



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ
FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

MESTRADO ACADÊMICO

**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Neisseria* spp.
ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS EM SALVADOR, BRASIL**

JULIANA COSTA DE ARAÚJO SANTOS

**Salvador – Bahia
2021**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ
FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Neisseria* spp.
ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS EM SALVADOR, BRASIL**

JULIANA COSTA DE ARAÚJO SANTOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Leila Carvalho Campos
Co-orientador: Dr. Pablo Ivan Pereira Ramos

**Salvador – Bahia
2021**

“SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Neisseria* spp. ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS EM SALVADOR, BRASIL”.

JULIANA COSTA DE ARAÚJO SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 06 de abril de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Suzana Ramos Ferrer

Dra. Suzana Ramos Ferrer
Professora Adjunta
EBMSP

Soraia Machado Cordeiro

Dra. Soraia Machado Cordeiro
Professora Adjunta
UFBA

Adriano Queiroz Silva

Dr. Adriano Queiroz Silva
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, pelo apoio e incentivo. Todos foram muito importantes na minha criação e desenvolvimento, sempre me ensinando a ser um ser humano determinado que vai em busca de seus objetivos e que mantem o respeito ao outro.

A comunidade científica por estar sempre gerando conhecimentos científicos à sociedade, possibilitando descobrir fatos do passado, presente e futuro, além de contribuir para a qualidade de vida dos indivíduos com o desenvolvimento de tecnologias e informações que geram alicerces para promoção, prevenção e recuperação da saúde.

A minha orientadora, Leila Campos, e a Viviane Ferreira, que confiaram em meu potencial e me permitiram adentrar no campo da pesquisa científica e me ensinaram muito sobre Microbiologia, Epidemiologia e Biotecnologia. Com elas aprendi a seguir com determinação, comprometimento com o meu trabalho, visando não só o crescimento profissional como as contribuições que poderei alcançar para a saúde pública. Além delas, também expresso minha gratidão à Ítalo Ferreira, José Neto, Pablo Ivan e Lucas Gentil, que me incentivaram, me forneceram conhecimentos e apoio nos experimentos, destacaram meus pontos fortes e, de modo sincero, me ajudaram a reconhecer minhas falhas e melhorá-las a fim de contribuir para meu crescimento profissional e pessoal.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em especial ao Instituto Gonçalo Moniz, e ao Núcleo de Pesquisa e Inovação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, nas pessoas de Amancio Souza e Jacqueline Silva, que me receberam como estudante de iniciação científica, disponibilizando a estrutura, insumos e apoio necessários para realização da minha pesquisa e contribuíram para que eu agregasse conhecimentos fundamentais à minha formação acadêmica.

Às demais instituições e órgãos públicos que possibilitaram a realização desta pesquisa, o Ministério da Saúde e a Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia.

SANTOS, Juliana Costa de Araújo. Susceptibilidade antimicrobiana em cepas de *Neisseria* spp. isoladas de portadores assintomáticos em Salvador, Brasil – Dissertação de mestrado – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As espécies do gênero *Neisseria* colonizam a orofaringe de humanos e de muitos animais. Porém, apenas *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* são bem estabelecidas como patógenos humanos. Essa colonização assintomática permite que espécies patogênicas e comensais, como *N. lactamica*, coabitem no mesmo nicho, facilitando a captação de DNA e a transferência horizontal de genes, havendo a possibilidade de gerar desde imunidade contra os meningococos a formar cepas invasivas multirresistente. **OBJETIVO:** Descrever características de resistência aos antimicrobianos, do ponto de vista fenotípico e genotípico, de cepas circulantes de *Neisseria* spp. isoladas de portadores assintomáticos, em Salvador, Bahia. **MATERIAL E MÉTODOS:** Um total de 169 amostras de *Neisseria* spp. foram incluídas no estudo, compreendendo as espécies *N. meningitidis* ($n=105$), *N. lactamica* ($n=57$), *N. gonorrhoeae* ($n=3$), 3 *N. subflava* ($n=3$) e *N. polysaccharea* ($n=1$). Essas amostras foram isoladas de material de orofaringe de estudantes de 11 a 24 anos de idade, em 2014 e 2016. O método de microdiluição em caldo, para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de 10 agentes antimicrobianos, foi realizado em 140 isolados de *N. meningitidis* ($n=86$) e *N. lactamica* ($n=54$), empregando os critérios de interpretação do CLSI, EUCAST e BrCAST. Além disso, através da análise das sequências do genoma completo disponíveis, foi realizado um estudo filogenético e investigada a presença de genes de resistência a antibióticos em 153 isolados de *Neisseria* spp. **RESULTADOS:** Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos mostraram que 12,8% ($n=11/86$) dos isolados de *N. meningitidis* apresentaram susceptibilidade reduzida para até quatro antibióticos. As amostras de *N. lactamica* foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, embora todas as amostras tenham demonstrado a presença dos genes *penA*, *gyrA*, *rpoB*, *folP*, e/ou de genes de resistência associados à bomba de efluxo (genes *farABR*, *mtrCDER* e *macAB*). **CONCLUSÕES:** Neste estudo, a presença de genes de resistência não esteve diretamente associada à expressão de resistência aos antibióticos. No entanto, a possibilidade de troca genética entre espécies de *Neisseria* demonstrou a importância da realização de estudos contínuos para investigar a dinâmica do perfil de suscetibilidade de espécies de *Neisseria* como *N. meningitidis* para possibilitar um tratamento eficiente das doenças associadas a essas bactérias.

Palavras-chave: *Neisseria* spp.; *Neisseria meningitidis*; *Neisseria lactamica*; susceptibilidade antimicrobiana; concentração inibitória mínima; genômica.

SANTOS, Juliana Costa de Araújo. Antimicrobial susceptibility in *Neisseria* spp. strains isolated from asymptomatic carriers in Salvador, Brazil – Masters dissertation – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Neisseria* species are commonly found as part of the commensal microbiota in the upper respiratory tract of humans and many animals. Nevertheless, *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* are quite common as human pathogens. The asymptomatic colonization allows pathogenic and commensal species, such as *N. lactamica*, to cohabit in the same niche, facilitating the uptake of DNA and horizontal transfer of genes, which may allow the generation of immunity against meningococci and multiresistant invasive strains. **AIM:** To describe antimicrobial resistance characteristics, from the phenotypic and genotypic point of view, of circulating strains of *Neisseria* spp. isolated from asymptomatic carriers in Salvador, Bahia. **MATERIAL AND METHODS:** A total of 169 *Neisseria* spp. were included in the study, comprising the species *N. meningitidis* (n=105), *N. lactamica* (n=57), *N. gonorrhoeae* (n=3), *N. subflava* (n=3) and *N. polysaccharea* (n=1). These samples were isolated from oropharyngeal material of 11- to 24-year-old students in 2014 and 2016. The broth microdilution method, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 antimicrobial agents, was performed on 140 isolates of *N. meningitidis* (n=86) and *N. lactamica* (n=54), using the CLSI, EUCAST and BrCAST interpretation criteria. Furthermore, through the analysis of available complete genome sequences, a phylogenomic study was carried out and the presence of antibiotic resistance genes was investigated in 153 *Neisseria* spp. **RESULTS:** Antimicrobial susceptibility tests showed that 12.8% (n=11/86) of *N. meningitidis* isolates had reduced susceptibility to up to four antibiotics. The samples of *N. lactamica* were sensitive to all antimicrobials tested, although all samples demonstrated the presence of the genes *penA*, *gyrA*, *rpoB*, *folP*, and/or resistance genes associated with the efflux pump (genes *farABR*, *mtrCDER* and *macAB*). **CONCLUSIONS:** In this study, the presence of resistance genes was not directly associated with the expression of antibiotic resistance. However, the possibility of genetic exchange between *Neisseria* species demonstrated the importance of conducting continuous studies to investigate the dynamics of the susceptibility profile of *Neisseria* species such as *N. meningitidis* to enable an efficient treatment of diseases associated with these bacteria.

Keywords: *Neisseria* spp.; *Neisseria meningitidis*; *Neisseria lactamica*; antimicrobial susceptibility; minimal inhibitory concentration; genomics.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Membros do gênero <i>Neisseria</i>	22
Quadro 2	Genes pesquisados nos genomas de <i>Neisseria</i> spp.	34
Quadro 3	Descrição dos polimorfismos associados a substituições de aminoácidos em PBPs pesquisados nos genomas de <i>Neisseria</i> spp.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil de susceptibilidade das cepas de <i>Neisseria lactamica</i> isoladas de portadores assintomáticos.....	42
Tabela 2	Perfil de susceptibilidade das cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> isoladas de portadores assintomáticos.....	43
Tabela 3	Perfil das cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> que apresentaram susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos.....	44
Tabela 4	Distribuição dos genes de resistência identificados em cepas de <i>Neisseria</i> spp.....	45
Tabela 5	Distribuição dos polimorfismos de PBPs em cepas de <i>Neisseria</i> spp.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição dos isolados de <i>Neisseria</i> spp. na realização das análises do estudo.....	30
Figura 2	Árvore filogenética (à esquerda) construída a partir do genoma core compartilhado entre as cepas de <i>Neisseria</i> estudadas. À direita, metadados compilados para cada uma das cepas, constando a presença ou ausência de genes acessórios de interesse nestes genomas, e informações sobre o indivíduos assintomáticos a partir dos quais foram isolados <i>Neisseria</i> spp. em Salvador.....	48
Figura 3	Árvore filogenética de máxima verossimilhança construída a partir das sequências do gene <i>penA</i> entre as espécies de <i>Neisseria</i> estudadas.....	49
Figura 4	Rede filogenética, construída usando o método de decomposição de splits, das sequências do gene <i>penA</i> entre as espécies de <i>Neisseria</i> estudadas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AMP	Ampicilina
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
AZM	Azitromicina
BHI	Caldo Infusão de Cérebro-coração
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CAMHB	<i>Cation Adjusted Muller-Hinton Broth</i>
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
cc	Complexo Clonal
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIP	Ciprofloxacina
CL	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRO	Ceftriaxona
DMI	Doença Meningocócica Invasiva
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MEM	Meropenem
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MIC ₅₀	Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados
MIC ₉₀	Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados
MIN	Minociclina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>Ngo</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Nlac</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Nmen</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
PEN	Penicilina
RNA	Ácido Ribonucleico
RIF	Rifampicina
ST	Sequência Tipo
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 DESCRIÇÃO DO GÊNERO <i>Neisseria</i>	18
2.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	23
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 AMOSTRAS DE ESTUDO	29
4.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	30
4.3 ANÁLISE GENÔMICA DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	31
4.3.1 Identificação dos genes de resistência.....	31
4.3.2 Identificação de polimorfismos das proteínas de ligação à penicilina (PBP1 e PBP2)	35
4.3.3 Confirmação das espécies de <i>Neisseria</i> via informação genômica	35
4.3.4 Reconstruções de árvores e redes filogenéticas.....	36
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
4.5 ASPECTOS ÉTICOS	37
5 RESULTADOS	38
5.1 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	38
5.2 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E POLIMORFISMOS EM PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À PENICILINA (PBPS).....	39
5.3 ANÁLISE PAN-GENÔMICA E FILOGENÉTICA.....	40
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

APÊNDICE 1	73
APÊNDICE 2	74

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Neisseria* é composto por cerca de 30 espécies que apresentam como habitat natural as membranas mucosas de animais e do ser humano. Dentre estas espécies de diplococos gram-negativos, apenas *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* são bem estabelecidas como patógenos de humanos (ELIAS; FROSCHE; VOGEL, 2019). *N. gonorrhoeae* é o agente causador da gonorreia, que está evoluindo, nos últimos anos, para uma bactéria multirresistente (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016) e pode se tornar intratável devido a sua resistência a todas as classes de antimicrobianos disponíveis para o tratamento das infecções (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016). *N. meningitidis* (meningococo), habita normalmente o trato respiratório superior humano e, ocasionalmente, pode invadir a corrente sanguínea do hospedeiro previamente saudável, provocando a doença meningocócica invasiva (DMI) (SCHOEN et al., 2014; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

Tanto *N. meningitidis* (*Nmen*) quanto *N. gonorrhoeae* (*Ngo*) podem colonizar a faringe de forma assintomática. Isso permite que *Nmen* e *Ngo* coabitem nichos habitados por espécies comensais como *Neisseria lactamica* (*Nlac*). A prevalência de portadores de *Nmen* no Brasil é em média de 11,3%, porém varia entre 4,9% e 21,5% (DE MORAES et al., 2015; GIOIA et al., 2015; NUNES et al., 2016; SAFADI et al., 2014). Foi encontrado na literatura um único estudo brasileiro relatando a prevalência de portadores de *Nlac* no país, identificada em 4,5% (MOURA et al., 2018). Os portadores assintomáticos são transportadores das cepas bacterianas circulantes na comunidade, as quais podem sofrer processos de transferência horizontal de genes em seu habitat. As espécies do gênero *Neisseria* são naturalmente competentes, uma característica que permite a captação de DNA e a transferência horizontal de genes (TØNJUM; VAN PUTTEN, 2017). Desta forma, as espécies comensais de *Neisseria* são reservatórios e podem colaborar para a troca de informações genéticas, de modo a transferir determinantes de resistência antimicrobiana para *Ngo* e *Nmen* e, assim, contribuir com a propagação de bactérias resistentes e multirresistentes (ITO et al., 2005; SPRATT et al., 1992; WU et al., 2009).

Atualmente no Brasil, a recomendação de antibioticoterapia para casos de DMI pelo Ministério da Saúde inclui a administração de penicilina ou ampicilina em crianças e ceftriaxona tanto para crianças como adultos; sendo indicado para a quimioprofilaxia, o uso de ceftriaxona, ciprofloxacina ou rifampicina (BRASIL, 2019).

A partir da década de 1980, foi possível observar meningococos com menor

susceptibilidade à penicilina no Reino Unido, Espanha e África do Sul (BOTHÁ, 1988; SAEZ-NIETO et al., 1987; SPROTT; KEARNS; FIELD, 1988). Desde então, cepas com sensibilidade reduzida à penicilina têm sido relatadas em todo o mundo, apresentando um aumento ao longo do tempo (BLONDEAU; YASCHUK, 1995; BROWN et al., 2010; CANIÇA; DIAS; FERREIRA, 2004; DI CAPRIO et al., 2017; GORLA et al., 2011). Além disso, também foram relatados casos esporádicos de resistência a outras drogas como rifampicina e ciprofloxacina (CORSO et al., 2005; GORLA et al., 2018a; KAWASAKI et al., 2018; SOSA et al., 2001; TSANG et al., 2017; YAGUPSKY; ASHKENAZI; BLOCK, 1993). Recentemente, um estudo realizado na Etiópia demonstrou uma resistência de quase 70% à ceftriaxona (ALEMAYEHU; MEKASHA; ABEBE, 2017).

A transferência horizontal de genes é a principal hipótese para a diversidade genética entre espécies do gênero *Neisseria*, o que pode ter contribuído para a propagação da resistência à penicilina em cepas patogênicas a partir da década de 80 (GIANCACCCHI et al., 2017; KAHLER, 2017).

O uso abusivo de antibióticos é considerado o principal fator para os recorrentes casos de resistência antimicrobiana, dificultado a antibioticoterapia (BRASIL, 2009). A suposta transferência horizontal de genes entre as espécies de *Neisseria* e/ou entre diferentes gêneros da microbiota do trato respiratório superior, associada ao uso empírico e abusivo de antibióticos, pode ter auxiliado a expansão da ocorrência de resistência aos antibióticos (DAVIES; DAVIES, 2010). Entretanto, existem poucos estudos no mundo que avaliaram o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de espécies comensais, como *N. lactamica* (ARREAZA et al., 2002; KARCH; VOGEL; CLAUS, 2015; LUJAN et al., 1991; SAEZ-NIETO et al., 1985; WU et al., 2009). Estudos indicam que a colonização por *N. lactamica* na orofaringe humana pode gerar uma imunidade contra os meningococos (DEASY et al., 2015; GOLDSCHNEIDER, 1969; SAEZ-NIETO et al., 1985). Diante desta característica, *N. lactamica* torna-se a espécie comensal de maior interesse em estudos científicos.

A literatura demonstra uma sensibilidade reduzida para ampicilina, ciprofloxacina, penicilina e rifampicina em cepas de *N. lactamica*, salientando a importância da investigação do perfil de sensibilidade de cepas comensais (ARREAZA et al., 2002; SAEZ-NIETO et al., 1985). Diante disso, torna-se importante conhecer o perfil de susceptibilidade das cepas de *Neisseria* spp., com o intuito de contribuir com informações úteis para subsidiar estudos subsequentes. Esses estudos poderão gerar dados atualizados para inferir diretamente nos protocolos de tratamento e quimioprofilaxia das infecções causadas por espécies do gênero *Neisseria*. Desse modo, será possível evitar o surgimento e propagação de cepas resistentes

pelo uso empírico de antibióticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO DO GÊNERO *Neisseria*

Membros do gênero *Neisseria* são tipicamente diplococos Gram-negativos com um diâmetro de até 2µm e morfologia característica representada por lados adjacentes achatados, dando um formato semelhante a grãos de feijão. As espécies *N. elongata*, *N. weaveri*, *N. bacilliformis* e *N. shaeyganii* são exceções por apresentarem-se como bacilos pequenos, frequentemente dispostos como cocobacilos ou em cadeia (ELIAS; FROSCHE; VOGEL, 2019).

Os diplococos são imóveis, não esporulam e não possuem flagelo. *Nmen* é a única espécie que expressa uma cápsula polissacarídica, o que permite distinguir 12 sorogrupos (HARRISON et al., 2013). Isolados de várias espécies, como *N. flavescens*, *N. sicca* e *N. subflava* podem produzir um pigmento amarelado em meio Thayer-Martin. As espécies de *Neisseria* possuem crescimento ótimo em condições aeróbicas e à temperatura de 35°C-37°C. Entretanto, *Ngo* isolada de sítios corporais com tensão de oxigênio reduzida sugerem a capacidade de crescimento anaeróbico, devido à redução de nitrato (KNAPP; CLARK, 1984). Enquanto a maioria das espécies não é nutricionalmente exigente, as espécies patogênicas *Nmen* e *Ngo* são fastidiosas, apresentando especial susceptibilidade a fatores ambientais desfavoráveis, como temperaturas extremas, dessecação e condições alcalinas ou ácidas.

Meios de cultura enriquecidos como ágar sangue e ágar chocolate são utilizados para o crescimento das espécies patogênicas *Nmen* e *Ngo*. Após 48 horas de crescimento em ágar chocolate, as colônias de *Ngo* têm até 1 mm de diâmetro, são opacas, branco-acinzentadas, cintilantes e convexas. A morfologia pode variar de acordo com a presença de *pili* e de proteínas associadas à opacidade da colônia (proteínas Opa), envolvidas no processo de adesão ao epitélio (ELIAS; FROSCHE; VOGEL, 2019). As colônias de *Nmen* têm bordas lisas e inteiras e têm cerca de 1 mm de diâmetro após 18 horas de crescimento em ágar sangue; são cinzas, convexas, brilhantes e ocasionalmente mucoides. O ágar sangue abaixo das colônias pode exibir uma descoloração cinza-esverdeada. A coloração de Gram deve ser realizada para confirmar a presença de diplococos gram-negativos piriformes. Resultados consistentes são obtidos com colônias com menos de 24 horas, antes que os processos autolíticos apareçam (ELIAS; FROSCHE; VOGEL, 2019).

Todas as espécies são oxidase positivas, com exceção de *N. elongata* subsp. *nitroreducens* e algumas amostras de *N. bacilliformis* catalase positivas; e produzem ácido através da oxidação de carboidratos (LEMOS; ELIAS JR; CAMPOS, 2015).

O gênero *Neisseria* compreende predominantemente espécies oportunistas que colonizam as superfícies mucosas do trato respiratório superior humano. Porém, *Ngo* e *Nmen* são as espécies de *Neisseria* mais estudadas, pois estas apresentam os mais recorrentes relatos de processos infecciosos em humanos (ELIAS; FROSCHE; VOGEL, 2019; LIU; TANG; EXLEY, 2015; PARTE, 2014). Com menor frequência, também são reportadas espécies comensais de *Neisseria* responsáveis por casos de pneumonia, endocardite e meningite (KIRLEW; WILMOT; SALINAS, 2015; WAKUI et al., 2012; WANG et al., 2006).

A primeira descrição de um membro do gênero *Neisseria* foi em 1879, quando Albert Neisser observou pequenos diplococos (gonococos) nas células de exsudatos uretrais de pacientes com gonorreia (NEISSER, 1879 *apud* BARROSO, 2013). Atualmente, sabe-se que a *N. gonorrhoeae* é um patógeno obrigatório que causa a gonorreia, uma doença sexualmente transmissível comum em todo o mundo (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016). Porém, gonorreia foi nomeada por Galen em 130 d.C., do Grego *gonor* (semente) e *rhoia* (fluxo), sugerindo que a doença estava relacionada ao fluxo de sêmen. No século XIII, Maimonides identificou que a secreção uretral de pacientes com gonorreia masculina não era o sêmen, mas sim uma doença sexualmente transmissível (LIU; TANG; EXLEY, 2015). Em 1885, Bumm mostrou que os gonococos eram a causa da gonorreia, após a inoculação em voluntários humanos (LIU; TANG; EXLEY, 2015). Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou 86,9 milhões de casos de gonorreia, que continuam sendo uma preocupação global de saúde pública entre adultos em todo o mundo (ROWLEY et al., 2019). Atualmente, a disseminação de gonococos resistentes a antimicrobianos emergiu como uma grande preocupação de saúde pública, estando esta bactéria na lista de ameaças urgentes do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos (CDC, 2019).

Em 1887, Weichselbaum isolou meningococos do líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite (WEICHELBAUM, 1887 *apud* BARROSO, 2013); ele injetou líquido meníngeo purulento no espaço subdural de animais para reproduzir a doença clínica. Weichselbaum chamou inicialmente a bactéria de *Diplococcus intracellularis meningitidis*, refletindo sua forma e a presença dentro das células fagocíticas. O binômio *Neisseria meningitidis* foi proposto em 1920 e adotado, definitivamente, pelo Manual Bergey a partir da sua sexta edição (BARROSO, 2013; BRANHAM, 1953).

Nmen é um patógeno oportunista que pode causar meningite endêmica e epidêmica e/ou sepsis em todo o mundo. A meningite meningocócica epidêmica foi descrita pela primeira vez por Vieusseux em 1805 em Genebra (VIEUSSEUX, 1805). Durante o século XIX eram recorrentes as epidemias, envolvendo principalmente crianças e adolescentes, incluindo

recrutas militares. Em 1896, Kiefer descreveu o estado portador de meningococos na nasofaringe de pessoas saudáveis (CHRISTODOULIDES, 2013).

Nmen, por ser uma bactéria oportunista, pode permanecer na mucosa faríngea, o que torna o indivíduo um portador assintomático de uma cepa circulante, como também, invadir a mucosa, alcançar a corrente sanguínea e/ou a barreira hematoencefálica, atingir as meninges provocando a DMI, a qual pode ser manifestada como meningococemia ou meningite, ou a associação de ambas condições (SCHOEN et al., 2014). No Brasil, a taxa de incidência da DMI foi de 1 caso a cada 100 mil habitantes e a taxa de letalidade alcançou 22,9% em 2013 (BRASIL, 2016). Os padrões da doença diferem entre populações e a cepa infectante, porém é de consenso que os adolescentes e adultos jovens representam os grupos etários com a maior prevalência de portadores de *Nmen*, sendo considerados como os principais transmissores desse patógeno para os demais grupos etários (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; CHRISTENSEN et al., 2010).

As espécies *Ngo* e *Nmen* apresentam importante destaque como patógenos do gênero, porém, ocasionalmente, espécies comensais de *Neisseria* podem causar doenças em hospedeiros imunocomprometidos ou infecção sistêmica, após mordidas de animais em indivíduos suscetíveis (LIU; TANG; EXLEY, 2015). Além disso, algumas espécies comensais de *Neisseria* têm se tornado alvo de estudos para compreender a evolução genética de *Ngo* e *Nmen* e tornar estas bactérias menos perigosas à sociedade (VAUGHAN et al., 2006). O primeiro isolamento da *Neisseria* comensal foi de *Micrococcus cinereus* (mais tarde chamada de *Neisseria cinerea*) por von Lingelsheim, em 1906 (VON LINGELSHEIM, 1906 *apud* LIU; TANG; EXLEY, 2015), quem também descreveu *Neisseria sicca*, *Neisseria flava* e *Neisseria subflava*.

Em 1934, Jessen identificou que cocos gram-negativos fermentavam a lactose, além da glicose e maltose (JESSEN, 1934 *apud* HOLLIS; WIGGINS; WEAVER, 1969). Três décadas mais tarde um estudo identificou cepas similares à *Nmen*, porém fermentadoras de lactose, que eram sorologicamente indistinguíveis do sorogrupo B de *Nmen* (MITCHELL; RHODEN; KING, 1965). Inicialmente denominada de *Neisseria lactamicus*, onde *lactus* significa leite e *amicus* é amigo ou amigável, este organismo se distinguia química e sorologicamente das estirpes de *Nmen* devido à atividade fermentadora distinta e incompatibilidade com os demais sorogrupos (HOLLIS; WIGGINS; WEAVER, 1969). Com isso, em 1970, foi reconhecida uma nova espécie a qual foi denominada como *Neisseria lactamica* pelo Subcomitê de Taxonomia da *Neisseriaceae* (CATLIN, 1971).

N. lactamica (*Nlac*), em particular, parece gerar um grau de imunidade contra os meningococos devido à proteção cruzada dos antígenos de superfície (DEASY et al., 2015; GOLDSCHNEIDER, 1969; SAEZ-NIETO et al., 1985). As duas espécies competem pelo mesmo nicho ecológico e, ao contrário do que ocorre com *Nmen*, o estado de portador por *Nlac* é mais prevalente em crianças pequenas e parece ter um papel importante na preparação do sistema imunológico da criança contra *Nmen* (CARTWRIGHT et al., 1987). A colonização do trato respiratório superior por esta espécie começa logo após o nascimento. A taxa de colonização atinge o pico (> 20%) entre um e dois anos após o nascimento e, posteriormente, diminui com a idade para um nível baixo (<5%) em adolescentes de 14 a 17 anos. Isso contrasta fortemente com a dinâmica de colonização de *Nmen*, que aumenta desde o nascimento e atinge picos entre 15 a 19 anos e depois diminui com a progressão da idade (BENNETT et al., 2005; CARTWRIGHT et al., 1987; GOLD et al., 1978). Essas observações levaram à hipótese de que a colonização por *Nlac* facilita o desenvolvimento de uma imunidade natural contra meningococos (GOLD et al., 1978) e isso tem sido explorado para o desenvolvimento de vacinas contendo antígenos derivados de *Nlac* (GORRINGE et al., 2009; VAUGHAN et al., 2006).

As espécies de *Neisseria* compõem uma proporção significativa da microbiota orofaríngea humana, atingindo até 5,2%, colonizando uma ampla variedade de hospedeiros e sítios corporais (Quadro 1) (TØNJUM; VAN PUTTEN, 2017; RETCHLESS et al., 2020).

Como *Ngo* e *Nmen* colonizam a faringe humana de forma assintomática, essas bactérias podem coabitar nichos habitados por espécies comensais. Esta observação assume grande importância pelo fato das espécies do gênero *Neisseria* serem naturalmente competentes, uma característica que permite a captação de DNA e a transferência horizontal de genes (TØNJUM; VAN PUTTEN, 2017). Assim, as espécies comensais de *Neisseria* podem representar reservatórios potenciais dos quais *Ngo* e *Nmen* podem adquirir determinantes de resistência antimicrobiana. Como exemplo, podemos citar uma cepa de *Nmen* responsável por um surto de doença meningocócica nos Estados Unidos entre 2007 e 2008, que parece ter adquirido seu alelo *gyrA* de resistência à ciprofloxacina de *Nlac* predominante na comunidade, através da transferência horizontal de genes (WU et al., 2009). Do mesmo modo, a resistência à cefalosporina de algumas cepas de *Ngo* é devida a um mosaico de alelos do gene *penA* de origem comensal (ITO et al., 2005; SPRATT et al., 1992)

Quadro 1 – Espécies de *Neisseria* e seus hospedeiros

Espécies de <i>Neisseria</i> e seus hospedeiros		
Homem (orofaringe)	Cão	Golfinho
<i>N. meningitidis</i>	<i>N. weaveri</i>	<i>N. mucosa</i>
<i>N. lactamica</i>	<i>N. flavescens</i>	var. <i>heidelbergensis</i>
<i>N. gonorrhoeae</i> *	<i>N. animaloris</i>	
<i>N. animaloris</i>	<i>N. mucosa</i>	Macaco
<i>N. bacilliformis</i>	<i>N. sicca</i>	<i>N. macacae</i>
<i>N. cinerea</i>	<i>N. canis</i>	
<i>N. elongata</i>	<i>N. shayeganii</i>	Abutre
subsp. <i>elongata</i>	<i>N. zoodegmatis</i>	<i>N. sicca</i>
subsp. <i>glycolytica</i>		
subsp. <i>nitroreducens</i>	Porquinho da Índia	Pato
<i>N. flavescens</i>	<i>N. animalis</i>	<i>N. mucosa</i>
<i>N. mucosa</i>	<i>N. denitrificans</i>	
var. <i>mucosa</i>		Mosquito, mosca, carrapato
var. <i>heidelbergensis</i>	Vaca	<i>Neisseria</i> spp.
<i>N. polysaccharea</i>	<i>N. dentiae</i>	
<i>N. sicca</i>		Abelha
<i>N. subflava</i>	Gato, leopardo, leão, tigre	<i>N. meningitidis</i>
bv. <i>flava</i>		
bv. <i>perflava</i>	<i>N. animaloris</i>	Piolho
bv. <i>subflava</i>		<i>N. perflava</i>
<i>N. zoodegmatis</i>	Iguana	<i>N. mucosa</i>
<i>N. weaveri</i>	<i>N. igaunae</i>	<i>N. flavescens</i>

*Também presente no trato urogenital.

2.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A redução da resistência antimicrobiana foi estabelecida como a sexta prioridade da OMS, através do 13º Programa Geral de Trabalho, visando melhorar a saúde mundial entre 2019 e 2023 (WHO, 2019). Em 2015, foi elaborado um relatório por esta organização sobre a vigilância no consumo de antibióticos em 65 países e territórios. Em comparação com outros locais da região das Américas, o Brasil demonstra um maior consumo de antimicrobianos, sendo o principal deles a classe dos β -lactâmicos e penicilinas, seguido pelos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas, e em terceira posição as quinolonas (WHO, 2018).

Apesar do surgimento dos antibióticos ter sido um inquestionável benefício para a comunidade, o uso abusivo e indiscriminado destes medicamentos contribuiu para os inúmeros casos de resistência aos antimicrobianos (DAVIES; DAVIES, 2010). Segundo a O'Neill (2016), se o contexto atual em relação aos antimicrobianos for mantido, até 2050 haverá 10 milhões de óbitos por ano em decorrência da resistência a esses medicamentos, superando as mortes por câncer (O'NEILL, 2016). A aquisição ascendente de resistência a antibióticos pelas bactérias é resultado de vários mecanismos que exigem a modificação do material genético existente ou aquisição de novo material genético de outra fonte (STEFANELLI, 2011). Isto demonstra a necessidade de estudos que permitam a otimização do uso de antibióticos existentes e/ou criação de novos antimicrobianos.

Fatores como a seleção de bactérias mais resistentes, ocasionada pelo uso abusivo ou inadequado de antibióticos e a transferência horizontal de genes contribuem para a propagação dos casos de resistência antimicrobiana (DAVIES; DAVIES, 2010). Esta transferência consiste na passagem de fragmentos de DNA, responsáveis por bloquear o efeito de antimicrobianos, de uma cepa para outra. Isto pode ocorrer de três formas: conjugação, transdução e transformação (HAMILTON; DILLARD, 2006). A conjugação, corresponde a troca de pequenos fragmentos do material genético bacteriano, como plasmídeos, através de um *pilus* conjugativo. Na transdução, um bacteriófago permite o deslocamento do fragmento de DNA de uma bactéria para outra. Já a transformação consiste no englobamento de pequenas porções do material genético presente no meio extracelular por uma bactéria após lise de outra bactéria (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2019).

A transformação e a conjugação são provavelmente os mecanismos mais utilizados por *Nmen* para aquisição de determinantes de resistência, em vista da capacidade do meningococo em captar DNA externo e pela presença do *pilus*, o qual facilita a transferência de material genético entre bactérias, embora a incorporação de fragmentos de DNA seja mais eficiente

quando este material pertence a espécies do mesmo gênero (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2019; PROFT; BAKER, 2009). Estudos demonstraram a possibilidade da transferência de plasmídeo entre espécies patogênicas e comensais de *Neisseria*, o que também permitiria a passagem de genes de resistência entre espécies (KARCH; VOGEL; CLAUS, 2015; LUJAN et al., 1991; ROTMAN; SEIFERT, 2014; SAEZ-NIETO et al., 1990). Este fato sugere que espécies comensais de *Neisseria* podem desempenhar papéis prejudiciais ao organismo humano. Cepas de *Nlac* foram identificadas com perfil de susceptibilidade reduzida à antibióticos recomendados para o tratamento e quimioprofilaxia da DMI, o que pode indicar a presença de genes de resistência (ARREAZA et al., 2002; KARCH; VOGEL; CLAUS, 2015; SAEZ-NIETO et al., 1985; WU et al., 2009).

Os antibióticos recomendados para o uso terapêutico da DMI são β -lactâmicos, uma classe que é frequentemente relatada com perfil de susceptibilidade reduzida em estudos com *Nmen* (DRAWZ; BONOMO, 2010; ZAPUN; MORLOT; TAHA, 2016; ZOUHEIR; ATANY; BOUDEBOUCH, 2019). A origem do gene de resistência aos β -lactâmicos ainda é desconhecida, embora existam hipóteses da transferência horizontal de genes de resistência entre *Nmen* e espécies comensais de *Neisseria*, como *Nlac* (SAEZ-NIETO et al., 1990; QVARNSTROM; SWEDBERG, 2006; VERSCHUEREN et al., 1982). Bowler e colaboradores (1994), como exemplo, sugeriram que as espécies *N. cinerea* e *N. flavescens* foram responsáveis pela transferência do gene *penA* para cepas de meningococos, conferindo a estas últimas resistência à penicilina (BOWLER et al., 1994).

Cepas do meningococo com susceptibilidade reduzida à penicilina correspondem aos primeiros e mais recorrentes relatos de resistência deste patógeno (CHEN et al., 2015; GORLA et al., 2011; HARCOURT et al., 2015; RILEY; BROWN; KRISHNAN, 1991; VACCA et al., 2018). Por se tratar de uma droga utilizada empiricamente para a DMI há décadas, cepas de *Nmen* podem ter desenvolvido mecanismos de resistência contra a penicilina, entre estes, a produção de formas alteradas da proteína de ligação à penicilina (PBP), a qual atua inibindo a ação bactericida da penicilina (BOWLER et al., 1994; DILLON; PAUZÉ; YEUNG, 1983). Em comparação com a penicilina, a resistência à ampicilina é menos recorrente, porém estudos identificaram cepas de *Nmen* e *Nlac* com resistência intermediária a este antibiótico, corroborando a hipótese da transferência horizontal de genes de resistência entre espécies de *Neisseria* spp. (ARREAZA; FUENTE; VÁZQUEZ, 2000; BOWLER et al., 1994; GIOIA et al., 2015; GORLA et al., 2011; SAEZ-NIETO et al., 1987).

Em contrapartida, a maioria dos estudos que analisa o perfil de resistência para ceftriaxona demonstram que este antimicrobiano parece ser a melhor opção terapêutica para

DMI, visto que trabalhos realizados no Brasil, EUA, Canadá, Espanha e Itália revelaram sensibilidade em todas as cepas testadas (ARREAZA; FUENTE; VÁZQUEZ, 2000; GIOIA et al., 2015; HARCOURT et al., 2015; TSANG et al., 2017; VACCA et al., 2018). Em contraponto, um estudo conduzido na Etiópia relatou alta taxa de resistência à ceftriaxona em crianças e adolescentes (ALEMAYEHU; MEKASHA; ABEBE, 2017).

Estudos como o de Corso e colaboradores (2005) demonstram resistência à ciprofloxacina e associam este perfil aos mecanismos de resistência das fluoroquinolonas, como a bomba de efluxo e mutações nas topoisomerases II e IV (CORSO et al., 2005). Além disso, esse grupo de antibióticos é utilizado nas Américas para diversas patologias infecciosas, como infecções do trato urinário, doenças respiratórias, diarreias agudas e febre tifoide, o que também pode favorecer o surgimento de cepas resistentes a essas drogas (BRASIL, 2019; CORSO et al., 2005).

Publicações da Argentina, Brasil, China, EUA, Itália e Etiópia relatam sensibilidade reduzida à ciprofloxacina em cepas de meningococos (ALEMAYEHU; MEKASHA; ABEBE, 2017; BLAIN et al., 2016; CORSO et al., 2005; CHEN et al., 2015; GORLA et al., 2018a; VACCA et al., 2018). Além disso, estudos na Austrália, Espanha, EUA e França relataram cepas de *Nmen* com susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina e identificaram alterações no gene *gyrA*, o qual está associado a resistência a este antibiótico (ALCALÁ et al., 2004; HARCOURT et al., 2015; SHULTZ; TAPSALL; WHITE, 2000).

Apesar dos relatos de resistência à ciprofloxacina, este antibiótico ainda parece ser a melhor alternativa para quimioprofilaxia da DMI, visto que estudos demonstram que o uso profilático de rifampicina pode induzir resistência a essa ansamicina (FRASER et al., 2006; TOTH et al., 2017; YAGUPSKY; ASHKENAZI; BLOCK, 1993). Além disso, Stefanelli e colaboradores (2001) detectaram cepas de meningococos com perfil de elevada resistência à rifampicina e identificaram mutações no gene *rpoB*, as quais conferiram resistência à rifampicina nestes isolados (STEFANELLI et al., 2001).

Além das drogas supracitadas, o perfil de susceptibilidade para sulfonamidas é frequentemente estudado em cepas de *Nmen* demonstrando uma redução na susceptibilidade à sulfametoxazol-trimetoprim (BLAIN et al., 2016; CHEN et al., 2015). Além disso, estudos em portadores assintomáticos demonstraram isolados comensais do gênero *Neisseria* com susceptibilidade reduzida às sulfonamidas, apoiando a hipótese de que a resistência à sulfonamida em algumas estirpes de *Nmen* pode ter sido adquirida por transferência horizontal de genes de resistência (ARREAZA; FUENTE; VÁZQUEZ, 2000).

Com relação à *Ngo*, este patógeno pode ser considerado uma bactéria multirresistente, tornando-se intratável devido à sua resistência a todas as classes de antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infecções (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016). Além disto, a colonização nasofaríngea por *Ngo* é problemática pois trata-se de uma condição na qual o indivíduo é assintomático e, portanto, difícil de erradicar (TØNJUM; VAN PUTTEN, 2017). Deste modo, as cepas de *Ngo* presentes na faringe podem ajudar a disseminar a resistência antimicrobiana e promover a transmissão de doenças.

Para determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias são realizados os testes de susceptibilidade antimicrobiana, os quais determinam a concentração inibitória mínima (MIC) capaz de conter a proliferação bacteriana. As informações necessárias para a execução e interpretação desses testes são fornecidas, principalmente, pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). No Brasil, foi publicada em dezembro de 2018, pela Secretaria de Vigilância em Saúde, a portaria nº 64, a qual estabelece o uso das normas do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) para interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos em todo laboratório público e privado do país (OKUMOTO, 2018). O BrCAST é um subcomitê do EUCAST que realiza um consenso internacional e/ou harmonização com o EUCAST e CLSI (SBPC/ML, 2015), diferentemente do CLSI e EUCAST, os quais recomendam seus pontos de corte baseado nas análises de cepas norte americanas e europeias, respectivamente, de modo a determinar um padrão para os microrganismos circulantes (BRCAST, 2020; CLSI, 2020; EUCAST, 2020). O consenso realizado pelo BrCAST justifica as discrepâncias quanto aos pontos de corte dos demais comitês para *Nmen*, sendo de maior destaque as informações para penicilina e rifampicina (APÊNDICE 1).

Enquanto os testes de susceptibilidade antimicrobiana são determinantes quanto ao perfil de susceptibilidade das cepas, a identificação de genes de resistência a partir da informação contida no genoma completo destas bactérias gera hipóteses sobre a potencialidade da resistência ou sensibilidade aos antibióticos do isolado estudado. Ademais, a pesquisa de genes de resistência também pode fornecer informações adicionais como polimorfismos nos genes, e essa associação pode gerar suposições mais assertivas quanto ao perfil de susceptibilidade.

Os genes de resistência antimicrobiana estão localizados nos chamados genes acessórios do pan-genoma, os quais representam a diversidade das espécies. O pan-genoma refere-se ao repertório genômico total de um dado clado filogenético, este clado pode ser constituído por categorias taxonômicas como espécie, filo ou até reino (VERNIKOS et al., 2015). O pan-

genoma descreve a união de genes compartilhados ou não por diversos genomas de interesse. O pan-genoma engloba três grupos de genes: *core*, acessórios e únicos. O grupo *core* é formado por genes que são comuns a todas ou a maioria das espécies; o acessório é constituído dos genes presente em pelo menos uma espécie e ausentes no grupo *core* e o conjunto dos genes únicos, como o próprio nome já diz, é formado por genes específicos de cada organismo, genes únicos no universo da análise (VERNIKOS et al., 2015).

Genes acessórios normalmente estão relacionados com vias bioquímicas e funções que não são essenciais para o crescimento, mas que conferem vantagens seletivas tais como: adaptação a diferentes nichos, resistência à antibióticos e colonização de novos hospedeiros (MEDINI et al., 2005). Os genes acessórios podem ter origem de transferência horizontal ou por evolução parafilética (uma duplicação seguida de mutação) (GUIMARÃES et al., 2015).

O nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos sobre a prevalência e os fatores de risco associados com o estado de portador de *Nmen* entre adolescentes e adultos jovens na cidade de Salvador. Em um estudo realizado em 2014, foram isoladas cepas de *Nmen* e *Nlac* do material de orofaringe de estudantes de 11 a 19 anos de idade, provenientes de escolas públicas da cidade de Salvador (NUNES et al., 2016). Em 2016, o estudo foi ampliado para uma faixa etária de estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade, onde foram isoladas outras espécies de *Neisseria* além de *Nmen* e *Nlac* (FERREIRA et al., 2020). Tomando por base a suposta transferência horizontal de genes entre as espécies de *Neisseria* e/ou entre diferentes gêneros da microbiota do trato respiratório superior, associada ao uso empírico e abusivo de antibióticos, o presente estudo foi iniciado em 2017 para ampliar o banco de dados do grupo com informações sobre o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas circulantes de *Neisseria* spp. isoladas de portadores assintomáticos utilizando métodos de bancada, microdiluição e bioinformática, para determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e identificação de genes de resistência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Descrever o perfil de resistência aos antimicrobianos, do ponto de vista fenotípico e genotípico, de cepas circulantes de *Neisseria* spp. isoladas de portadores assintomáticos, em Salvador, Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a concentração inibitória mínima de agentes antimicrobianos em cepas de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*, através do método de microdiluição em caldo;
- Identificar a presença de genes de resistência em cepas de *Neisseria* spp.;
- Correlacionar o perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica* à presença de genes de resistência;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE ESTUDO

No presente estudo foram analisadas 169 amostras de *Neisseria sp.* isoladas em dois estudos de portadores assintomáticos de *N. meningitidis* realizados em 2014 (NUNES et al., 2016; MOURA et al., 2018) e 2016 (FERREIRA et al., 2020), sendo 113 (59 de *N. meningitidis* e 54 de *N. lactamica*) oriundas do estudo de 2014 e 56 do estudo de 2016, a saber: *N. meningitidis* (n=46); *N. lactamica* (n=3); *N. gonorrhoeae* (n=3), *N. subflava* (n=3) e *N. polysaccharea* (n=1). Após a identificação da espécie através de provas clássicas e moleculares, essas amostras foram armazenadas a -80°C em caldo infusão de cérebro-coração (BHI; Difco, Becton Dickinson and Company, BD, EUA) acrescido de 20% de glicerol.

O primeiro estudo foi realizado entre setembro e dezembro de 2014, com 1200 estudantes de 11 a 19 anos de idade, de 134 escolas municipais e estaduais de Salvador, Bahia (NUNES et al., 2016). Um total de 59 indivíduos foram positivos para colonização por *Nmen*, com prevalência total de portadores de 4,9% (NUNES, et al., 2016). O estudo de Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 2020), foi conduzido com estudantes de 18 a 24 anos de idade, de um centro universitário da rede privada, em Salvador, Bahia. Nesta pesquisa foi identificada uma prevalência de portadores de *N. meningitidis* de 12,3% na população.

No presente estudo, as amostras foram submetidas a duas análises: teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos através de sequências genômicas previamente obtidas (FERREIRA et al., 2020; MOURA et al., 2018; NUNES et al., 2016). Dentre as 169 amostras do estudo, 124 foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e à pesquisa de genes de resistência, 16 foram analisadas apenas pelo teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e em 29 cepas de *Neisseria spp.* foi realizada unicamente a análise do genoma para a pesquisa de genes de resistência (Figura 1).

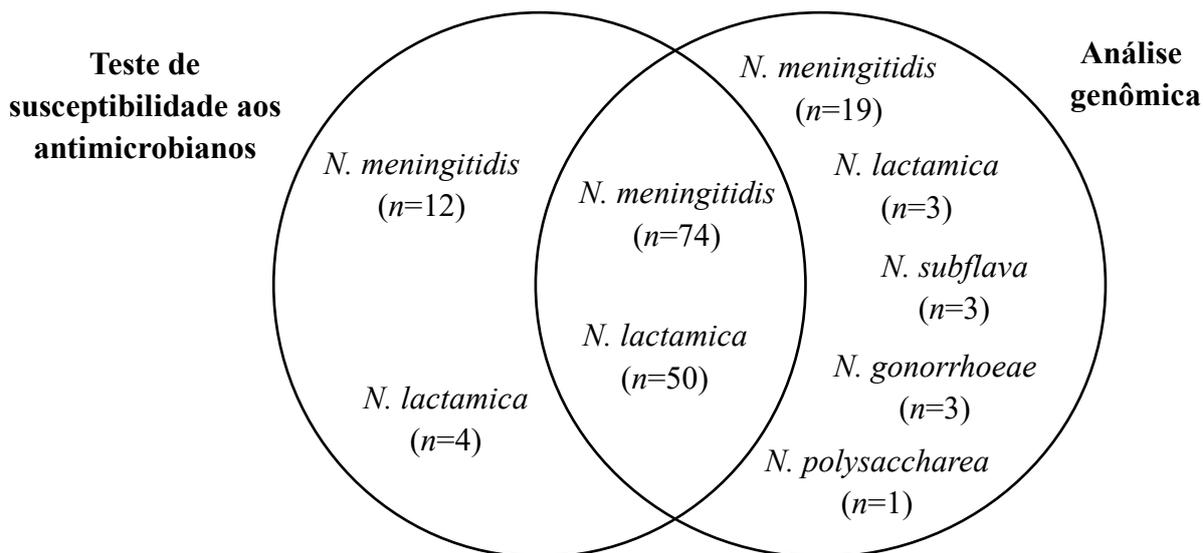


Figura 1 – Distribuição dos isolados de *Neisseria* spp. em relação as análises do estudo.

Além das amostras, foi possível recuperar dos estudos prévios informações epidemiológicas (classificação etária, sexo), fenotípicas (espécie, sorogrupo) e genotípicas (sequência tipo, complexo clonal) dos isolados.

4.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Um total de 140 cepas de *Neisseria* spp. estavam viáveis para a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, sendo 86 cepas de *N. meningitidis* (59 isoladas em 2014 e 27 isoladas em 2016) e 54 cepas de *N. lactamica* isoladas em 2014. A padronização para a realização dos testes de susceptibilidade foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2017; NCCLS, 2003).

As cepas de *Neisseria* spp. armazenadas em BHI com 20% de glicerol foram inicialmente descongeladas, homogeneizadas e, em seguida, com o auxílio de uma alça de inoculação de 10µL, os inóculos foram semeados em placas de ágar sangue de carneiro a 5% (Laborclin, Curitiba, Paraná, Brasil) e incubadas por 24 horas a 35±2°C com atmosfera de CO₂ a 5%.

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) capaz de inibir o crescimento bacteriano. As MICs foram determinadas para os seguintes antimicrobianos: ampicilina (AMP), azitromicina (AZM), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CL), meropenem (MEM), minociclina (MIN), penicilina

(PEN), rifampicina (RIF) e sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

As soluções de antimicrobianos foram preparadas na concentração de 1.280 µg/mL e armazenadas a -20°C por até 6 meses, exceto para rifampicina, estocada por até 1 mês devido à sua baixa estabilidade. Em seguida, diluições seriadas dos antimicrobianos foram realizadas em meio de “Cation adjusted Muller-Hinton Broth” (CAMHB) (Becton Dickinson and Company, BD, EUA) enriquecido com sangue de cavalo lisado a 5%. Para as diluições seriadas foram utilizadas as seguintes concentrações: 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 µg/mL para AMP, AZM, CTR, CL, MRP, MIN e SXT; RIF até 0,125 µg/mL; e CIP e PEN até 0,01 µg/mL.

Para o inóculo, foi utilizada uma suspensão bacteriana em tampão salina 0,9%, pH 7, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Após a incubação das placas durante 20-24 horas a 35±2°C com atmosfera de CO₂ a 5%, as MICs foram detectadas visualmente a partir da identificação de um depósito bacteriano, sob a forma de botão, no fundo dos poços. Para controle das análises de susceptibilidade antimicrobiana, utilizou-se a cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para a interpretação da susceptibilidade para MIC nas cepas de *Neisseria* spp. foram utilizados os critérios recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2020), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUCAST, 2020) e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) (BrCAST, 2020) (APÊNDICES 1 e 2).

4.3 ANÁLISE GENÔMICA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Um total de 153 genomas de *Neisseria* spp. estavam disponíveis para análise, a partir do sequenciamento do genoma total das sequências rascunho das cepas de *Neisseria* spp. realizado nos estudos de 2014 (MOURA et al., 2018) e 2016 (FERREIRA et al., 2020), Esses genomas compreenderam as seguintes espécies: *N. meningitidis* (n=93), *N. lactamica* (n=53), *N. gonorrhoeae* (n=3), *N. subflava* (n=3) e *N. polysaccharea* (n=1).

4.3.1 Identificação dos genes de resistência

A partir das sequências genômicas dos isolados de *Neisseria* spp., estratégias de buscas foram empregadas para identificação de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos

testados. Primeiramente, foram utilizadas as ferramentas de análise disponibilizada pelo CARD — *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) (ALCOCK et al., 2020) e pelo ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>). Posteriormente, foi possível ampliar o número de genes de resistência identificados através da formação do pan-genoma, que permite reconhecer todos os genes presentes nos genomas dos microrganismos.

As buscas por genes de resistência aos antimicrobianos basearam-se na disponibilidade de bases de dados curadas e de alta qualidade para muitos destes genes. Na plataforma CARD os genomas das cepas de *Neisseria* spp. sequenciadas foram submetidos, em formato FASTA, para a ferramenta de análise utilizando os seguintes parâmetros: *Select Data Type* (DNA), *Select Criteria* (*Perfect and Strict Hits Only*), *Nudge* $\geq 95\%$ *identity Loose hits to Strict* (*Exclude nudge*), *Sequence Quality* (*Low-quality/coverage*), *CARD:Live* (opção não marcada). Os arquivos de saída produzidos pela ferramenta (incluindo tabelas e arquivos com extensão *json*) foram armazenados localmente para compilação dos resultados sob a forma de tabelas.

Também foi realizada uma análise baseada nos *contigs* produzidos durante o sequenciamento, utilizando a ferramenta ABRicate, que é capaz de buscar determinantes de resistência nas seguintes bases de dados: *Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database* (FELDGARDEN et al., 2019), *ResFinder* (ZANKARI et al., 2012), *MEGARes 2.0* (DOSTER et al., 2020) e *ARG-ANNOT* (GUPTA et al., 2014). A ferramenta ABRicate foi executada em um servidor UNIX utilizando os parâmetros padrão: **abricate --db \$db --threads 20 > output.{\$db}.tab**,. Para este padrão, o parâmetro **--db \$db** corresponde a uma das bases de dado apresentadas acima e o parâmetro **--threads** indica a quantidade de núcleos disponíveis para a paralelização do algoritmo, neste caso 20.

Os arquivos de saída produzidos foram, então, manualmente curados para verificação e remoção de redundância de genes de resistência identificados por diferentes bases de dados em uma mesma posição. Como limitação desta ferramenta, que executa as buscas utilizando BLAST+, apenas os genes de resistência adquiridos podem ser identificados (mutações pontuais não o são) e sua correta identificação depende da existência e conservação do gene nas bases de dados utilizadas.

Além dessas plataformas, os genomas de *Neisseria* spp. foram submetidos a uma anotação conjunta usando a ferramenta Prokka v. 1.12 (SEEMANN, 2014), visando identificar todas as características relevantes em uma sequência do genoma. Como referência para este processo foi utilizado o genoma de *Neisseria meningitidis* MC58 (BioProject: PRJNA251; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>). A partir dos genomas já anotados, os arquivos

GFF3 produzidos pelo Prokka foram usados como dados de entrada no Roary v. 3.11.2 (PAGE et al., 2015), um *pipeline* pan-genômico, ou seja, uma ferramenta capaz de mostrar o conjunto de genes presente em um clado. Dessa forma, o Roary expõe os genes *core* (genes comuns a todas ou a maioria das espécies) e os genes acessórios (genes presente em pelo menos uma espécie e ausentes no *core*) contidos em um grupo de genomas. Os seguintes parâmetros foram aplicados nessa etapa: similaridade mínima entre os genes igual a 80%; fração mínima de presença entre os genomas comparados igual a 80%.

Através dessas buscas e análises foi pesquisada a presença de 23 genes de resistência antimicrobiana (Quadro 2).

Quadro 2 – Relação dos genes pesquisados nos genomas de *Neisseria* spp.

Gene	Descrição	Antibiótico relacionado
<i>penA</i>	Proteína ligada à penicilina 2	Penicilinas
TEM-1	β -lactamase	Penicilinas e β -lactâmicos
<i>gyrA</i>	Topoisomerase II	Ciprofloxacina
<i>parC</i>	Topoisomerase IV	Ciprofloxacina
<i>rpoB</i>	Subunidade β da RNA polimerase	Rifampicina
<i>folP</i>	Sintetase de di-hidropteroato	Sulfametoxazol-trimetoprim
<i>catP/catD</i>	Acetiltransferase clororamfenicol	Cloranfenicol
<i>tetB</i>	Oxitetraciclina - Bomba de efluxo	Tetraciclina e minociclina
<i>tetM</i>	Ribossomo dependente de GTPase (processo não bem definido)	Tetraciclina
<i>rpsJ</i>	Proteína ribossômica S10	Tetraciclina
<i>farA</i>	Proteína de fusão da membrana - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas
<i>farB</i>	Proteína transportadora da membrana - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas
<i>farR</i>	Regulador transcricional de <i>farA</i> e <i>farB</i> - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas
<i>macA/macB</i>	Proteínas transmembrana que formam um transportador de ligação de ATP - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas, especialmente macrolídeos
<i>mtrA/mtrD</i>	Citocromo transportador de elétrons periplasmático - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas
<i>mtrB/mtrE</i>	Proteínas de ancoradas à membrana - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas
<i>mtrC/mtrF</i>	Redutase terminal - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas
<i>hmrM</i>	Transportador dependente do gradiente de sódio - Bomba de efluxo	Múltiplas drogas

4.3.2 Identificação de polimorfismos das proteínas de ligação à penicilina (PBP1 e PBP2)

Além de identificar a presença do gene *penA* nos genomas de *Neisseria* spp., também foi pesquisada a presença e tipos de mutações em PBP1 e PBP2 (Quadro 3). Para esta finalidade, os genomas foram analisados através da ferramenta de análise disponibilizada pelo CARD— *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) (ALCOCK et al., 2020). As informações produzidas pela ferramenta foram armazenadas localmente para a compilação dos resultados sob a forma de tabelas.

Quadro 3 – Descrição dos polimorfismos associados a substituições de aminoácidos em PBPs pesquisados nos genomas de *Neisseria* spp.

Polimorfismo em PBPs	Descrição
A510V	Substituição de alanina por valina na posição 510
A516G	Substituição de alanina por glicina na posição 516
F504L	Substituição de fenilalanina por leucina na posição 504
H541N	Substituição de histidina por asparagina na posição 541
I312M	Substituição de isoleucina por metionina na posição 312
I551V	Substituição de isoleucina por valina na posição 551
I566V	Substituição de isoleucina por valina na posição 566
L421P	Substituição de leucina por prolina na posição 421
N512Y	Substituição de asparagina por tirosina na posição 512
P551L	Substituição de prolina por leucina na posição 551
P551S	Substituição de prolina por serina na posição 551
V316Y	Substituição de valina por tirosina na posição 316

4.3.3 Confirmação das espécies de *Neisseria* via informação genômica

A pesquisa dos polimorfismos em PBP através da plataforma CARD identificou espécies de *Neisseria* com tipos de mutações comuns a outra espécie do gênero, sendo então necessária a confirmação das espécies de algumas das cepas que apresentaram perfis conflitantes de PBP. Com este propósito, cepas previamente sequenciadas e depositadas na base

de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pertencentes as espécies de *N. meningitidis*, *N. lactamica* e *N. gonorrhoeae* foram utilizadas para realizar comparações “todas-contra-todas” e assim confirmar a espécie identificada pelo genoma. A identidade nucleotídica média (do inglês, average nucleotide identity [ANI]) foi estimada com base no BLASTn (método ANIb) implementado na ferramenta JSpeciesWS (RICHTER et al., 2016). Um valor de ANI $\geq 96\%$ foi utilizado para definir limites de espécies, uma vez que este critério possui boa correlação com estudos de hibridização DNA-DNA (FEDERHEN et al., 2016; GORIS et al., 2007).

4.3.4 Reconstruções de árvores e redes filogenéticas

Com a identificação dos genes *core* pela ferramenta Roary (PAGE et al., 2015), os dados da presença e ausência dos genes acessórios foram utilizados para construir uma representação gráfica em formato de árvore para demonstrar o grau de conservação gênica entre os genomas de *Neisseria* spp.

Também foi realizada a reconstrução filogenética dos genes anotados como *penA* com o intuito de identificar a similaridade das sequências do gene *penA* inter e intraespécies de *Neisseria*. Para isso, foi aplicada uma metodologia constituída por: 1) alinhamento múltiplo das sequências dos nucleotídeos com o algoritmo Muscle v. 3.8.31 (EDGAR, 2004) seguido pela curadoria manual destes alinhamentos; 2) verificação do sinal filogenético realizada através do *software* Tree-Puzzle 5.2 (SCHMIDT; HAESELER, 2007); 3) geração da árvore de máxima verossimilhança com o algoritmo PhyML (GUINDON et al., 2010) na sua versão paralela 3.3.20180621, com 1.000 réplicas de *bootstrap* e baseado no modelo evolutivo mais informativo (TrN+I+G neste caso), o qual foi determinado pelo critério de informação de Akaike presente no algoritmo jModelTest 2.1.10 (DARRIBA et al., 2012). As árvores foram editadas usando a ferramenta iTOL (LETUNIC; BORK, 2016).

Os alinhamentos múltiplos descritos no parágrafo anterior foram usados para a criação de redes filogenéticas utilizando a ferramenta SplitsTree v. 4 (disponível em: www.splitsree.org), objetivando identificar a variabilidade genética dos alelos de *penA* e inferir relações evolucionárias entre as linhagens. O método de decomposição de *splits* foi empregado durante esta análise.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os eventos de interesse foram descritos através de medidas de frequências (absolutas e relativas). As concentrações inibitórias mínimas de 50% (MIC₅₀) e de 90% (MIC₉₀) dos isolados foram determinadas seguindo os critérios de interpretação de susceptibilidade do CLSI, EUCAST e BrCAST. Os dados foram validados e analisados no Excel, versão 2002.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

Os estudos realizados em 2014 e 2016 foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, CAEE nº16099713.1.0000.0040 e CAEE 54392116.3.0000.0040, respectivamente. Estas aprovações permitem o uso futuro das cepas isoladas nos respectivos estudos, executados em conformidade com as diretrizes éticas e legais vigentes consoante Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

5 RESULTADOS

5.1 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

De acordo com os critérios utilizados para as análises, todas as cepas de *N. lactamica* mostraram-se sensíveis aos antibióticos analisados, apresentando concentrações inibitórias mínimas para 50% e 90% dos isolados (MIC₅₀ e MIC₉₀) com valores iguais a menor concentração antimicrobiana testada (Tabela 1).

Todas as 86 cepas de *N. meningitidis* analisadas apresentaram sensibilidade para os antibióticos AZM, CRO, CL, MEM e MIN, com MICs que variaram entre $\leq 0,06$ e $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Um total de 11 cepas (11/86; 12,8%) de *N. meningitidis* demonstrou uma susceptibilidade reduzida para um a quatro antibióticos testados, seguindo os critérios de interpretação do CLSI, EUCAST e BrCAST.

Para a maioria (84/86; 97,7%) das cepas de *N. meningitidis* houve concordância quanto ao perfil de susceptibilidade comparando os três critérios de interpretação, porém as análises foram divergentes para penicilina e rifampicina (Tabela 2). Duas cepas apresentaram MIC de $\leq 0,5$ e $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ para penicilina, sendo ambas classificadas como resistentes segundo o CLSI e EUCAST, porém de acordo com os critérios do BrCAST a cepa com MIC de $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ se caracterizou com resistência intermediária, ou seja, sensível aumentando exposição (dose-dependente). Uma cepa com MIC de $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ para rifampicina foi considerada sensível pelo CLSI e resistente pelos critérios fornecidos por EUCAST e BrCAST.

De acordo com os três comitês, foram identificados perfis de susceptibilidade reduzida à SXT (4 isolados), SXT-CIP (3 isolados), SXT-AMP (1 isolado), SXT-CIP-PEN (1 isolado) e SXT-CIP-PEN-AMP (1 isolado) (Tabela 3). De 10 isolados que se classificaram com susceptibilidade reduzida aos antibióticos, em concordância com os três comitês, oito cepas foram coletadas no ano de 2014 e duas cepas em 2016, pertencentes aos sorogrupos B (3/10; 30%), W (2/10; 20%), Z (2/10; 20%) e não-grupável (3/10; 30%). Duas cepas pertenciam ao cc1136 e outras duas cepas ao cc11; os demais isolados pertenciam a sequências tipo e complexos clonais distintos (Tabela 3).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E POLIMORFISMOS EM PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À PENICILINA (PBPS)

Através do estudo do pan-genoma e das plataformas CARD e ABRicate, foi possível analisar 153 genomas completos disponíveis, nos quais foram encontrados 20 genes de resistência aos antimicrobianos (Tabelas 3 e 4). Além disso, a análise dos genomas permitiu constatar que não houve divergências entre a classificação tradicional (fenotípica) das bactérias e a classificação genômica usando sequências de referências.

A análise do genoma foi realizada em nove de 10 cepas de *N. meningitidis* com perfil de susceptibilidade reduzida, sendo identificados 15 genes de resistência (*penA*, *gyrA*, *parC*, *rpoB*, *folP*, *farABR*, *macAB*, *mtrACDEF*) (Tabela 3). Os padrões mutacionais F504L e A510V foram observados em duas cepas com sensibilidade reduzida à penicilina e/ou ampicilina, enquanto as mutações N512Y ou P551L estavam presentes em duas cepas com susceptibilidade reduzida a outros antibióticos (Tabela 3).

A análise do genoma também foi realizada para outras 65 cepas de *N. meningitidis* e 50 de *N. lactamica* que passaram pelo teste de susceptibilidade antimicrobiana e apresentaram MICs sensíveis. Essa análise permitiu a identificação dos genes *penA*, *gyrA*, *parC*, *rpoB*, *folP* e genes relacionados à bomba de efluxo em todas as cepas de meningococos e 49 cepas de *N. lactamica* (Figura 2).

Os genes *penA*, *gyrA*, *parC*, *rpoB*, *folP*, *farA*, *farB*, *farR*, *macA*, *macB*, *mtrA*, *mtrC*, *mtrD* e *mtrE* foram identificados nas 93 cepas de *N. meningitidis* (100%), 52 de *N. lactamica* (98%), 3 de *N. gonorrhoeae* (100%) e 1 de *N. polysaccharea* (100%) (Tabela 4). O gene *mtrF* foi encontrado em 79% dos genomas analisados e cerca de 4% dos isolados de *Neisseria* spp. (6/153) continham ao menos um dos genes associados à resistência à tetraciclina (*tetB*, *tetM* e *rpsJ*). Cerca de 15% dos isolados de *N. lactamica* apresentaram o gene *hmrM* (8/53) e uma cepa continha apenas os genes *gyrA*, *farR*, *mtrC* e *hmrM*. Todavia, os demais isolados dessa espécie apresentaram, pelo menos, 14 genes de resistência no genoma, enquanto *N. subflava* demonstrou a presença de 9 genes de resistência para os três genomas analisados.

A análise dos polimorfismos em PBPs evidenciou a presença de uma a cinco mutações nas PBPs em 111 genomas (111/152; 73%), apresentando maior frequência as mutações de PBP2, primeiramente para F504L+A510V+N512Y (61/111; 54,9%), seguido por F504L+A510V (33/111; 29,7%) (Tabela 5). Foram encontrados cinco polimorfismos em PBP2 (F504L, A510V, I312M, V316T, N512Y) em duas cepas de *N. meningitidis*, que se mostraram sensíveis às penicilinas nos testes de susceptibilidade realizados.

Todas as cepas de *N. gonorrhoeae* ($n=3$) apresentaram a mutação L421P em PBP1, além de três a quatro polimorfismos em PBP2, sendo a única espécie onde foram identificadas as mutações A516G e A516G+P551S (Tabela 5). Cerca de 60% dos genomas de *N. meningitidis* e 98% de *N. lactamica* apresentaram polimorfismos em PBP2. Mutações do tipo P551L (10/111; 9%) e P551S (2/111; 1,8%) foram identificadas no genoma de *N. meningitidis* e *N. lactamica*, respectivamente. Apesar de possuírem o gene *penA*, não foram encontradas mutações nos genomas de *N. subflava*.

5.3 ANÁLISE PAN-GENÔMICA E FILOGENÉTICA

A Figura 2 representa a diversidade dos genes acessórios identificados, comparando-se com informações epidemiológicas e genômicas das cepas estudadas. A maioria das cepas foi isolada em 2014 (97/153; 63,4%), em adolescentes (67/153; 43,8%), do sexo feminino (92/153; 60,1%). Das 93 cepas de *N. meningitidis*, 87% eram não-grupáveis, porém, as cepas isoladas em 2014 apresentaram uma maior variedade de sorogrupos (B, E, W, Y, Z e NG) em relação as de 2016 (B e NG). As cepas identificadas com a mesma sequência tipo e complexo clonal foram organizadas próximas dentro da árvore, com a maioria das *N. meningitidis* pertencentes ao ST823 e cc198 (13/93; 14%) ou ST1136 e cc1136 (11/93; 11,8%) (Figura 2). Para a maioria das cepas de *N. lactamica* foram identificadas novas sequências tipo, originando complexos clonais ainda não identificados ($n=28/53$; 52,8%), todavia pode-se observar quatorze cepas do cc613, seis do cc1494 e quatro do cc624. E das três cepas de *N. gonorrhoeae* analisadas, duas pertenciam ao ST1588.

As análises evidenciadas na Figura 2 revelam que não houve significância estatística entre os dados epidemiológicos e fenotípicos com os dados genotípicos.

Os cladogramas dessa árvore foram agrupados demonstrando os genes em comum entre as diferentes espécies e a quantidade de genes presentes em cada espécie (Figura 2). Nesta figura observa-se uma separação bem evidente entre as espécies, onde todas as cepas de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* e *N. subflava* agruparam-se próximas entre si. Entretanto, uma cepa de *N. lactamica* (M37094) foi enquadrada em um clado onde as cepas de *N. subflava* estavam presentes.

A história evolutiva dos genes *penA* foi reconstruída e representada nas Figuras 3 e 4. A Figura 3 apresenta uma árvore filogenética não enraizada, criada pelo método de máxima verossimilhança a partir dos alinhamentos das sequências de *penA*, e a Figura 4 representa uma rede filogenética construída utilizando o método de decomposição de *splits* a partir do mesmo

conjunto de dados usados na Figura 3, complementando esta análise. Deste modo, foi possível identificar padrões semelhantes dentro da mesma espécie, havendo uma maior proximidade entre as sequências de *penA* de *N. meningitidis* com *N. polysaccharea* e *N. gonorrhoeae*, sugerindo um ortólogo recente em comum. Para *N. subflava* observa-se, entretanto, uma sequência de *penA* mais afastada das demais espécies, o que indica uma divergência das sequências desta espécie com relação às demais, e em particular a ausência de eventos de recombinação entre isolados de *N. subflava* e outras *Neisseria* spp. O padrão reticulado da rede apresentada na Figura 4 reafirma a extensa recombinação existente entre as diferentes sequências de *penA*, e os paralelogramas, culminando na separação entre isolados de *N. subflava*, são indicativo de sinal filogenético real suportando a divergências destas cepas com as demais espécies, como apresentado na Figura 3.

Através do alinhamento das sequências de *penA* foi possível identificar várias cepas idênticas (Figuras 3 e 4). Entre as cepas de *N. meningitidis*, foram identificados oito padrões distintos de *penA* com dois genes idênticos em cada padrão, um padrão com cinco sequências iguais e outros padrões com 8, 9, 11 e 12 sequências *penA* idênticas. Entre as cepas de *N. lactamica*, dois padrões distintos do gene *penA* continham duas sequências idênticas e outros padrões tinham quatro, cinco e 10 sequências de *penA* idênticas. Duas cepas de *N. gonorrhoeae* também apresentaram uma mesma sequência do gene *penA*.

Tabela 1 – Perfil de susceptibilidade das cepas de *Neisseria lactamica* isoladas de portadores assintomáticos.

Antibiótico	Intervalo das MICs obtidas (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Critério de Interpretação das MICs* (%)									Total de cepas analisadas
				CLSI			EUCAST			BrCAST			
				S	I	R	S	I	R	S	I	R	
AMP	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
AZM	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	-	-	-	-	-	-	54
CRO	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
CIP	≤0,01	≤0,01	≤0,01	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
CL	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
MEM	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
MIN	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
PEN	≤0,01	≤0,01	≤0,01	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
RIF	≤0,12	≤0,12	≤0,12	100	0	0	100	0	0	100	0	0	54
SXT	≤0,06 ≤0,06	≤0,06/ ≤0,06	≤0,06/ ≤0,06	100	0	0	-	-	-	-	-	-	54

Legenda: MIC: concentração inibitória mínima; MIC₅₀ e MIC₉₀: concentração inibitória mínima na qual 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente; CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST = *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; BrCAST = *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; S: sensível; I: intermediário (CLSI) ou sensível aumentando a exposição (EUCAST e BrCAST); R: resistente; AMP: ampicilina; AZM: azitromicina; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacina; CL: cloranfenicol; MEM: meropenem; MIN: minociclina; PEN: penicilina; RIF: rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim.

*Devido a inexistência de pontos de corte da MIC para *Neisseria lactamica*, foram utilizados os critérios de interpretação de *Neisseria meningitidis*.

- Ausência de critérios de interpretação.

Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade das cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos.

Antibiótico	Intervalo das MICs obtidas (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Critério de interpretação das MICs (%)									Total de cepas analisadas
				CLSI			EUCAST			BrCAST			
				S	I	R	S	I	R	S	I	R	
AMP	≤0,06–0,25	≤0,06	≤0,06	97,7	2,3	0	97,7	2,3*	0	97,7	2,3	0	86
AZM	≤0,06–0,12	≤0,06	≤0,06	100	0	0	-	-	-	-	-	-	86
CRO	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	86
CIP	≤0,01–0,25	≤0,01	≤0,03	94,2	0	5,8	94,2	0	5,8	94,2	0	5,8	86
CL	≤0,06–1	≤0,06	≤0,5	100	0	0	100	0	0	100	0	0	86
MEM	≤0,06–0,12	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	86
MIN	≤0,06	≤0,06	≤0,06	100	0	0	100	0	0	100	0	0	86
PEN	≤0,01–4	≤0,01	≤0,03	97,7	0	2,3	97,7	0	2,3	97,6	1,2	1,2	86
RIF	≤0,12–0,5	≤0,12	≤0,12	100	0	0	98,8	0	1,2	98,8	0	1,2	86
SXT	≤0,06–>32 / ≤0,06–>32	≤0,06/ ≤0,06	>32 / ≤32	88,4	0	11,6	-	-	-	-	-	-	86

Legenda: MIC: concentração inibitória mínima; MIC₅₀ e MIC₉₀: concentração inibitória mínima na qual 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente; CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST = *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; BrCAST = *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; S: sensível; I: intermediário (CLSI) ou sensível aumentando a exposição (EUCAST e BrCAST); R: resistente; AMP: ampicilina; AZM: azitromicina; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacina; CL: cloranfenicol; MEM: meropenem; MIN: minociclina; PEN: penicilina; RIF: rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim.

*Apesar do EUCAST não possuir critérios interpretativos para valores intermediários, a MIC encontrada (≥0,25 µg/mL) está entre os valores de sensibilidade (≤0,12 µg/mL) e resistência (>1 µg/mL) para ampicilina.

- Ausência de critérios de interpretação.

Tabela 3 – Perfil das cepas de *Neisseria meningitidis* que apresentaram susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos.

ID	Ano de coleta	Sorogrupo [^]	ST (cc) [^]	MIC dos antimicrobianos com susceptibilidade reduzida (µg/mL) [#]				Genes de resistência ^{&}	Polimorfismos de PBP2
				AMP	CIP	PEN	SXT		
M37087	2014	Z	11458 (NI)	≥0,25	-	-	≥32/≥16	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	F504L, A510V
M37104	2014	W	11 (11)	-	≥0,25	≥0,5	>32/>32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	F504L, A510V
M37106	2014	B	11453 (NI)	-	≥0,12	-	>32/≥32	*	*
M37111	2014	Z	2123 (NI)	≥0,25	≥0,25	≥4	>32/≥32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	F504L, A510V
M37112	2014	NG	639 (32)	-	≥0,12	-	>32/>32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	P551L
M37115	2014	B	Novo (41/44)	-	≥0,12	-	>32/≥32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	F504L, A510V
M37125	2014	NG	7450 (1136)	-	-	-	>32/>32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	-
M37141	2014	W	7097 (11)	-	-	-	>32/>32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	F504L, A510V
M42480	2016	B	11827 (35)	-	-	-	>32/≥32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	F504L, A510V, N512Y
M42481	2016	NG	1136 (1136)	-	-	-	>32/≥32	<i>penA, gyrA, parC, folP</i>	-

Legenda: ID: código de identificação dos isolados; ST: sequência tipo; cc: complexo clonal; MIC: concentração inibitória mínima; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; PEN: penicilina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; PBP2: proteína de ligação à penicilina tipo 2; NG: não-grupável. NI: não identificado.

[^] Dados identificados por MOURA et al., 2018 e FERREIRA et al., 2020

[#] Cepas classificadas com menor susceptibilidade antimicrobiana de acordo com os critérios interpretativos do CLSI.

* Ausência de análise do genoma.

& Todos os isolados, exceto M37106, também continham o gene *rpoB* e genes associados a bomba de efluxo (*farABR, macAB, mtrACDEF*).

- MICs sensíveis e/ou ausência de polimorfismos.

Tabela 4 – Distribuição dos genes de resistência identificados nas cepas de *Neisseria* spp.

Gene de resistência	Antibiótico que confere resistência	Nº de cepas com genes de resistência					Nº cepas com gene de resistência / Total de cepas analisadas
		<i>Neisseria meningitidis</i> (n=93)	<i>Neisseria lactamica</i> (n=53)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=3)	<i>Neisseria subflava</i> (n=3)	<i>Neisseria polysaccharea</i> (n=1)	
<i>penA</i>	Penicilinas	93	52	3	3	1	152/153
<i>TEM-1</i>	Penicilinas e β -lactâmicos	-	2	-	-	-	2/153
<i>gyrA</i>	Fluoroquinolona	93	53	3	3	1	153/153
<i>parC</i>	Fluoroquinolona	93	52	3	3	1	152/153
<i>rpoB</i>	Rifampicina	93	52	3	3	1	152/153
<i>folP</i>	Sulfametoxazol-trimetoprim	93	52	3	3	1	152/153
<i>farA</i>	Múltiplos antibióticos	93	52	3	-	1	149/153
<i>farB</i>	Múltiplos antibióticos	93	52	3	-	1	149/153
<i>farR</i>	Múltiplos antibióticos	93	53	3	3	1	153/153
<i>macA</i>	Múltiplos antibióticos	93	52	3	-	1	149/153
<i>macB</i>	Múltiplos antibióticos	93	52	3	3	1	152/153
<i>mtrA</i>	Múltiplos antibióticos	93	52	3	-	1	149/153
<i>mtrC</i>	Múltiplos antibióticos	93	53	3	3	1	153/153
<i>mtrD</i>	Múltiplos antibióticos	93	52	3	3	1	152/153
<i>mtrE</i>	Múltiplos antibióticos	93	52	3	-	1	149/153
<i>mtrF</i>	Múltiplos antibióticos	93	25	3	-	-	121/153

<i>hmrM</i>	Múltiplos antibióticos	-	8	-	-	-	8/153
<i>tetB</i>	Tetraciclina e Minociclina	1	-	-	-	-	1/153
<i>tetM</i>	Tetraciclina	-	-	2	-	-	2/153
<i>rpsJ</i>	Tetraciclina	1	1	3	-	-	5/153

Legenda:

- Ausência do gene de resistência.

Tabela 5 – Distribuição dos polimorfismos de PBPs nas cepas de *Neisseria* spp.

Espécie	Mutações da PBP1			Mutações da PBP2					Nº cepas com polimorfismos em PBP / Nº de cepas com <i>penA</i>
	L421P	P551L	P551S	F504L A510V	F504L A510V N512Y	F504L, A510V A516G	F504L A510V P551S A516G	F504L A510V I312M V316T N512Y	
<i>N. meningitidis</i>	-	10	-	15	29	-	-	2	56/93
<i>N. lactamica</i>	-	-	2	17	32	-	-	-	51/52
<i>N. gonorrhoeae</i>	3	-	-	-	-	2	1	-	3/3
<i>N. subflava</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0/3
<i>N. polysaccharea</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1/1
Total	3	10	2	33	61	2	1	2	111/152

Legenda: PBP: proteína de ligação à penicilina.

- Ausência do polimorfismo.

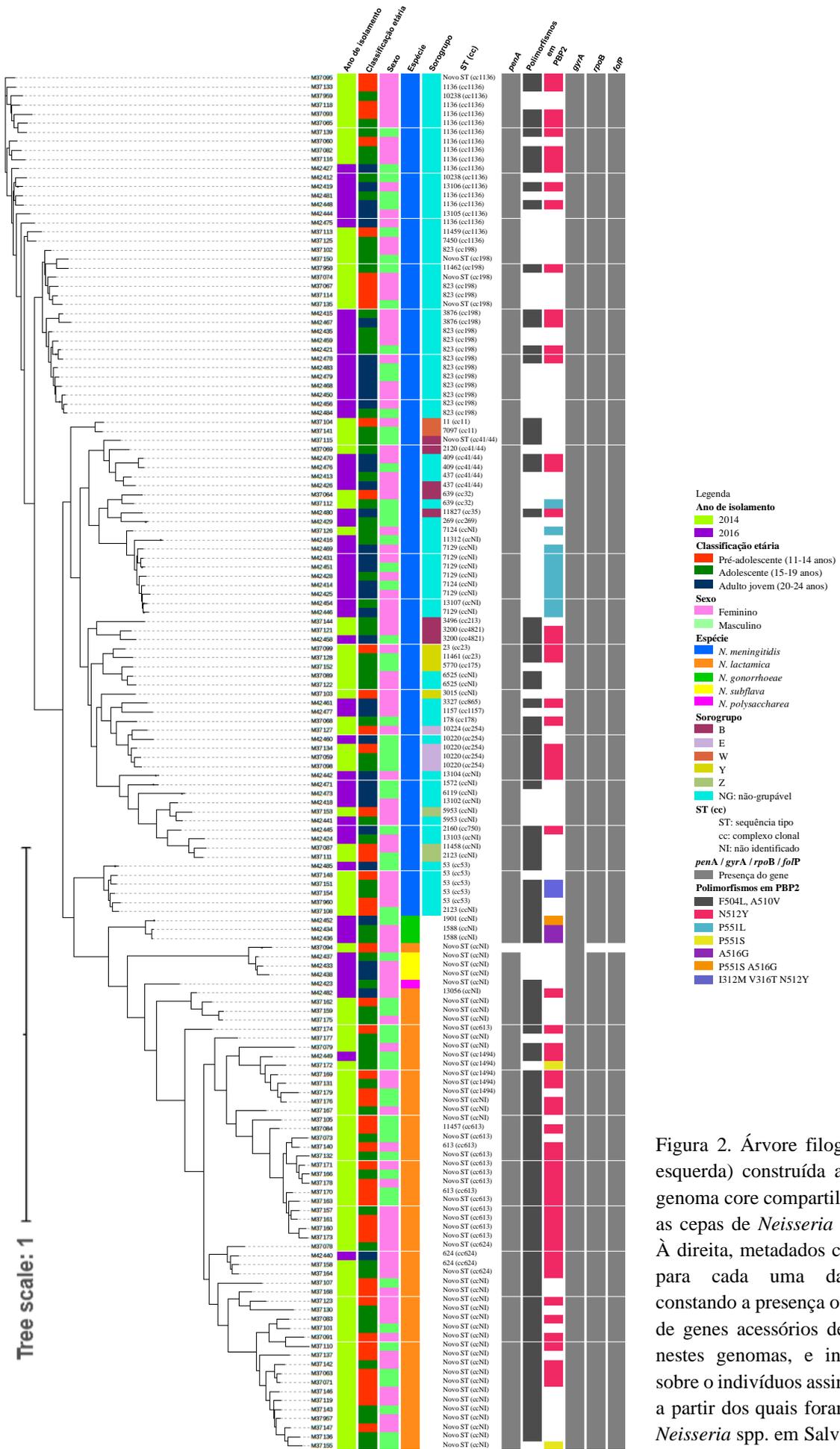


Figura 2. Árvore filogenética (à esquerda) construída a partir do genoma core compartilhado entre as cepas de *Neisseria* estudadas. À direita, metadados compilados para cada uma das cepas, constando a presença ou ausência de genes acessórios de interesse nestes genomas, e informações sobre o indivíduos assintomáticos a partir dos quais foram isolados *Neisseria* spp. em Salvador.

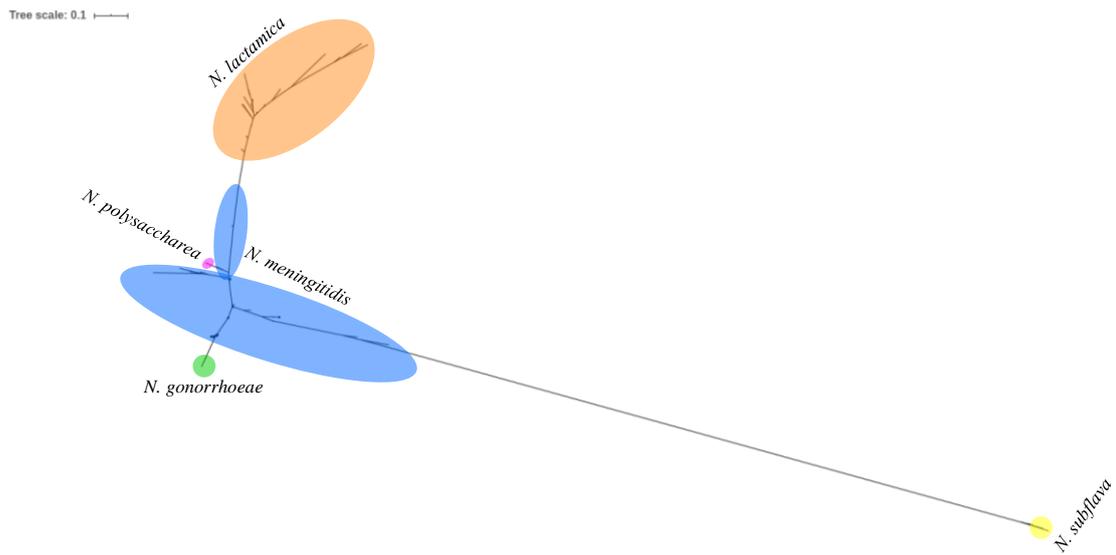


Figura 3 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança construída a partir das sequências do gene *penA* entre as espécies de *Neisseria* estudadas.

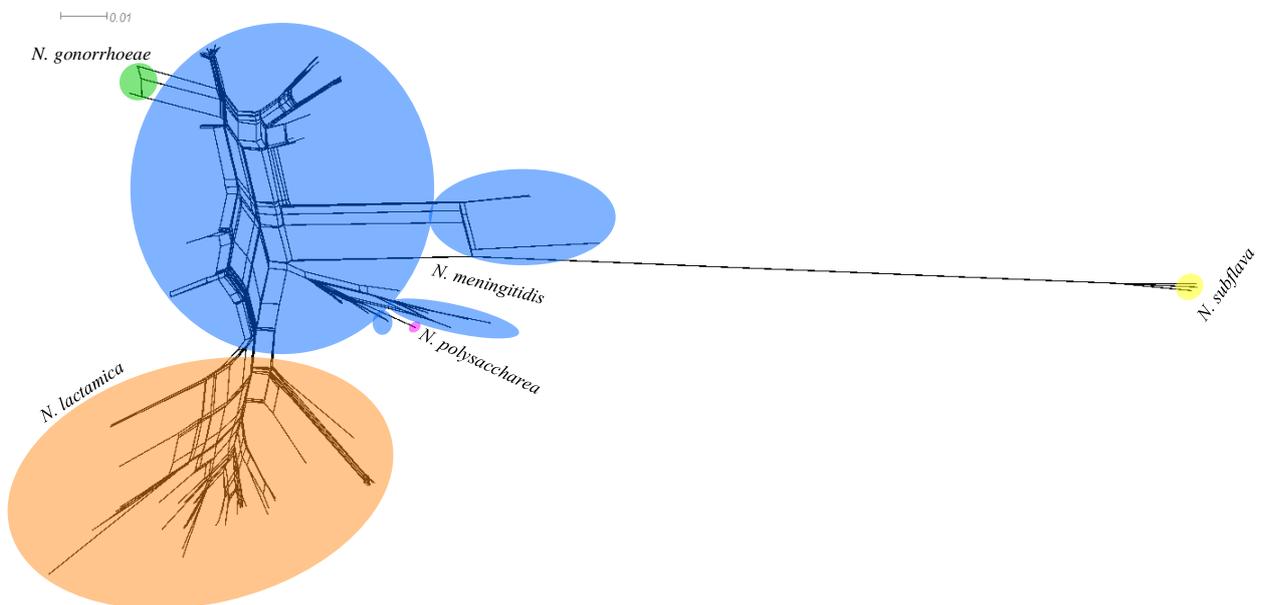


Figura 4 – Rede filogenética, construída usando o método de decomposição de *splits*, das sequências do gene *penA* entre as espécies de *Neisseria* estudadas.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou os resultados do perfil de susceptibilidade antimicrobiana associado à presença de genes de resistência, em isolados de *Neisseria* spp., a partir de amostras de orofaringe coletadas de portadores assintomáticos em 2014 e 2016, em Salvador, Bahia (FERREIRA et al., 2020; MOURA et al., 2018; NUNES et al., 2016).

Inicialmente, é importante mencionar que nem todas as amostras de *Neisseria* spp. estavam disponíveis para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e para a análise dos genes de resistência através sequências do genoma completo. Por exemplo, nem todas as amostras do estudo de 2014 foram submetidas ao sequenciamento do genoma total; apenas aquelas que apresentaram um resultado inconsistente na técnica de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLST) utilizada naquele estudo. Além disto, quando realizamos o subcultivo de algumas cepas, algumas não estavam viáveis. Isto explica as diferenças no número de amostras incluídas para cada etapa desta investigação.

Com relação ao critérios de interpretação dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, através de um consenso internacional e/ou harmonização com o EUCAST e CLSI, é importante destacar que o BrCAST não utiliza dados de cepas circulantes no Brasil para estabelecer os pontos de corte para interpretação. Além disto, os critérios do comitê brasileiro para *Neisseria meningitidis* não permitem a determinação do perfil de susceptibilidade de cepas para azitromicina e sulfametoxazol-trimetoprim, sendo que estes perfis foram definidos, no presente estudo, através do CLSI. Seguindo os parâmetros do EUCAST e BrCAST, foi possível identificar apenas sete cepas de *N. meningitidis* com susceptibilidade reduzida à penicilina, ampicilina, ciprofloxacina e/ou rifampicina.

Existem diversos estudos que analisam o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Neisseria meningitidis* ao redor do mundo, particularmente em relação a cepas invasivas. Na maioria dos continentes, a resistência à ciprofloxacina e rifampicina é rara, não ultrapassando 1% das cepas analisadas (CORSO et al., 2005; HARCOURT et al., 2015; IBARZ-PAVÓN et al., 2012), porém na África foi reportada uma susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina de 16,3% e, na China, esta resistência foi maior que 80% em isolados invasivos e 47% de portadores (ALEMAYEHU; MEKASHA; ABEBE, 2017; CHEN et al., 2015). No Brasil, são poucas as cepas circulantes que apresentam susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina e rifampicina (GORLA et al., 2018a; GORLA et al., 2018b; IBARZ-PAVÓN et al., 2012).

O antibiótico que apresenta um consenso de altas taxas de não-susceptibilidade é a penicilina. Valores elevados foram encontrados na Etiópia com 83,3% das cepas de *N.*

meningitidis com resistência intermediária e 12,2% resistentes à penicilina (ALEMAYEHU; MEKASHA; ABEBE, 2017). Na Europa, países como Alemanha e Itália demonstraram, respectivamente, 17% e 45% dos isolados com resistência intermediária à droga supra citada (KARCH; VOGEL; CLAUS, 2015; VACCA et al., 2018). Na América do Norte, essa taxa varia entre 11% e 22% (BROWN et al., 2010; HARCOURT et al., 2015). Já na América Latina, até 70% das cepas de meningococos demonstram resistência intermediária à penicilina (IBARZ-PAVÓN et al., 2012).

No Brasil, desde o início do século XXI, são poucas as publicações relacionadas ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Neisseria meningitidis* (GIOIA et al., 2015; GORLA et al., 2011; GORLA et al., 2018a; GORLA et al., 2018b; IBARZ-PAVÓN et al., 2012; SILVA et al., 2018). Os artigos demonstraram que menos de 20% das cepas analisadas apresentaram susceptibilidade reduzida aos antibióticos, assim como o presente estudo, que identificou 12,8% das cepas de *N. meningitidis* com perfil de resistência ou resistência intermediária aos agentes antimicrobianos testados. De modo geral, os estudos nacionais demonstraram sensibilidade dos meningococos à ceftriaxona, o que se assemelha aos nossos achados. Porém, as análises para penicilina evidenciaram uma taxa de não-susceptibilidade entre 3% e 33% e entre 13% e 45% para ampicilina, nas cepas de *N. meningitidis* circulantes no país (GIOIA et al., 2015; GORLA et al., 2011; GORLA et al., 2018a; GORLA et al., 2018b; IBARZ-PAVÓN et al., 2012; SILVA et al., 2018).

Após a análise do genoma completo de 153 cepas de *Neisseria* spp., foi possível identificar que 152 genomas continham o gene *penA*, que codifica a PBP2, uma proteína envolvida na síntese da parede celular bacteriana. Alterações em PBPs podem reduzir a afinidade aos β -lactâmicos, resultando em cepas não-sensíveis (TAHA et al., 2007). Oito tipos de polimorfismos em PBP2 foram identificados em 70,6% dos genomas com *penA*, sendo as mutações F504L, A510V e N512Y as mais prevalentes. Todavia, o perfil de susceptibilidade reduzida à penicilina só pôde ser visto em duas cepas de *N. meningitidis*, pertencentes aos sorogrupos W e Z, com os polimorfismos F504L e A510V. Apesar de outros estudos indicarem que modificações em PBP2, principalmente com os polimorfismos F504L, A510V, I515V, H541N e I566V, ocasionam uma redução na sensibilidade à penicilina (TAHA et al., 2007; TSANG et al., 2019). Entretanto, este tipo de associação não foi visto no presente estudo.

Um possível motivo para essa discrepância entre a identificação de substituições na proteína e a ausência de resistência observada fenotipicamente pode ser a não avaliação, neste estudo, da expressão gênica nestes isolados. Nas análises somente o genoma foi analisado, o qual representa todas as potencialidades, em termos de funções gênicas, codificadas para cada

isolado. A expressão de cada determinante de resistência, contudo, pode ser variável de acordo com as condições ambientais que a bactéria se encontra. Sendo assim, é fundamental manter estudos atualizados, e ampliar o rol de ferramentas ômicas empregadas, quanto ao perfil de susceptibilidade à penicilina, visto que nos últimos 30 anos os relatos de cepas de *N. meningitidis* com susceptibilidade reduzida à penicilina tem aumentado em vários países, inclusive no Brasil, porém com MICs mais baixas que as do presente trabalho (ALEMAYEHU; MEKASHA; ABEBE, 2017; GORLA et al., 2018b; CHAFFIN, 1989; BROWN et al., 2010; MENDELMAN et al., 1989).

Os padrões encontrados para os genes *penA* evidenciam a similaridade dessas sequências dentro de uma mesma espécie, com padrões contendo de duas até doze sequências idênticas, observada através da árvore e rede filogenéticas. Também foi possível observar extensa recombinação genética destas sequências, conduzindo a um cenário complexo em seus padrões de evolução, a despeito do isolamento destas amostras em uma mesma comunidade de indivíduos.

Para *N. subflava*, as sequências do gene *penA* foram organizadas em um ramo mais longo, o que demonstra, em comparação com as demais espécies do estudo, uma taxa elevada de variações no gene e uma história evolutiva própria, envolvendo menos recombinações entre *N. subflava* as demais espécie de *Neisseria*. Por outro lado, o estudo de Shimuta et al. (2020) demonstrou a ausência do gene *penA* em isolados de *N. subflava*, o que corrobora uma maior diferença na sequência do gene *penA* em comparação com outras espécies de *Neisseria* (SHIMUTA et al., 2020). Apesar do presente estudo identificar a presença do gene *penA* nos genomas de *N. subflava*, não foram encontrados polimorfismos em PBP2.

Como uma penicilina, a susceptibilidade reduzida à ampicilina também está associada ao gene *penA*. As mutações do tipo F504L e A510V em *penA* foram identificadas nas duas cepas de *N. meningitidis* com susceptibilidade reduzida à ampicilina, as quais pertenciam ao sorogrupo Z e demonstraram grande semelhança na sequência do gene *penA*, encontrados em um mesmo ramo da árvore filogenética. Gorla e colaboradores (2018b) ao analisarem isolados de *N. meningitidis* identificaram 45% de cepas brasileiras com susceptibilidade reduzida à ampicilina, gerando um alerta quanto a eficácia do uso terapêutico deste antibiótico para os casos de DMI e o risco de um maior número de bactérias com resistência à ampicilina (GORLA et al., 2018b).

No presente estudo, todos os isolados de *Neisseria meningitidis* e *N. lactamica* apresentaram susceptibilidade para a ceftriaxona. Um estudo de Whiley e colaboradores (2010) identificou que os polimorfismos G542S, P551S e P551L em PBP2, comuns em cepas de *N.*

gonorrhoeae, estariam associados à resistência à ceftriaxona (WHILEY et al., 2010). O presente estudo identificou, em cepas sensíveis à ceftriaxona, a presença das mutações P551L e P551S nos genomas de *N. meningitidis* e *N. lactamica*, respectivamente. A presença de mutações em diferentes espécies de *Neisseria* que antes haviam sido reportadas apenas no genoma de *N. gonorrhoeae*, corrobora para a teoria da transferência horizontal de genes e, conseqüentemente, que espécies comensais sejam reservatórios de genes associados à resistência aos antimicrobianos (BOWLER et al., 1994; SAEZ-NIETO et al., 1990; QVARNSTROM; SWEDBERG, 2006).

De acordo com o Ministério da Saúde, além de penicilina e ampicilina, a ceftriaxona é recomendada na aplicação terapêutica para casos de DMI no Brasil. Entretanto, apesar do alerta quanto a eficácia do uso terapêutico de alguns dos antibióticos recomendados, este estudo demonstrou que os meningococos estudados, em sua grande maioria, foram susceptíveis ao tratamento preconizado.

Além da ceftriaxona, os antibióticos azitromicina, cloranfenicol, meropenem e minociclina também demonstraram sensibilidade nos isolados testados, resultado que foi semelhante à outros estudos que avaliam o perfil de susceptibilidade em cepas de *Neisseria meningitidis* e/ou *N. lactamica* (ARREAZA et al., 2002; GORLA et al., 2018b; HARCOURT et al., 2015; SHARMA et al., 2019).

Os agentes antimicrobianos recomendados pelo Ministério da Saúde brasileiro para quimioprofilaxia da DMI são ceftriaxona, ciprofloxacina e rifampicina. Ainda que artigos brasileiros reportem raros casos, com menos de 1% das cepas *N. meningitidis* resistentes à ciprofloxacina (GIOIA et al., 2015; GORLA et al., 2018a), o presente estudo identificou cinco cepas de *N. meningitidis* resistentes a esta fluoroquinolona. Entretanto, apesar dos genomas destas cepas conterem os genes *gyrA* e *parC*, não foi possível associar a presença desses genes à resistência a ciprofloxacina, visto que 100% dos meningococos sensíveis à ciprofloxacina apresentaram os genes supracitados. Um desses isolados resistentes obteve uma MIC $\geq 0,25\mu\text{g/mL}$ e pertencia à linhagem W135:P1.5,2:ST-11, identificada anteriormente como uma cepa hipervirulenta e resistente à ciprofloxacina encontrada no Brasil e na Argentina (GORLA et al., 2018a; SORHOUEY-PEREIRA et al., 2013; WEIDLICH et al., 2008). Estes resultados apontam para a importância da análise ampla e utilização de métodos complementares, fenotípicos e genômicos, para o estudo da resistência nestas bactérias.

Além dessa linhagem, um estudo grego identificou duas cepas de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B, ST-3129, resistentes à ciprofloxacina (MIC=0,25mg/L), contendo a mutação T91I no gene *gyrA* (TZANAKAKI et al., 2020). Estas cepas tinham origens de locais distintos,

uma no Afeganistão e outra na Síria, com uma diferença de 30 dias entre os dois casos de meningite. Essa disseminação de linhagens, cada vez mais acelerada, evidencia a necessidade de uma análise contínua do perfil de sensibilidade das cepas circulantes no país para obter uma melhor estratégia para a quimioprofilaxia da DMI.

Os genes *rpoB* e *folP*, responsáveis por conferir resistência à rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprim, respectivamente, foram identificados em 99% dos genomas analisados. Todavia, apenas dois isolados apresentaram susceptibilidade reduzida à rifampicina e dez para sulfametoxazol-trimetoprim. Apesar do estudo ter encontrado cepas com susceptibilidade reduzida à rifampicina, o número pequeno de cepas identificadas com esse perfil não permite uma inferência concreta sobre o uso desse antibiótico. Vale ressaltar que são poucos os relatos de resistência a esse antibiótico em estudos realizados no Brasil (GORLA et al., 2011; SILVA et al., 2018) e no mundo (BERTRAND et al., 2012; VACCA et al., 2018).

Sulfametoxazol-trimetoprim é uma combinação de antibióticos indicada no tratamento de infecções do trato respiratório, trato urinário e sistema gastrointestinal. No Brasil, o Ministério da Saúde indica o uso de sulfametoxazol-trimetoprim apenas como a segunda linha no tratamento da coqueluche (BRASIL, 2019). Entretanto, na China, a associação destes antibióticos pode ser utilizada para o tratamento dos contactantes portadores de *N. meningitidis* (CHEN et al., 2015). Todavia, os trabalhos que analisaram o perfil de susceptibilidade para sulfametoxazol-trimetoprim em cepas de *N. meningitidis* demonstram taxas elevadas de resistência (CHEN et al., 2015; HU et al., 2014; SHARMA et al., 2019). Da mesma forma, o presente estudo demonstrou uma MIC₉₀ de valor elevado para sulfametoxazol-trimetoprim, indicando que mesmo doses elevadas de desses antibióticos seriam ineficazes contra 90% das cepas de *N. meningitidis* analisadas.

Além dos genes supracitados, outras sequências foram encontradas na maioria dos genomas, como os genes de resistência a múltiplas drogas que atuam através de bombas de efluxo. Porém, a literatura tem relatado com maior frequência os genes *farABR* e *mtrCDER* em espécies de *N. gonorrhoeae* (LEE; SHAFER, 1999; LEE et al., 2003). Os genes *farAB* codificam um sistema de bomba de efluxo responsável por gerar resistência a compostos formados por ácidos graxos de cadeia longa (LEE et al., 2003). O estudo de Lee e Shafer (1999) demonstra que a presença de *mtrR* pode promover a expressão de *farAB* e consequente resistência a ácidos graxos em gonococos (LEE; SHAFER, 1999). Este e outros estudos também apontam que *mtrR* atua com um repressor transcricional de *mtrCDE*, desempenhando um papel fundamental na modulação da transcrição do operon *mtrCDE* e pode atuar como regulador de *farR* e *macAB*, de modo a conferir resistência aos agentes hidrofóbicos (LEE;

SHAFER, 1999; LEE et al., 2003; GOLPARIAN et al., 2014). Além disso, evidências indicam que as proteínas expressas pelos genes *farAB* são reguladas negativamente por *farR* (LEE et al., 2003). O estudo de Ma e colaboradores (2020) aponta para a presença do gene *mtrC* em cepas de *N. meningitidis* adaptadas urogenitalmente (MA et al., 2020). Acreditamos que diante do compartilhamento de um mesmo nicho, a orofaringe humana, a transferência de informações genéticas entre meningococos e gonococos pode explicar a presença dos genes relacionados à bomba de efluxo em espécies comensais de *Neisseria*.

O *hmrM* é um outro gene relacionado à bomba de efluxo que foi reportado uma única vez em *Haemophilus influenzae* (XU et al., 2003). Entretanto, no presente estudo, esse gene foi identificado em oito genomas de *N. lactamica*. Além de *hmrM*, a presença de um outro gene, o *sodC*, já havia sido relatada em cepas de meningococos com sua provável adquirida do *H. influenzae* por transferência horizontal (KROLL et al., 1998). Esses eventos reforçam a hipótese da transferência horizontal de genes e reafirma a plasticidade do gênero *Neisseria* para aquisição de DNA externo proveniente de gêneros distintos (SCHOEN et al., 2009).

Os genes *tetB*, *tetM* e *rpsJ*, associados a resistência à tetraciclina – antibiótico este que pode ser utilizado para o tratamento de gonorreia –, são mais frequentemente reportados no genoma de *N. gonorrhoeae* (FIORE et al., 2020). Todavia, assim como a presença de *tetM* foi anteriormente reportada em cepas comensais como *N. subflava* (FIORE et al., 2020), o presente estudo identificou os genes *tetB* e *rpsJ* em cepas de *N. meningitidis*, provavelmente em decorrência da troca de material genético entre espécies.

A Figura 2 evidencia que, em contraste com a conservação interespecífica, a variação de genes intraespécies é grande, corroborando a ideia de que a inserção de material externo é facilitada entre bactérias da mesma espécie devido à similaridade genômica (ALFSNES et al., 2018). Isso pode ser observado nas cepas de *N. meningitidis* e *N. lactamica*, as quais apresentaram grandes variações quanto a quantidade de genes presentes entre as cepas deste estudo. Esses achados contribuem para a hipótese de que o principal mecanismo de aquisição de genes de resistência antimicrobiana para cepas invasivas seja através da transferência horizontal de genes entre espécies comensais de *Neisseria*, principalmente *N. lactamica* e *N. meningitidis* (VÁRQUEZ, 2001).

De modo geral, os resultados apresentados permitem supor que a presença de genes de resistência não está diretamente associada a não-sensibilidade ao antibiótico, uma vez que a maioria dos isolados que identificou genes de resistência aos antibióticos não apresentou MICs interpretáveis como resistentes ou intermediárias. Isto provavelmente ocorra porque os genes presentes nos genomas não estão sendo expressos, o que não aciona a resistência a esses

antibióticos. Essa inexpressividade pode ocorrer por ausência de uma mutação em potencial ou uma combinação de mutações que ativem a resistência, por superexpressão ou supressão do gene de resistência diante da presença de outros componentes (ambiente, antígenos, proteínas ou genes) ou porque ainda não houve interação da bactéria com o antibiótico de modo a ativar o gene de resistência (PALMER; CHAIT; KISHONY, 2018; PETERSON; KAUR, 2018).

Existem diferentes mecanismos responsáveis pela expressão de genes de resistência antimicrobiana; acreditando-se que a presença desses determinantes no genoma das espécies de *Neisseria* seja ocasionada através da transferência horizontal. Isto parece estar associado à plasticidade genômica do gênero, que permite a incorporação de diferentes materiais genéticos em seu DNA (SCHOEN et al., 2009). No caso das cepas de *N. lactamica*, por exemplo, embora elas tenham mostrado sensibilidade aos antimicrobianos analisados, o fato de ter sido identificada a presença de genes envolvidos com mecanismos de resistência aos antimicrobianos, torna esta espécie um reservatório potencial desses genes, que poderiam ser transferidos para uma cepa patogênica no ambiente da orofaringe (ALFSNES et al., 2018).

Essa capacidade constante de aquisição de genes de resistência reforça a necessidade de uma vigilância contínua da susceptibilidade antimicrobiana e características genômicas em *Neisseria*, particularmente em *N. meningitidis*.

7 CONCLUSÕES

- A maioria das cepas de *N. meningitidis* analisadas foi sensível aos antibióticos recomendados para o tratamento e quimioprofilaxia da doença meningocócica invasiva;
- Foram identificados genes de resistência à penicilina, ampicilina, ciprofloxacina e rifampicina em quase a totalidade dos genomas analisados;
- Não foi possível estabelecer uma associação direta entre a presença de genes de resistência antimicrobiana e os polimorfismos gênicos com MICs não-sensíveis;
- Cepas intraespécies apresentaram uma maior conservação de genes e similaridade das sequências *penA*, o que pode facilitar a troca de material genético;
- A identificação de cepas resistentes à ciprofloxacina e apresentando os genes *gryA* e *parC* gera um alerta para a capacidade de disseminação de cepas meningocócicas hipervirulentas e com resistência à fluoroquinolonas;
- A vigilância epidemiológica da susceptibilidade antimicrobiana, particularmente em cepas de *N. meningitidis*, deve ser contínua, tendo em vista a presença de uma diversidade de genes relacionados a mecanismos de resistência, que podem ser transferidos horizontalmente intra ou interespécies.

REFERÊNCIAS

- ALCALÁ, B. et al. *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to ciprofloxacin: First report in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 409, 2004.
- ALCOCK, B. P. et al. Card 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Res**, v. 48, n. 1, p. 517-525, 2020.
- ALEMAYEHU, T.; MEKASHA, A.; ABEBE, T. Nasal carriage rate and antibiotic susceptibility pattern of *Neisseria meningitidis* in healthy Ethiopian children and adolescents: A cross-sectional study. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. 1-11, 2017.
- ALFSNES, K. et al. A genomic view of experimental intraspecies and interspecies transformation of a rifampicin-resistance allele into *Neisseria meningitidis*. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 11, p. 1-14, 2018.
- ARREAZA, L.; FUENTE, L.; VÁZQUEZ, J. A. Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 44, n. 6, p. 1705-1707, 2000.
- ARREAZA, L. et al. What about antibiotic resistance in *Neisseria lactamica*? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 545-547, 2002.
- BARROSO, D. E. Doença meningocócica. In: COURA, J. R. (ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap. 2, p. 1481-1501.
- BENNETT, J. S. et al. Genetic diversity and carriage dynamics of *Neisseria lactamica* in infants. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2424-2432, 2005.
- BERTRAND, S. et al. Evolutionary changes in antimicrobial resistance of invasive *Neisseria meningitidis* isolates in Belgium from 2000 to 2010: Increasing prevalence of penicillin nonsusceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2268-2272, 2012.

BLAIN, A. E. et al. Penicillin use in meningococcal disease management: Active bacterial core surveillance sites, 2009. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 1-3, 2016.

BLONDEAU, J. M.; YASCHUK, Y. In vitro activities of ciprofloxacin, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphenicol, and rifampin against fully susceptible and moderately penicillin-resistant *Neisseria meningitidis*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 39, n. 1, p. 2577-2579, 1995.

BOTHA, P. Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Southern Africa. **The Lancet**, v. 331, n. 8575, p. 54, 1988.

BOWLER, L. D. et al. Interspecies recombination between the pen genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: Natural events and laboratory simulation. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 333-337, 1994.

BRANHAM, S. E. Serological relationships among meningococci. **Bacteriological Review**, v. 17, n. 3, p. 175-188, 1953.

BRASIL. Guia de vigilância em saúde. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços**, 3ª ed., 2019.

_____. Guia de vigilância epidemiológica. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**, 7ª ed., p. 816, 2009.

_____. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da doença meningocócica, Brasil, 2007-2013. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 29, p. 1-8, 2016.

BRCAS. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.

BROWN, E. M. et al. Epidemiology of invasive meningococcal disease with decreased susceptibility to penicillin in Ontario, Canada, 2000 to 2006. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 54, n. 3, p. 1016-1021, 2010.

CANIÇA, M.; DIAS, R.; FERREIRA, E. *Neisseria meningitidis* c:2b:P1.2,5 with intermediate resistance to penicillin, Portugal. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 526-529, 2004.

CARTWRIGHT, K. et al. The stonehouse survey: Nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. **Epidemiology & Infection**, v. 99, n. 3, p. 591-601, 1987.

CATLIN, B. W. Report (1966-1970) of the subcommittee on the taxonomy of the *Neisseriaceae* to the international committee on nomenclature of bacteria. **J. Syst. Bacteriol.**, v. 21, p. 154-155, 1971.

CAUGANT, D. A.; TZANAKAKI, G.; KRIZ, P. Lessons from meningococcal carriage studies. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 52-63, 2007.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the united states**. Atlanta, GA, 2019

CHEN, M. et al. Shifts in the antibiotic susceptibility, serogroups, and clonal complexes of *Neisseria meningitidis* in Shanghai, China: A time trend analysis of the pre-quinolone and quinolone eras. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 6, p. 1-22, 2015.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: Mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of Molecular Evolution**, p. 1-15, 2019.

CHRISTENSEN, H. et al. Meningococcal carriage by age: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 853-861, 2010.

CHRISTODOULIDES, M. A history of bacterial meningitis from antiquity to modern times. In: CHRISTODOULIDES, M. (ed.). **Meningitis: Cellular and molecular basis**. Oxford, GB, 2013. Cap. 1, p. 1-16.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100**. 2020.

CORSO, A. et al. Emergence of *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in Argentina. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 595-596, 2005.

DARRIBA, D. et al. Jmodeltest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nat Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE MORAES, J. C. et al. Prevalence, risk factors and molecular characteristics of meningococcal carriage among brazilian adolescents. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 11, p. 1197-1202, 2015.

DEASY, A. M. et al. Nasal inoculation of the commensal *Neisseria lactamica* inhibits carriage of *Neisseria meningitidis* by young adults: A controlled human infection study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1512-1520, 2015.

DI CAPRIO, G. et al. Increased rate of penicillin non-susceptible strains of *N. meningitidis* in Naples, Italy. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 6, p. 389-390, 2017.

DILLON, J. R.; PAUZÉ, M.; YEUNG, K.-H. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. **The Lancet**, v. 321, n. 8328, p. 779-781, 1983.

DOSTER, E. et al. Megares 2.0: A database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. **Nucleic Acids Res**, v. 48, n. 1, p. 561-569, 2020.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

EDGAR, R. C. Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ELIAS, J.; FROSCHE, M.; VOGEL, U. *Neisseria*. In: CARROLL, K. C., et al. (ed.). **Manual of clinical microbiology**. 12 ed. Washington, DC: ASM Press, 2019. P. 640-655

EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of mics and zone diameters**. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.

FEDERHEN, S. et al. Meeting report: Genbank microbial genomic taxonomy workshop (12–13 may, 2015). **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p., 2016.

FELDGARDEN, M. et al. Validating the amrfinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n. 11, p. 1-19, 2019.

FERREIRA, V. M. et al. Meningococcal carriage in young adults six years after meningococcal c conjugate (mcc) vaccine catch-up campaign in Salvador, Brazil. **Vaccine**, v. 38, n. 14, p. 2995-3002, 2020.

FIORE, M. A. et al. Exploration of the *Neisseria* resistome reveals resistance mechanisms in commensals that may be acquired by n. Gonorrhoeae through horizontal gene transfer. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 2020.

FRASER, A. et al. Antibiotics for preventing meningococcal infections (review). **The Cochrane Library**, v. 8, n. 4, p. 1-45, 2006.

GIANCACCINI, E. et al. An unwanted guest: *Neisseria meningitidis* - carriage, risk for invasive disease and the impact of vaccination with insight on Italy incidence. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 15, n. 7, p. 689-701, 2017.

- GIOIA, C. A. C. et al. Detection of *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers in a university hospital from Brazil. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 4, p. 322-327, 2015.
- GOLD, R. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 112 - 121, 1978.
- GOLDSCHNEIDER, I. Human immunity to the meningococcus: I. The role of humoral antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 129, n. 6, p. 1307-1326, 1969.
- GOLPARIAN, D. et al. Importance of multidrug efflux pumps in the antimicrobial resistance property of clinical multidrug-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 6, p. 3556-3559, 2014.
- GORIS, J. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. 1, p. 81-91, 2007.
- GORLA, M. C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated from meningitis cases in Brazil from 2006 to 2008. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 2, p. 85-89, 2011.
- GORLA, M. C. et al. Emergence of resistance to ciprofloxacin in *Neisseria meningitidis* in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 286-288, 2018a.
- GORLA, M. C. et al. Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive cases in Brazil from 2009 to 2016. **J Med Microbiol**, v. 67, n. 6, p. 750-756, 2018b.
- GORRINGE, A. R. et al. Phase I safety and immunogenicity study of a candidate meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 8, p. 1113-1120, 2009.
- GUIMARÃES, L. C. et al. Inside the pan-genome - methods and software overview. **Current Genomics**, v. 16, n. 4, p. 245-252, 2015.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of phyml 3.0. **Syst Biol**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GUPTA, S. K. et al. Arg-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 58, n. 1, p. 212-220, 2014.

HAMILTON, H. L.; DILLARD, J. P. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: From DNA donation to homologous recombination. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 376-385, 2006.

HARCOURT, B. H. et al. Population-based surveillance of *Neisseria meningitidis* antimicrobial resistance in the United States. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 1-6, 2015.

HARRISON, O. B. et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 566-573, 2013.

HOLLIS, D. G.; WIGGINS, G. L.; WEAVER, R. E. *Neisseria lactamicus* sp. n., a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. **APPLIED MICROBIOLOGY**, v. 17, n. 1, p. 71-77, 1969.

HU, S. et al. *Neisseria meningitidis* serogroup w135 sequence type 11, Anhui province, China, 2011–2013. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 7, p. 1236-1237, 2014.

IBARZ-PAVÓN, A.B et al. Laboratory-Based Surveillance of *Neisseria meningitidis* Isolates from Disease Cases in Latin American and Caribbean Countries, SIREVA II 2006–2010. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. 1-13, 2012.

ITO, M. et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in central Japan. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 49, n. 1, p. 137-143, 2005.

KAHLER, C. M. Emergence of a urogenital pathotype of *Neisseria meningitidis*. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 510-512, 2017.

KARCH, A.; VOGEL, U.; CLAUS, H. Role of *penA* polymorphisms for penicillin susceptibility in *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 7, p. 729-735, 2015.

KAWASAKI, Y. et al. Invasive meningococcal disease due to ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis* sequence type 4821: The first case in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 4, p. 305-308, 2018.

KIRLEW, C.; WILMOT, K.; SALINAS, J. L. *Neisseria sicca* endocarditis presenting as multiple embolic brain infarcts. **Open Forum Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 1-2, 2015.

KNAPP, J. S.; CLARK, V. L. Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 1, p. 176-181, 1984.

KROLL, J. S. et al. Natural genetic exchange between *Haemophilus* and *Neisseria*: intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 13, p. 12381-12385, 1998.

LEE, E. H. et al. Farr regulates the farab-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an mtrr regulatory mechanism. **J Bacteriol**, v. 185, n. 24, p. 7145-7152, 2003.

LEE, E. H.; SHAFER, W. M. The farab-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 839-845, 1999.

LEMOS, A. P. S. D.; ELIAS JR, W. P.; CAMPOS, L. C. *Neisseria*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (ed.). **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015. Cap. 27, p. 233-244.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (itol) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. 1, p. 242-245, 2016.

LIU, G.; TANG, C. M.; EXLEY, R. M. Non-pathogenic *Neisseria*: Members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. **Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 1297-1312, 2015.

LUJAN, R. et al. Penicillin-resistant isolates of *Neisseria lactamica* produce altered forms of penicillin-binding protein 2 that arose by interspecies horizontal gene transfer.

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, v. 35, n. 2, p. 300-304, 1991.

MA, K. C. et al. Adaptation to the cervical environment is associated with increased antibiotic susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae*. **Nat Commun**, v. 11, n. 1, p. 4126, 2020.

MEDINI, D. et al. The microbial pan-genome. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 6, p. 589-594, 2005.

MENDELMAN, P. M. et al. Genetic diversity of penicillin G-resistant *Neisseria meningitidis* from Spain. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1025-1029, 1989.

MITCHELL, M. S.; RHODEN, D. L.; KING, E. Lactose-fermenting organisms resembling *Neisseria meningitidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 90, n. 2, p. 560, 1965.

MOURA, A. et al. Epidemiology and molecular characterization of *Neisseria lactamica* carried in 11-19 years old students in Salvador, Brazil. **Int J Med Microbiol**, v. 308, n. 4, p. 454-458, 2018.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. Sixth Edition, USA, 2003.

NUNES, A. M. et al. Meningococcal carriage among adolescents after mass meningococcal conjugate vaccination campaigns in Salvador, Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. 1-11, 2016.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**. 2016

OKUMOTO, O. Portaria nº 64, de 11 de dezembro de 2018 Diário Oficial da União, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil, 14 dez. 2018. Seção 1, p. 59.

PAGE, A. J. et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3691-3693, 2015.

PALMER, A. C., CHAIT, R., KISHONY, R. Nonoptimal Gene Expression Creates Latent Potential for Antibiotic Resistance. **Mol. Biol. Evol**, v. 35, n. 11, p. 2669–2684, 2018.

PARTE, A. C. Lpsn - list of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2014. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: Junho de 2020.

PETERSON, E., KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2928, p. 1-21, 2018.

PROFT, T.; BAKER, E. N. Pili in gram-negative and gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 4, p. 613-635, 2009.

QVARNSTROM, Y.; SWEDBERG, G. Variations in gene organization and DNA uptake signal sequence in the folp region between commensal and pathogenic *Neisseria* species. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1-9, 2006.

RETCHLESS, A. C. et al. Oropharyngeal microbiome of a college population following a meningococcal disease outbreak. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 632, 2020.

RICHTER, M. et al. Jspeciesws: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929-931, 2016.

RILEY, G.; BROWN, S.; KRISHNAN, C. Penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 14, p. 997, 1991.

ROTMAN, E.; SEIFERT, H. S. The genetics of *Neisseria* species. **The Annual Review of Genetics**, v. 48, p. 405-431, 2014.

ROWLEY, J. et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bull World Health Organ**, v. 97, n. 8, p. 548-562, 2019.

SAEZ-NIETO, J. A. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in a school population during an epidemic period in Spain. **Journal of Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 279-288, 1985.

SAEZ-NIETO, J. A. et al. Isolation of *Neisseria meningitidis* strains with increase of penicillin minimal inhibitory concentrations. **Epidemiology & Infection**, v. 99, n. 2, p. 463-469, 1987.

SAEZ-NIETO, J. A. et al. *Neisseria lactamica* and *Neisseria polysaccharea* as possible sources of meningococcal β -lactam resistance by genetic transformation.

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, v. 34, n. 11, p. 2269-2272, 1990.

SAFADI, M. A. et al. Carriage rate and effects of vaccination after outbreaks of serogroup C meningococcal disease, Brazil, 2010. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 5, p. 806-811, 2014.

SBPC/ML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial). Comitê brasileiro de testes de sensibilidade aos antimicrobianos. **Revista Informativa da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial**, ed. 68, ano 6, p. 12, 2015.

SCHMIDT, H. A.; HAESLER, A. V. Maximum-likelihood analysis using tree-puzzle. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. 6, n. 6, p. 1-23, 2007.

SCHOEN, C. et al. Genome flexibility in *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 27, Suppl 2, p. B103-B111, 2009.

SCHOEN, C. et al. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, Article 114, p. 1-16, 2014.

SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SHARMA, S. et al. Meningococcal meningitis: A multicentric hospital-based study in Kathmandu, Nepal. **The Open Microbiology Journal**, v. 13, n. 1, p. 273-278, 2019.

SHIMUTA, K. et al. A loop-mediated isothermal amplification assay targeting *Neisseria gonorrhoeae* penA-60.001. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 64, n. 1, p. 1-5, 2020.

SHULTZ, T. R.; TAPSALL, J. W.; WHITE, P. A. An invasive isolate of *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to quinolones. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 44, n. 4, p. 1116, 2000.

SILVA, L. A. et al. *Neisseria meningitidis* disease-associated clones in Amazonas state, Brazil. **Infect Dis (Lond)**, v. 50, n. 9, p. 697-704, 2018.

SORHOUE-TEREIRA, C. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Neisseria meningitidis* disease-causing strains in Argentina, 2010. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2013.

SOSA, J. et al. Typing and susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Cuba (1993-1999). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 523-525, 2001.

SPRATT, B. G. et al. Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, n. 2, p. 115-125, 1992.

SPROTT, M. S.; KEARNS, A. M.; FIELD, J. M. Penicillin-insensitive *Neisseria meningitidis*. **The Lancet**, v. 331, n. 8595, p. 1167, 1988.

STEFANELLI, P. Emerging resistance in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Expert Reviews**, v. 9, n. 2, p. 237-244, 2011.

STEFANELLI, P. et al. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease: Detection of point mutations in the *rpoB* gene and molecular characterization of the strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 219-222, 2001.

STEPHENS, D. S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. **The Lancet**, v. 369, n. 9580, p. 2196-2210, 2007.

TAHA, M. K. et al. Target gene sequencing to characterize the penicillin g susceptibility of *Neisseria meningitidis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 8, p. 2784-2792, 2007.

TØNJUM, T.; VAN PUTTEN, J. *Neisseria*. In: COHEN, J.; POWDERLY, W.; OPAL, S. (ed.). **Infectious diseases**. 4 ed. London: Elsevier Limited, 2017. cap. 179, p. 1553-1564.

TOTH, A. et al. First description of a rifampicin-resistant *Neisseria meningitidis* serogroup y strain causing recurrent invasive meningococcal disease in Hungary. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 64, n. 1, p. 1-7, 2017.

TSANG, R. S. et al. Ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis* in Canada: Likely imported strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 265-268, 2017.

TSANG, R. S. W. et al. Wgs analysis of a penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* strain containing a chromosomal *rob-1* beta-lactamase gene. **J Antimicrob Chemother**, v. 74, n. 1, p. 22-28, 2019.

TZANAKAKI, G. et al. First report of meningococcal ciprofloxacin resistance in Greece due to invasive isolates of the sequence type ST-3129. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 12, p. 2467-2470, 2020.

UNEMO, M.; DEL RIO, C.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A major global public health problem in the 21st century. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 3, p. 1-32, 2016.

VACCA, P. et al. *Neisseria meningitidis* antimicrobial resistance in Italy, 2006 to 2016. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 62, n. 9, p. 1-6, 2018.

VÁRQUEZ, J. A. The resistance of *Neisseria meningitidis* to the antimicrobial agents: An issue still in evolution. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 39-45, 2001.

VAUGHAN, T. E. et al. Proteomic analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine antigens. **Vaccine**, v. 24, n. 25, p. 5277-5293, 2006.

VERNIKOS, G. et al. Ten years of pan-genome analyses. **Curr Opin Microbiol**, v. 23, p. 148-154, 2015.

VERSCHUEREN, H. et al. Plasmids in *Neisseria meningitidis*. **The Lancet**, v. 319, n. 8276, p. 851-852, 1982.

VIEUSSEUX, G. Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. **J Med Chi Pharm**, v. 11, p. 163-193, 1805.

WAKUI, D. et al. A case of meningitis due to *Neisseria subflava* after ventriculostomy. **J Infect Chemother**, v. 18, n. 1, p. 115-118, 2012.

WANG, C. Y. et al. Bacteraemic pneumonia caused by *Neisseria lactamica* with reduced susceptibility to penicillin and ciprofloxacin in an adult with liver cirrhosis. **J Med Microbiol**, v. 55, n. 8, p. 1151-1152, 2006.

WEIDLICH, L. et al. High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of w135:P1.5,2:St-11 clone in southern Brazil. **J Infect**, v. 57, n. 4, p. 324-331, 2008.

WHILEY, D. M. et al. Reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* is associated with mutations G542S, P551S and P551L in the gonococcal penicillin-binding protein 2. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1615–1618, 2010.

WHO. **The thirteenth general programme of work, 2019–2023. Promote health - keep the world safe - serve the vulnerable.** World Health Organization, 2019.

_____. **Who report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation.** Geneva, 2018.

WU, H. M. et al. Emergence of ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis* in North America. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 9, p. 886-892, 2009.

XU, X.-J. et al. Molecular cloning and characterization of the hmr multidrug efflux pump from *Haemophilus influenzae* Rd. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 12, p. 937-943, 2003.

YAGUPSKY, P.; ASHKENAZI, S.; BLOCK, C. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease and failure of chemoprophylaxis. **The Lancet**, v. 341, n. 8853, p. 1152-1153, 1993.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.

ZAPUN, A.; MORLOT, C.; TAHA, M. K. Resistance to beta-lactams in *Neisseria* ssp due to chromosomally encoded penicillin-binding proteins. **Antibiotics (Basel)**, v. 5, n. 4, p. 12, 2016.

ZOUHEIR, Y.; ATANY, T.; BOUDEBOUCH, N. Emergence and spread of resistant *N. meningitidis* implicated in invasive meningococcal diseases during the past decade (2008-2017). **The Journal of Antibiotics**, v. 72, n. 3, p. 185-188, 2019.

APÊNDICE 1

Crítérios de interpretação de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para concentração inibitória mínima em *Neisseria meningitidis* estabelecidos pelo CLSI, EUCAST e BrCAST em 2020.

ANTIMICROBIANO	CLSI			EUCAST			BrCAST		
	S (µg/mL)	I (µg/mL)	R (µg/mL)	S (µg/mL) *	I** (µg/mL) *	R (µg/mL) *	S (µg/mL) *	I (µg/mL) *	R (µg/mL) *
Amoxicilina	X	X	X	≤0,12	X	>1	≤0,12	0,25-1	>1
Ampicilina	≤0,12	0,25-1	≥2	≤0,12	X	>1	≤0,12	0,25-1	>1
Azitromicina	≤2	-	-	-	X	-	-	-	-
Cefotaxima	≤0,12	-	-	≤0,12	X	>0,12	≤0,12	-	>0,12
Ceftriaxona	≤0,12	-	-	≤0,12	X	>0,12	≤0,12	-	>0,12
Ciprofloxacina	≤0,03	0,06	≥0,12	≤0,03	X	>0,03	≤0,03	-	>0,03
Cloranfenicol	≤2	4	≥8	≤2	X	>2	≤2	-	>2
Levofloxacina	≤0,03	0,06	≥0,12	EI	X	EI	EI	EI	EI
Meropenem	≤0,25	-	-	≤0,25	X	>0,25	≤0,25	-	>0,25
Minociclina	≤2	-	-	≤1	X	>2	≤1	2	>2
Penicilina	≤0,06	0,12-0,25	≥0,5	≤0,06	X	>0,25	≤0,06	0,12-1	>1
Rifampicina	≤0,5	1	≥2	≤0,25	X	>0,25	≤0,25	-	>0,25
Sulfametoxazol	≤2	4	≥8	X	X	X	X	X	X
Trimetoprim-Sulfametoxazol	≤0,12/2,4	0,25/4,75	≥0,5/9,5	-	X	-	-	-	-
Tetraciclina	X	X	X	≤1	X	>2	≤1	2	>2

Legenda: CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; BrCAST = Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; S = sensível; I = intermediário; R = resistente; X = ausência de critérios interpretativos do comitê para uso do agente para terapia antimicrobiana. EI = não existem evidências suficientes de que o organismo ou grupo seja um bom alvo para terapia com o agente.

* Os comitês EUCAST e BrCAST expressão critérios de interpretação na unidade de mg/L, a qual é correspondente a µg/mL.

** EUCAST não possui critérios de interpretação para valores intermediários.

APÊNDICE 2

Crítérios de interpretação de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para concentração inibitória mínima em *Neisseria gonorrhoeae* estabelecidos pelo CLSI, EUCAST e BrCAST em 2020.

ANTIMICROBIANO	CLSI			EUCAST			BrCAST		
	S (µg/mL)	I (µg/mL)	R (µg/mL)	S (µg/mL) *	I** (µg/mL) *	R (µg/mL) *	S (µg/mL) *	I (µg/mL) *	R (µg/mL) *
Azitromicina	≤1	-	-	≤1***	X	-	≤1***	-	-
Cefepima	≤0,5	-	-	-	X	-	X	X	X
Cefixima	≤0,25	-	-	≤0,12	X	>0,12	X	X	X
Cefotaxima	≤0,5	-	-	≤0,12	X	>0,12	≤0,12	-	>0,12
Cefotetano	≤2	4	≥8	X	X	X	X	X	X
Cefoxitina	≤2	4	≥8	-	X	-	X	X	X
Cefpodoxima	≤0,5	-	-	-	X	-	X	X	X
Ceftizoxima	≤0,5	-	-	X	X	X	X	X	X
Ceftriaxona	≤0,25	-	-	≤0,12	X	>0,12	≤0,12	-	>0,12
Ciprofloxacina	≤0,06	0,12-0,5	≥1	≤0,03	X	>0,06	≤0,03	0,06	>0,06
Espectinomicina	≤32	64	≥128	≤64	X	>64	≤64	-	>64
Ofloxacina	X	X	X	≤0,12	X	>0,25	≤0,12	0,25	>0,25
Penicilina	≤0,06	0,12-1	≥2	≤0,06	X	>1	≤0,06	0,12-1	>1
Tetraciclina	≤0,25	0,5 - 1	≥2	≤0,5	X	>1	≤0,5	1	>1

Legenda: CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; BrCAST = Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; S = sensível; I = intermediário (CLSI) ou sensível, aumentando a exposição (EUCAST e BrCAST); R = resistente; X = ausência de critérios interpretativos do comitê para uso do agente para terapia antimicrobiana.

* Os comitês EUCAST e BrCAST expressão critérios de interpretação na unidade de mg/L, a qual é correspondente a µg/mL.

** EUCAST não possui critérios de interpretação para valores intermediários.

*** Os comitês EUCAST e BrCAST determinam que a azitromicina é sempre usada em conjunto com outro agente efetivo. Para fins de teste, com o objetivo de detectar mecanismos de resistência adquiridos, o critério de interpretação epidemiológico é de 1 mg/L.