais ou áreas geográficas¹⁸². Com o encontro das primeiras⁵¹ cepas de *Neisseria gonorrhoeae* portadoras do plasmídio Tet M, de 25,2 Mda, mediador de resistência à tetraciclina, a dinâmica da gonorréia nas populações ganha um novo rumo, pois este plasmídio tem a capacidade de mobilizar e transferir outros plasmídios de menor peso molecular, a despeito dos plasmídios de resistência à penicilina.

A pressão seletiva pelo uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, pode ainda proporcionar uma condição epidemiológica sombria. Sob a condição de ser a cidade de São Paulo uma área geográfica "aberta", torna-se susceptível ao recebimento de cepas "importadas", como demonstramos em nossos achados. O processo de pressão seletiva pode favorecer a instalação de surtos epidêmicos. Este fenômeno tem sido observado, como decorrência das utilizações medicamentosas inadequadas, tais como: indicações de "farmacistas", automedicação e ainda, por padronizações terapêuticas oficiais, decididas de forma intempestiva, sem qualquer programa de vigilância epidemiológica.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- 6.1. A sensibilidade das *Neisseria gonorrhoeae* produtora e não produtora de penicilinase, frente a penicilina, cefotaxina, tianfenicol e espectinomicina, é semelhante ao observado nos países desenvolvidos. Entretanto, foram observados altos índices de resistência a tetraciclina, comprovando o fenômeno de um processo seletivo instalado na cidade de São Paulo, decorrente dos vários aspectos culturais e técnicos indutores deste fenômeno.
- 6.2. Os auxotipos simples observados neste estudo são caracteristicamente difundidos em todo o mundo. Quanto aos auxotipos de múltiplos requerimentos observados entre as cepas pesquisadas, surgem provavelmente de um processo de mutação de cepas oriundas de áreas geográficas bem delimitadas em países desenvolvidos.
- 6.3. Alguns dos sorotipos isolados entre as NGPP são característicos de áreas geográficas bem definidas (EUA, África ocidental e extremo leste).
- 6.4. Foram encontrados três tipos de plasmídeos entre as cepas PPNG estudadas: o Asiático (4,5 Mda), o Africano (3,2 Mda) e o Toronto (3,05 Mda).

6.5. As características fenotípicas observadas nas cepas de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase estudadas neste trabalho, colocam a cidade de São Paulo na condição de área geográfica "aberta" ao fenômeno de "importação".

PERSPECTIVA

7. PERSPECTIVA

Face aos resultados obtidos neste trabalho e aos mais recentes conhecimentos epidemiológicos, torna-se imperativo a instalação de um programa de vigilância epidemiológica, visando manter sob controle a dinâmica de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* na população, bem como, estadiar o comportamento de sensibilidade entre estas cepas selvagens. Da mesma forma, a caracterização epidemiológica das cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, pode ter implicação importante sobre o controle da gonorréia em São Paulo e no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*.

1. AALELN, R.B. & GUNDERSEN, W.B. Molecular characterization and comparison of plasmid content in seven different strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, 95:13-21, 1987.
2. ABECK, D.; JOHNSON, A.P.; ALEXANDER, F.; KORTING, H.C.; BALLARD, R.C. "In vitro" activity of eight antimicrobial agents against non-penicillinase-producing gonococci isolated in Munich. **Genitourin. Med.**, 64: 233-4, 1988.
3. ADLER, H.W. & MCCUTCHAN, J.A. Survey of cases of gonorrhoea caused by Penicillinase Producing *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom. **Genitourin. Med.**, 61:36-8, 1985.
4. ANHALT, J.P. & WASHINGTON II, J.A.. Preparation and storage of antimicrobial solutions. In: Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J.; Shadomy, H.J. ed. **Manual of clinical microbiology**. 4ª ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1985. p. 1019-20.
5. ANSISNK-SCHIPPER, M.C.; HUIKESHOVEN, M.H; WOULDSTRA, R.K.; VAN KLINGEREN, B.; DE KONING, G.A.J.; TIO, D.; JANSEN SCHOONHOVEN, F.; COUTINHO, R.A. Epidemiology of PPNG infections in Amsterdam: analysis by auxanografic typing and plasmid characterization. **Br. J. Vener. Dis.**, 60: 23-8, 1984.
6. ARYA, O.P.; REES, E.; PERCIVAL, A.; ALERGANT, C.D.; ANNELS, E.H.; TURNER, G.C. Epidemiology and treatment of gonorrhoea caused by penicillinase-producing strains in Liverpool. **Br. J. Vener. Dis.**, 54:28-35, 1978.

* De acordo com: NORONHA, D.R. & ANDRADE, M.T.D. **Normas de referências bibliográficas aplicadas à Saúde Pública**. 2ª ed. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação da FSP/USP, 1990.

7. ASHFORD, W.A.; GOLASH, R.G.; HEMMING, V.G. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Lancet**, 2:657-8, 1976.
8. BARBOUR, A.G. Properties of penicillin-binding proteins in *Neisseria gonorrhoeae*, **Antimicrob. Agents Chemother.**, 19:316-22, 1981.
9. BARNES, R.C. & HOLMES, K.K. Epidemiology of gonorrhoeae: current perspectives. **Epidemiol. Rev.**, 6:1-30, 1984.
10. BARÓ, T.; CONESA J.G.; VÂZQUEZ, J.A.; MIRALLES, R.; ALIA, C. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana, auxotipia, serotipia y análisis plasmídico de 75 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Barcelona. **Med. Clin. (Barc.)**, 92: 765-8, 1989.
11. BARROS, J.M. Aumenta a incidência da gonorréia. **Atual. med.**, (supl.):2-5, abr. 1975.
12. BAYARD, V.; CHO, D.; JUSTO, C.; RODRIGUEZ, C. Prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* productora de penicillinase en una clinica de alto riesgo, en la region metropolitana. **Rev. Med. Panamá**, 11: 156-60, 1986.
13. BELDA, W. Doenças sexualmente transmissíveis. (Encarte). **J. Inform. Urol.** (16), fev., 1985.
14. BELLO, C.S.S.; LLOYD-EVANS, N.; MCROBBIE, I.; MABEY, D.C.W. & ODUGBEMI, T.O. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* from The Gambia, West Africa. **Eur. J. Sex. Transm. Dis.**, 2:229, 1985.
15. BERLINER, D.S. & NO, P.U. Prevalence of penicillinase - producing *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. **Aviat. Space Environ. Med.**, 57:1170-5, 1986.

16. BESTANE, W.J.; MEIRA, A.R.; MELONI, W.; MARTINS, E.M.A.; PEREIRA, S.C.; ARMINDA, M.; TURINI, G.; SILVA, M.R.; SMIT, S.P.; SARAIVA, M.A. Tratamento da cistite em farmácias de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 26: 185-6, 1980.
17. BESTANE, W.J. A gonorréia e outras uretrites na cidade de Santos, Estado de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 24:133-8, 1978.
18. BESTANE, W.J.; MEIRA, A.R.; KRASUCKI, M.R.; AUN, R.A.; COELHO, C.S.; CHAZANAS, W.; PERI, E.; SLAWKA, S. Alguns aspectos da prescrição de medicação para o tratamento de gonorréia em farmácias de Santos (SP). **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 26: 2-3, 1980.
19. BLOG, F.B.; CHANG, A.; KONING, G.A.J.; ORANJE, A.P.; STOLZ, E.; BOSSCHER-KOETSIER, G.; JONGE-SUY, M.P.E.; MICHEL M.F.; O'NIEL, E.; WEERDT-VAN AMEYDEN, S.; GAASTRA, L. Penicillinase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Rotterdam. **Br. J. Vener. Dis.**, 53: 98-100, 1977.
20. BOGAERTS, J; VAN DEPITTE, J; VAN DICK, E.; VAN HOOFF, R.; DEKEGEL, M.; PIOT, P. In vitro antimicrobial sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* from Rwanda. **Genitourin. Med.**, 62: 217-20, 1987.
21. BOHNHOFF, M.; MORELLO, J.A.; LERNER, S.A. Auxotypes, Penicillin susceptibility, and serogroups of *Neisseria gonorrhoeae* from disseminated and uncomplicated infections. **J. Infect. Dis.**, 154:225-30, 1986.
22. BREWER, F.; MATUSZAK, D.L.; LIBONATI, J.P.; JACKAMAN, N.E.R.; ISRAEL, E. Tetracycline-resistant *Neisseria*. (Letter). **N. Engl. J. Med.**, 315:1548-9, 1986.
23. BROWN, J.T. & ROBERTS, M.C. Cloning and characterization of Tet M gene from a *Ureaplasma urealyticum* strain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31:1852-4, 1987.

24. BROWN, S.; WARNNISSORN, T.; BIDDLE, J.; PANIKABUTRA, K.; TRAISUPA, A. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Bangkok: is single drug treatment phassé. **Lancet**, 2:1366-8, 1982.
25. BROWN, S.T.; ZACARAS, F.R.K.; ARAL, S.O. Las enfermedades de transmission sexual en los países en desarrollo. **Foro Mund. Salud**, 8:101-4, 1987.
26. BRUNHAM, R.C.; PLUMMER, F.; SLANEY, L.; RAND, F.; DEWITT, W. Correlation of auxotype and protein I type with expression of disease due to *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Infect. Dis.**, 152:339-43, 1985.
27. BRUNTOM, J.; CLARE, D.; MEIER, M. A Molecular epidemiology of antibiotic resistance plasmids of *Haemophilus* species and *Neisseria gonorrhoeae*. **Rev. Infect. Dis.**, 8:713-24, 1986.
28. BUCHANAN, T.M & HILDEBRANDT, F.J. Antigen-specific sorotyping of *Neisseria gonorrhoeae*: characterization based upon principal outer membrana protein. **Infect. Immun.**, 32:985-94, 1981.
29. BUISSON, Y.; RIOU, J.Y.; LABIDI, A.; ARBORIO, M.; GUIBOURDENCHE, M. A propos des gonocoques, producteurs de Beta-lactamase isolés à Dakar: sensibilité à divers antibiotiques, auxotype et contenu plasmidique. **Pathol. Biol. (Paris)**, 33: 550-3, 1985.
30. BURDETT, V. Identification of tetracycline resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). **Antimicrob. Agents Chemother.**, 18:753-60, 1980.
31. BYGDEMAM, S.; KALLINGS, I.; DANIELSSOM, D. Serogrouping and Auxotyping for Epidemiological study of Beta-lactamase producing *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Sweden. **Acta Derm. Venereol. (Stockh)**, 61: 329-34, 1981.

32. BYGDEMAN, S.M.; GILLENIOUS, E.C.; SANDSTROM, E.G. Comparison of two different tests of monoclonal antibodies for the serological classification of *Neisseria gonorrhoeae*. In: SCHOOLNIK, G.K.; BROOKS, G.F.; FALKOW, C.E.; FRASCH, C.E.; KNAPP, J.S.; MCCUTCHAN, J.A.; MORSE, S.A. ed. **The pathogenic *Neisseria gonorrhoeae***. Washington D.C., American Society for Microbiology, 1985. p.31-6.
33. CANNON, J.G.; SPARLING, P.F. The genetics of the gonococcus. **Annu. Rev. Microbiol.**, 38:111-33, 1984.
34. CAPRILLI, F.; CRESCIMBENI, E.; PRIGNANO, G.; LATELLA, C. L. Auxonograma di *Neisseria gonorrhoeae* come Sistema di indagine epidemiologica. **Ann. Ist. Super. Sanità**, 20:221-6, 1984.
35. CARBALLO, M.; PAUZE, M.; DILLON, J.R. Increase of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with combined plasmid-mediated resistance to tetraciclina (TRNG) and penicillin (PPNG). **Can. Dis. Wkly. Rep.**, 16:219-22, 1990.
36. CARIFO, K. & CATLIN, B.W. *Neisseria gonorrhoeae* auxotyping: differentiation of clinical isolates based on growth response on chemically defined media. **Appl. Microbiol.**, 26:223-30, 1973.
37. CARLSON, B.L.; CALNAN M.B.; GOODMAN, R.E. Phadebact monoclonal GC-OMMI test for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Clin. Microbiol.**, 25:1982-6, 1987.
38. CARMONA, O.; LOPEZ, D.; GRAFFE, H.; SILVA, H. Sensibilidad "in vitro" de la *Neisseria gonorrhoeae* frente a 12 antibióticos. **Invest. Med. Int.**, 10: 160-3, 1983.
39. CATLIN, B.W. Characteristics and auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae*. In: BERGAN, T. & MORRIS, J.R. ed. **Methods in microbiology**. New York, Academic Press, 1978. v.10, p. 346-88.

40. CATLIN, B.W. Nutricional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requeriments for gonococcal typing. **J. Infect. Dis.**, 128: 178-82, 1975.
41. CAUSSE, G. Um problema mundial. **Salud mund.**, (mayo):3-7, 1975.
42. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Antibiotic-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Policy guidelines for detection, management and control. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 36:(Suppl.45): 01-14, 1987.
43. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Cases of specifiabe desease, United States, Weeks ending December 31, 1989 and January 2, 1989 (52nd week). **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 37:803, 1989.
44. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Chromosomally mediated resistant *Neisseria gonorrhoeae* - United States. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 33:408-10, 1984.
45. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Global distribution of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG). **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 31:1-3. 1982.
46. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Gonorrhea. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 31:29-33, 1983.
47. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Infections due to penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*: Florida. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 30:245-7, 1981.
48. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* United States, 1986. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 36:107-8, 1987.

49. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*: United States, Florida. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 35:12-4, 1986.
50. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Sentinel surveillance system for antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 36:585, 1987.
51. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* Geórgia, Pensylvania, New Hampshire. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, 34:563-70, 1985.
52. CHITWARAKORN, A.; ARIYARIT, C.; PANIKABUTRA, K.; BUATEING, A.; BIDDLE, J.; THOMPSON, S.; BROWN, S. Treating gonococcal infections resistant to penicillin in Bangkok: comparison of cefuroxime and spectinomycin. **Genitourin. Med.**, 61: 306-10, 1985.
53. CHOWDHURY, M.N.H.; PAREEK, S.S.; MAHGOUB, E.S. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Riyadh, Saudi Arabia. **Br. J. Vener. Dis.**, 57:256-8, 1981.
54. CHU, M-L.; HO, L-J.; LIN, H-C. WU, Y-C. Epidemiology of Penicillin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Taiwan, 1960-1990. **Rev. Clin. Infect. Dis.**, 14:450-7, 1992.
55. CHU, M-L.; SHIEN, M.H.; CHANG, S.A.; WU, Y.C. Epidemiological characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Taiwam. Part. I: Prevalence of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) and its "in vitro" susceptibility to 39 antibiotics. **J. Formosan. Med. Assoc.**, 86: 759-68, 1987.
56. COHEN, M.S.; COONEY, M.H.; BLACKMAN, E.; SPARLING, P.F. In vitro antimicrobial susceptibility of penicillinase-producing and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 24: 597-9, 1983.

57. CONDE-GLEZ, C.J.; CALDERON, E.; ECHANIZ, G.; SOLORZAMO, F.; BELTRAN, M. Serogroup specificity and antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Mexico city. **J. Antimicrob. Chemother.**, 21: 413-6, 1988.
58. COOVADIA, Y.M.; DAA, M.A.; KHARSANI, A.; RAMSAROOP, U.; BHAMJEE, A. The emergence of penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Durban. **S. Afr. Med. J.**, 65:835-7, 1984.
59. COPLEY, C.G. *Neisseria gonorrhoeae*: subdivision of auxogroups by genetic transformation. **Genitourin. Med.**, 63:153-60, 1987.
60. COPLEY, C.G.; GOUCH, K.; EGGLESTONE, S.I. Epidemiological studies on *Neisseria gonorrhoeae* isolated in the United Kingdom. **Eur. J. Epidemiol.**, 1:166-71, 1985.
61. CREWE-BROWN, H.H.; MAHOMED, M.F.; POCHEEE, E.; SUEWAN, K.A.; ADAMS, A.; EBRAHIM, O. Penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Pretoria. **S. Afr. Med. J.**, 67:159, 1985.
62. CRUM, J.W.; DUANGMANI, C.; VIBULYASEKHA, S.; SUTHISOMBOON, K. Resistance to penicillin and identification of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* among clinical isolates in Thailand. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 2: 360-1, 1980.
63. D'COSTA, L.J.; PLUMMER, F.A.; BOWMER, I.; FRANSEN, L.; PIOT, P.; RONALD, A.R.; NSANZE, H. Prostitutes are a major reservoir of sexually transmitted diseases in Nairobi, Kenya. **Sex. Transm. Dis.**, 12:64-7, 1985.
64. DESAI, P.J.; MORRISOM, J.A.; FLEMING, A.F. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Ndola, Zambia. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 84:131, 1990.

65. DILLON, J.R.; PAUZÊ, M. Relationship Between Plasmid Content and Auxotype in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates. **Infect. Immun.**, 33:625-7, 1981.
66. DILLON, J.R.; BYGDEMAN, S.M.; SANDSTROM, E.G. Serological ecology of *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG and non-PPNG) strains: Canada perspective. **Genitourin. Med.**, 63:160-8, 1987.
67. DILLON, J.R.; CARBALLO, M.; PAUZE, M. Evaluation of eight methods for identifications of pathogenic *Neisseria* species: Neisseria-KWIK, RIM-N, Gonobio-teste, minitek, Gonochek II, Gonogen, Phadebact monoclonal GC-OMMI test and Syva microtrak test. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 493-9, 1988.
68. DILLON, J.R.; CARBALLO, M.; KING, S.D.; BRATHWAITE, A.R. Auxotypes, plasmid contents, and serovars of gonococcal strains (PPNG and non-PPNG) from Jamaica. **Genitourin. Med.**, 63: 233-8, 1987.
69. DILLON, J.R.; PAUZÊ, M; JESSAMINE, A. G. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Canada. **Can. Med. Assoc. J.**, 125:851-5, 1981.
70. DILLON, J.R.; PAUZÊ, M.; YEUNG, K-H. Molecular and epidemiological analysis of penicillinase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Canada 1976-84: evolution of new auxotypes and Beta-lactamase encoding plasmids. **Genitourin. Med.**, 62: 151-7, 1986.
71. DILLON, J.R.; PAUZÊ, M.; YEUNG, K.H. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria Meningitidis*. **Lancet**, 1:779-81, 1983.
72. DUTILH, B.; GUIBOURDENCHE, M.; ALLAB, M.; BEBEAR, C.; RIOU, J.Y. Etude des auxotypes, du contenu plasmidique et des serovars de trois souches de *Neisseria gonorrhoeae* isolées a Bordeaux in 1985. **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, 80:38-44, 1987.

-
73. EICHMANN, A.R. & PIFFARETTI, J.C. Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Zurich, Switzerland. **Br. J. Vener. Dis.**, 60:147-50, 1984.
74. EISENSTEIN, B.I.; SOX, T.; BISWAS G.; BLACKAMN, E.; SPARLING, P.F. Conjugal transfer of the gonococcal penicillinase plasmid. **Science**, 195:998-1000, 1977.
75. ELWELL, L.P.; ROBERTS, M.; MAYER, L.W.; FALKOW, S. Plasmid-mediated Beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 11:528-33, 1977.
76. ESCHENBACH, D.A. A review of role of Beta-lactamase producing bacteria in obstetric-gynecologic infections. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 156:495-503, 1987.
77. EUSTATIA, J.M. & WANGA, O. Antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Curaçao. **Trop. Geogr. Med.**, 36:341-4, 1984.
78. FALK, E.S.; BYGDEMAN, S.M.; BIRKELAND, N.K.; BJORVATN, B.; KALLINGS, I.; SANDSTROM, E. Genotypes and phenotypes of Beta-lactamase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* from African countries. **Genitourin. Med.**, 64: 226-32, 1988.
79. FALK, E.S.; DANIELSSON, D.; BJORVATN, B.; MELBY, K.; SORENSEN, B.; KRISTIANSEN, B-E.; LUND, S.; SANDSTROM, E. Phenotypic and genotypic characterization of penicillinase-producing strains of *Neisseria*. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, 93: 91-7, 1985.
80. FANTASIA, M.; FILETICI, E.; MONDELLO, F.; CRESCIMBENI, E.; BELARDI, M. Beta-lactamase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Rome, Italy. **Br. J. Vener. Dis.**, 59:342-3, 1984.
81. FARROW, J.A. & BELL, T.A. Penicillinase-producing *Neissera gonorrhoeae* infection in adolescent prostitutes in detention. **J. Adolesc. Health. Care**, 5:120-3, 1984.

-
82. FARUKI, H.; KOHMESCHER, R.N.; MCKINNEY, W.P.; SPARLING, P.F. A community based outbreak of infection with penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase (chromosomally mediated resistance). **N. Engl. J. Med.**, 313: 607-11, 1985.
83. FEKETE, T.; SERFASS, D.A.; LAFREDO, S.C.; CUMDY, K.R. Susceptibility to cephalosporins of Penicillin-susceptible and Penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* from Philadelphia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 33: 164-6, 1989.
84. FENOLL, A.; BERRÓN, S.; VÂZQUEZ, J.A. Analysis of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Madrid (Spain) from 1983-85. **Epidemiol. Infect.**, 99:455-62, 1987.
85. FINEGOLD, S.M. & BARON, E.J., ed. **Bailey & Scott diagnóstico microbiológico**. 7ª ed., Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1989. p.190-210: Metodos para evaluar la efectividad antimicrobiana.
86. FRANCHINI, M. Prevalência de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase no Distrito Federal. [Apresentada ao I Encontro Nacional sobre Doenças Sexualmente Transmissíveis e III Simpósio sobre Doenças Sexualmente Transmitidas no Brasil Central, Brasília, D.F., 1984].
87. FRANKE, A.E.; CLEWELL, D.B. Evidence for a chromosomeborne transposon (Tn 916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "Conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. **J. Bacteriol.**, 145:494-502, 1981.
88. FUNG, H.W. & NG, W.W.S. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*, in 21 patients attending an STD clinic in Hong Kong. **Br. J. Vener Dis.**, 59:138, 1983.

-
89. GARCIA MORENO, J.; DILLON, J.R.; ARROYAVE, R.; MALDONADO, A.; FICH, F.; SALVO, A.; VILLALOBOS, D.; VINCENT, P.; PAUZE, M. Identification of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Chile during clinical and microbiological study of gonococcal susceptibility to antimicrobial agents. **Genitourin. Med.**, 63: 6-12, 1987.
90. GARCIA MORENO, J.; MALDONADO, A.; ARROYAVE, R.; DILLON, J.R.; VILLALOBOS, D. *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinasa en Chile. **Bol. Inst. Salud Publica Chile**, 24:9-11, 1983.
91. GEDEBOU, M. & TASSEW, A. Penicillin and tetracycline susceptibility of gonococci from Addis Ababa and incidence of penicillinase-producing strains. **J. Trop. Med. Hyg.**, 90:301-5, 1987.
92. GENCO, C.A.; KNAPP, J.S.; CLARK, V.L. Conjugation of plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* to other *Neisseria* species: potencial reservoirs for the Beta-lactamase plasmid. **J. Infect. Dis.**, 150:397-401, 1984.
93. GHERUNPONG V.; LEELAPORN, A.; SRIYOSACHATI, S. Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* among female patients in Siriraj Hospital, 1981. **J. Med. Assoc. Thai.**, 65:172-4, 1982.
94. GIVAN, K.F. & JAEGER, R. Auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from heterosexual men, homosexual men, and heterosexual women. **Sex. Transm. Dis.**, 13:19-23, 1986.
95. GOH, B.T.; RODIN, P.; JOHNSTON, N.A.; WONG, H.H.Y. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*: epidemiology, antimicrobial susceptibility and plasmid types. **J. Infect.**, 1:63-9, 1985.
96. GOH, C.L.; MEIJA, P.; SING, E.H.; RAJAN, V.S.; THIRMOORTHY, T. Chemoprophylaxis and gonococcal infections in prostitutes. **Int.J. Epidemiol.**, 13:344-6, 1984.

97. GOUBY, A.; BORURG, G.; RAMUZ, M.. Previously undescribed 6,6 kilobase R plasmid in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 29:1095-7, 1986.
98. GREAVES, W.L.; RODRIGUES, L.M.; ANDERSON, B.; BIDDLE, J.; WITTINGTON, W.L. Outbreak of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* with an African connection. **South. Med. J.**, 79:420-3, 1986.
99. GUEGUEN, A.; PECARRERE, J.L.; RIBOT, J.J. *Neisseria gonorrhoeae* a Madagascar. Sensibilité aux antibiotiques. Recherche de souches productrices de Béta-lactamase. **Arch. Inst. Pasteur Madagascar**, 47:65-85, 1978.
100. GUERRY, P.; LE BLANC, D.J.; FALKOW, S. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. **J. Bacteriol.**, 116:1064-6, 1973.
101. GUTIÉRREZ, H.; SUÁREZ, G.; MENDEZ, S.; MARTÍNEZ, A.; CABRERA, D. Circulación de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* productora de Beta-lactamasa en Cuba. **Enferm. Transm. Sex.**, 4:143-5, 1990.
102. GUTHE, T. Present status of gonorrhoea control. **Postgrad. Med. J.**, 48 (suppl. 1): 7-11, 1972.
103. HAGBLUM, P.; KORCK, C.; JONSSON, A-B; NORMARK, S. Intragenic variation by site-specific recombination in the cryptic plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Bacteriol.**, 167:231-7, 1986.
104. HANDSFIELD, H.H.; KNAPP, J.S.; DIEHR, P.K.; HOLMES, K.K. Correlation of auxotype and penicillin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* with sexual preference and clinical manifestations of gonorrhea. **Sex. Transm. Dis.**, 7: 1-5, 1980.
105. HARRISON, W.O. Antibiotic resistant gonorrhea. **Cutis**, 33:81-3, 1984.

106. HARTLEY, D.L.; JONES, K.R.; TOBIAN, J.A.; LE BLANC, D.J.; MACRINA, F.L. Disseminated tetracycline resistance in oral streptococci: implication of a conjugative transposon. **Infect. Immun.**, 45:13-7, 1984.
107. HASTING, J.R.; HEMMING, V.G.; WALLER, T.; BETTINGER, J.; SCHULTENOVER, S.; SORRELLS, T.; ASHFRD, W.A. Incidence of Beta lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in a select population. **Am. J. Obstet. Gynec.**, 130: 733-4, 1978.
108. HEALTH AND WELFARE CANADA. Penicillinase-producing and chromosomally-mediated penicillin-resistant gonococci in Canada - 1984. **Can. Dis. Wkly Rep.**, 11:81-4, 1985.
109. HEFFRON, R.; RUBENS, C.; FALKOW, S. Transportation of a plasmid DNA sequence that mediates ampicillin resistance: identify of laboratory-constructed plasmids and clinical isolates. **J. Bacteriol.**, 129:530-3, 1977.
110. HENDRY, A.T. & STEWART, I.O. Auxonographic grouping and typing of *Neisseria gonorrhoeae*. **Can. J. Microbiol.** 25:512, 1979.
111. HOOK III, E.W.; JUDSON, F.N.; HANDSFIELD, H.H.; EHRET, J.M.; HOLMES, K.K.; KNAPP, J.S. Auxotype/serovar diversity and Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in two Mid-Sized American Cities. **Sex. Transm. Dis.**, 14: 141-6, 1987.
112. ISON, C.A.; BINDAYNA, K.M.; WOODFORD, N.; GILL, M.J.; EASMON, C.S.F. Penicillin and cephalosporin resistance in gonococci. **Genitourin. Med.**, 66:351-6, 1990.
113. ISON, C.A.; GEDNEY, J.; EASMON, C.S.F. Chromosomal resistance of gonococci to antibiotics. **Genitourin. Med.**, 63:239-43, 1987.

114. ISON, C.A.; GEDNEY, J.; HARRIS, J.R.W.; EASMON, C.S.F. Penicillinase producing gonococci: a spent force? **Genitourin. Med.**, 62:302-7, 1986.
115. ISON, C.A.; & EASMON, C.S.F. Changes in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolated in London. **J. Med. Microbiol.**, 30:239-44, 1989.
116. JAFFE, H.W.; BIDDLE, J.W.; JOHNSON, S.R.; WIESNER, P.J. Infections due to penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in the United States: 1976-1980. **J. Infect. Dis.**, 144:191-7, 1981.
117. JOHNSON, A.P.; ABECK, D.; WALL, R.A.; MABEY, C.D.W.; TAYLOR-ROBINSON, D. Plasmid content, auxotype and protein-I serovar of gonococci isolated in the Gambia. **Epidemiol. Infect.**, 99:669-4, 1987.
118. JOSHI, R.M. & LAWANDE, R.V. Sensitivity pattern Beta-lactamase screening of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Zaria, Northern Nigeria. **Trop. Geogr. Med.**, 37:74-6, 1985.
119. JOSODIWONDO, S. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Jakarta, Indonesia. **Br. J. Vener. Dis.**, 58:408-9, 1982.
120. KALAIMATHEE, K.K.; KOM, C.L.; NGEOW, Y.F. Plasmid profiles of *Neisseria gonorrhoeae* in peninsular Malaysia. **Microbiol. Immunol.**, 29:921-6, 1985.
121. KAUFMAN, R.E.; JOHNSON, R.E.; JAFFE, H.W.; THORNSBERRY, C.; REYNOLDS, G.H.; WIESNER, P.J.; COOPERATIVE STUDY GROUP. National gonorrhoea therapy monitoring study. **N. Engl. J. Med.**, 294:1-4, 1976.
122. KING, S.D.; BRATHWAITE, A.R.; DILLON, J.R. Treatment of gonorrhoea and susceptibility to antimicrobials of PPNG and non-PPNG strains in Jamaica. **Genitourin. Med.**, 63: 365-70, 1987.

123. KNAPP, J.S.; BYGDEMAN, S.; SENDSTION, E.; HOLMES, K.K. Nomenclature for the serological classification of *Neisseria gonorrhoeae*. In: Schoolnik, G.R.; Brooks, G.F.; Falkow, S.; Frasch, C.E.; Knapp, J.S; Mccutchan, J.A.; Morse, S.A., ed. **The pathogenic Neisseria**. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1985. p.4-5.
124. KNAPP, J.S.; HOLMES, K.K.; BONIN, P.; HOOK III, E.W. Epidemiology of gonorrhoea: distribution and temporal changes in auxotype/serovar classes of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sex. Transm. Dis.**, 14:26-32, 1987.
125. KNAPP, J.S.; JOHNSON, S.R.; ZENILMAN, J.M.; ROBERTS, M.C.; MORSE, S.A. High-level tetracycline resistance resulting from Tet M in strains of *Neisseria* sp, *Kingella denitrificans* and *Eikenella corrodens*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 32: 765-7, 1988.
126. KNAPP, J.S.; Laboratory methods for the detection and phenotypic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains resistant to antimicrobial agents. **Sex. Transm. Dis.**, 15:225-31, 1988.
127. KNAPP, J.S.; TAM, M.R.; NOWINSK, R.C.; HOLMES, K.K; SANDSTROM, E.G. Serological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with use of monoclonal antibodies to gonococcal membrane protein I. **J. Infect. Dis.**, 150:44-8, 1984.
128. KNAPP, J.S.; THORNSBERRY, C.; SCHOOLNICK, G.A.; WIESNER, P.J.; HOLMES, K.K. Phenotypic and epidemiologic correlates of auxotype in *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Infect. Dis.**, 138:160-5, 1978.
129. KNAPP, J.S.; ZENILMAN, J.M.; BIDDLE, J.W.; PERKINS, G.H.; DEWITT, W.E.; THOMAS, M.L.; JOHSON, S.R.; MORSE, S.A. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline. **J. Infect. Dis.**, 155:819-22, 1987.

-
130. KOHL, P.K.; ISON, C.A.; DANIELSSOM, D.; KNAPP, J.S.; PETZOLDT, D. Current status of serotyping of *Neisseria gonorrhoeae*. **Eur. J. Epidemiol.**, 6:91-5, 1990.
131. KOHL, P.K.; KNAPP, J.S.; HOFMANN, J.H.; GRUENDER, K.; PETZOLDT, D.; TAMS, M.R.; HOLMES, K.K. Epidemiological analyses of *Neisseria gonorrhoeae* in the Federal Republic of Germany by auxotyping and serological classification using monoclonal antibodies. **Genitourin. Med.**, 62:45-50, 1986.
132. KORCH, C.; HAGBLOM, P.; OHMAN, H.; GORANSSON, M.; NORMARK, S. Cryptic plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*: complete nucleotide sequence and genetic organization **J. Bacteriol.**, 163:430-8, 1985.
133. LABIDI, A.; MARTIN, P.M.V.; GUIBOURDENCHE, M.; RIOU, J.Y. Surveillance épidémiologique des gonocoques producteurs de Beta-lactamase. II - Caractérisation des plasmides de 66 souches isolées en France (mai 1979-mars 1983). **Pathol. Biol. (Paris)**, 32:1013-8, 1984.
134. LA SCOLEA JR, L.J. & YOUNG, F.E. Development of a defined minimal medium for the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. **Appl. Microbiol.**, 28:70-6, 1974.
135. LATIF, A.S.; SUMMERS, R.S.; MASON, P.R. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Harare, Zimbabwe. **Cent. Afr. J. Med.**, 29:121-2, 1983.
136. LAUGHON, B.E.; EHRET, J.M.; TANINO, T.T. Fluorescent antibody for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Clin. Microbiol.**, 25:2388-91, 1987.
137. LEFEVRE, J.C.; GAUBERT, E; TEMPESTA, M.C.; LARENG, M.B. Surveillance des souches de *Neisseria gonorrhoeae* isolées a Toulouse. Sensibilité aux antibiotiques in vitro et contenus plasmidiques. **Pathol. Biol. (Paris)**, 36:635-8, 1988.

138. LIND, I.; RIOU, J.Y.; SING, E.H.; BENTZON, M.W. Antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*: guidelines for use of the WHO reference strains. (WHO-Monograph). Copenhagen, Serun Institute/WHO, s.d.
139. LOMBARDI, C; SIQUEIRA, L.F.G.; SANTOS Jr., M.F.Q.; FRANCISCO, W.; BELDA, W. *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase: primeira cepa isolada em São Paulo, SP. (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, 19:374-6, 1985.
140. MAGALHÃES, M. *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase no Recife, Brasil. **Rev. Microbiol.**, 18:229-34, 1987.
141. MAGALHÃES, M. Resistência à penicilina em *Neisseria gonorrhoeae*. Recife, 1984. (Tese para Professor Titular - Centro de Ciências da Saúde da UFPe).
142. MAGALHÃES, M. Uretrite causada por *Neisseria gonorrhoeae*, produtora de penicilinase: relato de um caso. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, 20:116-8, 1984.
143. MARTIN, J.E. & LESTER, A. Transgrow, a medium for transport and growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. **Public Health**, 86:30-3, 1971.
144. MASON, P.R. & LATIF, A.S. Penicillinase producing gonococci. **Cent. Afr. J. Med.**, 30:238-41, 1984.
145. MASON, P.R. & GWANZURA, L. Characterisation by plasmid profiles, serogroups, and auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* from Harare, Zimbabwe. **Genitourin Med.**, 64:303-7, 1988.
146. MASON, P.R.; GWANZURA, L.; CHIMBIRA, T.H.K.; MTIMAVALYE, L.; MATHOO, J. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from maternal and child infections in Harare. **Cent. Afr. J. Med.**, 35:367-71, 1989.

-
147. MASON, P.R.; GWANZURA, L.; LATIF, A.S.; MAROWA, E. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Harare, Zimbabwe. **Sex. Transm. Dis.**, 17:63-6, 1990.
148. MASSHOOR, K.; BHUJWALA, R.A.; PANDHI, R.K.; SINGH, O.P.; BHARGAVA, N.C. Susceptibility of *N. gonorrhoeae* to penicillin, ampicillin, tetracycline, erythromycin, cotrimoxazole and supristol. An "in vitro" study. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, 23: 171-5, 1980.
149. MATTHEW, M. Plasmid-mediated Beta-lactamase of Gram-negative bacteria, properties and distribution. **J. Antimicrob. Chemother.**, 5:349-58, 1979.
150. MCMANUS, T.J.; HARRIS, J.R.W.; ISON, C.A.; EASMON, C.J.F. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **N. Engl. J. Med.**, 307:1706, 1982.
151. MEE, B.J.; TURBETT, G.; RICH, G. The epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Western Australia based on antibiotic resistance and plasmid profiles. **J. Antimicrob. Chemother.**, 21, 117-24, 1988.
152. MEMBERS OF THE AUSTRALIAN GONOCOCCAL SURVEILLANCE PROGRAMME. Penicillin sensitivity of gonococci in Australia: development of Australian gonococcal surveillance programme. **Br. J. Vener. Dis.**, 60:226-30, 1984.
153. MEYERS, J.A.; SANCHEZ, D.; ELWELL, L.P.; FALKOW, S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. **J. Bacteriol.**, 127:1529-37, 1976.
154. MILOVANOVIC, A.; SEEDNAOUI, P.; CATALAN, F. Gonocoques 89: premieres résistances aux tetracyclines. **Nouv. Dermatol.**, 8:644-5, 1989.

155. MINSHEW, B.H.; BEARDSLEY, J.L.; KNAPP, J.S. Evaluation of Crono Gen coagglutination test for serodiagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Identification of problem isolates by auxotyping, serotyping, and with a fluorescent antibody reagent. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 3:41-5, 1985.
156. MONAYAR, H.K.; LEDESMA, A.; NOBILE, V.; VIARENGO, J.A. Epidemiology and treatment of uncomplicated gonorrhoeae caused by non-PPNG strains in Córdoba, Argentina: auxotypes, susceptibility profiles, and plasmid analyses of urethral isolates from men. **Genitourin. Med.**, 63:246-9, 1987.
157. MONTGOMERY, K.; RAYMOND JR., L.; DREW, W.L. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, 9:205-7, 1979.
158. MONTI, M.; CAVICCHINI, S.; BERTI, E.; ALESSI, E. Ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* resistenti alla penicillina e penicillinasi-produttori. **G. Ital. Derm. Vener.**, 119:305-8, 1984.
159. MORSE, S.A.; LYSKO, P.G.; McFARLAND, L.; KNAPP, J.S.; SANDSTROM, E.; CRITCHLOW, C.; HOLMES, K.K. Gonococcal strains from homosexual men have outer membranes with reduced permeability to hydrophobic molecules. **Infect. Immun.**, 37:432-8, 1982.
160. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance standards antimicrobial susceptibility testing: Third informational supplement. M-100, 53. NCCLS. Villa Nova, PA, 1991.
161. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Tentative standard, M7-T2, 8. NCCLS. Villa Nova, PA, 1988.

-
162. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard: M7-A, 5. NCCLS. Villa Nova, PA, 1985.
163. NOBLE, R.C. & MILLER, B.R. Auxotypes and antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in black and white patients. **Br. J. Vener. Dis.**, 56:26-30, 1980.
164. O'CALLAGHAN, C.H.; MORRIS, A.; KIRBY, S.M.; SHINGLER, A.H. Novel method for detection of Beta-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 1:283-8, 1972.
165. OBASEIKI-EBOR, E.E.; OYAIDE, S.M.; OKPERE, E.E. Incidence of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) strains and susceptibility of gonococcal isolates to antibiotics in Benin City, Nigeria. **Genitourin. Med.**, 61:367-70, 1985.
166. ODUGBEMI, T.O. In vitro antibiotic sensitivity of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Lagos-Nigeria. **East. Afr. Med. J.**, 58:691-4, 1981.
167. ODUGBEMI, T.O.; WHITTINGTON, W.L.; DEWITT, W.; PERKINS, G.; JOHNSON, S.; BIDDLE, J.; PIZIAK, M.; ALBRITTON, W.L. Epidemiological characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from the Far East. **Br. J. Vener. Dis.**, 59:285-8, 1983.
168. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). *Neisseria gonorrhoeae*. Resistencia a multiples antibioticos. **Bol. Epidemiol.**, 6:7-10, 1985.
169. ORIEL, J.D. Public health aspect of sexually transmitted diseases. **Public Health. Rev.**, 12:131-57, 1984.

170. OSATO, K.; TSUGAMI, M.; HARADA, K.; MARUYAMA, J. Incidence of gonorrhoea due to penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Japan 1981-3, and treatment using a new antibiotic combination, BRL 25000 (amoxycillin and Clavulanic acid). **Genitourin. Med.**, 62:158-62, 1986.
171. OSOBA, A.O.; JOHNSON, N.A.; OGUMBANJO, B.O.; OCHEI, J. Plasmid profile of *Neisseria gonorrhoeae* in Nigeria and efficacy of spectinomycin in treating gonorrhoea. **Genitourin. Med.**, 63:1-5, 1987.
172. OSOBA, A.O.; ROTOWA, N.A.; OGUNBANJO, B.O.; OCHEI, J. Review of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Idaban, Nigeria, and their susceptibility to antibiotics. **Eur. J. Sex. Transm. Dis.**, 1:145-8, 1984.
173. OTTH, L.; WILSON, G.; ZAROR, L. Sensibilidad de *Neisseria gonorrhoeae* a seis drogas antimicrobianas. **Rev. Chil. Tecnol. Med.** 6: 217-20, 1983.
174. PARISER, H.; MARINO, A.F.; HAND, C. Analysis of a recent epidemic due to penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*: epidemiologic and medical considerations. **Sex. Transm. Dis.**, 9:132-4, 1982.
175. PATO, M.V.; PIRES, I.R.; VAN KLINGEREN, B.; ROSA, D.L.H. *Neisseria gonorrhoeae* productrices de pénicillinase (NGPP) isolées à Lisbonne 1982-1987. **Pathol. Biol. (Paris)**, 36:639-42, 1988.
176. PEETERS, M.; FROST, E.H.; COLLET, M.; OSSARI, S.; YUERT, F.; IVANOFF, B. Changing Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Francville-Gabon. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31:1288-90, 1987.
177. PERCIVAL, A.; CORKILL, J.E.; ARYA, O.P.; ROWLANDS, J.; ALERGANT, C.D.; REES, E.; ANNELS, E.H. Penicillinase-producing gonococci in Liverpool. **Lancet**, 2:1379-82, 1976.

178. PERINE, P.L.; MORTON, R.S.; PIOT, P.; SIEGEL, M.S.; ANTAL, G.M. Epidemiology and treatment of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Sex. Transm. Dis.**, 6 (suppl.2):152-8, 1979.
179. PHILLIPS, I. Beta-lactamase-producing, penicillin resistant gonococcus. **Lancet**, 2:656-7, 1976.
180. PIOT, P.; VAN DICK, E.; COLAERT, J.; URSI, J.P.; BOSMANS, E.; MEHEUS, A. Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* strains from Europe and Africa. **Antimicrob. Agents Chemother.** 15: 535-9, 1979.
181. PIZIAK, M.V.; WOODBURY, C.; BERLINER, D.; TAKAFUJI, E.; KIRKPATRICK, J.; OPAL, S.; TRATMONT, E. Resistance trends of *Neisseria gonorrhoeae* in the Republic of Korea. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 25:7-9, 1984.
182. PLUMMER, F.A. & BRUNHAM, R.C. Gonococcal recidiving, diversity, and ecology. **Rev. Infect. Dis.** 9:846-59, 1987.
183. RAJAN, V.S.; THIRUMOORTHY, T.; TAN, N.J. Epidemiology of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Singapore. **Br. J. Vener. Dis.**, 57:158-61, 1987.
184. RATNAM, A.V.; PATEL, M.I.; MULENGA, R.C.; HIRA, S.K. Penicillinase-producing gonococcal strains in Zambia. Observations on treatment failures. **Br. J. Vener. Dis.**, 58:29-31, 1982.
185. RELLOGG Jr., D.S.; HOLMES, K.K.; HILL, G.A. **Laboratory diagnosis of gonorrhoeae**. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1976. (CUMITECH 4).
186. RIOU, J.Y.; MARTIN, P.M.V.; GUIBOURDENCHE, M. Surveillance épidémiologique des gonocoques producteurs de Beta-lactamase. I - Auxotypage de 83 souches isolées en France (mai 1979-avril 1983). **Presse Med.**, 13:1133-6, 1984.

187. RIOU, J.Y.; PRERE, M.F.; PEAN, Y; GHNASSIA, J.C.; THABAUTA, A.; MEYRAM, M.; CASIN, I.; DUTILH, B.; CARBONNELLE, B.; PINON, G; FELTEN, A.; GUIBOURDENCHE, M. Caracteristiques des soreches de *Neisseria gonorrhoeae* productrices de penicillinase isolées en France de 1979. **Pathol. Biol.** (Paris), 33:791-5, 1987.
188. ROBERTS M.C. Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2:518-23, 1989.
189. ROBERTS, M. & FALKOW, B. Conjugal transfer of R plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. **Nature**, 266:630-1, 1977.
190. ROBERTS, M.; EWELLL, L.P.; FALKOW, B. Molecular characterization of two Beta-lactamase specifying plasmids isolated from *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Bacteriol.**, 131:557-63, 1977.
191. ROBERTS, M.C. & KENNY, G.E. Dissemination of the Tet M tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 29:350-2, 1986.
192. ROBERTS, M.C. & KNAPP, J.S. Host range of the conjugative 25,2 Megadalton tetracycline resistance plasmid from *Neisseria gonorrhoeae* and related species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 32:488-91, 1988.
193. ROBERTS, M.C. & KNAPP, J.S. Transfer frequency of various 25,2 Mda tetracycline resistance plasmids in *Neisseria gonorrhoeae*. **Sex. Transm. Dis.**, 16:91-4, 1989.
194. ROBERTS, M.C. & MONCLA, B.J. Tetracycline resistance and Tet M in oral anaerobic bacteria, *Neisseria perflava* and *Neisseria sicca*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 32:1271-3, 1988.
195. ROBERTS, M.C.; HILLIER, S.L.; HALE, J.; HOLMES, K.K.; KENNY, C.E. Tetracycline resistance and Tet M in pathogenic urogenital bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 30:810-2, 1986.

196. ROBERTS, M.C.; KOUTSKY, L.A.; HOLMES, K.K.; LE BLANC, D.J.; KENNY, G.E. Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal Tet M sequences. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 28:141-3, 1985.
197. ROBERTS, M.C.; WAGENVOORT, J.H.T.; VAN KLINGEREN, B.; KNAPP, J.S. Tet M and Beta-lactamase containing *Neisseria gonorrhoeae* (tetracycline resistant and penicillinase producing in the Netherlands). **Antimicrob. Agents Chemother.**, 32:158-60, 1988.
198. RODRIGUEZ, J.; FLUXENCH-CHIESA, Z.; RONDA, C.H.R.; KOURI, Y.; CUEVAS, R.; NEVAREZ, M.; PEREZ, M. "In vitro" susceptibility of 50 Non-Beta-lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains to 12 antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 23: 242-4, 1983.
199. ROMANOWSKI, B.; SUTHERLAND, R.; AMAND, C.M. Epidemic of gonorrhoea due to penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Can. Med. Assoc. J.**, 127:1201-3, 1982.
200. SANDSTROM, E.G. & DANIELSON, D.. Serology of *Neisseria gonorrhoeae* classification by coagglutination. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 88:27-38, 1980.
201. SANDSTRON E.G.; LINDEL, P.; HARFAST, B.; BLOMBERG, F.; RYDEN, A.C.; BYGDEMANI, S. Evaluation of a new set of *Neisseria gonorrhoeae* serogroup W-specific monoclonal antibodies for serovar determination. In: Schoolnik, G.R.; Brooks, G.F.; Falkow, S.; Frasch, C.E.; Knapp, J.S; Mccutchan, J.A. & Morse, S.A., ed. **The pathogenic Neisseria**. Washington, D.C. American Society for Microbiology, 1985. p.26-30.

-
202. SANDSTRON, E.G.; CHEN, K.C.B.; BUCHANAN, T.M. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: coagglutination serogroups WI e WII/WIII correspond to different outer membrane protein I molecules. **Infect. Immun.**, 38:462-70, 1982.
203. SANDSTRON, E.G.; KNAPP, J.S.; BUCHANAN, T.M. Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: W-antigen serogrouping by coagglutination and protein I antigens. **Infect. Immun.**, 35:229-36, 1982.
204. SARAFIAN, S.R. & KNAPP, J.S. Molecular epidemiology of gonorrhea. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2 (suppl.):549-55, 1989.
205. SASTROWIDJOJO, H. & IDAJADI, A. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* among prostitutes in Surabaya. **Br. J. Vener. Dis.**, 59:98-9, 1983.
206. SCHWARZ, S.K.; ZENILMAN, J.M.; SCHNELL, D.; KNAPP J.S.; HOOK III, E.W.; THOMPSON, S.; JUDSON, F.N.; HOLMES, K.K. National surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **JAMA**, 264:1412-7, 1990.
207. SHAW, T. Tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae* (TRNG) - British Columbia. **Can. Dis. Wkly. Rep.**, 12:10-1, 1986.
208. SHMILOVITZ, M. & HAMBURGER, S. Persistence of a high incidence of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in Haifa District. **Isr. J. Med. Sci.**, 19:672-6, 1982.
209. SHTIBEL, R. & TOMA, S. *Neisseria gonorrhoeae*: evaluation of same methods, used for carbohydrate utilization. **Can. J. Microbiol.**, 24:177-81, 1978.
210. SHTIBEL, R. Auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in Toronto: relationship to penicillin resistance and to sex of patient. **J. Med. Microbiol.**, 20:197-202, 1985.

-
211. SHTIBEL, R. Susceptibility pattern in vitro of the penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains. **Can. Med. Assoc. J.**, 121:273-5, 1979.
212. SILVER, P.S. & DARLING, W.M. Penicillin-insensitive gonococci in the Bolton area: preponderance in young women and immigrants. **Br. J. Vener. Dis.**, 47:367-72, 1971.
213. SIMA, A. & MAVEOMMATI, L. Plasmid profile of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. **Eur. J. Epidemiol.**, 3:191-6, 1986.
214. SIMPSON, J.A. & OLIVER, S.P. Beta-lactamase producing isolates of *Neisseria gonorrhoeae* in Cape Town. **S. Afr. Med. J.**, 69:307-8, 1986.
215. SIQUEIRA, L.F.G. O problema da *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase e sua possível ocorrência na cidade de São Paulo. São Paulo. 1987. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP).
216. SIQUEIRA, L.F.G. O laboratório nas doenças sexualmente transmissíveis III. **Bol. Inform. Unión**, 34:3-4, 1984.
217. SIQUEIRA, L.F.G. O laboratório nas doenças sexualmente transmissíveis. **Bol. Inform. Unión**, 32:1-2, 1983.
218. SNG, E.H.; LIM, A.L.; YEO, K.L. Susceptibility to antimicrobials of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Singapore: implications on the need for more effective treatment regimens and control strategies. **Br. J. Vener. Dis.**, 60:374-9, 1984.
219. SNG, E.H.; YEO, K.L.; RAJAN, V.S.; LIM, A.L. Comparison of methods for the detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Br. J. Vener. Dis.**, 56:311-3, 1980.

220. SNG, E.H.; YEO, K.L.; RAJAN, V.S. Simple method for detecting penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus*. **Br. J. Vener. Dis.**, 57:141-2, 1981.
221. SOIBELMAN, M.; AMARAL, L.R.; POLMINI, A.L.F.; LERRER, D.P.; LEITE, S.S. Indicação de medicamentos por balconistas de farmácia em Porto Alegre, RS. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 32:79-83, 1986.
222. SOMPOLINSKY, D.; ABO-AKEL, A.A.; BOLDUR, I.; CAHANA, H. Plasmid prophiles and auxotrophy of *Neisseria gonorrhoeae* from Israel. **Isr. J. Med. Sci.**, 21:69-71, 1985.
223. SPARLING, P.F. Treatment of gonorrhoea: what effect will antibiotic resistance have in the future? **Sex. Transm. Dis.**, 6 (Suppl.):120-5, 1979.
224. SPARLING, P.F.; SURUBBI, F.A.; BLACKMAN, E. Inheritance of low-level resistance to penicillins, tetracycline and chloranphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Bacteriol.**, 124:740-9, 1975.
225. STEERS, E.; FOLTZ, E.L.; GRAVES, B.S.; RIDEN, J. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 9:307-11, 1959.
226. TAM, M.R.; BCHANAN, T.M; SANDSTROM, E.G.; HOLMES, K.K.; KNAPP, J.S.; SIADAR, A.W.; NOWINSKI, R.C. Sorological classification of *Neisseria gonorrhoeae* with monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, 36:1042-53, 1982.
227. TELZAK, E.E.; SPITALNY, K.C.; FAUR, Y.C.; KNAPP, J.S.; GUNN, R.A.; BLUM, S.; SCHULTZ, S. Risk factors for infection with plasmid-mediated high-level tetracycline resistente *Neisseria gonorrhoeae*. **Sex. Trans. Dis.**, 16:132-6, 1989.

228. THIN, R.N.; BARLOW, D.; EYKYN, S.; PHILLIPS, I. Imported penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* becomes endemic in London. **Br. J. Vener. Dis.**, 59:364-8, 1983.
229. THOMSON, K.S. Penicillinase-producing strains. **Med. J. Aust.**, 1:676, 1977.
230. THORNSBERRY, C. Detection of B-lactamase in *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. Batavia, Ill., The National Center for Continuing Education, s.d. (CDC 80 - 42).
231. TUPASI, T.E.; CALUBIRAN, O.V.; TORRES, C.A. Single oral dose of cefaclor for the treatment of infections with penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Br. J. Vener. Dis.**, 58:176-9, 1982.
232. URABE, S.; YOSHIDA, S.C.; MIZUGUCHI, Y. Epidemiology and treatment of gonorrhoea caused by penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Fukuoka, Japan. **Br. J. Vener. Dis.**, 59:37-40, 1983.
233. VAN DYCK, E.; ROSSAY, R.; DUHAMEL, M.; BEHETS, F.; LAGA, M.; MZILA, M.; BYGDEMAM, S.; VAN HEDVERSWIJM, H.; PIOT, P. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Zaire: high level, plasmid-mediated tetracycline resistance in Central Africa. **Genitourin. Med.**, 68:11-6, 1992.
234. VAN EMBDEM, J.D.A.; DESSENS, M.; VAN KLINGEREN, B. A new Beta-lactamase plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 15:247-58, 1985.
235. VAN EMBDEN, J.D.A.; VAN KLINGEREN, B.; DESSENS-KROON, M.; VAN WIJNGAARDEN, L.J. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherland: Epidemiology and Genetic and Molecular Characterization of their plasmids. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 18:789-97, 1980.

236. VAN KLINGEREN, B.; VAN WIJNGAARDEN, L.J.; DESSENSKROON, M.; VAN EMBDEN, J.D.A. Penicillinase-producing gonococci in the Netherlands in 1987. **J. Antimicrob. Chemother.**, 1:15-20, 1983.
237. VAN PARIJS, L.G. No hay de que avergonzarse. **Salud mund.**, (mayo):20-5, 1975.
238. VAZQUEZ, J.; FENOLL, A.; BERRON, S.; TELLEZ, A.; BILBAO, R. Penicillinase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Madrid. **Genitourin. Med.**, 61:139-40, 1985.
239. WAGHORN, D.J.; AZADIAN, B.S.; TALBOYS, C. "In vitro" activity of selected antimicrobial agents against penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) and non-PPNG strains. **Genitourin. Med.**, 62: 373-6, 1986.
240. WAITKINS, S.A. & ANDERSON, R.D. Failure of the fluorescent antibody reaction to identify penicillinase-producing gonococci. **J. Clin. Pathol.**, 35:215-8, 1982.
241. WANG, S.P.; HOLMES, K.R.; KNAPP, J.S.; OTT, S.J.; KYZER, D.D. Immunologic classification of *Neisseria gonorrhoea* with Immunofluorescence. **J. Immunol.**, 119:794-803, 1977.
242. WASHINGTON II, J.A. Susceptibility tests Agar Dilution. In: Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J.; Shadomy, H.J., ed. **Manual of clinical microbiology**. 4th ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1985. p.967-71.
243. WAUGH, M.A.; LACEY, C.J.N.; HAWKEY, P.M.; HERITAGE, J.; TURNER, A.; JEPHCOTT, A.E. Spread of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to tetracycline outside the United States of America. **Br. Med. J.**, 296:898, 1988.
244. WICKREMESINGHE, R.S.B. & RODRIGO, H.T. Penicillinase producing gonococci in Srilanka. **Ceylon Med. J.**, 27:185-8, 1982.

-
245. WIESNER, P.J. Penicillin-resistant gonococci: result of plasmid promiscuit. **South Med. J.**, 70:769-70, 1977.
246. WIESNER, P.J.; HANDSFIELD, H.H.; HOLMES, K.K. Low antibiotic resistance of gonococci causing disseminated gonococcal infection. **N. Engl. J. Med.**, 288:1221-4, 1973.
247. WILLCOX, R.R. A survey of problems in the antibiotic treatment of gonorrhea, with special reference to South-East Asia. **Br. J. Vener. Dis.**, 46:217-42, 1980.
248. WOODFORD, M.; BINDAYNA, K.M.; EASMAM, C.S.F.; ISON, C.A. Associations between serotype and susceptibility to antibiotic of *Neisseria gonorrhoeae*. **Genitourin. Med.**, 65:86-91, 1989.
249. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Neisseria gonorrhoeae* producing Beta-lactamase (Penicillinase). **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 52:357-9, 1977.
250. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Neisseria gonorrhoeae*. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 60:73-4, 1985.
251. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG). **Wkly. epidemiol. Rec.**, 62:51, 1987.
252. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sexually transmitted diseases surveillance. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 58:183-5, 1983.
253. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sexually transmitted diseases. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 61:94-6, 1986.
254. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sexually transmitted diseases. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 61:97-8, 1985.
255. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Surveillance of Beta-lactamase-producing *N. gonorrhoeae* (PPNG). **Wkly. Epidem. Rec.**, 58:5-7, 1983.

256. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Surveillance of Beta-lactamase-producing *N. gonorrhoeae* (PPNG). **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 58:373-4, 1983.
257. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Surveillance of *Neisseria gonorrhoeae*. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 57:384-5, 1982.
258. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Surveillance of *Neisseria gonorrhoeae*. **Wkly. epidemiol. Rec.**, 59:48-9, 1984.
259. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Surveillance of *N. gonorrhoeae* producing Beta-lactamase. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 56:77-9, 1981.
260. WYFFELS, A.; HAEGEMAN, F.; MEHEUS, A. Prevalence de *Neisseria gonorrhoeae* productrices de penicillinase et traitement de la gonococcie au Niger. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, 65:363-7, 1985.
261. YEUNG; R-H.; DILLON, J.R.; PAUZE, M.; WALLACE, E. A move 4,9 kilobase plasmid associated with an outbreak of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Infect. Dis.**, 153:1162-5, 1986.
262. YOSHIDA, S.I.; URABE, S.; MIZUGUCHI, Y. Antibiotic sensitivity patterns of penicillinase-positive and penicillinase-negative strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Fukuoka, Japan. **Br. J. Vener. Dis.**, 58:305-7, 1982.
263. YOUNG, H.; MOYES, A.; ROBERTSON, D.H.H.; MCCARTNEY, A. C.; LINDSAY, G.; GALLACHER, G.; TAIT, I.B.; BROGAN, O.; FOX, C.; KOHIYAR, G.A.; PARRATI, D.; ALEXANDER, I. Gonococcal infection within Scotland: antigenic heterogeneity and antibiotic susceptibility of infecting strains. **Eur. J. Epidemiol.**, 6:1-8, 1990.
264. YVERT, F.; FROST, E.; GUIBOURDENCHE, M.; RIOU, J.Y.; IVANOFF, B. Auxotypes and serogroups of penicillinase producing and non-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Franceville, Gabon. **Genitourin. Med.**, 61:99-102, 1985.

-
265. ZAIDI, A.A.; ARAL, S.O.; REYNOLDS, G.H.; BLOUNT, J.H.; JONES, O.G.; FIGHTHER, R.R. Gonorrhoea in the United States: 1967-1979. **Sex. Transm. Dis.**, 10:72-6, 1983.
266. ZAJDOWICZ, T.R.; SANCHES, P.L.; BERG, S.W.; KERBS, S.B.J.; NEWQUIST, R.L.; HARRISON, N.O. Comparison of ceftriaxone with cefoxitin in the treatment of penicillin-resistant gonococcal urethritis. **Br. J. Vener. Dis.**, 59:176-83, 1983.
267. ZENILMAN, J.M.; NIMS, L.J.; MENEGUS, M.A.; MOLTE, F.; KNAPP, J.S. Spectinomycin-resistant gonococcal infections in United States. **J. Infect. Dis.**, 156:1002-4, 1987.
268. ZENILMAN, J.M.; WHITTINGTON, W.L.; FRAZIER D.; REICE, R.J.; KNAPP, J.S. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Dade County, Florida: Phenotypic characterization of isolates from 1983, 1984, and 1986. **Sex. Transm. Dis.**, 15:158-63, 1988.

ANEXOS

M100-S3

M7-A2

TABLE 2B MIC Interpretive Standards ($\mu\text{g/mL}$) of Three Categories of Susceptibility for *Neisseria gonorrhoeae*

Antimicrobial Agent	Susceptible	Moderately Susceptible ^a	Intermediate ^b	Resistant
Cefixime ^c	≤ 0.25	—	—	—
Cefotaxime ^c	≤ 0.5	—	—	—
Cefotetan	≤ 2	—	4	≥ 8
Cefoxitin	≤ 2	—	4	≥ 8
Ceftazidime ^c	≤ 0.5	—	—	—
Ceftriaxone ^c	≤ 0.25	—	—	—
Cefuroxime	≤ 1	2	—	≥ 4
Enoxacin ^c	≤ 0.5	—	—	—
Ofloxacin ^c	≤ 0.25	—	—	—
Penicillin	≤ 0.06	0.12–1	—	≥ 2
Spectinomycin	≤ 32	—	64	≥ 128
Temafloxacin ^c	≤ 0.25	—	—	—
Tetracycline	≤ 0.25	0.5–1	—	≥ 2

NOTE: Information in boldface type is considered tentative for one year.

FOOTNOTES

- a. Moderately susceptible organisms have a documented lower clinical cure rate (85–95%) compared to >95% for susceptible strains.
- b. An intermediate or indeterminate result for an antimicrobial agent indicates either a technical problem that should be resolved by repeated testing or a lack of clinical experience in treating organisms with these zones or MICs. The latter seems to be the case for cefotetan, cefoxitin, and spectinomycin.
- c. For these antimicrobial agents, the absence of resistant strains precludes defining any results categories other than susceptible.

NCCLS VOL. 11 NO. 17 December 1991

Fonte: NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 1991. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Third informational supplement M100-S3, NCCLS, Villa Nova, PA.