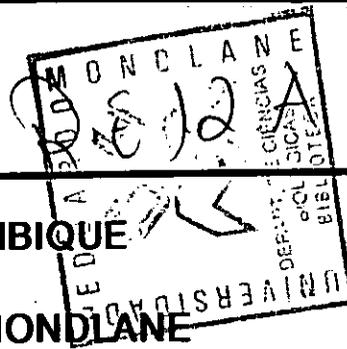


B10-1



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Titulo:

CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES DE NEISSERIA GONORRHOEAE EM MOÇAMBIQUE: AUXOTIPAGEM, SEROTIPAGEM E CONCENTRAÇÃO INIBITORIA MÍNIMA

SUPERVISORA:	DR ^a . ELENA FOLGOSA
CO-SUPERVISOR:	DR. MANUEL VIDAL
AUTORA:	JOSEFA MELO

MAPUTO, 05 DE JUNHO DE 1995

1

INDICE:

1. Agradecimentos-----	3
2. Sumário-----	4
3. Introdução e objectivos-----	5
4. Material e Métodos-----	11
4.1. Isolamento-----	11
4.1.1. Cultura-----	11
4.1.2. Morfologia das colónias-----	11
4.1.3. Coloração de Gram-----	12
4.1.4. Oxidase-----	12
4.1.5. Teste de B-Lactamase-----	12
4.1.6. Teste de degradação de Hidratos de Carbono-----	12
4.2. Recultura-----	13
4.3. Auxotipagem-----	13
4.4. Serotipagem-----	14
4.5. Teste de sensibilidade a antibióticos-----	14
5. Resultados-----	16
5.1. Estirpes produtoras de Penicilinases (PPNG)-----	17
5.2. Estirpes não-PPNG-----	18
6. Discussão -----	20
7. Conclusão-----	22
8. Recomendações-----	24
9. Bibliografia consultada-----	25



1. AGRADECIMENTOS:

Este estudo foi possível graças ao financiamento da União Europeia, Aids Task Force, Projecto de Sida/DTS. É de agradecer a assitência técnica dispensada pela Senhora Hilde* e a amabilidade dos Senhores E. Van Dyck** e Bea Vuylsteke* em terem cedido material de consulta e feito comentários sobre o trabalho.

Um agradecimento muito especial à D^{ra} Tânia Crucitti+ , à D^{ra} Elena Folgosa++, Supervisora deste trabalho; e à minha família por todo o tipo de apoio que me prestaram.

Estes agradecimentos também se estendem a todos que directa ou indirectamente contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

* Instituto de Medicina Tropical-Bélgica (IMT)

** Responsavel do Departamento de Micro-Biologia do IMT

+ Assistente técnica da Uniao Europeia, programa Sida/DTS

++ Responsável do Laboratório Nacional de Referência de DTS

2. SUMÁRIO

Um total de 151 estirpes não-selectivas de *Neisseria gonorrhoeae*, isoladas de amostras de corrimento uretral colhidas a pacientes do sexo masculino consecutivamente observados nas consultas de DTS da cidade de Maputo, foram enviadas do Laboratório Nacional de Referência de D.T.S. em Moçambique para o Instituto de Medicina Tropical em Antuérpia-Bélgica. Destas, 137 estirpes de *Neisseria gonorrhoeae* foram recultivadas e testadas quanto a sua sensibilidade a sete (7) antibióticos, pelo método de diluição de agar, para a determinação da concentração inibitória mínima; foi efectuada a auxotipagem segundo a metodologia de Catlin e a serotipagem pela metodologia de Sandstrom e Danielsson usando a nomenclatura de Knapp. Noventa (65,7%) das estirpes isoladas, foram produtoras de B-lactamase (PPNG) e 47 (34,3%) não produziram B-lactamase (não-PPNG). Das estirpes produtoras de B-lactamase, 62 (68,9%) foram consideradas estritamente PPNG e 28 (31,1%) PPNG altamente resistentes a Tetraciclina (PPNG/TRNG). Das não-PPNG, 1 estirpe (2,13%) mostrou resistência cromossómica á Penicilina; 21 (44,7%) mostraram resistência cromossómica á Tetraciclina; e 5 (10,6%) mostraram resistência cromossómica á Penicilina e Tetraciclina. Uma (1) estirpe foi altamente resistente á Tetraciclina (TRNG) e apresentava resistência cromossómica ao Tianfenicol. Das 137 estirpes, 76 (55,4%) foram resistentes ao Tianfenicol. Todas as estirpes foram sensíveis a Kanamicina, Espectinomicina, Ciprofloxacina e Ceftriaxone. Foram detectados 20 serovars diferentes, sendo os mais frequentes: IA₆ com 39(28,5%) estirpes e IA₂ com 15(11%) estirpes do serogrupo WI e IB₃ com 22 estirpes(16,1%), IB₅ com 15(11%) estirpes e IB₂₃ com 8(5,8%) estirpes do serogrupo WII/WIII. Foram encontrados 9 auxotipos sendo os mais predominantes: PRO⁻ com 57(41,6%) estirpes, PRO⁰ com 50(36,4%) estirpes, PRO⁻, HYPO⁻, URA⁻ (PHU⁻) com 12(8,8%) estirpes e HYPO⁻, URA⁻ (HU⁻) com 7(5,1%) estirpes.

3. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Gonorreia é uma doença conhecida desde a antiguidade e continua sendo uma infecção bacteriana muito comum no Mundo (4,6). O agente etiológico da gonorreia é Neisseria gonorrhoeae, isolado por Albert L. S. Neisser, em 1879 (29). O organismo, comumente conhecido como gonococo, é um diplococo gram-negativo, imóvel, não esporulante, o qual caracteristicamente se dispõe aos pares com os lados adjacentes aplanados(27,29).

A Neisseria gonorrhoeae é um organismo muito frágil, altamente susceptível a influências de ambientes adversos tais como temperaturas extremas e secura; é igualmente susceptível a muitos antissépticos e desinfectantes, e não sobrevive muito tempo fora do seu hospedeiro natural (28,29), o homem (30).

Gonorreia é transmitida entre indivíduos por contacto directo, usualmente sexual. No sexo masculino, a manifestação mais comum da infecção, é uma uretrite aguda, caracterizada por um ataque abrupto de disúria e secreção uretral purulenta. O período de incubação é de 2 a 7 dias (28,29). Nas mulheres, o local primário da Gonorreia urogenital é o endocervix. As infecções são acompanhadas por secreção vaginal purulenta, disúria e aumento da frequência urinária. Muitas mulheres com gonorreia não complicada, permanecem assintomáticas ou não desenvolvem sintomas suficientes para uma atenção médica. Em algumas mulheres com cervicite, a infecção ascende ao útero e às trompas de falópio, e estende-se até aos ovários. Como estes estreitos tubos (trompas) ficam cheios de pús e aderências, a passagem dos óvulos torna-se difícil, resultando em salpingites, peritonites pélvicas, ou ambas; estas complicações são referidas como doença inflamatória pélvica (PID). A reacção inflamatória do PID pode causar a obstrução das trompas, levando a infertilidade ou a gravidez ectópica (28,29). A Gonorreia é particularmente perigosa para bebés nascidos de mulheres infectadas. A criança pode contrair Gonorreia durante a passagem através do canal de parto e desenvolver a doença dos olhos chamada oftalmia gonocócica neonatal(29). A crescente evidência de que certas DTS como úlceras genitais, gonorreias, infecções por Chlamydia, tricomoníase, funcionam como factores de risco para a transmissão da infecção do HIV é extremamente importante. Além disso, a infecção por HIV e a imunossupressão parecem

alterar a história natural das DTS de maneira a que provavelmente aumentem a sua transmissão (27).

A incidência da Gonorreia varia com a idade e é maior entre jovens e pessoas sexualmente activas. Os factores demográficos de risco para esta doença incluem: estrato sócio-económico, início precoce de actividade sexual, estado civil - particularmente os solteiros (27). A Gonorréia nos Países industrializados tem sido registada com baixa incidência em relação aos Países do Terceiro Mundo onde a incidência se estima em 10% ao ano (24). Apesar de tratamentos efectivos e queda dramática no número total de casos de Gonorreia na Europa e USA, a erradicação desta doença nestes Países desenvolvidos tem sido dificultada pela existência de um " grupo-alvo" de transmissores com alta prevalência de Gonorreia assintomática, ou pela importação de estirpes de N.gonorrhoeae resistentes a antibióticos de Países menos desenvolvidos como a Ásia e África (8,13). Membros do grupo-alvo tendem a permanecer agrupados em áreas geográficas (geralmente nas cidades). Estes são frequentemente indivíduos com repetidos episódios de Gonorreia, que não se abstiveram sexualmente mesmo sendo sintomáticos; pacientes com comportamentos de alto risco, que são mais susceptíveis de ser infectados e transmitir a Gonorreia aos seus parceiros sexuais, em relação aos membros da população em geral (27). O grande reservatório de indivíduos assintomáticos portadores de N. gonorrhoeae, assim como o uso indiscriminado de antibióticos para a profilaxia e tratamento da Gonorreia, indubitavelmente servem para exacerbar o problema desta doença (19).

Segundo Bygdeman (1981), a infecção assintomática é uma das mais importantes causas de insucesso no tratamento da Gonorreia e também de disseminação da infecção gonocócica na sociedade. A proporção da Gonorreia assintomática em mulheres foi reportada para cerca de 50-80%, enquanto que a incidência em homens primeiramente foi considerada baixa (6). A eficácia da transmissão da Gonorreia é dependente do local anatómico exposto bem como do número de exposições no sexo masculino. O risco de adquirir uma infecção uretral após um simples contacto com uma pessoa infectada é estimado em cerca de 20 a 30% , enquanto que nas mulheres, a taxa de transmissão numa simples exposição é maior (cerca de 60 a 80%), em parte devido à retenção da ejaculação infectada (27). A escolha do agente antimicrobiano

para a terapia da Gonorreia é influenciada por uma variedade de factores. Os níveis de antibiótico no soro devem ser superiores ou iguais a três vezes a concentração inibitória mínima (MIC) da estirpe de Neisseria gonorrhoeae infectante por pelo menos 8 horas, de modo a assegurar a cura da infecção não complicada. Para além disso, a escolha do agente antimicrobiano deve reflectir os padrões locais de resistência antimicrobiana e a probabilidade de que os pacientes com infecção gonocócica sejam coinfectados ou tenham sido recentemente expostos a outros agentes sexualmente transmissíveis, por exemplo Chlamydia trachomatis (27).

Na prática clínica, tem havido uma selecção de mutantes resistentes a antibióticos ao longo de várias décadas e recentemente têm aparecido muitos plasmídeos diferentes com elevados níveis de resistência a antibióticos. A consequência destes eventos tem sido a de tornar a terapia com Penicilina ineficaz em algumas áreas, e ameaçar a utilidade clínica da Tetraciclina. Existe uma disponibilidade de terapia efectiva para as estirpes gonocócicas resistentes áqueles antibióticos; como por exemplo a Espectinomina e Ceftriaxone, mas estes são antibióticos mais caros em relação a Penicilina e Tetraciclina (5). Assim, o controle da Gonorreia tem sido muito complicado, não só pela emergência de resistência mediada por plasmídeos, mas também pela emergência da resistência a agentes terapêuticos antimicrobianos, mediada cromossomicamente (4,15,23).

Estirpes de N.gonorrhoeae expressando elevado nível de resistência á Tetraciclina (TRNG), foram primeiramente reportadas em 1985 nos Estados Unidos, CDC (Centers for Disease Control),Atlanta,USA, e nos Países Baixos, embora um estudo retrospectivo nos Estados Unidos tivesse revelado a descoberta de uma estirpe em 1983 (20). Todas as estirpes TRNG têm sido reportadas como possuidoras de um plasmídeo de aproximadamente 40,6 Kb (25,2 Mda),o qual possui um determinante de resistência da classe M. Esta resistência, segundo Casin et al, (1988), é devida à aquisição do determinante estreptocócico Tet M, localizado no plasmídeo 25,2 Mda (31).

Estirpes PPNG foram reportadas pela 1ª vez em 1976 (22) pelo C.D.C. (Centers for Disease Control) Atlanta, USA, por Ashford et al. Estas estirpes resistentes á Penicilina, de diferentes origens geográficas diferem nas suas propriedades biológicas (7). Perine et al (citado por Schipper, 1985)

encontrou em estirpes PPNG de África um plasmídeo de 3,2 Mda que codifica para a produção de Penicilinases e nas estirpes de Ásia foi um plasmídeo de 4,4 Mda.

A percentagem de estirpes PPNG nos países de África é bastante elevada. Ex.: África do Sul (32,7% = 35 PPNG num total de 107 estirpes testadas) (11); Ruanda, mais de 50% de 104 estirpes testadas foram PPNG (1); Kenya (15% PPNG) (12), Zaire (59% PPNG) (2), Zâmbia (52% PPNG) em 1986 (9) e mais de 50% PPNG no Zimbabwe (10).

Em áreas onde a Penicilina é usada para tratamento da Gonorreia, estirpes isoladas de amostras para teste de cura ou todas as estirpes gonocócicas, dependendo da prevalência de estirpes produtoras de Penicilinases, devem ser testadas para a produção de Penicilinases (B-lactamase). Existem testes simples para a detecção de B-lactamase, baratos e standardizados (14,26). Muitas explicações têm sido postas para o rápido desenvolvimento da resistência em certas áreas do que noutras. A mais proeminente é o uso indiscriminado de antibióticos orais, ou o uso frequente de Penicilina benzatínica de acção prolongada. Estas terapias produzem níveis relativamente baixos do fármaco no soro, os quais são mantidos por períodos de tempo consideráveis. Ora, essas são exactamente as condições necessárias para a selecção de mutantes com pequenos aumentos na resistência à antibióticos. Os antibióticos são disponíveis sem prescrição médica no Extremo Oriente e em muitas áreas do Mundo e isto conta para o aumento dos problemas de estirpes gonocócicas com resistência a fármacos nessas áreas (8). Testes de sensibilidade de estirpes de *N. gonorrhoeae* a antibióticos dão uma informação epidemiológica muito útil para a formulação de guias de tratamento. A monitorização ocasional dos padrões de sensibilidade por um período de tempo, é usada para detectar o desenvolvimento da resistência ao antibiótico, e pode indicar a necessidade para uma mudança nos esquemas de tratamento. O único método recomendado para a monitorização do padrão de sensibilidade de *Neisseria gonorrhoeae* é o MIC pelo método de diluição de agar (14).

Têm sido desenvolvidas várias técnicas para diferenciação das estirpes de acordo com a sua capacidade de crescer em presença de certos amino-ácidos ou outros nutrientes específicos ---Auxotipagem (27). Certos auxotipos são biológica e clinicamente importantes. Uma estirpe por exemplo, a qual requer

arginina, hipoxantina e uracilo (AHU⁻), está associada com múltiplas propriedades, incluindo resistência à acção bactericida do soro humano; capacidade para causar infecções uretrais assintomáticas em homens; e elevada probabilidade de causar bacteriémia. Auxotipagem é um instrumento poderoso para estudos epidemiológicos e para a caracterização da virulência, especialmente se combinada com a serotipagem e outros marcadores como por ex: análise de plasmídeos; ajuda a caracterizar as estirpes em casos de situações jurídicas, a comparar estirpes de *Neisseria* isoladas de parceiros sexuais e a controlar a Gonorreia (5,15).

As estirpes podem também ser diferenciadas por Serotipagem, esquema baseado nas diferenças antigénicas da proteína I da membrana externa dos gonococos (27). A classificação serológica de *N.gonorrhoeae* em serogrupos W por coaglutinação, baseada nas reacções com determinantes antigénicos da proteína I da membrana externa do gonococo, foi descrita por Sandstrom em 1979 (32).

Em 1980, Sandstrom e Danielsson descreveram a base para a classificação serológica de gonococos por coaglutinação, com o auxílio de anticorpos policlonais específicos, onde as estirpes foram separadas em 3 serogrupos designados WI, WII e WIII. A distinção foi também baseada nas diferenças em antígenos da proteína I, a maior proteína da membrana externa. Estirpes WI possuem antígenos da Proteína I/A, enquanto estirpes WII/WIII têm antígenos da Proteína I/B. Anticorpos monoclonais foram desenvolvidos contra os epítopes da PI/A e PI/B. Duas séries de seis anticorpos monoclonais de cada foram seleccionados. O padrão de reacção observado com uma estirpe particular foi designado "Serovar" que denota variedade, serologicamente definido por estes anticorpos monoclonais (5,7,16,34). A análise da distribuição do Serovar é aplicável a muitos diferentes tipos de problemas epidemiológicos. Pode ser usada para investigar a distribuição geográfica de estirpes num País, para a detecção de estirpes clinicamente importantes, exemplo: estirpes causando infecções disseminadas; estirpes causando infecções assintomáticas, e estirpes com baixa sensibilidade a antibióticos. Pode ser também usada no controlo de testes terapêuticos, ex: na avaliação da falência terapêutica versus reinfeção e para separar estirpes em casos de dupla infecção (34).

Em Moçambique há poucos dados sobre a incidência real da

gonorréia e de estirpes resistentes.

O trabalho ora proposto tem por **objectivos**:

- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) a 7 antibióticos (Penicilina, Tetraciclina, Tianfenicol, Espectinomicina, Kanamicina, Ceftriaxone e Ciprofloxacina), alguns dos quais usados para o tratamento da Gonorreia;
- Classificar as estirpes conforme as suas necessidades nutricionais -- Auxotipagem;
- Classificar serològicamente as estirpes em serogrupos e em serovars com base na antigenicidade dos tipos de ProteínaI (ProteínaIA e ProteínaIB) da membrana externa da N.gonorrhoeae, usando anticorpos monoclonais -- Serotipagem;
- Correlacionar os serogrupos, auxotipos e padrão de sensibilidade a antibióticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 151 estirpes não-selectivas de *Neisseria gonorrhoeae*, isoladas de pacientes consecutivamente observados nas consultas de DTS de 5 (cinco) Centros de Saúde da cidade de Maputo, durante o período de Janeiro a Junho de 1994, com queixas de corrimento uretral, foram enviadas do Laboratório Nacional de Referência de DTS em Maputo, para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Medicina Tropical em Antuérpia -- Bélgica. As estirpes estavam conservadas em pequenas aliquotas, em meio skim-milk (leite magro) + 20% glicerol, congeladas em gelo seco, num pequeno coleman. Do total de estirpes enviadas, foram testadas 137 para determinação do auxotipo, serotipo e padrão de sensibilidade a 7 antibióticos: Penicilina, Tetraciclina, Kanamicina, Tianfenicol, Espectinomicina, Ceftriaxone e Ciproflaxacina.

Constituíram critérios de entrada para esses pacientes: sexo masculino, secreção uretral purulenta, e nenhum tratamento com antibiótico nas 48h antes da observação. Os Centros de Saúde escolhidos foram: CS de Infulene, Maxaquene, Alto-Maé, Xipamanine, 1º de Junho e o Hospital geral de Chamanculo.

4.1. Isolamento: O isolamento é o diagnóstico de referência para as infecções gonocócicas. Meios selectivos contendo antibióticos, ex: Thayer Martin modificado (TMM), têm sensibilidade diagnóstica de 80 a 95%, dependendo em parte do local anatómico colhido para cultura(27).

4.1.1. Cultura: As amostras que vinham dos Centros de Saúde em tubos com zaragatoas mergulhadas em meio de transporte Stuart eram semeadas no meio Thayer Martin modificado de modo a conseguir-se o isolamento da *Neisseria gonorrhoeae*. As subculturas foram feitas em meio GC (GC base + hemoglobina e Isovitalex), para posterior Identificação com base na morfologia das colónias, coloração de Gram, teste de Oxidase e teste de Degradação de Hidratos de Carbono:

4.1.2. Morfologia das colónias: As placas foram examinadas depois de 18-24 horas e depois de 48 horas de incubação. Depois de um dia de incubação, colónias típicas tinham 0,5-1mm de diâmetro e variavam de cinzentas a esbranquiçadas, transparentes

a opacas.

4.1.3. Coloração de Gram: Para a identificação dos gonococos, a coloração de Gram é a técnica mais usada. Uma colónia suspeita de cada placa de cultura que tivesse tido crescimento, foi emulsionada numa pequena gota de soro fisiológico numa lâmina. A lâmina foi seca, fixa e corada, seguindo a metodologia clássica da coloração de Gram(14).

Culturas de 24h mostram diplococos Gram negativos típicos enquanto que em culturas velhas de 48 h ou mais, a interpretação é dificultada pela alta taxa de células mortas (14).

4.1.4. Oxidase: Para este teste, foram usados discos oxidase contendo hidrócloro de dimetil-para-fenilenediamine . Uma colónia suspeita foi picada com uma ansa estéril e esfregada no disco. A reacção positiva tornava o local esfregado, de cor púrpura entre 20 segundos.

4.1.5. Teste de B-Lactamase:

Para as 137 estirpes, usou-se o Nitrocefina (Oxoid)--- Cefalosporina cromogénica em pó com o respectivo tampão diluente, que se conserva na geleira. Adicionou-se o tampão ao pó, e a solução amarela mantém-se estável a 4°C por muitas semanas; aliquotas congeladas a -25°C podem permanecer estáveis por meses.

Procedimento: Para cada uma das 137 estirpes, deitou-se uma gota da solução de Nitrocefina numa lâmina. Picaram-se algumas colónias e emulsionaram-se no reagente. O desenvolvimento de uma cor vermelha em 30 segundos indicava a presença de B-lactamase.

4.1.6. Teste de degradação de Hidratos de Carbono: A identificação confirmatória das colónias foi feita com base no teste de degradação de hidratos de Carbono. Usaram-se discos de papel impregnados de Carbohidratos (Minitex, BBL-Cockeysville MD USA). A suspensão das colónias foi feita no tampão Minitex. Adicionaram-se 6-7 gotas da suspensão em cada um dos 4 hidratos de Carbono (dextrose, maltose, sacarose, lactose) e incubaram-se as placas durante 4 horas em ambiente sem CO₂, a 37°C. A reacção confirmatória foi dada pela degradação de dextrose (mudança de cor vermelha para amarela) e nenhuma reacção em outros hidratos de carbono.

4.2. Recultura: As amostras que estavam em aliquotas de skim-milk (leite desnatado) + 20% glicerol, a -70°C , foram recultivadas em New York City (NYC) agar (GC agar base + Sangue de cavalo Laked + suplemento de leveduras autolisadas + VCAT*)(14). Descongelaram-se as amostras em skim-milk e colocou-se uma gota de cada suspensão do skim-milk na placa NYC. Deixou-se secar a gota e depois distribuiu-se o inóculo com uma ansa estéril para as restantes partes da placa, de modo a assegurar o crescimento de colónias isoladas. As placas inoculadas foram incubadas a 35°C , em atmosfera húmida ($> 70\%$ humidade), contendo 3-10% CO_2 , por 24-48 horas. A identificação presumptiva das colónias foi feita com base na morfologia das colónias, coloração de Gram e teste de Oxidase, enquanto que a definitiva foi com base no teste de degradação de açúcares .

* VCAT = Vancomicina, Colistina, Anisomicina, Trimetroprine

4.3. AUXOTIPAGEM

A tipificação de acordo com as necessidades nutricionais - Auxotipagem, foi primeiramente descrita por Catlin em 1973 (5,14).

Para a auxotipagem das estirpes de Maputo, seguiu-se a metodologia de Catlin (38): preparou-se um meio quimicamente definido, cujo tipo de agar base foi (Sigma: AA agar A -1296) com todos os produtos necessários para o crescimento, onde todas as estirpes crescem. A placa com este meio serviu de controlo. Prepararam-se outros meios a partir de agar base, omitindo sucessivamente amino-ácidos nitrogenados como Prolina, Ornitina, Arginina, Metionina, Uracilo e Hipoxantina, omitindo aminoácidos ou vitaminas e omitindo Cistina-Cisteína. A falta destes dois últimos aminoácidos resultou na inibição de crescimento para todas as estirpes e foi também considerada como placa controlo. A suspensão das estirpes foi feita em Mueller-Hinton broth (MHB) e a inoculação por um inoculador semi-automático (Denley) com 21 pontas, o qual distribuiu $1 \mu\text{l}$ de suspensão em cada estirpe nas diferentes placas. Deixou-se secar o inóculo e incubou-se a 35°C com humidade e 5% CO_2 . Os resultados foram lidos 48 horas depois. Para cada série de 20 estirpes auxotipadas, havia uma placa controlo onde todas as estirpes cresciam e outra placa sem crescimento e incluiu-se ainda uma estirpe (WHO) de auxotipagem

conhecida como controle. Desta forma, o auxotipo padrão foi determinado pela necessidade da estirpe. O padrão de auxotipagem é indicado por Exemplo: Pro⁻ para necessidade de Prolina, Arg⁻/Hyx⁻/Ura⁻ (AHU⁻) para necessidade de Arginina, Hipoxantina e Uracilo. Gonococos capazes de crescer em todos os meios foram chamados Prototróficos (Proto).

4.4. SEROTIPAGEM

Para a serotipagem das 137 estirpes isoladas, usou-se um jogo de anticorpos monoclonais (SYVA; Palo Alto-Califónia, USA) para caracterizar serovars da proteína IA(WI): 4A₁₂, 4G₅, 2F₁₂, 6D₉, 5G₉, 5D₁ e anticorpos monoclonais IB:(WI/WII): 3C₈, 1F₅, 2D₆, 2G₂, 2D₄ e 2H1 para IB serovars. A separação em serogrupos foi feita com base nos anticorpos policlonais WI e WII/WIII.

Os anticorpos monoclonais foram adicionados à solução de Proteína A ou Pansorbin (células de S. aureus que servem de material de suporte que se liga á porção FC dos anticorpos monoclonais), depois da lavagem desta solução. A suspensão de gonococos foi feita em PBS estéril (GIBCO:076-0100N), fervida para expôr os epitopes PI (17) durante 10 minutos. Iguais volumes da suspensão bacteriana e de reagentes foram misturados. Cada estirpe foi classificada a serovar dependendo do padrão de reactividade usando a nomenclatura de Knapp et al. Este tipo de nomenclatura usa o prefixo IA ou IB consoante a reactividade com os reagentes de anticorpos monoclonais específicos das proteínas IA ou IB respectivamente (13,33).

4.5. TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Porque muitos antibióticos não são 100% puros, a concentração usada baseou-se na actividade ou na potencialidade (material activo por miligrama) do antibiótico, de acordo com as especificações do fabricante. Esta informação inclui a data de expiração, e instruções sobre a sua conservação. As soluções mãe foram preparadas dissolvendo o antibiótico no solvente apropriado e esterilizando por filtração (filtro de 0,22 µm). Estas soluções foram armazenadas em pequenas aliquotas a -20°C ou a uma temperatura mais baixa para mais de seis meses. Depois

de descongeladas, as aliquotas de solução mãe foram imediatamente usadas; nunca se podem voltar a recongelar. Os antibióticos foram incorporados no meio de agar nas diferentes concentrações do antibiótico, tendo em conta os diferentes níveis de resistência local. Geralmente, é mais relevante e importante conhecer o valor máximo do que o valor inferior do MIC. No caso da Espectinomicina e Kanamicina, os valores da concentração mínima inibitória (MIC) de estirpes resistentes ($\geq 256 \mu\text{g/ml}$), excedem de longe os valores normais ($4-32 \mu\text{g/ml}$) das estirpes sensíveis (14).

A MIC para 7 antibióticos foi determinada usando a técnica de diluição de agar. O meio usado foi o GC agar (meio base DIFCO:0289-01-1) com 1% de Isovitalex (BBL: 11876) e 10% da diluição do antibiótico.

As diluições dos antibióticos tinham os seguintes intervalos:

Penicilina: ($0,15 - 32 \mu\text{g/ml}$), Kanamicina: ($4 - 64 \mu\text{g/ml}$), Tianfenicol: ($0,125 - 8 \mu\text{g/ml}$), Tetraciclina: ($0,25 - 64 \mu\text{g/ml}$), Espectinomicina ($4 - 64 \mu\text{g/ml}$), Ceftriaxone ($0,001 - 0,06 \mu\text{g/ml}$) e Ciprofloxacina ($0,001 - 0,06 \mu\text{g/ml}$). O inóculo de 24h em Columbia Blood agar (BA) (consiste de Columbia agar (GIBCO, BBL) e 5% de sangue de carneiro, foi suspenso em MHB e a turvação foi ajustada a 0,5 McFarland, dando uma concentração de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colónias (CFU) por ml. Diluiu-se a suspensão a 1:10 em MHB para obter uma concentração de 10^7 CFU/ml. Um inoculador semi-automático (Denley) distribuiu por placa, $0,0001\text{ml} = 10^4$ CFU/ml.

Deixou-se secar o inóculo e incubou-se em 35°C , em incubador de CO_2 , num ambiente de 5% CO_2 para que no dia seguinte se lessem os resultados. O MIC foi dado pela concentração mais baixa do antibiótico que inibiu o crescimento ou que apenas permitiu o crescimento de não mais de 2 colónias, ou uma pequena névoa visível. Também se usaram estirpes (WHO) para controle, de MIC conhecido.

5. RESULTADOS:

Das 151 estirpes conservadas em leite magro , só 137 foram estudadas. A sensibilidade destas estirpes em relação à Penicilina e Tetraciclina foi muito baixa, tendo-se registado que:

. Apenas 41 estirpes (29,9%) das 137 foram sensíveis à Penicilina. Foram resistentes 96 estirpes, sendo 11 (8,03%) com MIC entre 2 e 8 $\mu\text{g/ml}$ de Penicilina e 85 estirpes (62,04%) com MIC entre 16 e 64 $\mu\text{g/ml}$. Das 137 estirpes, 60 (43,7%) não foram resistentes a Tetraciclina e 77 (56,3%) foram resistentes, sendo 48 (35,03%) com MIC entre 2 e 8 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina e 29 (21,2%) com elevada resistência à Tetraciclina (TRNG). - Ver tabelas 1 e 2, Anexo I.

. foram β -lactamase positivas, 90 estirpes (65,7%) e destas 62 (68,9%) foram consideradas estritamente produtoras de Penicilinas (PPNG), segundo os critérios estabelecidos pelo Comité Nacional para Laboratórios Clínicos Standards (NCCLS): β -lactamase positivas e MIC < 16 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina (26).-Ver classificação no anexo XIII.

. Das 90 estirpes, 28 (31,1%) foram consideradas PPNG altamente resistentes à Tetraciclina (PPNG/TRNG): β -lactamase positivas e MIC \geq 16 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina. - Ver tabela 3 Anexo II.

. Das 137 estirpes estudadas, 47 (34,3%) foram β -lactamase negativas (não-PPNG). Destas 47, 1(2,1%) mostrou resistência cromossômica à Penicilina (não-PPNG, não-TRNG com MIC \geq 2 $\mu\text{g/ml}$ a Penicilina e MIC < 2 $\mu\text{g/ml}$ à Tetraciclina) ; 21 estirpes (44,7%) mostraram resistência cromossômica à Tetraciclina (não-PPNG, não-TRNG, com MIC \geq 2 $\mu\text{g/ml}$ à Tetraciclina e MIC < 2 $\mu\text{g/ml}$ de Penicilina. Cinco (5) estirpes (10,6%) mostraram resistência cromossômica à Penicilina e Tetraciclina (não-PPNG, não-TRNG com MIC \geq 2 $\mu\text{g/ml}$ a Tetraciclina; uma (1) estirpe não-PPNG foi altamente resistente à Tetraciclina (TRNG) e tinha MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$ ao Tianfenicol.- Ver tabela 4, Anexo II

. Resistência ao Tianfenicol, nas 137 estirpes, verificou-se em 76 estirpes(55,4%).

. As 137 estirpes foram classificadas em 20 serotipos

(serovars), sendo 14 do serogrupo WII/WIII e 6 do serogrupo WI.
- Ver tabela 5, Anexo III.

. Foram encontrados nas 137 estirpes, 9 auxotipos diferentes, sendo os mais predominantes, o PRO⁻ com 57 estirpes (41,6%) e o PROTO com 50 (36,5%), seguido de PRO⁻, HYPO⁻, URA⁻ com 12 estirpes (8,8%). Ao serogrupo WI pertenceram 60 estirpes distribuídas em 6 auxotipos e 75 estirpes pertenceram ao serogrupo WII/WIII e distribuíram-se em 7 auxotipos. Duas estirpes, uma de cada serogrupo, não foram tipificáveis - Ver tabela 6, Anexo IV e tabela 8, anexo VI.

5.1. ESTIRPES PRODUTORAS DE PENICILINASES (PPNG):

. As 90 estirpes β-lactamase positivas (PPNG), foram classificadas em 13 serovars do serogrupo WII/WIII e 6 serovars do serogrupo WI. Dos serovars do serogrupo WI, o que registou maior predominância, foi o IA6 com 31 estirpes (34,4%), seguido de IA2 com 15 estirpes (16,7%); enquanto que para o serogrupo WII/WIII, os serovars mais numerosos foram IB5 com 9 estirpes (10,0%) e o IB3 com 8 estirpes (8,9%). - Ver tabela 7, anexo V.

. Foram identificados 7 auxotipos, sendo os mais predominantes o PROTO com 38 estirpes (42,2%) e o PRO⁻ com 33 estirpes (36,7%), encontrando-se os restantes auxotipos em frequências muito baixas. Duas estirpes não foram tipificáveis.

. Foram simultaneamente resistentes à Penicilina e Tetraciclina, 50 estirpes (55,5%). E destas, 27 foram altamente resistentes à Penicilina e a Tetraciclina (PPNG/TRNG) com MIC ≥ 16 µg/ml para cada antibiótico. - Ver tabela 3, Anexo II.

. Das 90 estirpes, 44 (48,8%) foram resistentes ao Tianfenicol, com MIC entre 2 e 8 µg/ml. Ver tabela 11, anexo 11.

. Trinta e duas (35,5%) das 90 estirpes, foram resistentes a Tetraciclina e ao Tianfenicol, sendo 10 (11,1%) estirpes TRNG.

. Os serovars mais predominantes do serogrupo WI destas estirpes PPNG, pertenceram aos auxotipos também predominantes: IA2: 6 estirpes do auxotipo PRO⁻, 5 estirpes do auxotipo HYPO⁻, URA⁻ e 3 estirpes do auxotipo PROTO; o IA6: com 18 estirpes do auxotipo PROTO e 9 estirpes PRO⁻; o IB5: 4 estirpes PROTO e 5 PRO⁻; enquanto que o IB3 registou 3 estirpes PRO⁻ e 4 do auxotipo PRO⁻, HYPO⁻, URA⁻.

. Os serotipos relacionados com resistência a Penicilina foram: IA6 com 31 (34,4%) das 90 estirpes com MIC \geq 16 μ g/ml, seguido do IB3 com 8 estirpes (8,8%) com MIC \geq 32 μ g/ml, e o IB5 com 9 estirpes (10%) com MIC \geq 16 μ g/ml, tendo os restantes serotipos sido distribuídos em baixas frequências.

. Os Auxotipos relacionados com resistência á Penicilina foram: PRO⁺, com 38 estirpes (42,2%), sendo 36 estirpes (40%) com MIC \geq 16 μ g/ml; o PRO⁻ com 33 estirpes (36,6%), sendo 30 (33,3%) com MIC \geq 16 μ g/ml e a seguir, com frequências baixas, os auxotipos : PRO⁻, HYPO⁻, URA⁻ com 6 estirpes (6,6%) com MIC=64 μ g/ml, seguido de HYPO⁻, URA⁻ com 5 estirpes (5,5%) com MIC=16 μ g/ml.

. Serovars relacionados com resistência á Tetraciclina: IA6 com 10 estirpes (11,1%), sendo 9 destas TRNG com MIC=32 μ g/ml e 1 com MIC= 2 μ g/ml; IA2 com 10 estirpes com MIC \geq 16 μ g/ml, ambos pertencentes ao serogrupo WI. Do serogrupo WII/WIII foram: IB3 com 6 estirpes com MIC entre 2 e 4 e IB5 com 8 estirpes, sendo 2 estirpes TRNG com MIC= 64 μ g/ml.

. Auxotipos relacionados com resistência á Tetraciclina: PRO⁺, com 16 estirpes (17,7%), sendo 13 (14,4%) TRNG com MIC \geq 16 μ g/ml, PRO⁻, com 20 estirpes (22,2%), sendo 6 com MIC=16 μ g/ml e as restantes com MIC entre 2 e 4 μ g/ml.

. Serovars relacionados com resistência ao Tianfenicol:

IA6 com 6 (6,6%) das 90 estirpes com MIC= 2 μ g/ml; IB3 com 8 estirpes (8,8%) com MIC entre 2 e 4 μ g/ml; IB5 com 9 estirpes (10%) com MIC entre 2 e 8 μ g/ml.

. Auxotipos relacionados com resistência ao Tianfenicol:

PRO⁺ com 17 estirpes (18,8%), MIC= 2 μ g/ml; PRO⁻ com 18 estirpes (20%) com MIC entre 2 e 8 μ g/ml; PRO⁻, HYPO⁻, URA⁻ (PHU⁻) com 6 estirpes (6,6%) com MIC= 2 μ g/ml.

5.2. ESTIRPES NÃO-PPNGs:

Das 137 estirpes, 47 foram B-lactamase negativas, portanto, Não-PPNG. Destas 47, 6 estirpes (12,8%) foram cromossómicamente resistentes a Penicilina. - Ver tabela 9, Anexo VII

. Resistência cromossômica á Tetraciclina com MIC entre 2 e 8 μ g/ml, registou-se em 26 (55,3%) das 47 estirpes. Uma (2,13%) das 47 estirpes não-PPNG, registou uma elevada resistência a tetraciclina (TRNG). - Veja tabela 10, Anexo VII.

. Resistência cromossômica ao Tianfenicol registou-se em

32 das 47 estirpes não-PPNG (68,1%). - Ver Tabela 11, Anexo VIII.

. Foram encontrados 7 auxotipos nas 47 estirpes não PPNG tendo 38 estirpes pertencido ao serogrupo WII/WIII e 9 ao serogrupo WI.

. As estirpes distribuíram-se em 10 serovars diferentes, sendo 8 do serogrupo WII/WIII e 2 do serogrupo WI.--Ver tabela 17, anexo XII.

. Os serovares mais predominantes foram IB₃ com 14(29,8%) estirpes, o IA₆ com 8 (17,0%) estirpes seguido do IB₅ com 6 (12,8%). - Ver tabelas 12 Anexo VIII e tabela 17, anexo XII.

. Os serotipos relacionados com resistência á Penicilina foram:

IA₆ : 1 estirpe do serogrupo WI; IB₃ com 4 estirpes com MIC entre 2 e 4 µg/ml.

. Os auxotipos relacionados com resistência á Penicilina:

PRO⁻: 5 estirpes (10,6%) com MIC entre 2 e 4 µg/ml; PRO⁰: 1 estirpe com MIC= 4 µg/ml.

. Serovars relacionados com resistência á Tetraciclina:

IB₂: 5 estirpes(10,6%) com MIC=2 µg/ml; IB₃ com 7 estirpes (14,8%) com MIC entre 2 e 8 µg/ml; IB₅ com 5 estirpes(10,6%), sendo 1 estirpe com MIC= 64 µg/ml (Nao-PPNG/TRNG)!.

. Auxotipos com resistência á Tetraciclina:

PRO⁰:4 estirpes, sendo 1 com MIC= 64 µg/ml!; PRO⁻: 17 estirpes (36,2%) com MIC entre 2 e 8 µg/ml; PRO⁻,HYPO⁻,URA⁻ com 4 estirpes com MIC entre 2 e 4 µg/ml.

. Serovars relacionados com resistência ao Tianfenicol:

IB₃ com 8 estirpes (17%); IB₅ com 6 estirpes (12,8%); IB₂ com 5 estirpes (10,6%); IB₂₃ com 4 estirpes seguidos de IA₆ e IB₆ com 3 estirpes (6,4%) respectivamente. - Ver Tabela 13 Anexo IX.

. Auxotipos relacionados com resistência ao Tianfenicol:

PRO⁻ com 20(42,5%) das 47 estirpes PRO⁻,HYPO⁻,URA⁻ com 5 estirpes (10,6%); PRO⁰ com 4 estirpes (8,5%). - Ver tabela 14 Anexo IX.

. Com exceção dos antibióticos acima citados onde se registou resistência, todas as estirpes foram sensíveis aos restantes: Kanamicina, Espectinomicina, Ceftriaxone e Ciprofloxacina.

. A tabela 15, Anexo X, mostra a concentração inibitória mínima dos antibióticos testados neste estudo.

6. DISCUSSÃO

Registou-se um grande número de PPNG em relação a outros países de África (1,2,9,10,11,12) e a resistência á Tetraciclina foi também elevada, constituindo um novo fenómeno a nível do Sul de África. Estes dados estão de acordo com um estudo recente feito em Moçambique, onde 64% das estirpes eram PPNG (25). Houve um grande aumento na frequência das estirpes PPNG, pois no estudo efectuado em 1987 por Noya et al(37), 20% das estirpes estudadas foram PPNG, enquanto que neste estudo feito em 1994, a percentagem destas estirpes foi de 65,7%. O aumento na frequência destas estirpes poderia ser explicado pelo facto de que em Moçambique, muitos produtos terapêuticos são disponíveis sem prescrição, levando a casos de auto-medicação e consequente terapia incompleta ou a casos de uso indiscriminado dos mesmos. No estudo feito por Vuylsteke et al em Moçambique (25), a auto-medicação foi também suspeita como causa de uma maior frequência de Gonorreia em relação as infecções por C.trachomatis no sexo masculino, ao contrário do que se passa no sexo feminino. Com base nisto, pode-se especular que estas são algumas das razões para o grande número de PPNG isoladas neste estudo.

Foram encontradas 5 estirpes não-PPNG (10,6%) com resistência cromossômica a Penicilina e Tetraciclina com MIC \geq 2 μ g/ml para ambos os antibióticos. De todas as 137 estirpes deste estudo, 77 (56,2%) foram resistentes a Tetraciclina com MIC entre 2 e 64 μ g/ml, sendo 29 destas (21,2%) TRNG.----Ver tabela 3, anexo II. No trabalho de Gascoyne et al(1991), ele notou que embora o uso de tetraciclina como terapia para a Gonorreia tivesse diminuído, existia uma elevada percentagem de estirpes nos Estados Unidos e Países Baixos que eram TRNG e segundo ele, isto poderia ser devido ao uso da Tetraciclina nas infecções por Chlamydia trachomatis. A monitorização de estirpes gonocócicas que possuem resistência mediada cromossômicamente para Penicilina e Tetraciclina é importante porque estas estirpes comparadas com outras tendem a ter elevados MICs de Ceftriaxona e Ciprofloxacina, os quais são correntemente usados para a terapia gonocócica, pese embora que os referidos antibióticos não sejam usados como 1º linha em Moçambique (26). No estudo feito por Mason et al (1989), em Harare, encontrou que muitas estirpes (mais de 90%), foram sensíveis ao Tianfenicol,

contrariamente aos resultados de Maputo em que 76 estirpes foram resistentes, sendo 32 não-PPNG e 44 estirpes PPNG (10). A elevada taxa de resistência ao Tianfenicol (55,4%), poderia ser explicada pela frequente prescrição clínica do Cloranfenicol. Van Dyck et al (1992), afirma que a Kanamicina poderá ser usada para tratamento mas que o Tianfenicol não pode ser recomendado para tratamento da gonorreia em Kinshasa, já que falhas de tratamento têm sido correlacionadas com MIC>1mg/l (2).

Estirpes Pro⁻ e Proto predominaram em ambos os serogrupos e estavam relacionados com baixa susceptibilidade a antibióticos. Esta pouca sensibilidade a antibióticos em muitas estirpes Pro⁻ foi uma observação feita por muitos investigadores (7).

Mason e Gwanzura (1988) num estudo feito em Harare sobre as características e sensibilidade de estirpes de N.gonorrhoeae a antibióticos (10), encontraram números limitados de auxotipos, a maioria sendo Proto e Pro⁻. Ison et al (1993), só encontrou 7 auxotipos no estudo feito na África do Sul, no qual os auxotipos mais prevalentes eram o Proto e o Pro⁻ (36). Em África Ocidental, estirpes ARG são comuns, perfazendo 13% de não-PPNG na Gâmbia e 15% de não-PPNG no Gana. Odugbemi et al encontrou também apenas 4% de estirpes ARG⁻ em outras partes de África (23). Odugbemi também reportou que tipos Proto predominavam entre os serogrupos WI em África (7). No estudo de estirpes do Zimbabwe, o auxotipo ARG⁻ foi encontrado em infecções assintomáticas e Draper et al notou que estirpes ARG⁻ eram mais comuns em infecções assintomáticas do que em mulheres com Salpingite (23). Estes resultados assemelham-se aos das estirpes de Moçambique, com excepção das estirpes ARG⁻ que não se registaram neste estudo, eventualmente devido ao facto de as amostras terem sido colhidas apenas de indivíduos sintomáticos.

Segundo Schipper (1985), a estirpe Hypo⁻Ura⁻ (HU⁻) isolada em 1964 foi altamente susceptível a todos os antibióticos(7) . Em relação aos resultados deste estudo, estirpes Hypo⁻Ura⁻ foram encontradas maioritariamente no grupo PPNG e estavam relacionadas com resistência a antibióticos.

Foram encontrados 20 serovars diferentes, sendo na sua maioria do serogrupo WII/WIII num total de 14 (70,0%) e apenas 6 serovars (30,0%) pertenceram ao serogrupo WI. Entre as estirpes PPNG, registaram-se 13 serovars do subgrupo WII/WIII e 6 do serogrupo WI e entre as não-PPNG encontraram-se 9

serovars do serogrupo WII/WIII e apenas 1 serovar do serogrupo WI. Mason e Gwanzura, num estudo feito em Zimbabwe (23), encontraram 3/4 (três quartos) de nao-PPNG pertencendo ao serogrupo WII/WIII assim como em 42/66 estirpes PPNG com plasmídeo 4,4 Mda, mas apenas em 10/38 estirpes PPNG com plasmídeo 3,2 Mda. Ao todo 23 estirpes diferentes puderam ser reconhecidas com base no seu auxotipo e serogrupo.

O serovar mais frequente foi o IA₆ com 39 estirpes (28,5%). Este resultado assemelha-se ao do estudo feito por Ison et al (1993), onde o serovar IA₆ foi o mais frequente e foi reportado como um dos mais predominantes no Kenya (36).

Em ambos os serogrupos registaram-se serovars resistentes a diferentes antibióticos. Knapp et al, 1984, citado por Bygdeman 1985 (32), diz que o serogrupo WII/WIII mostra ser mais complexo do que o WI .

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo pode-se concluir que a Penicilina e a Tetraciclina não serviriam para o tratamento de primeira linha em Maputo, mesmo para estirpes não-PPNG, pois a elevada taxa de resistência a estes antibióticos e também ao Tianfenicol sugere que a utilidade destes antibióticos como tratamento seja de baixa eficácia. A Kanamicina que tem sido actualmente usada como tratamento de primeira linha poderá continuar a ser usada desta forma pois não se registou qualquer tipo de resistência a este antibiótico pelo menos em Maputo, cidade onde foram isoladas as estirpes estudadas, a partir de doentes com uretrite gonocócica. As estirpes testadas foram todas elas sensíveis a Espectinomicina, Ceftriaxona e Ciprofloxacina.

Estes dados enfatizam a importância de uma vigilância periódica da sensibilidade "in vitro" de N.gonorrhoeae aos antibióticos recomendados no tratamento de infecções gonocócicas e potencialmente úteis numa determinada área geográfica. Assim é essencial que no futuro, estudos in vitro de novos antibióticos sejam feitos em comunidades onde a prevalência de estirpes com resistência (mediada cromossomicamente, ou por plasmídeos) a esses antibióticos sejam propriamente avaliados.

Os resultados aqui apresentados deverão ser vistos com bastante

cuidado já que 14 estirpes não sobreviveram, presumindo-se que o tipo da estirpe tenha influências na sobrevivência. As estirpes que não sobreviveram, provavelmente tivessem características diferentes das estirpes estudadas. A transferência da tecnologia usada neste estudo, seria muito útil para outros estudos epidemiológicos da Gonorreia não só em Maputo mas noutras Províncias de Moçambique e noutros países do Continente Africano. Eventualmente, através desta tecnologia usada localmente se conseguissem obter mais características que este estudo não conseguiu detectar.

8. RECOMENDAÇÕES:

.Devido à elevada resistência a antibióticos relativamente baratos verificada neste estudo, poder-se-ia em coordenação com o sector epidemiológico do programa de SIDA/DTS, estudar as implicações em termos de custos, comparativamente aos novos padrões de tratamento: Kanamicina--1ª linha de tratamento e Espectinomicina--2ª linha, que são antibióticos mais caros.

.Estudos similares, envolvendo algumas Províncias do País que incluíssem por exemplo o corredor da Beira (Manica), seriam úteis para se poderem comparar as estirpes deste estudo com as outras (que podem ser diferentes destas).

.O Programa poderia envidar esforços no sentido de se conseguir uma monitorização a nível regional, de modo a detectarem-se estirpes que tenham determinadas características relacionadas com o padrão de resistência a antibióticos e consequentemente ligadas a diferentes manifestações da doença, o que facilitaria o controle das mesmas (estirpes).

9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Bogaerts J. Vandepitte J., Van Dyck E, Van Hoof R Dekegel M, Piot P.(1986). In vitro antimicrobial sensitivity of Neisseria gonorrhoeae from Rwanda. Genitourin Med, 62, 217-20.
2. Van Dyck E, Rossau R, Duhanel M, Bebets F, Logam, Nzilam, Bygdenan S, Van Heuverswijn H., Piot P.(1992). Antimicrobial Susceptibility of N.g. in Zaire: high level plasmid-mediated Tetracycline resistance in Central Africa. Genitourin Med, 68, 111-116.
3. Bell T.A, MD, MPH, Breslow N.E, (1989). A Reappraisal of the Epidemiology of Phenotypes of N.g. Ph.D. Thesis. Departments of pediatrics, Epidemiology and Biostatistics, University of Washington, Seattle, Washington.
4. Fekete T.(1993). Antimicrobial Susceptibility testing of N.g. and implications for Epidemiology and Therapy. Clinical Microbiology , 22-33.
5. Holmes K.K., Mardh P.A., Sparling P.F., Wiesner P.Jr W.C., Lemon M.S., Stamm W.E.(1984). Sexual Transmitted Diseases, 2nd edition, 131-144;903-914 pp. McGraw-Hill, NewYork, St Louis Colorado.
6. Bygdeman S.(1981).Serological Classification of Neisseria gonorrhoeae.Relation to antibiotic susceptibility and auxotypes. Epidemiological applications. , 7-41.
7. Schipper M.C.A.(1985). Auxonographic typing of N.g. isolated in the Netherlands. 7-41 pp . Amsterdam .
8. Roberts R.B. (1977). The Gonococcus. Development in medical microbiology and infections diseases, 111-139 pp, John Wiley & Sons, Inc .
9. Bryan P.J., Hira K.S., Bradyw. Luo N., Mwale C., Mpoko G.,

- Krieg R., Siwialiondo E., Reichart C., Waters C., Perine P.L. (1990) . Oral Ciprofloxacin Versus Ceftriaxone for treatment of urethritis from resistant N.g. In Zâmbia. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 819-822
10. Mason R.P., PHD, Gwanzura L., BSC, Latif A.S., MBCHB, Marowa. (1989). Antimicrobial Susceptibility of N.g. in Harare, Zimbabwe. Relationship to Serogrup. University of Zimbabwe Medical School , 63-66.
 11. Coovadia M.Y. MBchB, Van Don Ende Y. Hoosen A.A, Kharsany A. (1987). Susceptibility of Penicillinase- producing and non-Penicillinase - producing Strains of N.g. isolated in Durban, South Africa, to 15 B-lactam antibiotics. Faculty of Medicine, Medical School ,30-33.
 12. Brunham C.R.,Fransen L., Plummer F., Pid P. Slaney L., Bygdeman S., Nsanze H.(1985). Antimicrobial Susceptibility testing and phenotyping of N.g isolated from patients with ophtalmia neonatorum in Nairobi, Kenya. Antimicrobial agents and Chemotherapy ,393-96.
 13. Bindayna M.K. and A.C. (1989). Sampling methods for monitoring changes in gonococcal population. Epidemiology Inf., 103,203-209.
 14. Van Dyck E, Piot P., Meheus A. Bench-level laboratory manual for sexual transmitted diseases. WHO/VDT/89.443 P.10-21.
 15. Schoolink K. G. Brooks F.G., Falkows, Frhasch E.C., Knapp S. J., McCutchan A.J., Morse A.S. (1985). The Pathogenic Neisseriae , 3-11,102 , American Society Microbiology, Washington.
 16. Bygdeman M.S., Ruden K.A, Jonsson A, LidBrink P., Olofsson B-M, Backman M,Gastrin B, Kallings I, Ramberg M, Rylander M and Wretlind B.(1993). Antibiotic Susceptibility, Serovars an auxotypes of gonococcal isolates in Stokholm. Relation to geographical origin of the infection.

International journal of STD & AIDS, 4,33-40.

17. Wairen C, Phillips I. (1993). Penicillinase producing N.g. from St Thomas' Hospital 1976-1990. The first fifteen Years. Geniourin Med, 69, 201-207.
18. Ison A.C., PHD, MRCPATH, Tekki N., BSC, and Gill J.M. (1993) Detection of the Te + M Determinant in Neisseria g. Department of Medical Microbiology , 329-333.
19. Heritage J., Hawkey M.P. Leading articles ,(1988). Tetracycline- resistente N.g. Journal of Antimicrobial Chemotherapy , 22,575-582.
20. Gascoyne M.D., Heritage J., Hawkey M.P., Turner A and Van Kingeren B.(1991). Molecular evolution of Tetracycline-resistance plasmids carrying tet M found in N.g. from different countries. Journal of Antimicrobial Chemotherapy , 28, 173-183.
21. CDC Plasmid-mediated antimicrobial resistance in N.G. - United States. 1981 and 1989 MMWR vol 39/nº17 P. 285.
22. Cannon G. J. and Sparling F.P. (1984).The genetics of the gonococcus. Ann. Rev. Microbiology ,38, 11-33
23. Mason R.P., Gwanzura L. (1988). Charaterisation by plasmid profiles, Serogroups and auxotypes of N.g. from Harare, Zimbabwe. Genitourin Med, 64, 7-303.
24. Germain, Adrienne; Holmes Kingk; Piot P. and Wasserheit J.N. (1987). Reproductive Biology Reproductive Tract Infections. Global impact and priorities for women's reproductive health. 2nd Edition, 343-360 pp, Plenum Press, NewYork .
25. Vuylsteke B., Bastos R, Barreto J. Crucitti T., Folgosa E. Mondlane José, Dusauchoit, Piot P. Laga M. (1993). High Prevalence of sexually transmitted diseases in a rural area in Mozambique. Genitourin Med , 69, 427-430.

26. MMWR - CDC - Special focus: Surveillance for Sexually Transmitted diseases. 1993/vol.42/nºSS-3.
27. Adimora A. A., Hamilton H., Holmes K. K., Sparling F. P. (1994). Sexual Transmitted Diseases, 2nd edition, 4, 25, 32, 36 pp, Mcgraw-hill, INC.
28. Balows A., Hausler J. W., Hermann L.K., Isenberg D. H., Shadomy J. H. (1991) Manual of clinical Microbiology. fifth edition, 258-269 pp. American Society for Microbiology, Washington .
29. Acalmo E.I. (1991). Fundamentals of Microbiology. Third Edition, 316- 318 pp. The Benjamin/Cummings publishing company, INC.
30. Ketchum A. (1988). P. Micribiology: Concepts and Applications. John Wiley and sons. 579-581.
31. Casin I., Perene F., Issoire C., Riou Y. J., Morel P., Perol Y. (1989). High-level tetracycline resistance in Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae in France. Vol 8. France.
32. Bygdeman M.S., Gillenius E-V., Sandstrom G. E. (1985) . Comparison of different sets of Monoclonal antibodies for the Serological Classification of Neisseria gonorrhoeae. Pathogenic Neisseria, 31-35.
33. Knapp S.J., Bygdeman S., Sandstrom and Holmes K. (1985) Nomenclature for the Serological Classification of Neisseria gonorrhoeae. Pathogenic Neisseria. American Society for Microbiology, 4, 5.
34. Ruden A-K., Backman M., Bygdeman S., Jonsson A., Ringertz and Sandstrom E., (1986). Analysis of serovar distribution as a tool in epidemiological studies in gonorrhoea. Acta derm. Venereol. (stockh). 66, 325-333
35. MMWR-CDC. (1987). Antibiotic-Resistant strains of Neisseria gonorrhoeae. Policy guidelines for detection, management, and control. Vol. 36/nº 5S.

36. Ison C.A., Roope S.N., Dangor Y., Radebe F., and Ballard R. (1993). Antimicrobial susceptibilities and Serotyping of *Neisseria gonorrhoeae* in Southern Africa: influence of geographical source of infection. Epidemiol. Infect., 110, 297- 305.
37. Noya A., Folgosa E., Barquet L., dos Santos B.R., Schwalbach (1987). Ensaio terapêutico em casos masculinos de gonorreia. Penicilina Procaínica, versus Espectinomicina. Revista portuguesa de doenças infecciosas. Nº 1, 35-39.
38. Catlin, B.W. (1978). Characteristics and auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae*, P.345-380. In T. Bergen and J.R. Norris (ed.), *Methods in Microbiology*, vol 10. Academic Press, Inc, New York.

Anexo I

Frequência das 137 Estirpes de N.g. isoladas em relação aos MIC de Penicilina e Tetraciclina

Tabela 1: FREQUENCIA DAS 137 ESTIRPES EM RELACAO AO MIC DE PENICILINA

Penic.	Freq	%
0.015	2	1.5
0.025	1	0.7
0.060	1	0.7
0.125	4	2.9
0.250	7	5.1
0.500	19	13.9
1.000	7	5.1
2.000	4	2.9
4.000	3	2.2
8.000	4	2.9
16.000	12	8.8
32.000	19	13.9
64.000	54	39.4
Total	137	100.0

Tabela 2: FREQUENCIA DAS 137 ESTIRPES EM RELACAO AO MIC DE TETRACICLINA

Tetrac.	Freq	%
0.25	2	1.5
0.50	20	14.6
1.00	38	27.7
2.00	32	23.4
4.00	15	10.9
8.00	1	0.7
16.00	2	1.5
32.00	18	13.1
64.00	9	6.6
Total	137	100.0

Anexo II: Frequência das 90 estirpes PPNG e das 47 não-PPNG em relação aos MIC de Penicilina e Tetraciclina

Tabela 3 FREQUENCIA DAS 90 ESTIRPES PPNG EM RELACAO AOS MIC DE PENICILINA E TETRACICLINA

Tetrac.	0.50	1.00	2.00	4.00	16.00	32.00	64.00	Total
Penic.								
4.000	1	0	0	0	0	0	0	1
8.000	0	3	0	0	0	1	0	4
16.000	1	4	2	0	1	4	0	12
32.000	4	4	2	2	0	6	1	19
64.000	8	15	10	6	1	7	7	54
Total	14	26	14	8	2	18	8	90

Tabela 4: FREQUENCIA DAS 47 ESTIRPES nao-PPNG EM RELACAO AOS MIC DE PENICILINA E TETRACICLINA

Tetrac.	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00	64.00	Total
Penic.								
0.015	1	1	0	0	0	0	0	2
0.025	0	0	1	0	0	0	0	1
0.060	1	0	0	0	0	0	0	1
0.125	0	3	1	0	0	0	0	4
0.250	0	1	5	1	0	0	0	7
0.5	0	1	4	12	2	0	0	19
1	0	0	0	4	2	0	1	7
2	0	0	1	1	2	0	0	4
4	0	0	0	0	1	1	0	2
Total	2	6	12	18	7	1	1	47

Tabella 5: DISTRIBUICAO DAS 137 ESTIRPES DE N.G. DE ACORDO COM OS SEROGRUPOS E SEROVARES
 SEROGRUPO WI:61 ESTIRPES (44.5%)

SEROGRUPO WII/WIII:76 ESTIRPES(55.5%)

SEROGRUPO	SEROVARS:	%
WI	A1--	2
	A2--	15
	A5--	1
	A6--	39
	A8--	3
	A12--	1
	B1--	4
	B2--	6
	B3--	22
	B5--	15
	B6--	6
	B7--	1
WII/WIII	B8--	1
	B14--	1
	B18--	2
	B19--	1
	B22--	5
	B23--	8
	B25--	1
	B26--	1
	300*--	2
	TOTAL:	137
	100.00	

*-- Dupla Reactividade

Anexo IV

Auxotipos das 137 estirpes isoladas

**Tabela 6: FREQUENCIA DAS 137 ESTIRPES
DE N.g POR AUXOTIPO**

Auxo	Freq.	%
Proto	50	36.5
Proto, Phe	1	0.7
Pro	57	41.6
Pro + Phe	4	2.9
Pro, Arg	2	1.5
Pro, Hypo, Ura	12	8.8
Pro, Amino	1	0.7
Hypo, Ura	7	5.1
Amino	1	0.7
99 *	2	1.5
Total	137	100.0

* -- Nao tipificavel

Anexo V Serovars das 90 estirpes PPNg

Tabela 7 FREQUENCIA DAS 90 ESTIRPES
DE N.g POR SEROVAR

Serov.	Freq.	%
IA1	1	1.1
IA2	15	16.7
IA5	1	1.1
IA6	31	34.4
IA8	3	3.3
IA12	1	1.1
IB2	1	1.1
IB3	8	8.9
IB5	9	10.0
IB6	3	3.3
IB7	1	1.1
IB14	1	1.1
IB18	2	2.2
IB19	1	1.1
IB22	4	4.4
IB23	4	4.4
IB25	1	1.1
IB26	1	1.1
300*	2	2.2
Total	90	100.0

*-- reactividade dupla

Anexo VI: Auscultas encontrados nas 137 estirpes isoladas

Tabela 8: RELACAO ENTRE OS SEROGRUPOS E AUXOTIPOS NAS 137 ESTIRPES DE N.g. ISOLADAS

SEROGRUPO	AUXOTIPO	PROTO	PROTO,PH	PRO	PRO,PH	PRO,ARG	PRO,HYP,URA	PRO,AMINO	HYP,URA	AMINO	NT*
WI		28	0	19	3	0	2	0	7	1	1
WII/WIII		22	1	38	1	2	10	1	0	0	1

*NT -- Nao tipificavel.

Anexo VII Frequência das 47 estirpes não PPNG em relação aos MIC de Penicilina e Tetraciclina

Tabela 9: FREQUÊNCIA DAS 47 ESTIRPES NÃO PPNG EM RELAÇÃO AO MIC DE PENICILINA

Penic.	Freq.	%
0.015	2	4.3
0.025	1	2.1
0.060	1	2.1
0.125	4	8.5
0.250	7	14.9
0.500	19	40.4
1.000	7	14.9
2.000	4	8.5
4.000	2	4.3
Total	47	100.0

Tabela 10: FREQUÊNCIA DAS 47 ESTIRPES NÃO PPNG EM RELAÇÃO AO MIC DE TETRACICLINA

Tetrac.	Freq.	%
0.25	2	4.3
0.50	6	12.8
1.00	12	25.5
2.00	18	38.3
4.00	7	14.9
8.00	1	2.1
64.00	1	2.1
Total	47	100.0

Anexo VIII Frequência das 47 estirpes não-PPNg em relação ao Tianfenicol e distribuição dos Serovars nessas estirpes

Tabela 11: FREQUÊNCIA DAS 47 ESTIRPES NÃO PPNG EM RELAÇÃO AO MIC DE TIANFENICOL

Tianf.	Freq.	%
0.25	5	10.6
0.50	1	2.1
1.00	9	19.1
2.00	32	68.1
Total	47	99.9

Tabela 12: DISTRIBUICAO DAS ESTIRPES NAO PPNG POR SEROVAR

Serov.	Freq.	%
IA1	1	2.1
IA6	8	17.0
IB1	4	8.5
IB2	5	10.6
IB3	14	29.8
IB5	6	12.8
IB6	3	6.4
IB8	1	2.1
IB22	1	2.1
IB23	4	8.5
Total	47	100.0

Anexo IX

Serogrupos encontrados nas 47 estirpes não PPNg em relação ao MIC de Tianfenicol

Tabela 13: FREQUÊNCIA DOS SEROGRUPOS NAS 47 ESTIRPES NÃO PPNg EM RELAÇÃO AO MIC DE TIANFENICOL

Tianf.	0.25	0.50	1.00	2.00	Total
Serov.					
IA1	0	0.0	1.0	0	1
IA6	0	1.0	4.0	3	8
IB1	1	0.0	1.0	2	4
IB2	0	0.0	0.0	5	5
IB3	4	0.0	2.0	8	14
IB5	0	0.0	0.0	6	6
IB6	0	0.0	0.0	3	3
IB8	0	0.0	1.0	0	1
IB22	0	0.0	0.0	1	1
IB23	0	0.0	0.0	4	4
Total	5	1.0	9.0	32	47

Tabela 14: FREQUÊNCIA DOS AUXOTIPOS NAS 47 ESTIRPES NÃO PPNg EM RELAÇÃO AO MIC DE TIANFENICOL

Tianf.	0.25	0.50	1.00	2.00	Total
Auxo					
Proto	3	1.0	4.0	4.0	12.0
Proto, Phe	0	0.0	0.0	1.0	1.0
Pro	1	0.0	3.0	20.0	24.0
Pro + Phe	0	0.0	0.0	1.0	1.0
Pro,Hypo,Ura	0	0.0	1.0	5.0	6.0
Pro, Amino	1	0.0	0.0	0.0	1.0
Hypo, Ura	0	0.0	1.0	1.0	2.0
Total	5	1.0	9.0	32.0	47.0

Anexo X: Concentraço inibitória mínima (MIC) das 137 estirpes em relação aos 7 antibióticos estudados

Tabela 15: SENSIBILIDADE IN VITRO : Concentraço inibitória mínima (MIC) de 137 estirpes

Antibiótico	0.000	0.001	0.002	0.004	0.008	0.015	0.025	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Penicilina *						2	1		1	4	7	19	7	4	2				
Tetraciclina **											2	20	38	32	15	1			
Kanamicina																	22	115	
Tianfericol											31	9	21	70	5	1			
Espectinomina					.											1	133	3	
Ciprofloxacina	1			68	16	51		1											
ceftriaxona		2	13	37	51	27		7											

* somente nao-PPNG (N=47)

** somente nao-TRNG (N = 108)

Anexo XI

Frequência das 90 estirpes PPNg em relação ao MIC de Tianfenicol

**Tabela 16: FREQUÊNCIA DAS 90 ESTIRPES PPNg EM
RELAÇÃO AO MIC DE TIANFENICOL**

Tianf.	Freq.	%
0.25	26	28.9
0.50	8	8.9
1.00	12	13.3
2.00	38	42.2
4.00	5	5.6
8.00	1	1.1
Total	90.0	100.0

Anexo XII: Distribuição de 47 estirpes não PPNg por Serovar e Auxotipo

Tabela 17: DISTRIBUICAO DE 47 ESTIRPES NAO PPNg POR SEROVAR E AUXOTIPO

AUXOTIPO	PROTO	PROTO,PHE	PRO	PRO,PHE	PRO,HYP0,URA	PRO,AMINO	HYP0,URA	TOTAL
SEROGRUPO								
IA1	0	0	0	0	1	0	0	1
IA6	4	0	2	0	0	0	2	8
IB1	1	0	3	0	0	0	0	4
IB2	0	0	3	1	1	0	0	5
IB3	5	0	6	0	2	1	0	14
IB5	2	0	3	0	1	0	0	6
IB6	0	1	1	0	1	0	0	3
IB8	0	0	1	0	0	0	0	1
IB22	0	0	1	0	0	0	0	1
IB23	0	0	4	0	0	0	0	4
TOTAL	12	1	24	1	6	1	2	47

Antibiótico	Sensível µg/ml	Sensibili- dade Moderada µg/ml	Sensibilid- ade Intermédio µg/ml	Resistente µg/ml
Penicilina	=< 0.06	0.12-1.0	NA	>=2.0
Tetraciclina	=<0.25	0.50-1.0	NA	>=2.0
Espectinomic ina	=< 32.0	NA	64.0	>=128.0
Ceftriaxone	=<0.25			>=1.0
Ciprofloxa- cine	=<0.06			NA
Thiamfenicol				>=2.0
Kanamicina	=<32.0			>=128.0

-PPNG: Beta-lactamase + and MIC <16µg tetracycline/ml

-TRNG (plasmid-mediated tetracycline resistant N.g): MIC >=16 µg tetracycline/ml and beta-lactamase negative

-PPNG/TRNG: Beta-lactamase positive and MIC >=16 µg tetracycline/ml

-Chromosomal resistance to penicillin: non-PPNG, non-TRNG with MIC >=2µg penicillin/ml and MIC <2µg tetracycline/ml

-Chromosomal resistance to tetracycline: non-PPNG, non-TRNG with MIC >=2µg tetracycline/ml and MIC <2µg penicillin/ml

-Chromosomal resistance to penicillin and tetracycline: non-PPNG, non-TRNG with MIC >=2µg penicillin/ml and MIC >=2 µg tetracycline/ml

Reference:1) Surveillance for Sexually Transmitted Diseases, MMWR, August 13,1993/vol.42/N° SS-3.

2) Antimicrobial susceptibility testing of Neissera gonorrhoeae: Guidelines for use of the WHO reference strains.

