

**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *NEISSERIA  
MENINGITIDIS* ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DE 11 A  
19 ANOS DE IDADE RESIDENTES EM SALVADOR, BA**

**ANA RAFAELA SILVA SIMÕES MOURA**

**Salvador-Bahia**

**2017**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *NEISSERIA  
MENINGITIDIS* ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS  
DE 11 A 19 ANOS DE IDADE RESIDENTES EM SALVADOR, BA**

**ANA RAFAELA SILVA SIMÕES MOURA**

Orientador: Dr. Alan John Alexander McBride  
Co-orientadora: Dra. Leila Carvalho Campos

Dissertação apresentada ao curso de  
Pós-graduação em Biotecnologia em  
Saúde e Medicina Investigativa para  
obtenção do título de Mestre.

**Salvador –Bahia**

**2017**

" CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE NEISSERIA MENINGITIDIS ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DE 11 A 19 ANOS DE IDADE RESIDENTES EM SALVADOR, BA."

**ANA RAFAELA SILVA SIMÕES MOURA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Ana Carolina Paulo Vicente  
Pesquisadora  
IOC/FIOCRUZ



Dra. Milena Soares dos Santos  
Professora Adjunta  
UFBA



Dr. Luciano Kalabric Silva  
Pesquisador  
FIOCRUZ

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

Ministério da Saúde, Brasil (TC335/2013)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (SUS 007/2014)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Telma e Edson que sempre me incentivaram a seguir meus sonhos e forneceram todas as condições possíveis e o suporte necessário para que eu pudesse realizá-los

À Dra. Leila Carvalho Campos por toda a dedicação, ensinamentos e oportunidades de crescimento não somente como profissional, mas também como pessoa

Ao Dr. Alan J. McBride pelos ensinamentos e auxílio nesta etapa tão importante da minha vida

Ao Dr. Mitermayer dos Reis Galvão, pela motivação e inspiração em ser uma profissional dedicada à saúde pública

A Dr. Xin Wang e aos amigos e colaboradores do laboratório MVPDB (CDC-Atlanta) pela inestimável colaboração e auxílio no desenvolvimento deste projeto

Ao grupo PPNM, Ítalo, Ellen, Amélia, Viviane e Lara, por todos os momentos memoráveis que compartilhamos

Aos amigos, de longa data e aos feitos neste mestrado, pelo companheirismo e suporte nesta caminhada

Aos participantes e entrevistadores, pela colaboração nesta pesquisa

Ao auxílio e presteza da Sra. Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio na composição deste material

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desta dissertação

MOURA, Ana Rafaela Silva Simões. Caracterização genética de cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos de 11 a 19 anos de idade residentes em Salvador, Brasil. 100 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** *Neisseria meningitidis* é uma bactéria que tem como nicho ecológico a nasofaringe dos humanos e que ocasionalmente pode vir a causar doenças, como a meningite e a septicemia. O perfil populacional dos isolados de *N. meningitidis* é altamente diversificado tanto geneticamente como antigenicamente, devido à plasticidade genômica característica de *Neisseria* spp. e as frequentes transferências horizontais de genes observadas neste microrganismo. Uma vez que os jovens adultos são considerados os principais portadores e transmissores deste microrganismo e, conseqüentemente, fonte de alelos virulentos, o estudo da população de portadores do meningococo pode fornecer informações úteis para a compreensão da epidemiologia molecular do meningococo e para embasar medidas de prevenção contra este microrganismo. O objetivo desse estudo consiste em caracterizar molecularmente cepas de *N. meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos da cidade de Salvador, Bahia. **METODOLOGIA:** Para este estudo foram coletados material de orofaringe de 1.200 alunos de 11 a 19 anos de idade, de 137 escolas da rede pública de Salvador. Um total de 59 cepas de *N. meningitidis* foram identificadas através de métodos clássicos. A identificação dos genogrupos foi realizada através da técnica de PCR em tempo real ou por sequenciamento do genoma total. Os 59 isolados foram caracterizados genotipicamente através da técnica de *Multilocus Sequence Typing* e através da genotipagem das proteínas de membrana externa (PorA, PorB, FetA) e dos antígenos vacinais do sorogrupo B (FHbP, NadA e Nhba). **RESULTADOS:** Dos 59 isolados, 36 (61%) apresentaram-se não grupáveis. Entre as cepas capsuladas, o genogrupo B foi o mais prevalente (11,8%), seguido do Y (8,4%), E (6,7%), Z (5%), C (3,3%) e W (3,3%). Foram identificados 34 STs distribuídos em 14 complexos clonais, incluindo oito (23,5%) STs novos. O complexo clonal mais frequente foi o ST-1136 em 20% dos isolados. Dentre as variações de PorA e FetA, as mais prevalentes descritas foram P1.18,25-37 (11,86%), P1.18-1,3 (10,17%) e F5-5 (23,73%), F4-66 (16,95%) e F1-7 (13,56%), respectivamente. Observou-se um predomínio das proteínas de classe 3 (93,22%) dentro das variantes de PorB descritas. As três principais variantes da lipoproteína FHbP foram encontradas nos isolados com a variante FhbP 2 sendo a mais prevalente (n=30; 50,8%), seguida pela FHbP-1 (n=15; 25,4%) e FHbP-3 (n=14; 23,7%). Cerca de 90% dos isolados não apresentaram o gene *nadA*, enquanto que todos os isolados possuíam o gene *nhba*, sendo as subvariantes 10 (18,64%) e 600 (16,95%) as mais prevalentes. Foram observados, a presença de isolados com perfis semelhantes aos de outras cepas de linhagens hipervirulentas responsáveis por surtos descritos ao redor do mundo e do Brasil, como B: P1.19,15: F5-1: ST-639 (cc32); C: P1.22,14-6: F3-9: ST-3780 (cc103) e W: P1.5,2: F1-1: ST-11 (cc11). **CONCLUSÃO:** Os resultados obtidos destacam a necessidade de uma contínua vigilância molecular de *N. meningitidis* e o monitoramento de cepas emergentes. A distribuição de proteínas de membrana externa e dos antígenos vacinais do sorogrupo B podem ser de grande importância para avaliar os efeitos de medidas preventivas futuras contra a doença meningocócica.

**Palavras-chave:** *Neisseria meningitidis*, saúde pública, portador assintomático, epidemiologia molecular

MOURA, Ana Rafaela Silva Simões. Genetic characterization of strains of *Neisseria meningitidis* isolated from asymptomatic carriers aged 11 to 19 residing in Salvador, Brazil. 100 f. il. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine ) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Neisseria meningitidis* is a bacterium that has as an ecological niche in the nasopharynx of humans and that can occasionally cause diseases such as meningitis and septicemia. The population profile of isolates of *N. meningitidis* is highly diverse, both genetically and antigenically, due to the genome plasticity of *Neisseria* spp. and the frequent horizontal gene transfers observed in this microorganism. Young adults are considered the main carriers and transmitters of this microorganism and, consequently, the source of virulent alleles. Therefore, a study of meningococcal carriers can provide useful information for understanding the molecular epidemiology of meningococcus and to support prevention measures against this microorganism. The aim of this study was to determine the molecular characteristics of strains of *N. meningitidis* isolated from asymptomatic carriers in Salvador, Bahia, Brazil. **METHODS:** For this study, oropharynx material was collected from 1,200 students, aged 11 to 19, from 137 public schools in Salvador. A total of 59 strains of *N. meningitidis* were identified by classical methods. Genogroups were identified by real-time PCR or by whole-genome sequencing. The isolates were characterized by conventional molecular multilocus sequence typing (MLST) and genotyping of outer membrane protein genes (*porA*, *porB*, and *fetA*) and serogroup B vaccine antigens (FHbp, NadA and NhbA). Whole genome sequencing was performed on the isolates that could not be sequenced by conventional molecular typing methods. DNA sequences were submitted to the pubMLST website (<http://pubmlst.org/neisseria/>) for determination of the MLST sequence type (ST) and outer membrane protein type. **RESULTS:** Most of the *N. meningitidis* isolates were non-groupable (61%). Of the encapsulated Nm, serogroup B (11.8%) was the most prevalent, followed by Y (8.5%), E (6.7%), Z (5.1%), C (3.4%) and W (3.4%). The isolates were assigned to 34 different STs, 14 of which belonged to defined clonal complexes (CC). We identified eight (23.5%) new STs. The most frequent clonal complex was CC1136, which was present in 20% of the non-groupable isolates. The most predominant variants of PorA and FetA were P1.18,25-37 (11.86%), P1.18-1,3 (10.17%) and F5-5 (23.73%), F4-66 (16.95%) and F1-7 (13.56%), respectively. The main PorB were class 3 protein (93.22%), whereas among the FHbP lipoprotein the three major variants were described with FHbp-2 as the main prevalent (n=30; 50.8%), followed by FHbP-1 (n=15; 25.4%) and FHbP-3 (n=14; 23.7%). The majority of the isolates lacked NadA (90%), while all isolates contained an NhbA, variant 10 and 600 accounted for 18.64% and 16.95% of the isolates, respectively. In addition to the highly diverse meningococcal strains found among carriers, we detected strains of hyper-invasive lineages causing outbreaks around the world, including Brazil, such as B:P1.19,15:F5-1:ST-639 (CC32); C:P1.22,14-6:F3-9:ST-3780 (CC103) and W:P1.5,2:F1-1:ST-11 (CC11). **CONCLUSIONS:** Our data provides insight into the composition of meningococcal carriage in Salvador, Brazil. The genetic diversity of meningococcal population and the presence of hyper-invasive lineages among meningococcal carriage highlights: 1) the importance and need to continue the molecular surveillance of *N. meningitidis* and 2) to monitor the emergence of new meningococcal strains. The distribution of the outer membrane proteins and serogroup B vaccine antigens will be very valuable in evaluating the effects of any future preventive measure against meningococcal diseases.

**Key words:** *Neisseria meningitidis*, public health, carriage, Meningococcal Disease

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Composição proteica da membrana externa de <i>N. meningitidis</i> . Adaptado de SADARANGANI; POLLARD, 2010. ....	22
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Distribuição dos genogrupos de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados (*Minimum Spanning tree*).....52
- Gráfico 2** - Distribuição das variantes de FetA de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados. ....53
- Gráfico 3** - Distribuição das subfamílias de FHbP de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados.....54
- Gráfico 4** - Distribuição das subvariantes de NhbA de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados.....55

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Relação dos genogrupos de *N. meningitidis* identificados nas amostras positivas .45
- Tabela 2:** Características genótípicas dos isolados de *N. meningitidis* (n=59).....48
- Tabela 3:** Distribuição dos complexos clonais de *N. meningitidis* de acordo com o número de STs, número de isolados, genogrupos e perfil populacional mais frequente. ....51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP**, adenosina trifosfato
- BHI**, *brain heart infusion* (infusão de cérebro-coração)
- °C**, graus Celsius
- CC**, complexo clonal
- CDC**, Centers for Diseases Control and Prevention
- cnl***, *capsule null locus* (ausência do *loci* da cápsula)
- CO<sub>2</sub>**, dióxido de carbono
- cps***, *capsule biosynthesis* (gene de biossíntese da cápsula)
- Ct**, *cycle threshold* (ciclo inicial de amplificação)
- CTA**, *Cystine Trypticase Agar* (Ágar tríptico de cistina)
- DLV**, *double locus variation* (dupla variação em *loci*)
- DM**, doença meningocócica
- DNA**, *desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- dNTP**, Desoxinucleotídeo trifosfato
- ET**, *electrophoretic type* (tipo eletroforético)
- EUA**, Estados Unidos da América
- FHbp**, *human factor H binding protein* (proteína ligadora do fator H humano)
- HCl**, ácido clorídrico
- LOS**, lipooligossacarídeo
- MCC**, Vacina conjugada Men C
- MgCl<sub>2</sub>**, Cloreto de magnésio
- Min**, minutos

**mL**, mililitros

**MLEE**, *multilocus enzyme electrophoresis* (eletroforese enzimática de múltiplos loci)

**MLST**, *multilocus sequence type* (tipagem por sequenciamento de múltiplos loci)

**mM**, milimolar

**NadA**, Adesina A

**NhbA**, Antígeno de Ligação de Heparina de *Neisseria*

**OMP**, *outer membrane protein* (proteína de membrana externa)

**OMS**, Organização Mundial de Saúde

**OMV**, *outer membrane vesicles* (vesículas de membrana externa)

**Opa**, *Opacity associated protein* (proteína de opacidade)

**PCR**, reação em cadeia da polimerase

**pH**, potencial hidrogeniônico

**PorA**, Porina A

**PorB**, Porina B

**qPCR** PCR em tempo real

**siaD**, gene polissialiltransferase

**seg**, segundos

**SLV**, *single locus variation* (Variação única em loci)

**ST**, *sequence type* (tipo de sequência)

**STGG**, *Skim Milk-Tryptone-Glucose-Glycerin* (Leite desnatado- Triptona-Glicose-Glicerol)

**TLV**, *triple locus variation* (Variação tripla em loci)

**VR**, *variable region* (região variável)

**VTNC**, vancomicina, colistina e trimetropim

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	15
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	DOENÇA MENINGOCÓCICA.....	16
2.2	<i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> .....	17
2.2.1	<b>Fatores de virulência e componentes da membrana externa de <i>N. meningitidis</i></b> ..	17
2.2.1.1	Lipooligossacarídeo (LOS).....	18
2.2.1.2	Pili.....	18
2.2.1.3	Cápsula Polissacarídica .....	18
2.2.1.4	Proteínas de Membrana Externa.....	20
2.3	<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i></b> .....	23
2.3.1	<b>Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos loci (<i>Multilocus Sequence Typing, MLST</i>)</b> .....	23
2.3.2	<b>Sequenciamento do Genoma Completo</b> .....	24
2.4	<b>EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA</b> .....	25
2.4.1	<b>O Estado de Portador de <i>N. meningitidis</i></b> .....	27
2.4.2	<b>Epidemiologia Molecular de <i>N. meningitidis</i></b> .....	28
2.4.3	<b>Epidemiologia Molecular de <i>N. meningitidis</i> no Brasil</b> .....	30
2.5	<b>VACINAS MENINGOCÓCICAS</b> .....	32
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
3.1	<b>GERAL</b> .....	36
3.2	<b>ESPECÍFICOS</b> .....	36
3.2.1	Caracterizar as sequencia tipo (ST) e complexos clonais, proteínas de membrana externa (PorA, PorB e FetA) e antígenos vacinais do sorogrupo B (FHbp, NadA e Nhba) nas cepas de <i>N. meningitidis</i> identificadas;.....	36
3.2.2	Identificar a circulação de complexos clonais hiperinvasivos circulantes. ....	36
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	<b>POPULAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS DE NASOFARINGE</b> .....	37
4.2	<b>IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS</b> .....	38
4.3	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS GENOGRUPOS</b> .....	38
4.3.1	<b>Obtenção do DNA Bacteriano</b> .....	39
4.3.2	<b>Reação da PCR em Tempo Real (qPCR)</b> .....	39

4.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE <i>N. MENINGITIDIS</i> .....	40
4.4.1	<b>Análise das Sequências de DNA</b> .....	42
4.5	IDENTIFICAÇÃO DO OPERON <i>CAPSULE NULL LOCUS</i> .....	42
4.5.1	<b>Sequenciamento e Análise das Sequências</b> .....	43
4.6	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO.....	43
5	<b>RESULTADOS</b> .....	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	45
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>N. MENINGITIDIS</i> ATRAVÉS DO MLST	46
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS POR PROTEÍNAS DE MEMBRANA .....	47
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63
	REFERÊNCIAS .....	64
	ANEXOS .....	84

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença meningocócica (DM) é um grande problema de saúde pública (WHO, 2016) sendo considerada endêmica no Brasil, com taxas de incidência que variam de 1,00-2,00 casos/100.000 habitantes por ano (SAFADI et al., 2013a). É causada pela bactéria *Neisseria meningitidis* (meningococo), um patógeno comensal que habita a nasofaringe humana, sem causar a doença, em cerca de 8 a 35% da população, estabelecendo o estado de portador assintomático (TZENG; STEPHENS, 2000; ROSENSTEIN et al., 2001).

Os portadores assintomáticos são os principais veículos de transmissão e disseminação da *N. meningitidis*, sendo que a transmissão ocorre por meio do contato direto com as secreções da nasofaringe (STEPHENS, 1999; STEPHENS, 2009; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). O processo de transição entre o estado de portador, o risco de desenvolver a doença e/ou transmiti-la ainda não está bem elucidado na literatura, conferindo ao portador assintomático um risco à comunidade (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004).

A DM normalmente é causada por cepas hipervirulentas, associadas aos seis principais sorogrupos (A, B, C, Y, W e X), correlacionados a um limitado número de complexos clonais. Podemos citar o ST-41/44 e ST-32 associados ao sorogrupo B (DE FILIPPIS et al., 2012), ST-11 ao sorogrupo C e, mais recentemente, ao sorogrupo W, o ST-174 e ST-175 ao sorogrupo Y (LEMOS et al., 2010) e ST-103 ao sorogrupo C (GORLA et al., 2012). Entretanto, o perfil populacional das cepas de *N. meningitidis* pode variar com o tempo e a região geográfica, devido à alta plasticidade genômica do patógeno (CAUGANT et al., 1988; URWIN et al., 2004).

Embora o estado de portador assintomático apresente-se mais frequentemente do que o estado de doença, pesquisas desenvolvidas sobre colonização e caracterização molecular de isolados de *N. meningitidis* ainda são escassas, principalmente no Brasil. Estudos em portadores assintomáticos podem fornecer informações fundamentais sobre a epidemiologia, patogenicidade da DM, sobre a estrutura da população das cepas circulantes de *N. meningitidis*, além de serem essenciais antes e após períodos de intervenções vacinais. Fornece, desta forma, subsídios fundamentais para embasar medidas de saúde pública, principalmente no que tange à intervenção de surtos e políticas vacinais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇA MENINGOCÓCICA

A doença meningocócica (DM) consiste em uma infecção bacteriana causada por *N. meningitidis*, comumente referido como meningococo, um patógeno comensal presente na nasofaringe dos humanos (WHO, 2016). O primeiro evento da DM foi descrito em 1805 após uma epidemia em Genebra, Suíça. Entretanto, o patógeno causador da doença só foi isolado em 1882, a partir do líquido cefalorraquidiano de um paciente. Apenas no ano de 1890 descobriu-se que este microrganismo podia ser encontrado na nasofaringe de indivíduos saudáveis (FLEXNER, 1913).

O estado de portador assintomático ocorre quando o indivíduo saudável alberga o patógeno na nasofaringe, sem causar-lhe danos. Este estado pode ocorrer por períodos que variam de dias a meses e cerca de 8-35% da população em algum momento da vida irá albergar o patógeno de maneira assintomática (STEPHENS, 2007).

Entretanto, em função de alguns fatores tais como, ausência de anticorpos bactericidas, deficiência no sistema complemento e outros fatores imunossupressores (SJOHOLM; BRACONIER; SODERSTROM, 1982; FIJEN et al., 1999), entre outros, a bactéria pode assumir a forma invasiva e penetrar na corrente sanguínea desencadeando a doença meningocócica, cujo espectro clínico inclui meningite, meningococemia e, mais raramente, pneumonia e outras infecções (TZENG; STEPHENS, 2000; ARAYA et al., 2015).

A transmissão do patógeno ocorre, normalmente, através do contato direto com o indivíduo infectado, seja ele portador assintomático ou doente, por meio de gotículas da secreção de nasofaringe, sendo que após a transmissão, a doença pode se desenvolver em até 14 dias (STEPHENS, 2007). A população pediátrica é a mais susceptível à aquisição da doença, principalmente no período de transição entre a queda do título dos anticorpos maternos e os baixos índices dos anticorpos próprios dos lactentes (GOLDSCHNEIDER; GOTSCHLICH; ARTENSTEIN, 1969).

A meningite é a manifestação clínica mais frequente, com taxas globais de 80 a 85% dos casos reportados de DM (AL-TAWFIQ; CLARK; MEMISH, 2010), que podem ser fatais em 5 a 15% dos casos, mesmo com a antibioticoterapia adequada (ROSENSTEIN et al., 1999), ou levar a

sequelas neurológicas em 12 a 19% dos sobreviventes (EDWARDS; BAKER, 1981; ROSENSTEIN et al., 2001).

## 2.2 *Neisseria meningitidis*

*Neisseria meningitidis* é uma bactéria Gram negativa,  $\beta$ -proteobacterium e membro da família *Neisseriaceae*. Apresenta-se na forma de diplococo, com formato descrito como “grãos de café”. É um microrganismo aeróbio, intracelular, oxidase positivo e de crescimento fastidioso. Cresce tanto em meio de cultura de ágar sangue quanto ágar chocolate, em temperaturas entre 35-37 °C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. No processo de obtenção de energia as espécies de *Neisseria* produzem ácido a partir da oxidação de carboidratos, sendo que diferentes espécies realizam a oxidação de diferentes carboidratos e esta é uma das formas de identificação fenotípica da *N. meningitidis*, visto que esta utiliza a glicose e a maltose como fonte de energia para oxidação (WINN; KONEMAN; TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC, 2005; MURRAY; BARON, 2007; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A membrana de superfície da *N. meningitidis*, como das demais bactérias Gram negativas, apresenta duas membranas, a interna ou citoplasmática composta de fosfolipídios e a externa, composta por lipídios, proteínas de membrana externas e lipooligossacarídeos (LOS). As membranas externa e interna são separadas pela camada de peptideoglicano e podem ser circundadas por uma cápsula polissacarídica (ROSENSTEIN et al., 2001; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

### 2.2.1 Fatores de virulência e componentes da membrana externa de *N. meningitidis*

Os componentes da membrana externa, o lipooligossacarídeo, *pili*, a cápsula polissacarídea e as proteínas de membrana externa exercem papel importante no mecanismo de proteção, patogenicidade e na identificação fenotípica e/ou genotípica da bactéria.

### 2.2.1.1 Lipooligossacarídeo (LOS)

O glicolípido LOS é um fator importante na adesão e na ativação da resposta inata do sistema imune (STEPHENS, 2009). Ele é composto pelo lipídio A, que confere toxicidade e pelo core de oligossacarídeo, que é responsável por fornecer uma barreira resistência bacteriana aos efeitos bactericidas do soro humano. O meningococo apresenta estruturas variáveis de LOS, num total de 12 imunotipos, designados L1 a L12. (WINN; KONEMAN; TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC, 2005; STEPHENS, 2009).

### 2.2.1.2 Pili

As fimbrias ou *pili* são projeções filamentosas compostas por proteínas glicosiladas ancoradas à membrana externa e expostas na superfície celular (TZENG; STEPHENS, 2000). São responsáveis por intermediar a inserção do meningococo nas células da mucosa da nasofaringe e essenciais para a adesão do meningococo encapsulado nas células do hospedeiro (ROSENSTEIN et al., 2001). O movimento contráctil fornecido pela retração do *pili* promove a passagem da bactéria pela camada epitelial; o movimento sobre as superfícies do epitélio e a formação de microcolônias (MERZ; SO, 2000). Os *pili* são subdivididos em duas classes: classe 1 e classe 2, de acordo com suas características estruturais e funcionais (WINN; KONEMAN; TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC, 2005a).

### 2.2.1.3 Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica é um componente que pode estar presente ou não nas cepas de *N. meningitidis*, seja porque o gene da cápsula está ausente ou apenas com sua expressão suprimida (WEBER et al., 2006). Entretanto, a maioria dos casos DM é causada por cepas capsuladas. De fato, a cápsula é um dos principais fatores de virulência do meningococo (ROSENSTEIN et al., 2001; STEPHENS, 2007), responsável por conferir ao mesmo mecanismos de sobrevivência ao impedir ações de opsonofagocitose, ou seja, impedindo a ligação do sistema complemento ao meningococo, e assim inibindo a fagocitose da bactéria (KAHLER et al., 1998; VOGEL;

FROSCH, 1999); e, portanto, a ação do sistema complemento torna-se inviável. A cápsula atua também como componente de proteção da bactéria ao meio externo, impedindo sua dessecação durante a transmissão (VIRJI, 1996).

A estrutura da cápsula de *N. meningitidis* permite a classificação da bactéria em 12 sorogrupos, que por convenção são representados por letras maiúsculas – A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y e Z (HARRISON et al., 2013), sendo os sorogrupos A, B, C, W, X e Y os principais causadores de doenças invasivas (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). A caracterização dos sorogrupos é determinada pelas diferenças nas estruturas químicas da cápsula polissacarídica (CLAUS et al., 1997).

Durante a colonização na nasofaringe observa-se que a maioria dos meningococos não exhibe a cápsula polissacarídica. Tal fenômeno é descrito como consequência da variação de fase do gene responsável pela síntese da cápsula (HAMMERSCHMIDT et al., 1996a).

Os genes responsáveis pela síntese da cápsula estão agregados em um único cromossomo, denominado *cps locus*, divididos em seis regiões A-D, D' e (FROSCH; WEISGERBER; MEYER, 1989). A região A apresenta os genes responsáveis pela biossíntese da cápsula polissacarídica, com variantes sorogrupo específicos: variantes do gene polissialiltransferase (*siaD*), necessário para a síntese da cápsula dos sorogrupos B, C, W e Y; e o gene *myn*, necessário para a expressão da cápsula do sorogrupo A (SWARTLEY et al., 1997). As regiões B e C codificam as proteínas que facilitam o transporte dos polissacarídeos através da membrana (FROSCH et al., 1991) e as regiões D e E não apresentam função definida (FROSCH; WEISGERBER; MEYER, 1989).

É na região A aonde se observa a transformação e a recombinação dos genes responsáveis pela codificação dos diferentes sorogrupos, fenômeno associado ao mecanismo de troca de cápsula (*switch capsular*). Porém, as consequências dessa troca capsular no que tange a transmissão, estado de portador, virulência ou outros fatores envolvendo a biologia da bactéria ainda não estão bem elucidadas (HARRISON et al., 2010).

Cerca de 16% dos isolados de *N. meningitidis* não apresentam o material genético necessário para a síntese da cápsula, onde os operons responsáveis pela síntese e transporte da cápsula são substituídos por uma região não codificante, do inglês, *capsule null locus (cnl)* (CLAUS et al., 2002). A maioria dos isolados *cnl* está distribuída em complexos clonais

específicos, não hiperinvasivos. Apesar desses isolados serem encontrados mais frequentemente em portadores assintomáticos, existem alguns raros casos de DM ocasionada por cepas *cnl* (SCHORK et al., 2012).

#### 2.2.1.4 Proteínas de Membrana Externa

*N. meningitidis* apresenta proteínas de membrana externa (OMP) que estão intimamente relacionadas à virulência e à caracterização do patógeno (Figura 1). Algumas dessas OMPs são divididas em classes de acordo com o peso molecular e variam quanto a susceptibilidade à hidrólise enzimática e à desnaturação térmica (WINN; KONEMAN; TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC, 2005a).

PorA é uma porina de classe 1 codificada pelo gene *porA*, que constitui a maior porção da membrana externa (JOLLEY; MAIDEN, 2010). Apresenta oito alças expostas na membrana, com duas regiões variáveis principais (VR1 e VR2) e uma menos expressiva ou semi-variável (VR3) (JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007). As regiões variáveis VR1 (alça I) e VR2 (alça IV) são utilizadas para determinar os subtipos dos meningococo (VAN DER LEY et al., 1991). Atualmente existem cerca de 268 variantes do VR1 e 747 variantes do VR2 descritas na base de dados pública para tipagem molecular e diversidade do genoma microbiano, o PubMLST (<http://pubmlst.org/neisseria>).

PorB é uma proteína transmembrana de classe 2 ou classe 3 codificada pelo gene *porB*, que determina o sorotipo do meningococo (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985) e, apresenta quatro regiões variáveis (alças I, V, VI, e VII) (FEAVERS et al., 1992). Por convenção, os sorotipos, são representados por números arábicos (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985).

As proteínas de opacidade Opa e Opc são proteínas de classe 5 que auxiliam na aderência e invasão da bactéria no hospedeiro (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004). A Opa facilita a aderência do meningococo nas células epiteliais e nos neutrófilos, enquanto que a Opc atua na aderência da mucosa e na invasão das células endoteliais (WINN; KONEMAN; TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC, 2005a).

FetA é uma proteína externa de membrana, reguladora de ferro (JOLLEY; MAIDEN, 2010), que apresenta homologia com a proteína férrica da bactéria *Escherichia coli* (ALA'ALDEEN et al., 1990). É composta por 13 alças expostas na membrana, sendo a alça VII, a região variável (THOMPSON; FEAVERS; MAIDEN, 2003). Anteriormente, a FetA não era utilizada no sistema de tipagem do meningococo, principalmente devido a sua expressão limitada, em condições de limitações de ferro (JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007). Entretanto, observou-se a presença de anticorpos contra FetA no soro de pacientes convalescentes de DM (BLACK et al., 1986) e em testes *in vitro*, o anticorpo monoclonal anti-FetA exibe atividade bactericida específica contra a cepa utilizada para a produção do anticorpo (PETTERSSON et al., 1990). FetA é, portanto, considerada como uma candidata vacinal.

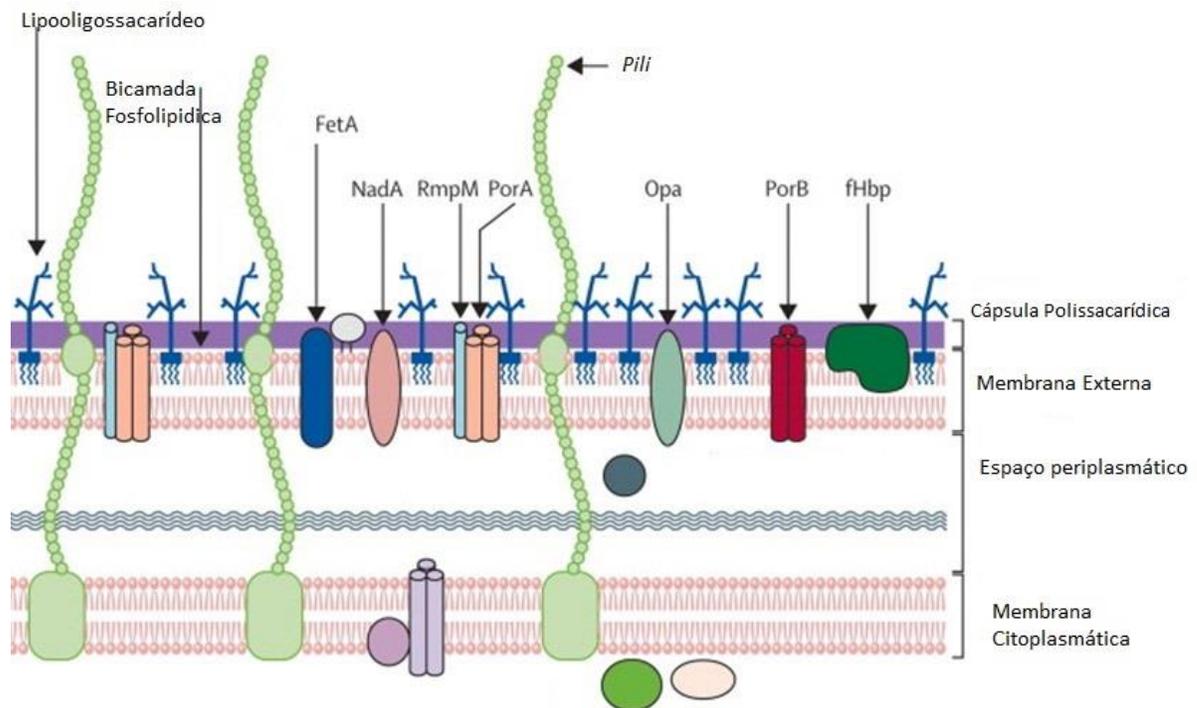
O sequenciamento do gene *fetA*, na sua porção variável, juntamente com o *porA*, permite a caracterização de clones emergentes ou em circulação na população (THOMPSON; FEAVERS; MAIDEN, 2003). Em alguns raros casos, os isolados podem apresentar deleção do gene *fetA*, bem como a deleção total ou parcial do gene *porA* (CLAUS et al., 2007; MARSH et al., 2007).

A proteína de ligação ao fator H (FHbP) é uma lipoproteína de membrana que se liga ao fator H humano, reduzindo a ativação do sistema complemento e aumentando as chances de sobrevivência do meningococo no soro (WELSCH; RAM, 2008; BEERNINK; GRANOFF, 2009). Diferentes nomenclaturas desse antígeno se sobrepõem, uma vez que ainda não foi definida uma nomenclatura única. Massignani e colaboradores (2003) classificaram a FHbP em variantes 1, 2 e 3 (MASIGNANI et al., 2003); Fletcher e colaboradores (2004) em 2 subfamílias A e B (2004) e o pesquisador Brehony e seus colaboradores (2009) propõem uma classificação por alelos/peptídeos, sendo que a variante 1 corresponde à subfamília B e as variantes 2 e 3 à subfamília A (MASIGNANI et al., 2003; FLETCHER et al., 2004). A FHbP é um antígeno vacinal em potencial, uma vez que os anticorpos gerados contra um tipo pertencente a uma das subfamílias apresentam imunidade cruzada para os outros tipos pertencentes da mesma subfamília (THOMPSON; FEAVERS; MAIDEN, 2003; TAHA; DEGHMANE, 2012).

NadA é uma proteína trimérica autotransportadora, envolvida na adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (CAPECCHI et al., 2005). O gene *nadA* está presente em aproximadamente 30% dos isolados clínicos e em 16% dos portadores assintomáticos (LUCIDARME et al., 2010; BAMBINI et al., 2014). Para a caracterização do mesmo, o gene foi inicialmente separado em 3

alelos (NadA-1, NadA-2 e NadA-3), em função dos tamanhos de banda apresentados na técnica de PCR (COMANDUCCI et al., 2002), mas atualmente, são descritas 5 variações de NadA (BAMBINI et al., 2014). Observa-se uma associação entre a variante do NadA e complexos clonais (cc) específicos, como por exemplo, o cc 11, cc32 e cc8 que estão, normalmente, associadas as variantes NadA-1, NadA-2 ou NadA-3, respectivamente e o complexo cc213 associado ao NadA-5 (LUCIDARME et al., 2010). Apesar da baixa frequência desta proteína nas amostras de portadores existe uma variante, a NadA-4, comumente encontrada em cepas de *N. meningitidis* isoladas de portadores (COMANDUCCI et al., 2004).

NhbA é uma lipoproteína presente em todas as cepas de *N. meningitidis* e possui a capacidade de recrutar heparina para a superfície bacteriana, aumentando a resistência da mesma ao soro (LUCIDARME et al., 2010). As subvariantes dessa lipoproteína induzem reação cruzada (PIZZA et al., 2000) e proteção mediada por anticorpos (LUCIDARME et al., 2010). Assim como a FHbp, a NhbA é um candidato vacinal.



**Figura 1-** Composição proteica da membrana externa de *N. meningitidis*. Adaptado de SADARANGANI; POLLARD, 2010.

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*

A tipagem molecular de *N. meningitidis* pode fornecer informações sobre a estrutura populacional do meningococo, suas variações e evoluções perante as alterações temporais e geográficas (CAUGANT, 2002; 2008; BUCKEE et al., 2010). As informações obtidas através da tipagem são de extrema importância para o embasamento epidemiológico sobre as cepas circulantes em uma determinada região, para o reconhecimento de potenciais surtos e para fundamentar medidas de vigilância e controle da DM. Entre as diversas técnicas utilizadas pode-se destacar, a tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci* e o sequenciamento do genoma total.

### 2.3.1 Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos *loci* (*Multilocus Sequence Typing*, MLST)

A técnica de MLST emprega o sequenciamento do DNA de sete genes constitutivos (*abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*) (MAIDEN et al., 1998). Esse método permite a caracterização dos isolados ao sequenciar as variações presentes na sequência nucleotídica de fragmentos internos dos genes constitutivos (PEREZ-LOSADA et al., 2013). Os isolados são caracterizados pelos alelos de cada um dos sete *loci*, formando um perfil alélico, também denominado de sequência tipo, do inglês *Sequence Type* (ST) (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

Cada ST recebe um número arbitrário que é correspondente a um tipo eletroforético (ET) (BREHONY; JOLLEY; MAIDEN, 2007). Quando um grupo de STs compartilha até quatro alelos em comum com um ST central têm-se um complexo clonal. O ST central é o suposto genótipo ancestral, ou seja, aquele em que os outros genótipos no complexo são descendentes e o complexo é então nomeado a partir desse ST (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003). Por enquanto, apenas o complexo ST-41/44 apresenta dois STs centrais devido a sua diversidade e tamanho (BREHONY; JOLLEY; MAIDEN, 2007). Além disto, os complexos clonais podem ser associados a sorogrupos específicos (BIRTLES et al., 2005).

O MLST é uma atualização do Eletroforese Enzimática em Múltiplos *loci* (MLEE), onde ao utilizar os genes constitutivos ao invés de comparar a mobilidade eletroforética das enzimas codificadas por eles, permite detectar mais variações, resultando em mais alelos por *locus* e comparar os dados obtidos pelo sequenciamento entre laboratórios. Consiste em uma técnica de

alta reprodutibilidade e portabilidade, uma vez que todos os dados são acessíveis através de um banco de dados disponível na internet (<http://pubmlst.org/neisseria/>) (MAIDEN et al., 1998).

Ao utilizar como alvo de sequenciamento os genes constitutivos que evoluem lentamente e não sofrem pressão seletiva como outros genes constituintes do genoma da *N. meningitidis*, a técnica de MLST torna-se uma ferramenta útil para avaliar as relações epidemiológicas de longo período, necessitando da combinação com o sequenciamento de outros genes sujeitos à pressão seletiva, tais como daqueles que codificam as proteínas de membrana externa (BYGRAVES et al., 1999; FEAVERS et al., 1999; BREHONY; JOLLEY; MAIDEN, 2007).

Ao associar o MLST com o sequenciamento das OMPs, o poder de discriminação é amplificado, possibilitando uma avaliação da ocorrência de surtos, bem como a distribuição de marcadores antigênicos que são candidatos vacinais (URWIN et al., 2004). A desvantagem da técnica consiste no limitado poder de discriminação e em ser uma técnica cara e laboriosa (ENRIGHT; SPRATT, 1999; TORPDAHL et al., 2005; HARBOTTLE et al., 2006).

### **2.3.2 Sequenciamento do Genoma Completo**

Apesar do MLST associado as OMPs ser considerada uma técnica padrão ouro para a caracterização molecular do meningococo, principalmente em países de baixo poder econômico, o sequenciamento do genoma completo tem se tornado uma opção para cientistas e até mesmo para laboratórios de rotina, tendo em vista a crescente redução dos custos para o sequenciamento e o crescente número de metodologias disponíveis no mercado, tornando o sequenciamento do genoma completo uma ferramenta fundamental para estudos populacionais, diagnóstico e vigilância (LARSEN et al., 2012).

Os dados gerados pelo sequenciamento do genoma completo são capazes de fornecer, ainda, informações que auxiliam no desenvolvimento de novos ensaios, mais sensíveis e específicos, para a identificação de microrganismos (DIDELOT et al., 2012). Como exemplo, podemos citar o ensaio de PCR em tempo real para identificação de *N. meningitidis* através do gene *sodC*, com elevada sensibilidade e especificidade, na identificação de meningococos não somente em isolados provenientes de doentes, mas também em estudos de portadores (DOLAN THOMAS et al., 2011).

Além disto, o sequenciamento do genoma completo nas suas mais diversas metodologias têm apresentando bons resultados no que tange a elevada discriminação e rapidez na genotipagem dos isolados (FOURNIER; DUBOURG; RAOULT, 2014). Adicionalmente, em posse das análises dos dados das sequencias oriundas do sequenciamento do genoma completo, torna-se possível avaliar elementos de virulência, prever cobertura vacinal e também resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis (DIDELOT et al., 2012; FOURNIER; DUBOURG; RAOULT, 2014; KWONG et al., 2015).

Tais análises e muitas outras passíveis de serem realizadas com os dados gerados através do sequenciamento do genoma completo reforçam a capacidade da era genômica nos estudos de diversidade gênica, patogênese, evolução, detecção e tratamento.

#### 2.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA

A doença meningocócica permanece um grave problema de saúde pública, afetando de 500.000 a 1.2 milhões de pessoas e matando entre 50 mil a 135 mil por ano em todo o mundo (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). No Brasil, ela apresenta níveis endêmicos de 1,8 casos por 100.000 habitantes (SAFADI, 2015).

A distribuição dos principais sorogrupos causadores da DM (A, B, C, W, Y e X) varia geográfica e temporalmente (HARRISON; TROTTER; RAMSAY, 2009b).

O sorogrupo A, por exemplo, no início do século 20, era o principal responsável pelo DM em diversas partes do mundo. Entretanto, por motivos ainda não esclarecidos, após a Segunda Guerra Mundial, este sorogrupo virtualmente desapareceu da Europa, Américas e Oceania, sendo encontrado apenas, com elevada incidência, na Ásia e na África, principalmente na região denominada de cinturão da meningite no continente africano. (SCHWARTZ; MOORE; BROOME, 1989; GREENWOOD, 1999; ABIO; NEAL; BECK, 2013). Recentemente, com o advento da vacina conjugada contra este sorogrupo têm-se observado uma redução significativa dos índices de incidência da doença pelo sorogrupo A nos continentes onde a vacina foi aplicada (XU et al., 2012; PELTON, 2016).

O sorogrupo B e C são os principais causadores da DM nos países industrializados e, diferentemente do sorogrupo A, estão mais associados a surtos e endemias do que a epidemias (BOSIS; MAYER; ESPOSITO, 2015). O sorogrupo B é descrito na Europa desde de 1970 e na América do Sul desde 1980 (ABIO; NEAL; BECK, 2013). Atualmente este sorogrupo é o principal causador da DM na América do Norte, Oceania, Cone Sul e Europa, (COHN; MACNEIL, 2015). É responsável por elevadas taxas de incidência na população pediátrica, principalmente em menores de 1 ano na Europa, onde 70% dos casos são associados a este sorogrupo, enquanto que nos Estados Unidos e Canadá, nota-se uma maior predominância do sorogrupo B em surtos envolvendo adultos jovens nas universidades (GASPARINI et al., 2014; COHN; MACNEIL, 2015).

O sorogrupo C é descrito como causador da DM em todas as faixas etárias, porém com maior destaque para surtos em adolescentes e adultos jovens (CAUGANT, 2008) e aparecendo como principal agente causador da doença no Brasil e em outros países da América Latina (IBARZ-PAVON et al., 2012). Nos últimos anos, também tem sido considerado o segundo sorogrupo mais associado a DM na América do Norte, Europa Oceania, inclusive com incidência crescente no cinturão africano (PELTON, 2016).

Os sorogrupos Y, W e X têm sido destaque em diversos surtos ao redor do mundo, sendo o sorogrupo Y mais frequente na América do Norte, principalmente entre adolescentes e adultos jovens (GASPARINI et al., 2014). Na Europa Central e nos países nórdicos observa-se uma predominância do sorogrupo Y na população adultos/idosos (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007; HILL et al., 2015; LADHANI et al., 2015).

O sorogrupo W é descrito causando pequenos surtos desde 1970 (KLEIMAN et al., 1978), porém foi após o surto ocorrido durante a peregrinação do Hajj no ano 2000 (AGUILERA et al., 2002), que este sorogrupo ganhou destaque devido a sua rápida expansão, transmissibilidade e elevada taxa de letalidade, o que proporcionou a expansão deste sorogrupo mundialmente, com destaque para a Inglaterra (FINDLOW; BORROW, 2016), África do Sul (MACNEIL et al., 2014), sul do Brasil (WEIDLICH et al., 2008) e no Cone Sul (ABAD et al., 2014), principalmente no Chile, onde este sorogrupo passou a ser a principal causa da DM na região (VALENZUELA et al., 2013; ULLOA, 2016).

Já o sorogrupo X é reportado causando doença desde o ano 1960 (EVANS; ARTENSTEIN; HUNTER, 1968) em casos esporádicos na América do Norte (RYAN; HOGAN, 1980), Europa (PASTOR et al., 1985), Austrália (HANSMAN, 1983) e África (GAGNEUX et al., 2000). No continente africano este sorogrupo tem causado diversos surtos, especialmente em Níger (CAMPAGNE et al., 1999) e Gana (GAGNEUX, S. P. et al., 2002; DJIBO et al., 2003).

#### **2.4.1 O Estado de Portador de *N. meningitidis***

A aquisição do meningococo e a colonização do mesmo na nasofaringe é uma etapa primordial para o desenvolvimento da DM (COHN; MACNEIL, 2015). As taxas de portadores são variáveis e a idade parece ser um dos mais relevantes fatores associados à condição de portador assintomático de *N. meningitidis* (CHRISTENSEN et al., 2010; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007)

Diferentemente de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* do tipo b, a prevalência de portadores de *N. meningitidis* é elevada em adolescentes e adultos jovens, particularmente entre aqueles que vivem em comunidades fechadas, ambientes aglomerados ou regiões onde foram registrados surtos recentes (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007). Outros fatores que aumentam o risco de ser portador são: sexo masculino, infecções respiratórias de origem viral e bacteriana concomitantes, tabagismo ativo e passivo, status socioeconômico baixo, bem como a proximidade dos contatos sociais (COHN; MACNEIL, 2015).

E, embora a colonização seja uma etapa fundamental para o desenvolvimento da doença, apenas uma pequena porcentagem dos colonizados (1-5%) evolui para o quadro patológico (STEPHENS; APICELLA, 2015) (GAGNEUX, S. et al., 2002), tornando a doença um desfecho raro em relação ao estado de portador (TROTTER; GAY; EDMUNDS, 2006).

Assim como a DM, o estado de portador, difere geográfica e temporalmente, sendo possível observar diferentes taxas de colonização que variam de aproximadamente 25% na Europa (CHRISTENSEN et al., 2010) para 5% na África (KRISTIANSEN et al., 2013) e 1,6% a 9,9% em diferentes países da América do Sul (DE MORAES et al., 2015; MORENO et al., 2015; DIAZ et al., 2016; NUNES et al., 2016) .

As correlações entre o estado de portador e a manifestação da doença invasiva ainda não estão bem esclarecidos (GASPARINI et al., 2014), mas sabe-se que os portadores são potenciais reservatórios de cepas patogênicas, que podem ser transmitidos à comunidade, (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; MACLENNAN et al., 2006; JOUNIO et al., 2012). Além disto, o estado de portador pode resultar em um processo de imunização sorogrupo específico (KREMASTINO et al., 1999; ROSENSTEIN et al., 2001), bem como, promover a variabilidade genética entre as cepas de *N. meningitidis*, a partir da troca de material genético com outras neisserias ou outras espécies de bactérias por recombinação (CAUGANT et al., 1986; HOLMES; URWIN; MAIDEN, 1999).

#### 2.4.2 Epidemiologia Molecular de *N. meningitidis*

Com o advento da caracterização molecular, a princípio com o MLEE e posteriormente com o MLST, foi possível observar as correlações genéticas entre as amostras de *N. meningitidis* (CAUGANT et al., 1988). Como por exemplo, foi detectado que a população de meningococos em portadores assintomáticos é altamente heterogênea (geneticamente e antigenicamente) (CAUGANT et al., 1988). Por outro lado, as cepas de *N. meningitidis* encontradas em pacientes acometidos pela doença meningocócica apresentam uma estrutura populacional clonal, denominados de clones hipervirulentos. Esses clones são estáveis, podendo persistir durante décadas, bem como apresentar uma distribuição global (CAUGANT et al., 1987a).

De modo geral, a caracterização das linhagens virulentas vai além da determinação dos complexos clonais, sofrendo influência das diferentes combinações de genes e variações alélicas (TINSLEY, NASSIF, 2001). Deste modo, foi estabelecido que a tipagem molecular dos meningococos deve compreender a caracterização das cepas através da técnica de MLST, o sequenciamento dos genes que codificam as proteínas PorA e FetA, bem como a determinação do sorogrupo, empregando-se a nomenclatura **sorogrupo:PorA:FetA:ST (complexo clonal)**, como por exemplo, B:P1.19,15:F5-1:ST-33 (cc32) (JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007). Mais recentemente, a caracterização dos genes codificantes de outras proteínas de membrana externa, tais como, FHbP, NadA e NhbA, passaram a ganhar destaque e importância não só pelo seu uso como componentes vacinais, mas também como ferramentas adicionais na distinção de clones de

*N. meningitidis* (COMANDUCCI et al., 2002; BAMBINI et al., 2009; HARRISON; TROTTER; RAMSAY, 2009a; CARTER, 2013; MUSTAPHA et al., 2015).

O sorogrupo A não apresenta muitas variações, exibindo um perfil populacional clonal e estes clones permanecem em circulação durante longos períodos (SMITH et al., 1993). A maioria dos surtos ocasionados por este sorogrupo apresenta complexos clonais específicos, com destaque para o ST-5 e o ST-7 (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). Por outro lado, os sorogrupos B e C, apresentam uma elevada recombinação genética, além de estarem relacionados ao surgimento e a transmissão transitória de isolados “hiperendêmicos” (SMITH et al., 1993).

O complexo clonal ST-32 é fortemente associado ao sorogrupo B ao redor do mundo, sendo responsável por surtos na África, EUA, Europa, e América do Sul (CAUGANT et al., 1988; WEDEGE et al., 1995; DIERMAYER et al., 1999). Entretanto, devido ao seu perfil transitório, o sorogrupo B pode estar associado a outros complexos clonais, tais como, o ST-41/44, presente em casos de DM nos EUA e Nova Zelândia (BREHONY; JOLLEY; MAIDEN, 2007); ST-8 que pode estar associado tanto ao sorogrupo B quanto ao C, presente em casos de DM desde 1970 (CAUGANT et al., 1987b); ST-269 evidenciado em surtos descritos no Canadá (LAW et al., 2015); e ST-4821, encontrado em um surto na China em 2005 (ZHOU et al., 2012).

Assim como o sorogrupo B, o sorogrupo C está presente em diversos surtos e epidemias ao redor do mundo, associado a diferentes complexos clonais. Citam-se o ST-8, descrito desde a década de 70 em casos de DM no Reino Unido, EUA e Europa (CAUGANT et al., 1987a; CAUGANT et al., 1988); ou o ST-103 descrito no Brasil em 1989 e presente em casos na Europa, América do Norte e do Sul e Ásia (DE LEMOS et al., 2007). Entretanto, até a década de 90, a maioria (79%) dos casos de DM ocasionadas pelo sorogrupo C era de cepas do complexo clonal ST-11, (RAMSAY et al., 1997; CLAUS et al., 2003), responsável por surtos na Europa, Austrália, EUA e Canadá (WHALEN et al., 1995; JELFS; MUNRO, 2001). Este complexo clonal, em menor escala, já foi descrito associado aos sorogrupos B em 1960 (CAUGANT et al., 1990) e W entre 1970 e 1990 (CAUGANT, 1998). Porém, após um surto ocorrido no ano 2000, durante uma peregrinação na Arábia Saudita, este complexo clonal passou a ser, prioritariamente, associado ao sorogrupo W, cepa W: P1.5,2: ST-11(cc11). Desde então, cepas geneticamente relacionadas a esta têm sido descritas ao redor do mundo, causando inúmeros surtos e elevando a incidência da DM em inúmeras regiões (AGUILERA et al., 2002; MAYER et al., 2002; LUCIDARME et al., 2015).

Os estudos de caracterização molecular de isolados de *N. meningitidis* em portadores assintomáticos demonstram que apesar da estrutura populacional diversa, cepas de *N. meningitidis* isoladas de portadores podem pertencer a complexos clonais hiperinvasivos. (JOLLEY et al., 2000; CLAUS et al., 2005). Esses estudos comprovam a alta variabilidade e recombinação entre a população de meningococos (JOLLEY et al., 2000), demonstrando que a população de *N. meningitidis* presente em portadores é uma das principais fontes de material genético, responsável pelo aumento e surgimento de novos genótipos e tipos antigênicos (MAIDEN; MALORNY; ACHTMAN, 1996).

#### **2.4.3 Epidemiologia Molecular de *N. meningitidis* no Brasil**

Surtos e casos esporádicos da DM têm sido descritos no Brasil desde 1916 (MILAGRES et al., 2000), mas foi no início da década de 20 que ocorreu pela primeira vez uma grande epidemia de doença meningocócica, no município de São Paulo, causada pelo sorogrupo A, o mesmo sorogrupo responsável por outra epidemia no ano de 1947 (DE MORAES; BARATA, 2005). Após essas duas grandes epidemias, as taxas de incidência e de letalidade da doença meningocócica permaneceram em níveis baixos até a década de 70, quando o país foi afetado por ondas de surtos epidêmicos em diversas regiões. A princípio com o sorogrupo C (cc11) em 1971), seguido pelo sorogrupo A (complexo clonal ST-5/subgrupo III) em 1974, sem que a incidência dos casos ocasionados pelo sorogrupo C tivesse diminuído ou retornado a valores endêmicos (DE MORAES; BARATA, 2005; MORAES, 2015).

Ao final da década de 70 e início da década de 80 observou-se uma mudança no perfil epidemiológico da doença meningocócica no Brasil, com uma expressiva redução dos casos ocasionados pelo meningococo sorogrupo A e C e um aumento substancial de DM causada pelo sorogrupo B, cepa B: P1.19,15 (DE LEMOS et al., 2007; SAFADI et al., 2013b), a mesma encontrada em Cuba (SACCHI et al., 1992a; LEMOS et al., 2006).

O sorogrupo B permaneceu como maior responsável pelos surtos e epidemias no Brasil até o início dos anos 2000, como foi demonstrado por Filippis & Vicente (2005) em um estudo avaliando os casos de DM em quatro Estados (Pernambuco, Bahia, Santa Catarina e Rio de Janeiro)

no período de 1999-2004. Cerca de 80% dos casos identificados foram ocasionados pelo sorogrupo B, com predomínio da cepa B: P1.19,15: F5-1: ST-639 (cc32), seguido por cepas pertencentes ao complexo clonal ST-41/44.

Apesar do predomínio do sorogrupo B, o sorogrupo C foi responsável pelo aumento das taxas de incidência de DM a partir dos anos 90, principalmente em São Paulo, com surtos causados ocasionados pelas cepas C: P1.5,2 (cc11); C: P1.3 (cc8) e C: P1.14-6 (cc103) (DE LEMOS et al., 2007). A partir do ano de 2002 foi observado um aumento progressivo dos casos de DM ocasionados pelo sorogrupo C, passando a ser o principal causador da DM em quase todo território nacional. Esta situação permanece até os dias atuais, com casos ocasionados por cepas pertencentes, principalmente, ao complexo clonal ST-103, sendo a cepa C: P1.14-6 (cc103), a linhagem hipervirulenta mais frequente nos casos descritos (DE LEMOS et al., 2007; GORLA et al., 2012; SAFADI et al., 2013b; SAFADI; BEREZIN; ARLANT, 2014).

A cidade de Salvador apresentou perfil epidemiológico similar ao descrito para o restante do território nacional e do estado da Bahia, com altas incidências do sorogrupo B na década de 80 e 90 ocasionados pela mesma cepa B: P1.19,15. Também foi observada nesta região, a substituição da prevalência do sorogrupo B pelo sorogrupo C nos anos 2000, ocasionada pela linhagem hipervirulenta em circulação no país, a cepa C: P1.14-6: ST-3770 e ST3780, pertencente ao complexo clonal 103 (CORDEIRO et al., 2007; GALVAO-DE-ARAÚJO et al., 2012). Entre 2007 e 2010 esta cepa foi responsável pelo aumento significativo do número de casos de DM na Bahia, sendo registrados 1,5 casos por 100.000 habitantes, com 50 mortes. Cerca de 50% dos casos e 48% das mortes ocorreram em Salvador, com elevada incidência na população de adolescentes e adultos jovens (CARDOSO, 2012).

Atualmente no país, existem poucos estudos relacionando o perfil populacional de cepas circulantes de *N. meningitidis* em portadores. Em um estudo realizado recentemente em Campinas, São Paulo, foi observada a circulação de clones com genótipos semelhantes aos encontrados em casos de doença meningocócica como, por exemplo, B: P1.19,15: ST-639 (cc32); B: P1.3: ST-409 (cc41/44); C: P1.14-6 (cc103) e W: P1.5,2: ST-11(cc11). Por De Moraes e colaboradores (2015). Esses autores encontraram também outros complexos clonais hipervirulentos como o ST-174 e ST-175, normalmente associados ao sorogrupo Y e a prevalência (61%) de amostras não grupáveis, distribuídos em sua maioria nos complexos clonais ST-53, ST-1136 e ST-198.

## 2.5 VACINAS MENINGOCÓCICAS

A vacinação permanece como a melhor estratégia para prevenção e proteção contra a DM, tendo em vista o elevado índice de fatalidade e sequelas, mesmo em posse do tratamento adequando (BOSIS; MAYER; ESPOSITO, 2015). A vacinação pode proteger o indivíduo da doença, seja produzindo anticorpos bactericidas em soro (BORROW et al., 2001), seja induzindo a imunidade de mucosa e, portanto, afetando a colonização e a transmissão do patógeno (RAMSAY et al., 2003). Este efeito pode ser extremamente vantajoso se a transmissão da doença for interrompida, mas, por outro lado, a vacina pode induzir a pressão seletiva imunogênica e com isto ocasionar a diversidade dos antígenos expostos na superfície bacteriana (GUPTA et al., 1996; MAIDEN, 2008), tornando a prevenção da DM um grande desafio global.

Atualmente existem três tipos de vacinas meningocócicas, as polissacarídicas, as polissacarídicas conjugadas e, mais recentemente, vacinas recombinantes que empregam proteínas de membrana externa, específicas para os principais sorogrupos A, B, C, W e Y.

As vacinas polissacarídicas surgiram no final dos anos 60 e sua ação se baseia na reação imunogênica do hospedeiro aos antígenos capsulares (MCINTYRE et al., 2012). Elas podem ser bivalentes (A/C), trivalentes (A, C, W) ou quadrivalentes (ACWY). São vacinas células T independentes e, portanto, não induzem memória imunológica (POLLARD; PERRETT; BEVERLEY, 2009). Essas vacinas apresentam uma baixa eficácia em crianças menores de dois anos, uma imunidade de curta duração em adultos (12 a 36 meses) e pouco ou nenhum efeito em portadores (MCINTYRE et al., 2012). Além disso, a repetição da imunização pode resultar em uma tolerância imunogênica, com acentuada depleção na resposta imune a cada nova dose aplicada. (GRANOFF et al., 1998; JOKHDAR et al., 2004). Essas vacinas continuam a ser utilizadas em algumas localidades, em casos de epidemias ou em populações de risco, por serem mais baratas (FLECK, 2003). Entretanto, devido as deficiências descritas acima, as vacinas polissacarídicas foram substituídas pelas vacinas polissacarídicas conjugadas em diversos países.

As vacinas polissacarídicas conjugadas, acoplam o antígeno polissacarídeo a uma proteína imunogênica. Normalmente é utilizada a proteína CRM<sub>197</sub> de *Corynebacterium diphtheriae* ou o toxóide tetânico. Esta conjugação acarreta no recrutamento das células T e, conseqüentemente na geração da memória imunológica (POLLARD; PERRETT; BEVERLEY, 2009). As vacinas

conjugadas podem ser monovalentes (A ou C), quadrivalentes (A, C, W e Y) (MAIDEN, 2013) e, ainda em fase de desenvolvimento, vacina pentavalente (A, C, W, Y e X) (MORAN et al., 2016). As vacinas conjugadas têm a vantagem de produzir memória imunológica, reduzir os índices de colonização e, com isso, interromper a transmissão, bem como a proteção efetiva em crianças menores de dois anos (READ et al., 2014; CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016).

A primeira vacina conjugada contra a DM foi a vacina meningocócica conjugada sorogrupo C (MCC), introduzida no final dos anos 90 no Reino Unido (MCINTYRE et al., 2012). Desde a sua introdução, as taxas de incidência da DM e de colonização apresentaram uma redução significativa (MAIDEN; STUART, 2002; BORROW et al., 2013), não apenas nos indivíduos vacinados, como também nos não vacinados, evidenciando seu potencial de imunização de rebanho (RAMSAY et al., 2003; MAIDEN et al., 2008; TROTTER; MAIDEN, 2009).

No Brasil, a MCC foi introduzida em 2010 e, atualmente, faz parte do programa de vacinação nacional, contemplando os menores de dois anos de idade. (SAFADI; BEREZIN; ARLANT, 2014). Neste mesmo ano, devido ao aumento da incidência da doença meningocócica sorogrupo C, o Estado da Bahia foi o único estado do território nacional a adotar a estratégia de vacinação para crianças menores de cinco anos de idade e indivíduos de 10 a 24 anos. Tal medida foi bastante eficaz, mostrando uma redução significativa no número de casos no período pós-vacinal (CARDOSO et al., 2012; BRASIL, 2016).

Atualmente, estão disponíveis três tipos de vacinas quadrivalentes, licenciadas para indivíduos compreendidos na faixa etária de dois a 55 anos de idade (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016). Como a MCC, estas vacinas têm demonstrado eficácia na redução dos índices da DM, indução da imunidade de rebanho, bem como a interrupção da transmissão por portadores (READ et al., 2014). Entretanto, custo elevado desta vacina torna a mesma inviável para o uso em países em desenvolvimento (CHANG; TZENG; STEPHENS, 2012).

O custo de implementação de vacinas foi algo que sempre dificultou as propostas de vacinação de rotina e em massa no continente africano. Entretanto, em 2001, entrou em vigor um consórcio, o Projeto Vacina contra Meningite, com participação da Organização Mundial de Saúde (OMS) e outros colaboradores, para o desenvolvimento de uma vacina conjugada contra o sorogrupo A (MenAfriVac®) acessível para a região do cinturão da meningite (LAFORCE et al., 2007). Seu

baixo custo tornou possível a realização de campanhas de vacinação em massa na população de um a 29 anos de idade (GRAHAM, 2016). Tal medida proporcionou uma redução expressiva dos índices da DM na região, bem como a ausência de portadores do meningococo A um ano após a campanha (KRISTIANSEN et al., 2014).

Embora o campo de pesquisas das vacinas tenha alcançado ótimos progressos contra os principais sorogrupos causadores da DM, o sorogrupo B permanece um grande desafio no que tange a estratégias de vacinação. A elevada similaridade entre a estrutura antigênica da cápsula polissacarídica e o tecido neural embrionário humano inviabiliza a utilização dos polissacarídeos como componentes vacinas, não só pela ausência de imunogenicidade, mas também devido ao risco do desenvolvimento de uma reação autoimune (ZLOTNICK et al., 2015).

Como alternativa, foram desenvolvidas vacinas baseadas nas vesículas da membrana externa (OMVs) em Cuba, América do Sul e Nova Zelândia (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016). Tais vacinas apresentaram relativa eficácia, mas com a desvantagem da ausência de proteção cruzada, uma vez que este tipo de vacina utiliza variantes específicas de PorA que induzem a produção de anticorpos bactericidas específicos (SADARANGANI; POLLARD, 2010; CARON et al., 2011).

O advento da caracterização molecular, juntamente com o sequenciamento do genoma completo trouxe uma nova perspectiva para o desenvolvimento de vacinas por meio da vacinologia reversa (RAPPUOLI, 2001). Por meio do sequenciamento do genoma total do sorogrupo B foi possível identificar a presença de proteínas de membrana capazes de induzir uma resposta imune, presente na maioria das cepas associadas a DM, e com variabilidade imunológica limitada entre os mais diversos isolados do sorogrupo B (BAKER, 2016). A lipoproteína de membrana e ligante ao fator H, FHbP, NadA e o NhbA foram identificados como candidatos vacinais promissores (HARRIS et al., 2011; SEIB et al., 2015). Tal descoberta levou a produção de duas vacinas baseadas em proteínas de membrana, a rLP2086 bivalente (BAKER, 2016) e a 4CMenB (CARTER, 2013).

A rLP2086 bivalente apresenta em sua composição a lipoproteína FHbP disposta em duas variações antigênicas, subfamília A e subfamília B (BAKER, 2016). A 4CMenB apresenta quatro componentes em sua formulação: as proteínas FHbP, NadA, NhbA e a vesícula de membrana

externa procedente de uma cepa epidêmica da Nova Zelândia - NZ 98/254 (B:4:P1.7-2,4) (ESPOSITO; PRINCIPI, 2014). O uso da 4CMenB já foi licenciado na Europa, América do Norte, Austrália (TONEATTO et al., 2011; DULL; MCINTOSH, 2012; MARTIN; SNAPE, 2013) e, mais recentemente, no Brasil (SAFADI, 2015). Essas vacinas apresentam a capacidade de proteção não somente contra o sorogrupo B, mas também para os demais sorogrupos, uma vez que tais proteínas de membrana estão amplamente distribuídas entre as cepas de meningococo, além de mostrar reação cruzada entre as diferentes variações antigênicas (DONNELLY et al., 2010; HONG et al., 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Caracterizar geneticamente cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos de 11 a 19 anos de idade, residentes em Salvador, Bahia.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterizar as sequencia tipo (ST) e complexos clonais, proteínas de membrana externa (PorA, PorB e FetA) e antígenos vacinais do sorogrupo B (FHbp, NadA e NhbA) nas cepas de *N. meningitidis* identificadas;

3.2.2 Identificar a circulação de complexos clonais hiperinvasivos circulantes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS DE NASOFARINGE

Foi conduzido um estudo de corte transversal na cidade de Salvador, Bahia. O período da coleta das amostras e dos dados epidemiológicos foi de setembro a dezembro de 2014. Os participantes deste estudo foram alunos matriculados no corrente ano letivo em escolas públicas municipais e estaduais desta cidade.

Como critérios de seleção para o estudo, o aluno precisaria: 1) estar matriculado em uma das escolas da rede pública de ensino, municipal ou estadual, selecionadas na cidade de Salvador, 2) residir neste mesmo município, 3) pertencer à faixa etária de 11 a 19 anos e 4) obter a concordância por escrito dos pais na participação do adolescente no estudo, quando este for menor de idade, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Jovens maiores de 18 anos deveriam assinar o TCLE. Além disto, todos os estudantes que concordaram em participar do estudo deviam assinar o Termo de Assentimento.

Os estudantes que apresentavam sinais e sintomas de qualquer doença infecciosa transmissível (como tosse, febre e espirros) ou da existência da impossibilidade de contato com o indivíduo selecionado e seu responsável legal após três tentativas foram excluídos do estudo.

O processo de seleção da amostra de escolares para o estudo foi probabilístico, por conglomerado, em dois estágios. No primeiro estágio da amostragem, das 660 escolas municipais e estaduais em funcionamento em Salvador no ano de 2014, conforme dados fornecidos pela Secretaria Municipal de Educação de Salvador e pela Secretaria Estadual de Educação do Estado da Bahia, foi calculado o tamanho amostral de 150 (106 + 40%, prevendo possíveis perdas) escolas para o estudo. As 150 escolas foram selecionadas de forma aleatória, com probabilidade de seleção ponderada pela proporção de alunos de 11 a 19 anos em cada uma das escolas da cidade. Das escolas selecionadas, 134 forneceram as listas com os nomes dos alunos e foram incluídas no estudo, perfazendo um total de 4.494 turmas. A amostra necessária para o estudo foi estimada em 245 turmas, com base em uma estimativa hipotética de prevalência de colonização por *N. meningitidis* de 9,9% - mesma prevalência obtida em um estudo realizado com escolares de

Campinas (DE MORAES et al., 2015) (DE MORAES et al., 2015), com precisão de +/- 2% para uma confiança de 95% e com uso de uma correção para o efeito do desenho de amostragem por cluster DEFF=2.

No segundo estágio, foram selecionados aleatoriamente 2.450 alunos (por turno, por série e por turmas, dez em cada turma, de forma aleatória e randomizada, utilizando-se programa computacional gerador de números aleatórios, a fim de alcançar o dobro de alunos necessário para o estudo de 5 cinco por turma), pois esperava-se que cerca de metade dos selecionados recusassem participar do estudo.

#### 4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS

Em cada voluntário foi realizada a coleta do material orofaríngeo, com a aplicação de um *swab* estéril na parte posterior da faringe. O material foi plaqueado diretamente em meio de Thayer Martin modificado com VCNT (vancomicina, colistina, nistadina e trimetopim) e armazenado em tubos plásticos contendo meio de transporte STGG (*Skim Milk-Tryptone-Glucose-Glycerin*) e encaminhados para o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz no período máximo de 4 horas.

No laboratório, os tubos de STGG foram armazenados a -70°C e as placas de cultura incubadas a 37°C em estufa com CO<sub>2</sub> (5%). Após 24-48h de incubação, as colônias sugestivas de *Neisseria* foram submetidas à coloração de Gram e posteriormente, ao teste da oxidase e prova de utilização de açúcares (WHO, 2011). As cepas identificadas como *N. meningitidis* foram confirmadas pelo API-NH® (bioMérieux, France) e mantidas a -70°C em meio de BHI (*Brain Heart infusion*) com 20% de glicerol.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GENOGRUPOS

A caracterização dos genogrupos dos meningococos foi realizada através da PCR convencional (NUNES et al., 2016) e foi confirmada neste estudo por PCR em tempo real (qPCR),

empregando-se *primers* específicos para a identificação dos genogrupos A, B, C, Y e W (CASTILO et al., 2011; DOLAN THOMAS et al., 2011). A identificação dos genogrupos E e Z foi realizada através do sequenciamento do genoma total, realizada no Laboratório de Meningite, do Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, USA, sob a coordenação da Dra. Xin Wang.

#### 4.3.1 Obtenção do DNA Bacteriano

Para a extração do DNA das cepas de *N. meningitidis* foi utilizada a técnica de fervura da suspensão de células. Após a reativação das cepas em placas de Trypticase Soy Ágar (TSA) com 5% de sangue de carneiro, as colônias foram ressuspensas em 1ml de Tris-HCl (10 mM; pH 8,0) até atingir uma suspensão equivalente a 3.0 da escala de McFarland. Esta suspensão foi submetida à fervura a 100°C por 10 minutos e em seguida, mantida a -20°C até o momento do uso (CASTILO et al., 2011).

#### 4.3.2 Reação da PCR em Tempo Real (qPCR)

As reações da qPCR foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Dolan Tomas e colaboradores (2011), empregando-se o equipamento Stratagene MX3005XP (Agilent Technologies©, EUA).

Os *primers* e as sondas utilizadas para (1) a confirmação da espécie *N. meningitidis* (*sodC*); (2) para a detecção da presença do gene da cápsula polissacarídea (*ctrA*) e (3) para a determinação dos genogrupos estão descritos no Anexo 1.

As reações foram realizadas em placas de 96 orifícios, empregando-se para cada reação: 2 µL de cada *primer* (direto e reverso) e sonda específica; 12,5µl da mastermix *PerfeCTa qPCR ToughMix, Low ROX* (Quanta Biosciences); 2 µl do DNA molde e 7,5 µl de água para PCR, totalizando um volume final de 25 µl. Em cada amplificação foram utilizados um controle negativo (contendo todos os componentes acima descritos com exceção do DNA molde) e um controle positivo. O ciclo estabelecido para as reações seguiu os seguintes parâmetros: 1 ciclo a 95°C por 10 min seguido por 50 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Análise dos Resultados

Os dados obtidos através da reação da qPCR foram analisados tomando-se por base dois parâmetros (i) padrão da curva da reação, que deve apresentar um formato sigmoide e com o estágio platô ao final da reação, demonstrando que todos os reagentes foram consumidos; (ii) pelo valor do Ct (*Cycle threshold*) que indica em qual ciclo da reação a curva de fluorescência de cada amostra cruza o limiar da fluorescência. De acordo com o protocolo de identificação e determinação dos genogrupos do meningococo, são aceitáveis os valores com Ct menor que 35 (CASTILO et al., 2011). As análises dos padrões de curvas foram plotadas em forma de gráfico e os valores do Ct foram analisados no MxPro QPCR *Software* (Agilent Technologies®, EUA).

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *N. MENINGITIDIS*

A caracterização molecular das cepas de *N. meningitidis* foi realizada através da técnica de Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos *Loci* (MLST) *Multilocus Sequence Typing* e através do sequenciamento das proteínas de membrana externa (PorA, PorB, FetA, FHbP, NadA e NhbA), seguindo os princípios estabelecido por Sanger e colaboradores (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977)

A técnica de MLST foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Maiden e colaboradores (1998), empregando-se *primers* específicos para sete genes conservados (*abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*). Para o sequenciamento das proteínas de membrana externa, foi empregada a metodologia padronizada pelo Laboratório de Meningite, do Center for Diseases Control and Preventions, USA (CASTILO et al., 2011). Os *primers* utilizados na técnica de MLST e no sequenciamento das proteínas de membrana externa, bem como os ciclos utilizados estão descritos nos Anexos 2 a 9.

A obtenção do DNA bacteriano a ser utilizado pelas duas técnicas foi realizada através do mesmo processo de fervura descrito no item 4.2.1. Da mesma forma, foi empregada a mesma técnica da PCR convencional para a amplificação dos fragmentos a serem sequenciados. A reação da PCR continha os seguintes componentes: 2-5 µl do DNA molde; 1 µl (20µM) de cada um dos *primers* (direto e reverso); 1 µl da *PCR Nucleotide Mix* (Roche®, EUA) a 10mM; 5 µl do tampão 2 (10x) do *Kit Expand High Fidelity PCR System* (Roche®, EUA); 0,5 µl a polimerase *Kit Expand High Fidelity PCR System* (Roche®, EUA) e água para PCR para completar um volume final de

50 µl. As reações foram realizadas em termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA).

Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.2% (E-gel; Invitrogen Corp, EUA) e as imagens foram digitalizadas no Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA). Esses produtos foram purificados utilizando-se a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, EUA), adicionando 2µL da enzima para cada 5 µL do amplicon. Esta mistura foi incubada por 15 minutos à 80°C e depois por 15 minutos à 37°C no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA). Os produtos purificados foram armazenados a - 20°C até realização da reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1* (Applied Biosystems, EUA). A mistura da reação foi composta por: 2-3 µL do *Big Dye Terminator*, 4 µL do tampão *Big Dye 5X*, 1 µL (3,2µM) do primer, 9-10 µL de água para PCR e 3 µL do DNA purificado, em um volume final de 20µL. Apenas um único *primer* é utilizado em cada reação e, portanto, este processo foi repetido para cada um dos *primers* específicos para o sequenciamento de cada um dos genes do MLST (*abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*) e das proteínas de membrana externa (*porA*, *porB*, *fetA*, *fHbP*, *nadA* e *nhba*). Os *primers* e os ciclos específicos utilizados no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA) estão descritos nos Anexos 2-9.

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados utilizando-se placas de 96 orifícios (*Centri.SEP 96 Plates*; Princeton Separations, EUA), por meio da centrifugação à vácuo em alta temperatura, no equipamento Thermo Savant DNA110 SpeedVac (Thermo Scientific™, EUA) por 1:15 horas. Após a centrifugação, o material foi ressuspenso em 20 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, EUA) e incubado por 5 minutos a 94°C e depois por 4 minutos a 4°C. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automatizado ABI 3130x (Applied Biosystems).

#### 4.4.1 Análise das Sequências de DNA

As sequências nucleotídicas obtidas no sequenciamento em formato FASTA foram analisadas a princípio na plataforma computacional *Meningococcus Genome Informatic Platform* (MGIP) (<http://mgip.biology.gatech.edu>) com edição, alinhamento, correções e análises complementares do consenso através do *software* DNASTar SeqmanPRO – Version 12.2 (DNASTAR, Inc.).

As sequências tipo (STs), complexos clonais (CC), variáveis (VR) das proteínas de membrana PorA, PorB e FetA, subfamílias do FhbP e subvariantes das proteínas de membrana NadA e NhbA, foram determinadas com base na sequência dos alelos comparando-se o perfil dos alelos dos isolados com as cepas de referências depositadas no banco de dados de MLST de *N. meningitidis* (<http://pubmlst.org/neisseria>).

Sequências novas de alelos foram submetidas ao curador do banco de dados PubMLST para a determinação do ST novo (JOLLEY; MAIDEN, 2010).

O programa BioNumerics Seven (Applied Math, EUA) foi utilizado para estimar a relação genética entre os diferentes STs.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DO OPERON *Capsule Null Locus*.

Para a identificação do operon não codificante, denominado *capsule null locus*, as amostras caracterizadas como não grupáveis foram submetidas a técnica de PCR, segundo a metodologia descrita por (CLAUS et al., 2002). A extração do material genético foi realizada seguindo as recomendações do fabricante do kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, EUA)

As reações foram realizadas em tubos estéreis de 2 mL, empregando-se para cada reação: 1 µL (10µM) de cada *primer* (direto e reverso); 6 µL MgCl<sub>2</sub> (concentração final 3mM); 5 µL 5X *Green GoTaq® Flexi Reaction Buffer*; 1 µL dNTPs (5mM); 0,25 µl GoTaq (5U/µl); 5 µl do DNA molde e 30,75 µl de água para PCR, totalizando um volume final de 50 µl. Em cada amplificação foram utilizados um controle negativo (contendo todos os componentes acima descritos com

exceção do DNA molde) e como controle positivo, uma amostra identificada como *N. lactamica*. O ciclo estabelecido para as reações seguiu os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95° por 10min seguido de 40 ciclos de 94C por 25 segundos, 55°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos (Anexo 10).

A análise dos produtos da reação foi conduzida por meio da separação eletroforética em gel de agarose a 2% (Ivotrogen, EUA)

#### 4.5.1 Sequenciamento e Análise das Sequências

Os produtos amplificados que apresentaram uma banda de aproximadamente 400 pares de base, visualizada em transiluminador, foram purificadas utilizando-se a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, EUA), adicionando 2µL da enzima para cada 5 µL do amplicon. Esta mistura foi incubada por 15 minutos à 80°C e depois por 15 minutos à 37°C.

A concentração do DNA foi verificada com o NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, EUA) e os produtos foram sequenciados de acordo com o protocolo da Plataforma de Sequenciamento PDTIS-FIOCRUZ (Anexo 11), empregando o sequenciador automatizado *Applied Biosystems Prism 377* (Applied Biosystems ABI 3100).

A análise das sequências obtidas no sequenciamento foi realizada através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.9.0).

#### 4.6 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

O sequenciamento do genoma completo foi realizado para a caracterização de 42 isolados (71%) que apresentaram resultados insatisfatórios no sequenciamento de alguns dos alvos estudados pelo MLST e no sequenciamento de proteínas de membrana.

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo as determinações do fabricante do kit ArchivePure DNA (5Prime, EUA). A concentração do DNA foi verificada com o NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, EUA). Os isolados foram sequenciados através da técnica de sequenciamento

por síntese empregada no equipamento MiSeq (Illuminia, EUA) e os resultados foram analisados através do *software* CLC Genomic Workbench (QIAGEN, EUA) no Laboratório de Meningite, do Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, USA. Os alelos do MLST, ST e complexos clonais foram identificados com base nas comparações dos genomas utilizando os alelos do PubMLST e a busca do BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A caracterização molecular das proteínas PorA, PorB, FetA, FHbP, NadA e NhbA foram identificados como descrito por Kretz e colaboradores (KRETZ et al., 2016)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram identificadas 59 amostras positivas de *N. meningitidis*, dentre os 1.200 alunos, conferindo uma prevalência de 4,9% à população estudada. Sendo 59 amostras positivas para o gene *sodC* e 41/59 positivos para o gene *ctrA*.

Através da caracterização dos genogrupos dos meningococos observou-se a prevalência de isolados não grupáveis ( $n=36$ ; 61%), dentre os quais 18 (50%) não eram capsulados (*capsule null* positivos). Entre os genogrupos capsulados, foi encontrada uma maior prevalência do genogrupo B (11,9%), seguido do Y (8,5%), E (6,8%), Z (5,1%), C (3,4%) e W (3,4%) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Relação dos genogrupos de *N. meningitidis* identificados nas amostras positivas

Genogrupo	No. de amostras	Percentual (%) de portadores
B	7	11,9
Y	5	8,5
E	4	6,8
Z	3	5,1
C	2	3,4
W	2	3,4
Não-grupável	36	61,0
Total	59	100,0

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *N. MENINGITIDIS* ATRAVÉS DO MLST

A caracterização das 59 cepas de *N. meningitidis* através da técnica de MLST demonstrou a existência de 34 STs e 14 complexos clonais (Tabela 1). Em 16,9% dos isolados não foi possível a caracterização de complexos clonais definidos. Dos 34 STs descritos, oito (23,5%) foram encontrados pela primeira através do nosso estudo e, portanto, submetidos ao banco de dados do PubMLST.

Os complexos clonais (cc) mais frequentes identificados foram o cc1136 ( $n=12$ ; 20,3%) e o cc198 ( $n=11$ ; 18,6%), ambos encontrados apenas em amostras não grupáveis (Tabela 2 e 3). Além disto, oito amostras do cc1136 e quatro do cc198 foram caracterizadas como *cnl* positivas. Em menor proporção, foram encontrados complexos de linhagens hiperinvasivas, tais como, cc23 (6,8%), cc41/44 (5,1%), cc32 (3,4%), cc11 (3,4%), cc35 (1,7%), cc103 (1,7%) e cc175 (1,7%).

Foi observada uma associação entre complexos clonais e alguns genogrupos específicos. Citam-se os complexos clonais cc1136, cc198 e cc53 observados nas amostras não grupáveis (NG) e acapsuladas (*cnl*); cc32 ( $n=1$ ; 1,7%), cc4821 ( $n=1$ ; 1,7%), cc41/44 ( $n=3$ ; 5,1%) associados ao genogrupo B; cc103 ( $n=1$ ; 1,7%) ao genogrupo C; cc11 ( $n=2$ ; 3,39%) ao W; cc23 ( $n=2$ ; 3,4%) e cc175 ( $n=1$ ; 1,7%) ao Y e cc254 ( $n=4$ ; 6,8%) ao genogrupo E (Tabela 2, Gráfico 1).

Entre as 10 (16,9%) cepas de *N. meningitidis* que não apresentaram um complexo clonal definido, três foram caracterizadas como sendo dos genogrupos Z (três cepas), Y (duas cepas), B (uma cepa) e o restante como NG. Além disso, observou-se, a presença de dois complexos clonais hipervirulentos (cc23 e cc32) em amostras caracterizadas como não grupáveis (Tabelas 2 e 3).

Considerando a designação de cepa recomendada pela Sociedade Europeia de Doença Meningocócica (EMGM) (Jolley et al., 2007), foram identificados 44 padrões genotípicos, com a prevalência do NG: P1.18,25-37: F5-5: ST-823 (cc198) ( $n=7$ ; 11,9%) e NG: P1.7-1,1: F4-66: ST-1136 (cc1136) ( $n=4$ ; 6,8%). Em menor escala, foram encontrados genótipos relacionados a clones hipervirulentos: B: P1.19,15: F5-1: ST; C: P1.22,14-6: F3-9: ST-3780 (cc103) e W: P1.5,2: F1-1: ST-11 (cc11) (Tabela 3). Análises entre os genótipos encontrados e a distribuição espacial dos isolados não evidenciaram correlações entre as cepas encontradas e as escolas ou a possível presença de *clusters* em nenhuma das escolas estudadas.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS POR PROTEÍNAS DE MEMBRANA

A Tabela 1 mostra a caracterização genética das proteínas de membrana externa realizada para as 59 cepas de *N. meningitidis*. Foram encontradas um total de 36 variantes de PorA (P1.VR1, VR2), sendo 18 variantes de VR1 e 34 variantes de VR2, com um predomínio dos subtipos P1.18,25-37 ( $n=7$ , 11,9%) e P1.18-1,3 ( $n=6$ , 10,2%). Além disto, uma cepa do genogrupo Y (Y: P1.7-2: F1-5: ST-11461(cc23)), apresentou a porção VR2 deletada (Tabela 2).

Nas análises das variantes de PorB, observou-se o predomínio das proteínas de classe 3 ( $n=55$ , 93,2%), com a prevalência de PorB 3-84 ( $n=20$ , 33,9%). Além disto, cinco novos tipos de PorB foram identificados (2-194; 3-36; 3-122; 3-320 e 3-381) (Tabela 2).

Entre as 17 variantes de FetA encontradas, as mais prevalentes foram F5-5 ( $n=14$ , 23,7%), F4-66 ( $n=10$ , 16,9%) e F1-7 ( $n=8$ , 13,6%). Apenas uma das cepas (NG: P1.18-4,25-60: ST-11459 (cc1136)) apresentou deleção no gene *fetA* (Tabela 2). Foram observadas, ainda, cinco cepas pertencentes a diferentes complexos clonais, apresentando variantes associadas a linhagens virulentas, tais como F5-1, F2-7 e F3-9 (Gráfico 2).

As três variantes da lipoproteína FHbP foram identificadas, sendo a variante FHbP 2 a mais prevalente ( $n=30$ ; 50,8%), seguida pela FHbP -1 ( $n=15$ ; 25,4%) e FHbP -3 ( $n=14$ ; 23,7%). De modo geral, de todas as 16 variantes descritas, as mais prevalentes foram FHbP -3.94 ( $n=10$ ; 16,9%) e FHbP -1.4 ( $n=10$ ; 16,9%), associadas com cc1136 e cc198, respectivamente; e FHbP -2.21 ( $n=8$ ; 13,6%), sendo esta última associada a três conjuntos distintos de cepas: quatro que não possuem complexos clonais determinados, três associadas ao cc23 e uma ao cc175 (Tabela 2 e Gráfico 3).

Vinte subvariantes diferentes de NhbA foram identificadas, sendo a NhbA-10 a mais frequente ( $n=11$ ; 18,6%), associada ao complexo clonal cc198, seguida da NhbA-600 ( $n=10$ ; 16,9%), pertencente ao cc 1136 (Gráfico 4). Com relação ao *nadA*, as análises demonstraram que este gene estava ausente em 94,9% das amostras.

**Tabela 2:** Características genótípicas dos isolados de *N. meningitidis* (n=59)

Tipo Capsular	ST	Complexo Clonal	PorA	PorB	FetA	fHbp <sup>1</sup>	NhbA <sup>2</sup>	NadA	Nº de isolados
B	639	32	P1.19,15	3-1	F5-1	2.19	231	NadA-1.1	1
B	2120	41/44	P1.18-7,9	3-16	F1-5	2.19	2	Neg	1
B	<b>11453</b>	ND	P1.19,15-1	3-45	F1-7	2.24	21	Neg	1
B	3200	4821	P1.17-6,23-6	3-372	F3-36	2.16	669	Neg	1
B	3496	213	P1.22,14-26	3-14	F5-9	3.45	18	NadA-4/5	1
B	<b>11577</b>	41/44	P1.22,14-6	3-64	F1-199	2.19	291	Neg	1
B	5892	41/44	P1.7-2,13-1	3-66	F4-38	2.19	335	Neg	1
C	3771	35	P1.7-2,13-7	3-154	F1-7	2.24	21	Neg	1
C	3780	103	P1.22,14-6	2-23	F3-9	2.25	24	Neg	1
W	<b>11</b>	11	P1.5,2	2-3	F1-1	2.151	29	NadA-2/3	1
W	7097	11	P1.5,2	2-3	F1-1	2.151	29	NadA-2/3	1
Y	<b>11545</b>	ND	P1.5-1,10-4	3-100	F1-7	2.21	9	Neg	1
Y	23	23	P1.5-2,10-2	3-53	F13	2.104	8	Neg	1
Y	3015	ND	P1.18-1,3	2-194	F3-4	2.16	20	Neg	1
Y	<b>11461</b>	23	P1.7-2	3-36	F1-5	2.21	145	Neg	1
Y	5770	175	P1.5-1,10-3	3-100	F1-7	2.21	9	Neg	1

Nota: Os números em negrito representam os novos STs que foram descritos pela primeira vez através do nosso estudo. ND- Complexo Clonal não determinado; NG- não grupável \* ausência do gene fetA ;<sup>1</sup>nomenclatura utilizada: variante.peptideo (MASIGNANI et al., 2003) <sup>2</sup>Nomenclatura Novartis. *Cnl- Capsule null locus* . Neg- negativo para o gene *nadA*

Tipo Capsular	ST	Complexo Clonal	PorA	PorB	FetA	fHbp <sup>1</sup>	NhbA <sup>2</sup>	NadA	Nº de isolados
E	10220	254	P1.7-1,1	3-38	F3-67	1.13	9	Neg	2
E	10220	254	P1.7-1,1	3-38	F3-67	2.104	9	Neg	1
E	10224	254	P1.21,16	3-320	F3-9	1.13	9	Neg	1
Z	<b>11458</b>	ND	P1.19,15	3-1	F5-7	2.16	101	NadA-2/3.8	1
Z	2123	ND	P1.18-1,3	3-38	F5-7	2.25	101	Neg	1
Z	5953	ND	P1.18-1,30-2	3-63	F5-7	2.22	92	Neg	1
NG	823	198	P1.18,25-37	3-84	F5-5	1.4	10	Neg	4
	6525	ND	P1.5-11,10-13	3-100	F1-7	2.21	101	Neg	2
	1136	1136	P1.18-1,3-4	3-84	F4-66	3.94	600	Neg	2
	1136	1136	P1.18-1,3	3-84	F4-66	3.94	600	Neg	1
	178	178	P1.19-5,15-23	3-38	F1-7	1.12	6	Neg	1
	823	198	P1.18,25-37	3-84	F5-5	1.1	10	Neg	1
	823	198	P1.18,25-44	3-84	F5-5	1.4	10	Neg	1
	823	198	P1.18-1,30-4	3-381	F5-5	1.4	10	Neg	1
	1136	1136	P1.18-1,3-8	3-84	F4-66	3.31	600	Neg	1
	6519	23	P1.18-1,30-2	3-36	F5-5	2.21	145	Neg	1
	6519	23	P1.18-1,30	3-36	F5-5	2.21	145	Neg	1
	6525	ND	P1.5-11,10-13	3-100	F1-7	2.21	9	Neg	1
	639	32	P1.19,15	3-1	F5-1	2.19	145	NadA-1.1	1

Nota: Os números em negrito representam os novos STs que foram descritos pela primeira vez através do nosso estudo. ND- Complexo Clonal não determinado; NG- não grupável \* ausência do gene fetA ;<sup>1</sup>nomenclatura utilizada: variante.peptideo (MASIGNANI et al., 2003) <sup>2</sup>Nomenclatura Novartis. *Cnl- Capsule null locus* . Neg- negativo para o gene *nadA*

Tipo Capsular	ST	Complexo Clonal	PorA	PorB	FetA	fHbp <sup>1</sup>	NhbA <sup>2</sup>	NadA	Nº de isolados
<i>Cnl</i>	1136	1136	P1.18-1,3	3-84	F4-66	3.94	600	Neg	3
	823	198	P1.18,25-37	3-84	F5-5	1.4	10	Neg	2
	53	53	P1.7,30-3	3-64	F1-2	2.102	58	Neg	2
	53	53	P1.7-2,30-3	3-64	F1-5	2.102	58	Neg	1
	53	53	P1.7,30-2	3-64	F1-5	2.102	65	Neg	1
	53	53	P1.7,30-45	3-64	F1-2	2.102	58	Neg	1
	823	198	P1.18,25-32	3-37	F5-5	1.4	10	Neg	1
	1136	1136	P1.18-1,3-7	3-84	F4-66	3.94	600	Neg	1
	7129	ND	P1.12-6,13-39	3-122	F5-5	3.627	308	Neg	1
	7450	1136	P1.18,25	3-37	F2-7	3.94	145	Neg	1
	<b>11459</b>	1136	P1.18-4,25-60	3-84	*	3.31	262	Neg	1
	<b>11462</b>	198	P1.22-1,14-23	3-84	F5-5	1.4	10	Neg	1
	10238	1136	P1.18-4,25-50	3-84	F4-66	3.94	600	Neg	1
	<b>11552</b>	1136	P1.18-1,3-8	3-84	F4-66	3.94	600	Neg	1

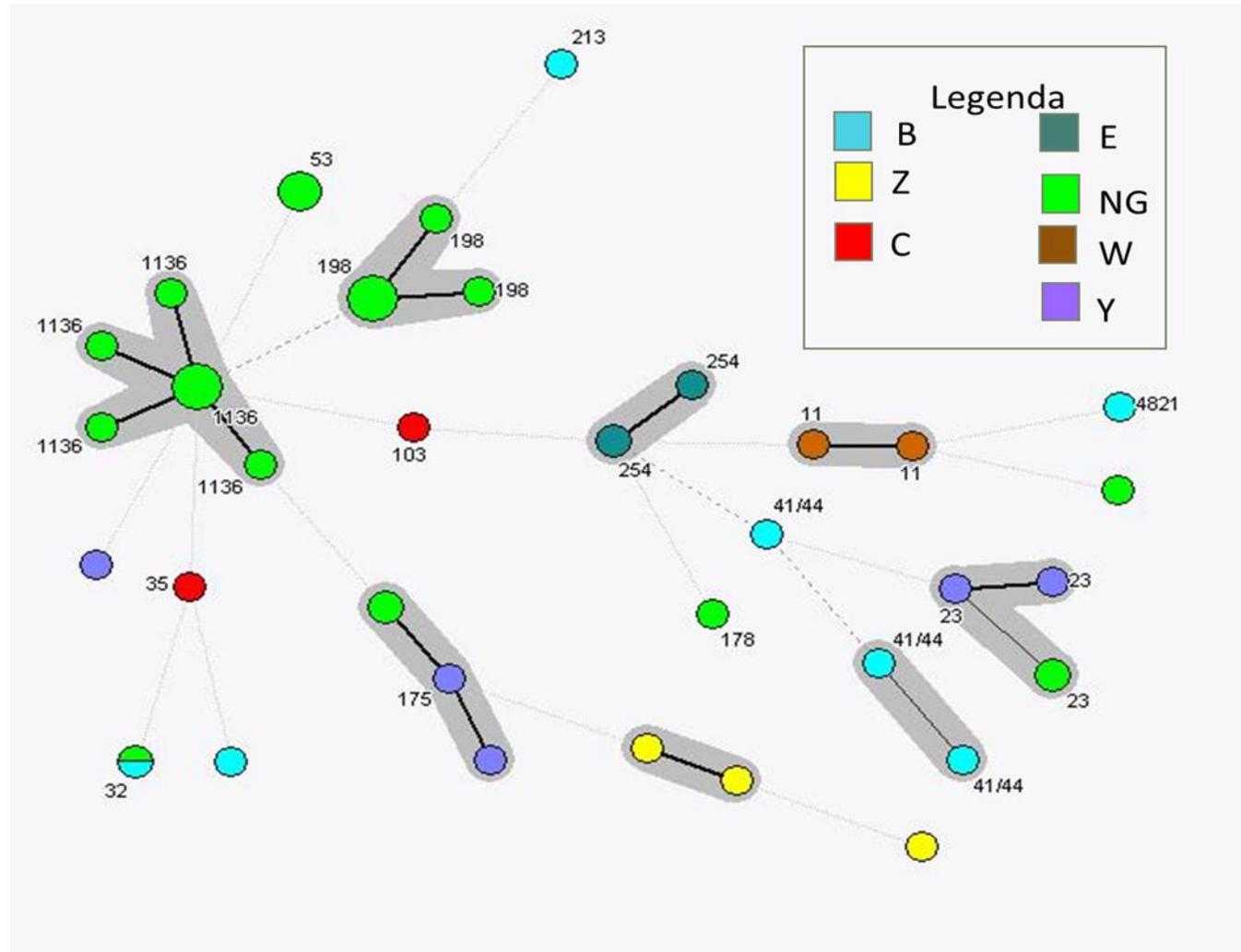
Nota: Os números em negrito representam os novos STs que foram descritos pela primeira vez através do nosso estudo. ND-Complexo Clonal não determinado; NG- não grupável \* ausência do gene fetA ;<sup>1</sup>nomenclatura utilizada: variante.peptideo (MASIGNANI et al., 2003) <sup>2</sup>Nomenclatura Novartis. *Cnl*- *Capsule null locus* . Neg- negativo para o gene *nadA*

**Tabela 3:** Distribuição dos complexos clonais de *N. meningitidis* de acordo com o número de STs, número de isolados, genogrupo e perfil populacional mais frequente.

<b>Complexo Clonal</b>	<b>Nº de Isolados (%)</b>	<b>Nº de ST(s)</b>	<b>Genogrupo(s) (% dos isolados)</b>	<b>Perfil mais frequente (% dos isolados)</b>
cc1136	12 (20,3)	5	<i>cnl</i> (66,6); NG(33,3)	<i>cnl</i> :P1.18-1,3:F4-66 (33,3)
cc198	11 (18,6)	2	<i>cnl</i> (36,3); NG(63,3)	NG:P1.18,25-37:F5-5 (63,6)
ND	10 (16,9)	8	NG (40,0); Z (30,0); Y (20,0); B (10,0)	Heterogêneo
cc53	5 (8,4)	1	<i>cnl</i> (100,0)	<i>cnl</i> :P1.7,30-3:F1-2 (40,0)
cc254	4 (6,7)	2	E (100,0)	E:P1.7-1,1:F3-67 (75,0)
cc23	4 (6,7)	3	Y (50,0); NG (50,0)	Heterogêneo
cc41/44	3 (5,0)	3	B (100,0)	Heterogêneo
cc11	2 (3,3)	2	W (100,0)	W:P1.5,2:F1-1 (100,0)
cc32	2 (3,3)	1	B (50,0); NG (50,0)	B:P1.19,15:F5-1 (100,0)
cc35	1 (1,6)	1	C (100,0)	C:P1.7-2,13-7:F1-7 (100,0)
cc103	1 (1,6)	1	C (100,0)	C:P1.22,14-6:F3-9 (100,0)
cc175	1 (1,6)	1	Y (100,0)	Y:P1.5-1,10-3:F1-7 (100,0)
cc178	1 (1,6)	1	NG (100,0)	NG:P1.19-5,15-23:F1-7 (100,0)
cc4821	1 (1,6)	1	B (100,0)	B:P1.17-6,23-6:F3-36 (100,0)
cc213	1 (1,6)	1	B (100,0)	B:P1.22,14-26:F5-1 (100,0)

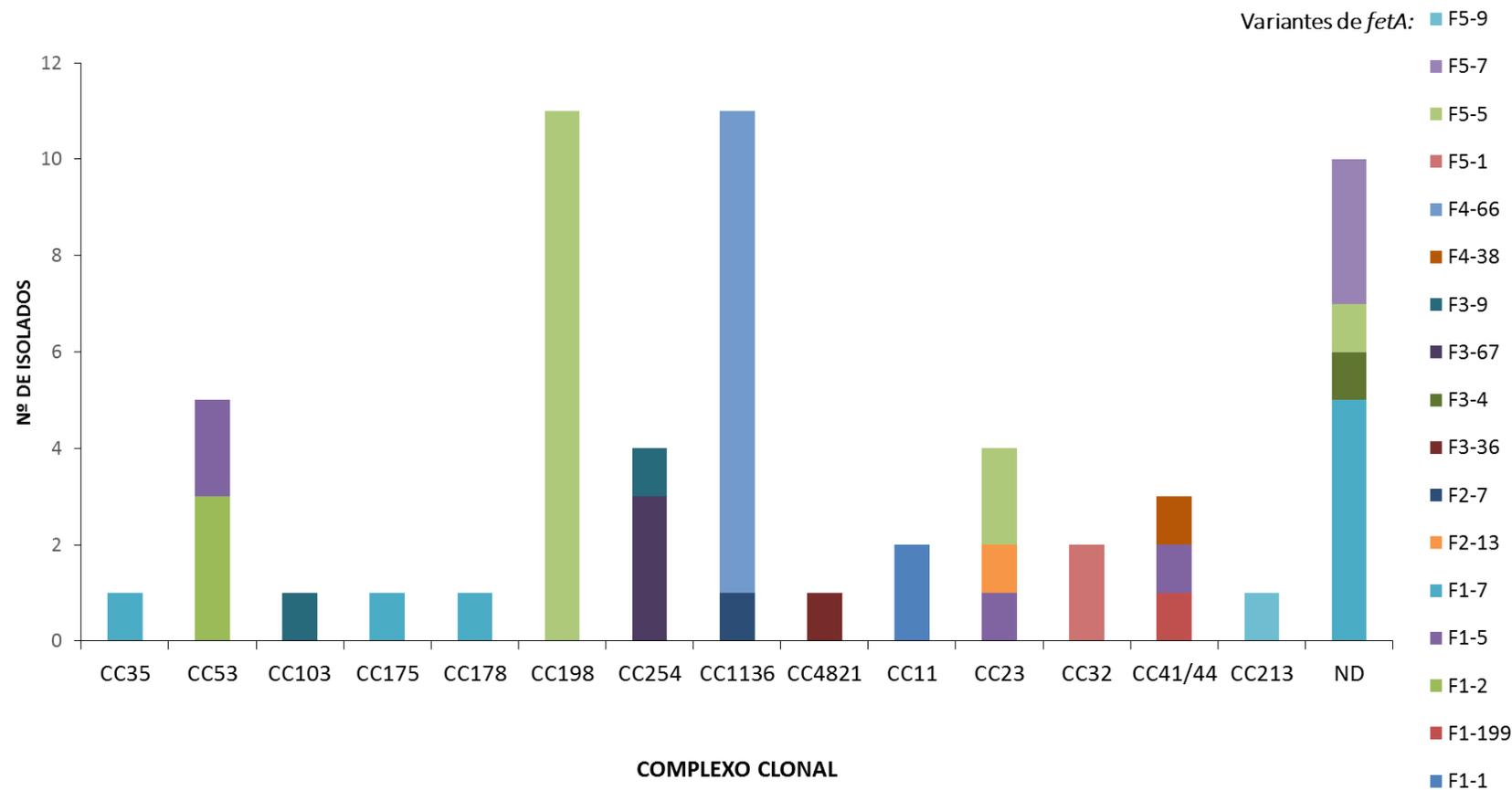
ND- Complexo Clonal não determinado; NG- não grupável; *cnl* = capsule null locus.

**Gráfico 1-** Distribuição dos genogrupos de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados (*Minimum Spanning tree*)



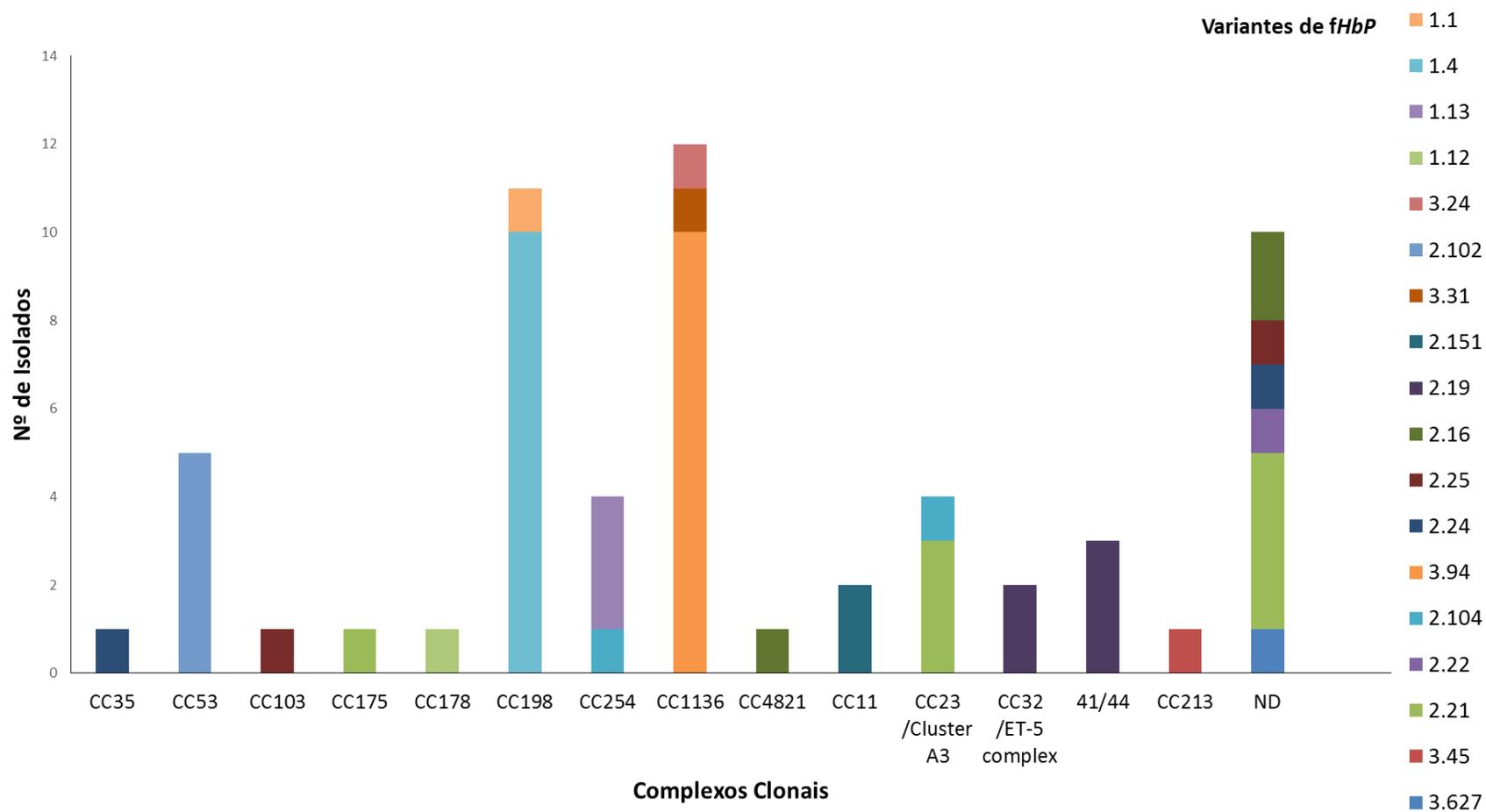
Nota: O tamanho do círculo é proporcional ao número de isolados. As amostras que não apresentam numeração são aquelas que não apresentam complexo clonal definido. As linhas grossas representam apenas uma variação por *locus* (SLV), as linhas finas e contínuas duas variações por *locus* (DLV) e as linhas finas e pontilhadas três variações por *locus* (TLV). NG- não grupável.

**Gráfico 2** - Distribuição das variantes de FetA de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados.



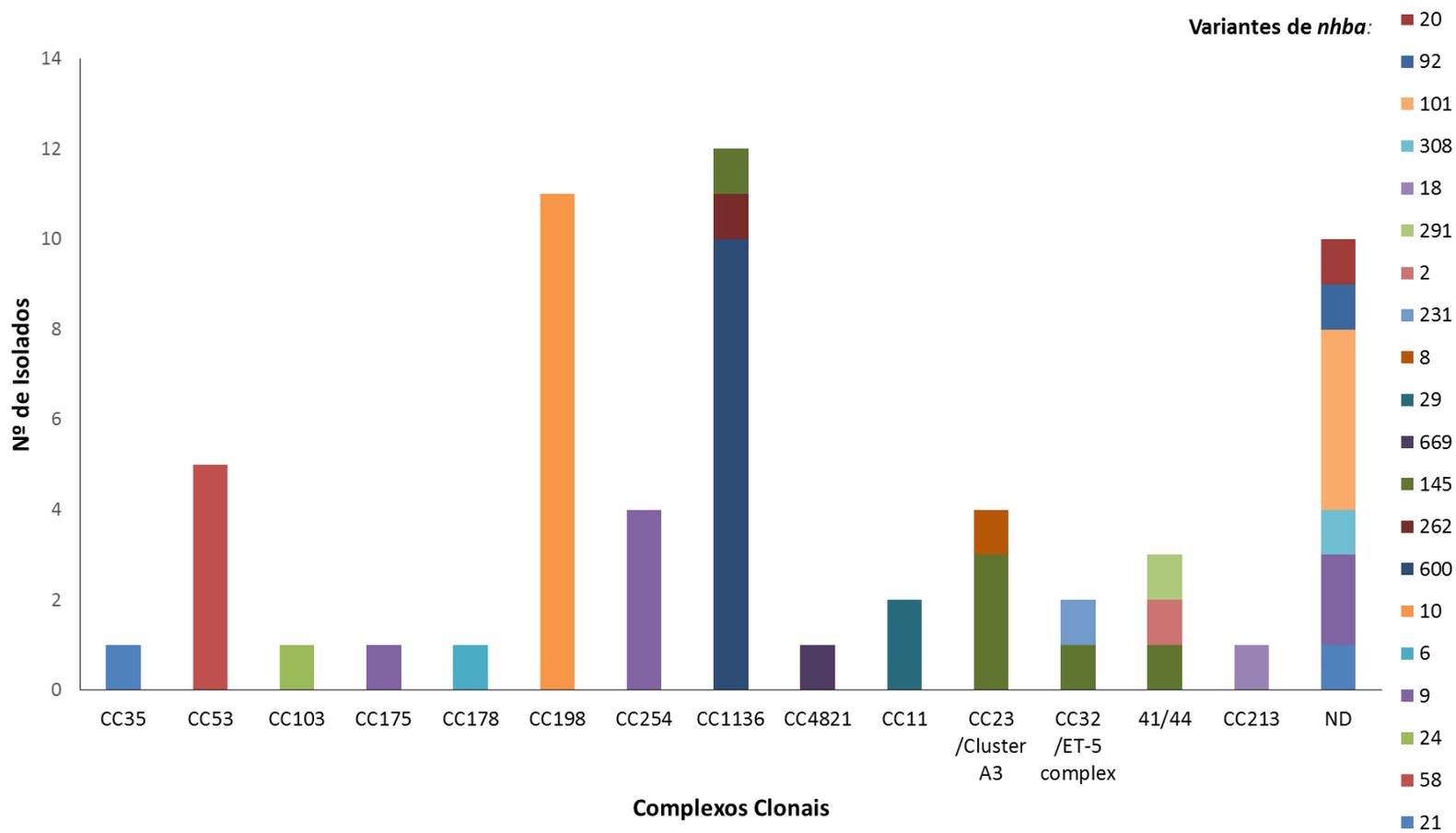
Nota: CC= a complexo clonal, NG= não grupável, ND= complexo clonal não definido

**Gráfico 3** - Distribuição das subfamílias de FHbP de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados.



Nota: CC= a complexo clonal, NG= não grupável, ND= complexo clonal não definido

**Gráfico 4** -Distribuição das subvariantes de Nhba de *N. meningitidis* de acordo com os complexos clonais identificados



Nota: CC= a complexo clonal, NG= não grupável, ND= complexo clonal não definido

## 6 DISCUSSÃO

De modo geral, a prevalência de colonização encontrada em nosso estudo (4,9%) pode ser considerada baixa quando comparada a outro estudo realizado no Brasil, em Campinas que apresentou uma prevalência de 9,9% (DE MORAES et al., 2015) ou a estudos na Europa com taxas superiores a 15% (CAUGANT et al., 1994; CHRISTENSEN et al., 2010; JOUNIO et al., 2012; GABUTTI; STEFANATI; KUHDARI, 2015). Por outro lado, a prevalência observada em nosso estudo foi semelhante aquelas reportadas no Chile (4,0%) (RODRIGUEZ et al., 2014), Colômbia (6,5%) (MORENO et al., 2015) e México (1,6%) (ESPINOSA DE LOS MONTEROS et al., 2009).

A alta prevalência de MenB e MenY não é exclusividade do nosso estudo, sendo reportada em portadores do Chile (DIAZ et al., 2016), Colômbia (MORENO et al., 2015), Itália (GASPARINI et al., 2014), Inglaterra (MAIDEN; STUART, 2002) e outras localidades (YAZDANKHAH et al., 2004; JOUNIO et al., 2012). O estudo de DIAZ et al. (2016), no Chile, mostra ainda uma baixa frequência do sorogrupo C nos isolados de portadores. De acordo com YAZDANKHAH et al. (2004) o MenC apresenta uma taxa de probabilidade de causar doença 14 vezes maior que MenB, sendo, portanto, considerado menos passível à uma colonização duradoura.

É importante ressaltar que, particularmente em relação ao sorogrupo C, a baixa prevalência encontrada (0,16%; 2/1200) está possivelmente relacionada com a campanha vacinal realizada em 2010 contra *N. meningitidis* do sorogrupo C realizada na faixa de 10-24 anos de idade, em Salvador (CARDOSO et al., 2012). Tal medida pode ter influenciado na redução de colonizados, pois, conforme evidenciado em estudos no Reino Unido, a introdução da MCC na população de adolescentes e adultos jovens foi responsável pela redução de mais 67% de colonizados no grupo não vacinado, evidenciando o fenômeno de imunização de rebanho (RAMSAY et al., 2001; RAMSAY et al., 2003; MAIDEN et al., 2008).

A maioria dos isolados (61%) foi caracterizada como não grupável, sendo que a metade destes era acapsulada. Estes achados estão de acordo com a literatura, onde diversos estudos demonstram o predomínio de isolados não grupáveis em amostras de *N. meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos (CAUGANT et al., 1994; YAZDANKHAH et al., 2004; BOGAERT et al., 2005; JOUNIO et al., 2012; DE MORAES et al., 2015; JONES et al., 2015).

O microrganismo pode ser considerado não grupável por três fatores distintos: 1) mutações pontuais ou pareamento irregular com os genes da cápsula (*siaD*); 2) ocorrências de inserções e recombinações na região responsável pela biossíntese da cápsula ou 3) deleção completa do gene necessário para a produção da cápsula (*cps - capsule-synthesis*) (DOLAN-LIVENGOOD et al., 2003). Este último mecanismo é relativamente frequente, não só nas nossas amostras, mas também em outros estudos, mostrando que cerca de 16-34% de isolados de portadores são classificados como *cnl* (CLAUS et al., 2002; CLAUS et al., 2005; GASPARINI et al., 2014; JONES et al., 2015). Além disto, em função da capacidade do meningococo de realizar constante troca de material genético, cepas não capsuladas podem se tornar virulentas pela aquisição de genes capsulares durante a co-colonização com outras bactérias comensais encontradas na nasofaringe (SWARTLEY et al., 1997; PUTONTI et al., 2013) e ainda causar a doença em indivíduos imunossuprimidos (HOANG et al., 2005; JOHSWICH et al., 2012; XU et al., 2015). Segundo Hammerschmidt e colaboradores (1996b), a ausência da cápsula pode vir a ser uma vantagem para a bactéria durante a colonização na nasofaringe humana, facilitando a aderência ao epitélio. Por outro lado, a colonização por cepas não-grupáveis pode também ser benéfica para o hospedeiro, induzindo a uma resposta imunológica cruzada contra outros antígenos de superfície do meningococo (CARTWRIGHT, 1995)

Interessante é o fato de que uma das cepas não grupáveis isoladas em nosso estudo, pertencente ao ST639, apresentou o mesmo padrão genotípico de outra do genogrupo B, do mesmo ST, com exceção da variante da proteína NhbA (Tabela 3). É possível supor que esta cepa não grupável tenha sido originalmente do genogrupo B e que tenha sofrido alterações genéticas no *locus* capsular através de mutações, inserções ou deleções e tenha perdido parte da região codificadora do genogrupo. Uma análise mais aprofundada do genoma dessas duas cepas poderia fornecer informações mais precisas. É importante mencionar também que essas cepas não apresentavam nenhuma relação epidemiológica, pois foram isoladas de estudantes de escolas distintas. A capsula polissacarídica, mesmo que em menor frequência, é rotineiramente expressa em isolados de portadores (JOLLEY et al., 2000; YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; CLAUS et al., 2005). Os 23 isolados capsulados caracterizados nesse estudo foram distribuídos em seis tipos capsulares, dos quais quatro são normalmente associados à doença meningocócica invasiva (BORROW et al., 2016).

Embora a identificação dos sorogrupos de *N. meningitidis* possa prover informações epidemiológicas importantes, esta informação sozinha não é suficiente, principalmente no que tange a identificação de cepas hipervirulentas responsáveis por surtos, uma vez os casos de DM são ocasionados por um limitado número de sorogrupos (CAUGANT, 1998). Essas evidências tornam fundamental a caracterização molecular dos isolados através de análises de sequenciamento, para uma melhor compreensão dos padrões evolucionários, da transmissão do meningococo, bem como uma ferramenta na avaliação da eficácia e impacto das vacinas.

O MLST é uma técnica muito útil para o monitoramento da disseminação de isolados de *N. meningitidis*, nacional e internacionalmente, não só para a vigilância da DM mas também como fonte de dados para estudos da distribuição de populações do meningococo e a evolução do patógeno (JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007). Em associação com a tipagem das proteínas de membrana, o poder de discriminação na caracterização dos isolados é amplificado, possibilitando a maior distinção entre as cepas circulantes. Por outro lado, é importante ressaltar que 71% das cepas de *N. meningitidis* identificadas em nosso estudo, apresentaram resultados insatisfatórios no sequenciamento de alguns dos alvos estudados pelo MLST e no sequenciamento de proteínas de membrana. Esses resultados mostram a necessidade do emprego de uma metodologia complementar, no caso, o sequenciamento do genoma completo, para uma caracterização molecular mais completa dos isolados. Na verdade, com a redução do custo dos métodos de WGS, esta metodologia tem ganhado espaço paulatinamente, tornando-se uma ferramenta crucial nos estudos epidemiológicos, fornecendo informações com elevado poder de discriminação das variações genômicas, com alta qualidade de cobertura e análise de dados genealógicos com rapidez, precisão e reprodutibilidade (JOLLEY; MAIDEN, 2013; JONES et al., 2015; KWONG et al., 2015; LUCIDARME et al., 2015; KRETZ et al., 2016; MUSTAPHA; MARSH; HARRISON, 2016).

Através da caracterização molecular das cepas de *N. meningitidis* por meio das técnicas de MLST, sequenciamento de proteínas e do genoma completo, foi possível evidenciar que a população de meningococo na população estudada é altamente diversificada antígenicamente. Quase 60% dos isolados, por exemplo, foram classificados em diferentes STs, o que corrobora os achados da literatura (CAUGANT et al., 1988; URWIN et al., 2004; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; BAMBINI et al., 2009). Esta grande variabilidade genética pode estar relacionada a um mecanismo de adaptação ao estilo de vida comensal do patógeno na nasofaringe humana, em resposta às ações do sistema imune do hospedeiro e a competição com outras espécies bacterianas da microbiota (SCHOEN et al., 2007), resultando em alta

recombinação gênica e frequente troca de material genético entre espécies (HOLMES; URWIN; MAIDEN, 1999; KONG et al., 2013).

Os isolados de portadores apresentam, normalmente uma gama de STs, com apenas uma pequena porção destes considerados hipervirulentos (ZHOU et al., 2012). Este resultado foi evidenciado em nossos isolados, com a presença de 34 STs distintos, distribuídos em 14 complexos clonais. Dentre os complexos clonais identificados, os cc1136 (20,3%), o cc198 (18,6%) e cc53 (8,4%) foram os mais prevalentes, sendo este resultado esperado. Esses complexos clonais são geralmente associados a amostras de portadores, não apenas entre isolados não grupáveis, como também entre aqueles caracterizados como *cnl* (CLAUS et al., 2005).

As associações entre complexos clonais hipervirulentos e soro/genogrupos específicos, descritos em diversos estudos de isolados oriundos de portadores ou de doentes (URWIN, 2003; VOGEL; CLAUS; FROSCH, 2004; CLAUS et al., 2005) foram encontradas neste estudo, com cerca de 24% dos isolados distribuídos entre setes complexos clonais hipervirulentos. Como por exemplo, a associação entre os isolados do genogrupo B e os complexos clonais cc41/44, cc32 e cc4821 identificada em nosso estudo, já foi descrita na literatura, sendo os dois primeiros reportados em amostras invasivas a mais de 50 anos (RACLOZ; LUIZ, 2010; BAMBINI et al., 2013) e em isolados oriundos de portadores (CLIMENT et al., 2010; JOUNIO et al., 2012). Com relação ao cc4821, este complexo foi descrito na década de 70 associado ao sorogrupo C em portadores na China, passando a ser encontrado no sorogrupo B desde o ano de 2003, causando inúmeros casos de surtos e endemias (ZHANG et al., 2013; SHAN et al., 2014). Tais associações demonstram a elevada plasticidade do patógeno, capaz de apresentar relações persistentes entre sorogrupos e genótipos, bem como as consequências que as sucessivas recombinações gênicas entre os isolados de portadores podem vir a desencadear, como por exemplo, o aparecimento de cepas patogênicas.

Os isolados do genogrupo B apresentaram um perfil genotípico bastante heterogêneo, sendo observadas diferentes combinações entre as proteínas de membrana dentro o mesmo complexo clonal. Esta grande variabilidade antigênica demonstra que apenas a determinação de complexos clonais não é suficiente para prever os antígenos vacinais e as proteínas de membrana que poderiam ser alvos vacinais. Por outro lado, tem-se verificado que genótipos altamente transmissíveis podem perdurar durante décadas (BUCKEE et al., 2008). No nosso estudo podemos observar a presença da cepa B: P1.19,15: F5-1: ST-639 (cc32), descrita como responsável por diversos surtos em Cuba (CLIMENT et al., 2010) e em casos da doença

invasiva no Brasil desde 1995 (DE FILIPPIS; VICENTE, 2005). Este padrão genotípico, associado ao genogrupo B, tem sido frequentemente encontrado em quase toda a extensão do território nacional, com elevada predominância na região Nordeste (DE FILIPPIS et al., 2012).

A permanência de genótipos altamente transmissíveis também foi observada em associação ao genogrupo C, com a presença da cepa C: P1.22,14-6: F3-9: ST-3780 (cc103). Esta cepa diverge do genótipo de isolados oriundos de doença invasiva apenas pela VR1 do subtipo (PorA). Em circulação no Brasil desde 1980, esta cepa (C: P1.14-6: F3-9: ST-3780 (cc103)) (DE LEMOS et al., 2007) pode ser considerada uma das responsáveis pela crescente substituição do sorogrupo B pelo C na década de 90, culminando com a predominância do sorogrupo C como o maior responsável pela DM no Brasil. Uma cepa com o genótipo foi responsável pelo último grande surto reportado na Bahia e em Salvador, em 2010 (CARDOSO et al., 2012; GALVAO-DE-ARAÚJO et al., 2012).

O genogrupo Y, segundo tipo capsular mais frequente no nosso estudo, apresentou associações com dois complexos clonais importantes, cc23 e cc175. O cc23 descrito previamente em isolados de portadores assintomáticos, encontra-se, atualmente, associado a casos de DM nos Estados Unidos, América do Sul, África do Sul e Europa (ABAD et al., 2009; WHITNEY et al., 2009; CHANG; TZENG; STEPHENS, 2012). O complexo clonal cc175, por sua vez, é fortemente associado a casos de doença invasiva causado pelo genogrupo Y no Brasil, sendo encontrado em 17,6% das cepas de MenY isoladas de casos de 11 Estados do país, entre 2007 e 2011 (SANTOS, 2015). Além da associação com os complexos clonais, foi observada nas amostras de portadores deste estudo, perfis genotípicos de PorA (VR1:5-1/5-2 e VR2:10-) , FetA (F3-4 e F1-7) e FHbP (2.21) semelhantes aos dos isolados do genogrupo Y descritos em casos de doença invasiva no Canadá (TSANG et al., 2007), América Latina (ABAD et al., 2009) e no Brasil (SANTOS, 2015). Evidenciando a co-circulação de cepas patogênicas em isolados de portadores assintomáticos.

Com relação ao genogrupo W, é importante ressaltar que cepas apresentando o padrão genético W: P1.5,2: F1-1: ST-11 (cc11), encontrado em dois isolados em nosso estudo, tem sido relacionadas a um aumento de casos de DM endêmica em várias regiões do mundo, como África do Sul (VON GOTTFBERG et al., 2008), Inglaterra (LUCIDARME et al., 2015), Argentina (SORHOUEP-PEREIRA et al., 2013), Chile (ARAYA et al., 2015) e sul do Brasil (WEIDLICH et al., 2008). Esses casos têm apresentando altos níveis de fatalidade (28%), afetando indivíduos saudáveis em todas as faixas etárias e com manifestações clínicas divergentes das normalmente observadas da DM por outros sorogrupos, como por exemplo

sintomas gastrointestinais (MRF, 2016). O aumento do número de casos associados ao MenW na América Latina e no Brasil, onde o sorogrupo aparece como o terceiro mais prevalente (LOPEZ; DEBBAG, 2012; BARRA et al., 2013; SAFADI et al., 2013a), demanda uma contínua vigilância não apenas fenotipicamente, mas também quanto à caracterização genotípica das cepas, haja vista a alta transmissibilidade e virulência do genótipo em circulação.

Mais particularmente em relação aos antígenos vacinais do sorogrupo B pesquisados neste estudo, o nosso estudou mostrou que a maioria das cepas não apresentava a proteína NadA. Estes achados estão de acordo com outros estudos da literatura, mostrando uma baixa prevalência dessa proteína entre cepas de *N. meningitidis* isoladas de portadores (COMANDUCCI et al., 2004). Por outro lado, entre as variantes encontradas, podemos destacar a associação com complexos clonais hipervirulentos descritos na literatura, como por exemplo: NadA-1 (cc32); NadA-4 (cc2132) e NadA-2 (cc11) (COMANDUCCI et al., 2004; LUCIDARME et al., 2010; BAMBINI et al., 2014). Foi possível observar associações não randômicas entre as variantes de FHbP 2.102 e Nhba 58 (e PorB 3-64) nas amostras *cnl* (cc53); FHbP 1.4 e Nhba 10 (e PorB 3-84) nas amostras *cnl* (cc198); FHbP 3.94 e Nhba 600 (e PorB 3-84) nas amostras *cnl* (cc1136); e Nhba 21 e 24 associados aos complexos clonais cc35 e cc103, conforme descrito em outros estudos (Gráfico 3 e 4) (LUCIDARME et al., 2010; CLAUS et al., 2012; GASPARINI et al., 2014; LAW et al., 2015). Outras correlações foram observadas entre a variante FHbP 2.19 e o complexo clonal cc41/44 e as associações da subvariante do FHbP 2.21 a genótipos distintos, relacionados aos complexos clonais cc23, cc175 e cepas sem complexo clonal definido (Gráfico 3).

As proteínas de membrana PorA, PorB e fetA apresentaram um perfil genotípico mais distinto com elevada variabilidade entre essas OMPs dentro do mesmo genogrupo e complexo clonal, bem como presença dos mesmos tipos antigênicos em diferentes complexos clonais. Entretanto, mesmo observando esta variabilidade, foram notadas algumas correlações, especialmente entre perfis genotípicos hipervirulentos em circulação, como os clones descritos nos isolados B: P1.19,15: F5-1: ST-639 (cc32); C: P1.22,14-6: F3-9: ST-3780 (cc103) e W: P1.5,2: F1-1: ST-11 (cc11).

Se as associações observadas neste estudo se mantêm ao longo do tempo ou se emergem em função de forças seletivas, é uma questão ainda a ser elucidada. Existem poucos estudos que analisaram a presença dessas variantes proteicas em amostras de portadores e apenas a continuidade da vigilância poderá fornecer informações mais precisas sobre este assunto. Por outro lado, essas associações têm, de modo geral, um impacto na escolha de antígenos

potencialmente candidatos para a composição de vacinas. Uma vacina com componentes proteicos, devido a sua composição com antígenos amplamente distribuídos em isolados de meningococos presentes em portadores e em doentes, pode vir a produzir uma proteção de amplo espectro, bem como atuar indiretamente na população de portadores afetando a colonização e conseqüentemente a transmissão. Deste modo, a caracterização dos antígenos vacinais é fundamental para avaliar os impactos antes e após a implementação de vacinas.

Neste estudo, por meio da caracterização dos antígenos vacinais foi possível comparar as variantes presentes nos isolados estudados com aquelas descritas como componentes da vacina 4CMenB (ESPOSITO; PRINCIPI, 2014). Entre eles, apenas dois foram encontrados entre nossas amostras, o NhbA-2 e o FHbP 1.1, em cepas distintas, sendo a lipoproteína NhbA encontrada na cepa B: P1.18-7,9: F1-5: ST-2120(cc41/44) e o FHbP no isolado NG: P1.18,25-37: F5-5: ST-823(cc198) (Tabela 2). Por outro lado, é importante ressaltar que apesar dos nossos resultados mostrarem uma baixa prevalência dos antígenos presentes na 4CMenB, alguns estudos tem reportado elevada reatividade entre subvariantes de FHbP-1; entre as subvariantes heterólogas da lipoproteína NhbA e a alta reatividade entre as variantes NadA-1, NadA-2 e NadA-3 (CARTER, 2013; HONG et al., 2013; VOGEL et al., 2013; MAMELI et al., 2015; MEDINI; STELLA; WASSIL, 2015; ABAD et al., 2016; WASKO et al., 2016). Deste modo, com exceção do componente PorA, subtipo específico e do FHbP-1 que apresenta baixa reatividade entre as demais subvariantes FHbP-2 e FHbP-3, os demais antígenos proteicos podem ter efeito na população de colonizados estudados, uma vez que estudos sobre a efetividade da vacina 4CMenB destacam que a presença de apenas um dos componentes pode ser capaz de induzir a cobertura vacinal esperada (DONNELLY et al., 2010; HONG et al., 2013).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nesta investigação representam um dos poucos estudos sobre a caracterização molecular de cepas de *N. meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos, que aprofundam as análises em relação as proteínas de membrana e de antígenos vacinais do sorogrupo B.

Os dados aqui descritos demonstram a alta variabilidade antigênica entre os isolados de portadores assintomáticos, bem como a presença de amostras hipervirulentas em circulação na população de colonizados. Esses achados evidenciam a importância da contínua vigilância em relação aos genótipos circulantes na população de portadores, com o objetivo de auxiliar na compreensão da epidemiologia da doença meningocócica, embasar medidas de saúde pública e avaliar o impacto da implementação vacinas.

## REFERÊNCIAS

ABAD, R. et al. Molecular characterization of invasive serogroup Y *Neisseria meningitidis* strains isolated in the latin america region. **J. Infect.**, v. 59, n. 2, p. 104-114, 2009.

ABAD, R. et al. Serogroup W meningococcal disease: Global spread and current affect on the southern cone in latin america. **Epidemiol. Infect.**, v. 142, n. 12, p. 2461-2470, 2014.

ABAD, R. et al. Predicted strain coverage of a new meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in spain: Analysis of the differences with other european countries. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150721, 2016.

ABIO, A.; NEAL, K. R.; BECK, C. R. An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years. **Pathog. Glob Health**, v. 107, n. 7, p. 373-380, 2013.

AGUILERA, J. F. et al. Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the hajj pilgrimage, europe, 2000. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 8, p. 761-767, 2002.

AL-TAWFIQ, J. A.; CLARK, T. A.; MEMISH, Z. A. Meningococcal disease: The organism, clinical presentation, and worldwide epidemiology. **J. Travel Med.**, v. 17 Suppl, n., p. 3-8, 2010.

ALA'ALDEEN, D. A. et al. The 70 kilodalton iron regulated protein of *Neisseria meningitidis* is not the human transferrin receptor. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 57, n. 1-2, p. 37-42, 1990.

ALCALA, B. et al. Capsule switching among C:2b:P1.2,5 meningococcal epidemic strains after mass immunization campaign, spain. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 12, p. 1512-1514, 2002.

ARAYA, P. et al. *Neisseria meningitidis* ST-11 clonal complex, chile 2012. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, n. 2, p. 339-341, 2015.

BAKER, C. J. Prevention of meningococcal infection in the United States: Current recommendations and future considerations. **J. Adolesc. Health**, v. 59, n. 2 Suppl, p. S29-37, 2016.

BAMBINI, S. et al. Neisseria adhesin a variation and revised nomenclature scheme. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 21, n. 7, p. 966-971, 2014.

BAMBINI, S. et al. Distribution and genetic variability of three vaccine components in a panel of strains representative of the diversity of serogroup B meningococcus. **Vaccine**, v. 27, n. 21, p. 2794-2803, 2009.

BAMBINI, S. et al. An analysis of the sequence variability of meningococcal *fHbP*, *nadA* and *nhba* over a 50-year period in the Netherlands. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e65043, 2013.

BARRA, G. N. et al. Molecular characterization of invasive *Neisseria meningitidis* strains isolated in Chile during 2010-2011. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66006, 2013.

BEDDEK, A. J. et al. Evidence for capsule switching between carried and disease-causing *Neisseria meningitidis* strains. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 7, p. 2989-2994, 2009.

BEERNINK, P. T.; GRANOFF, D. M. The modular architecture of meningococcal factor h-binding protein. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 9, p. 2873-2883, 2009.

BIRTLES, A. et al. Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from clinical samples and application of the method to the investigation of meningococcal disease case clusters. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 12, p. 6007-6014, 2005.

BLACK, J. R. et al. Human immune response to iron-repressible outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 54, n. 3, p. 710-713, 1986.

BOGAERT, D. et al. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in healthy Dutch children. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 6, p. 899-902, 2005.

BORROW, R. et al. Effectiveness of meningococcal serogroup C vaccine programmes. **Vaccine**, v. 31, n. 41, p. 4477-4486, 2013.

BORROW, R. et al. The global meningococcal initiative: Global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. **Expert. Rev. Vaccines**, v., n., p. 1-16, 2016.

BORROW, R. et al. Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom: Reevaluation of correlates of protection. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1568-1573, 2001.

BOSIS, S.; MAYER, A.; ESPOSITO, S. Meningococcal disease in childhood: Epidemiology, clinical features and prevention. **J. Prev. Med. Hyg.**, v. 56, n. 3, p. E121-124, 2015.

BRASIL, M. D. S. Informações epidemiológicas de meningite na Bahia Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/>>. Acesso em: Date Accessed

BREHONY, C.; JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, n. 1, p. 15-26, 2007.

BREHONY, C.; WILSON, D. J.; MAIDEN, M. C. Variation of the factor h-binding protein of *Neisseria meningitidis*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 12, p. 4155-4169, 2009.

BUCKEE, C. O. et al. Long-term evolution of antigen repertoires among carried meningococci. **Proc. Biol. Sci.**, v. 277, n. 1688, p. 1635-1641, 2010.

BUCKEE, C. O. et al. Role of selection in the emergence of lineages and the evolution of virulence in *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 39, p. 15082-15087, 2008.

BYGRAVES, J. A. et al. Population genetic and evolutionary approaches to analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the et-5 complex. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 18, p. 5551-5556, 1999.

CAMPAGNE, G. et al. Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. **Bull. World Health Organ.**, v. 77, n. 6, p. 499-508, 1999.

CAPECCHI, B. et al. *Neisseria meningitidis* nada is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 687-698, 2005.

CARDOSO, C. W. et al. Impact of vaccination during an epidemic of serogroup C meningococcal disease in Salvador, Brazil. **Vaccine**, v. 30, n. 37, p. 5541-5546, 2012.

CARDOSO, C. W. P., L. L.; REIS, M. G.; FLANNERY, B.; REIS, J. N. Impact of vaccination during an epidemic of serogroup C meningococcal disease in Salvador, Brazil. **Vaccine**, v. 30, n. 37, p. 5541-5546, 2012.

CARON, F. et al. From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: Longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, n. 6, p. 455-463, 2011.

CARTER, N. J. Multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB; Bexsero((r))): A review of its use in primary and booster vaccination. **BioDrugs**, v. 27, n. 3, p. 263-274, 2013.

CARTWRIGHT, K. A. **Meningococcal carriage and disease**. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, 1995

CASTILO, D. et al. **Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by neisseria meningitidis, streptococcus pneumoniae, and haemophilus influenzae**. 2. ed, 2011. 323 p.

CASTINEIRAS, T. M. et al. Capsular switching in invasive *Neisseria meningitidis*, Brazil(1). **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, n. 8, p. 1336-1338, 2012.

CAUGANT, D. A. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: Importance for the epidemiology of meningococcal disease. **Infect. Genet. Evol.**, v. 8, n. 5, p. 558-565, 2008.

CAUGANT, D. A. Molecular epidemiology of meningococci. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 95, n. 5, p. 319-322, 2002.

CAUGANT, D. A. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. **APMIS**, v. 106, n. 5, p. 505-525, 1998.

CAUGANT, D. A. et al. Clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing systemic disease in the Netherlands, 1958-1986. **J. Infect. Dis.**, v. 162, n. 4, p. 867-874, 1990.

CAUGANT, D. A. et al. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. **J. Gen. Microbiol.**, v. 132, n. 3, p. 641-652, 1986.

CAUGANT, D. A. et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p. 323-330, 1994.

CAUGANT, D. A. et al. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 8, p. 2060-2068, 1988.

CAUGANT, D. A. et al. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 6, p. 2781-2792, 1987a.

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

CAUGANT, D. A. et al. Genetic relationships and clonal population structure of serotype 2 strains of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 6, p. 1503-1512, 1987b.

CHANG, Q.; TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Meningococcal disease: Changes in epidemiology and prevention. **Clin. Epidemiol.**, v. 4, n., p. 237-245, 2012.

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

CLAUS, H. et al. Deletion of the meningococcal feta gene used for antigen sequence typing of invasive and commensal isolates from Germany: Frequencies and mechanisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 2960-2964, 2007.

CLAUS, H. et al. *Capsule null locus* meningococci: Typing of antigens used in an investigational multicomponent meningococcus serogroup B vaccine. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 155-160, 2012.

CLAUS, H. et al. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 6, p. 1813-1819, 2002.

CLAUS, H. et al. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 8, p. 1263-1271, 2005.

CLAUS, H. et al. Molecular divergence of the *sia* locus in different serogroups of *Neisseria meningitidis* expressing polysialic acid capsules. **Mol. Gen. Genet.**, v. 257, n. 1, p. 28-34, 1997.

CLAUS, H. et al. Identification of the hypervirulent lineages of *Neisseria meningitidis*, the st-8 and ST-11 complexes, by using monoclonal antibodies specific to nmedi. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 8, p. 3873-3876, 2003.

CLIMENT, Y. et al. Clonal distribution of disease-associated and healthy carrier isolates of *Neisseria meningitidis* between 1983 and 2005 in Cuba. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 802-810, 2010.

COHN, A.; MACNEIL, J. The changing epidemiology of meningococcal disease. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 29, n. 4, p. 667-677, 2015.

COMANDUCCI, M. et al. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 11, p. 1445-1454, 2002.

COMANDUCCI, M. et al. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 7, p. 4217-4223, 2004.

CORDEIRO, S. M. et al. Hospital-based surveillance of meningococcal meningitis in Salvador, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, n. 11, p. 1147-1153, 2007.

CRUM-CIANFLONE, N.; SULLIVAN, E. Meningococcal vaccinations. **Infect. Dis. Ther.**, v., n., p., 2016.

DE FILIPPIS, I. et al. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup b in Brazil. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33016, 2012.

DE FILIPPIS, I.; VICENTE, A. C. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the

mergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 53, n. 3, p. 161-167, 2005.

DE LEMOS, A. P. et al. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1266-1273, 2007.

DE MORAES, J. C.; BARATA, R. B. Meningococcal disease in Sao Paulo, Brazil, in the 20th century: Epidemiological characteristics. **Cad. Saude Publ.**, v. 21, n. 5, p. 1458-1471, 2005.

DE MORAES, J. C. et al. Prevalence, risk factors and molecular characteristics of meningococcal carriage among brazilian adolescents. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v., n., p., 2015.

DIAZ, J. et al. Prevalence of meningococcal carriage in children and adolescents aged 10-19 years in Chile in 2013. **J. Infect. Publ. Health**, v., n., p., 2016.

DIDELLOT, X. et al. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nat. Rev. Genet.**, v. 13, n. 9, p. 601-612, 2012.

DIERMAYER, M. et al. Epidemic serogroup B meningococcal disease in Oregon: The evolving epidemiology of the et-5 strain. **JAMA**, v. 281, n. 16, p. 1493-1497, 1999.

DJIBO, S. et al. Outbreaks of serogroup X meningococcal meningitis in Niger 1995-2000. **Trop. Med. Int. Health**, v. 8, n. 12, p. 1118-1123, 2003.

DOLAN-LIVENGOOD, J. M. et al. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 10, p. 1616-1628, 2003.

DOLAN THOMAS, J. et al. *sodC*-based real-time pcr for detection of *Neisseria meningitidis*. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19361, 2011.

DONNELLY, J. et al. Qualitative and quantitative assessment of meningococcal antigens to evaluate the potential strain coverage of protein-based vaccines. **Proc. Natl. Acad. Sci .USA**, v. 107, n. 45, p. 19490-19495, 2010.

DULL, P. M.; MCINTOSH, E. D. Meningococcal vaccine development--from glycoconjugates against menacwy to proteins against menb--potential for broad protection against meningococcal disease. **Vaccine**, v. 30 Suppl 2, n., p. B18-25, 2012.

EDWARDS, M. S.; BAKER, C. J. Complications and sequelae of meningococcal infections in children. **J. Pediatr.**, v. 99, n. 4, p. 540-545, 1981.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 482-487, 1999.

ESPINOSA DE LOS MONTEROS, L. E. et al. Prevalence of *Neisseria meningitidis* carriers in children under five years of age and teenagers in certain populations of Mexico City. **Salud Publ. Mex.**, v. 51, n. 2, p. 114-118, 2009.

ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N. Vaccine profile of 4CMenB: A four-component *Neisseria meningitidis* serogroup B vaccine. **Exp. Rev. Vaccines**, v. 13, n. 2, p. 193-202, 2014.

EVANS, J. R.; ARTENSTEIN, M. S.; HUNTER, D. H. Prevalence of meningococcal serogroups and description of three new groups. **Am. J. Epidemiol.**, v. 87, n. 3, p. 643-646, 1968.

FEAVERS, I. M. et al. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 12, p. 3883-3887, 1999.

FEAVERS, I. M. et al. Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 9, p. 3620-3629, 1992.

FIJEN, C. A. et al. Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in the Netherlands. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, n. 1, p. 98-105, 1999.

FINDLOW, H.; BORROW, R. What would be the best schedule for prevention of meningococcal disease in all ages? The UK experience. **Paediatr. Drugs**, v. 18, n. 2, p. 83-87, 2016.

FLECK, F. Who and msf appeal for funds for new meningitis vaccine. **BMJ**, v. 327, n. 7418, p. 769, 2003.

FLETCHER, L. D. et al. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2088-2100, 2004.

FLEXNER, S. The results of the serum treatment in thirteen hundred cases of epidemic meningitis. **J. Exp. Med.**, v. 17, n. 5, p. 553-576, 1913.

FOURNIER, P. E.; DUBOURG, G.; RAOULT, D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. **Genome Med.**, v. 6, n. 11, p. 114, 2014.

FRASCH, C. E.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 1985.

FROSCH, M. et al. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group ii capsular polysaccharides. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 5, p. 1251-1263, 1991.

FROSCH, M.; WEISGERBER, C.; MEYER, T. F. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, n. 5, p. 1669-1673, 1989.

GABUTTI, G.; STEFANATI, A.; KUHDARI, P. Epidemiology of *Neisseria meningitidis* infections: Case distribution by age and relevance of carriage. **J. Prev. Med. Hyg.**, v. 56, n. 3, p. E116-120, 2015.

GAGNEUX, S. et al. Microheterogeneity of serogroup A (subgroup iii) *Neisseria meningitidis* during an outbreak in northern Ghana. **Trop. Med. Int. Health**, v. 5, n. 4, p. 280-287, 2000.

GAGNEUX, S. et al. Clonal groupings in serogroup X *Neisseria meningitidis*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 462-466, 2002.

GAGNEUX, S. P. et al. Prospective study of a serogroup X *Neisseria meningitidis* outbreak in northern Ghana. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 5, p. 618-626, 2002.

GALVAO-DE-ARAÚJO, L. et al. **Emergence of meningococcal disease serogroup C in Salvador, Brazil.** INPC. Wurzburg, Germany, 2012. p. 256-256. p.

GASPARINI, R. et al. Molecular and serological diversity of *Neisseria meningitidis* carrier strains isolated from Italian students aged 14 to 22 years. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, n. 6, p. 1901-1910, 2014.

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E. C.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 129, n. 6, p. 1307-1326, 1969.

GORLA, M. C. et al. Phenotypic and molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* associated with an outbreak in Bahia, Brazil. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 30, n. 2, p. 56-59, 2012.

GRAHAM, J. Ambiguous capture: Collaborative capitalism and the meningitis vaccine project. **Med. Anthropol.**, v. 35, n. 5, p. 419-432, 2016.

GRANOFF, D. M. et al. Induction of immunologic refractoriness in adults by meningococcal c polysaccharide vaccination. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 3, p. 870-874, 1998.

GREENWOOD, B. Manson lecture. Meningococcal meningitis in Africa. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 4, p. 341-353, 1999.

GUPTA, S. et al. The maintenance of strain structure in populations of recombining infectious agents. **Nat. Med.**, v. 2, n. 4, p. 437-442, 1996.

HAMMERSCHMIDT, S. et al. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. **EMBO J.**, v. 15, n. 1, p. 192-198, 1996a.

HAMMERSCHMIDT, S. et al. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siad*): Correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. **Mol Microbiol.**, v. 20, n. 6, p. 1211-1220, 1996b.

HANSMAN, D. Meningococcal disease in South Australia: Incidence and serogroup distribution 1971-1980. **J. Hyg.**, v. 90, n. 1, p. 49-54, 1983.

HARBOTTLE, H. et al. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 7, p. 2449-2457, 2006.

HARRIS, S. L. et al. Preclinical evidence for the potential of a bivalent *fHbP* vaccine to prevent neisseria meningitidis serogroup C disease. **Hum. Vaccin**, v. 7 Suppl, n., p. 68-74, 2011.

HARRISON, L. H. et al. Population structure and capsular switching of invasive *Neisseria meningitidis* isolates in the pre-meningococcal conjugate vaccine era--United States, 2000-2005. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 8, p. 1208-1224, 2010.

HARRISON, L. H.; TROTTER, C. L.; RAMSAY, M. E. Global epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 27, n., p., 2009a.

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

HILL, D. M. et al. Genomic epidemiology of age-associated meningococcal lineages in national surveillance: An observational cohort study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 15, n. 12, p. 1420-1428, 2015.

HOANG, L. M. et al. Rapid and fatal meningococcal disease due to a strain of *Neisseria meningitidis* containing the capsule null locus. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 5, p. e38-42, 2005.

HOLMES, E. C.; URWIN, R.; MAIDEN, M. C. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, n. 6, p. 741-749, 1999.

HONG, E. et al. Could the multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) control *Neisseria meningitidis* capsular group X outbreaks in africa? **Vaccine**, v. 31, n. 7, p. 1113-1116, 2013.

IBARZ-PAVON, A. B. et al. Laboratory-based surveillance of *Neisseria meningitidis* isolates from disease cases in Latin American and Caribbean countries, SIREVAII 2006-2010. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44102, 2012.

JELFS, J.; MUNRO, R. Epidemiology of meningococcal disease in australia. **J. Paediatr. Child. Health**, v. 37, n. 5, p. S3-6, 2001.

JOHSWICH, K. O. et al. Invasive potential of nonencapsulated disease isolates of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 7, p. 2346-2353, 2012.

JOKHDAR, H. et al. Immunologic hyporesponsiveness to serogroup C but not serogroup A following repeated meningococcal a/c polysaccharide vaccination in Saudi Arabia. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, n. 1, p. 83-88, 2004.

JOLLEY, K. A.; BREHONY, C.; MAIDEN, M. C. Molecular typing of meningococci: Recommendations for target choice and nomenclature. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, n. 1, p. 89-96, 2007.

JOLLEY, K. A. et al. Carried meningococci in the czech republic: A diverse recombining population. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 12, p. 4492-4498, 2000.

JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. Automated extraction of typing information for bacterial pathogens from whole genome sequence data: *Neisseria meningitidis* as an exemplar. **Euro Surveill**, v. 18, n. 4, p. 20379, 2013.

JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. Bigsdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinform.**, v. 11, n., p. 595, 2010.

JONES, C. H. et al. Comparison of phenotypic and genotypic approaches to capsule typing *Neisseria meningitidis* using invasive and carriage isolate collections. **J. Clin. Microbiol.**, v., n., p., 2015.

JOUNIO, U. et al. Genotypic and phenotypic characterization of carriage and invasive disease isolates of *Neisseria meningitidis* in Finland. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 2, p. 264-273, 2012.

KAHLER, C. M. et al. The ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 12, p. 5939-5947, 1998.

KLEIMAN, M. B. et al. Meningitis caused by *Neisseria meningitidis* serogroup W135. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8, n. 5, p. 621-622, 1978.

KREMASTINO, J. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* among ethnic greek school children from Russian immigrant families in Athens. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 23, n. 1, p. 13-20, 1999.

KRETZ, C. et al. Whole genome characterization of the emerging epidemic meningococcal serogroup C and resurgence and serogroup W in Niger, 2015. **Emerg. Infect. Dis.**, v., n., p., 2016.

KRISTIANSEN, P. A. et al. Persistent low carriage of serogroup A *Neisseria meningitidis* two years after mass vaccination with the meningococcal conjugate vaccine, MenAfriVac. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, n., p. 663, 2014.

KRISTIANSEN, P. A. et al. Impact of the serogroup A meningococcal conjugate vaccine, MenAfriVac, on carriage and herd immunity. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, n., p., 2013.

KWONG, J. C. et al. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. **Pathology**, v. 47, n. 3, p. 199-210, 2015.

LADHANI, S. N. et al. Increase in endemic *Neisseria meningitidis* capsular group W sequence type 11 complex associated with severe invasive disease in England and Wales. **Clin. Infect. Dis.**, v. 60, n. 4, p. 578-585, 2015.

LAFORCE, F. M. et al. The meningitis vaccine project. **Vaccine**, v. 25, n., p., 2007.

LARSEN, M. V. et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 1355-1361, 2012.

LAW, D. K. et al. Characterization of invasive *Neisseria meningitidis* strains from Quebec, Canada, during a period of increased serogroup B disease, 2009-2013: Phenotyping and genotyping with special emphasis on the non-carbohydrate protein vaccine targets. **BMC Microbiol.**, v. 15, n., p. 143, 2015.

LEMOS, A. P. et al. Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. **J. Infect.**, v. 60, n. 3, p. 209-217, 2010.

LOPEZ, E. L.; DEBBAG, R. [meningococcal disease: Always present. Serogroup changes in the Southern Cone. **Rev. Chil. Infectol.**, v. 29, n. 6, p. 587-594, 2012.

LUCIDARME, J. et al. Characterization of *fhbp*, *nhba* (*gna2132*), *nadA*, *porA* and sequence type in group B meningococcal case isolates collected in England and Wales during January 2008 and potential coverage of an investigational group B meningococcal vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 6, p. 919-929, 2010.

LUCIDARME, J. et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. **J. Infect.**, v. 71, n. 5, p. 544-552, 2015.

MACLENNAN, J. et al. Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 6, p. 950-957, 2006.

MACNEIL, J. R. et al. *Neisseria meningitidis* serogroup W, Burkina Faso, 2012. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 20, n. 3, p. 394-399, 2014.

MAIDEN, M. C. The impact of protein-conjugate polysaccharide vaccines: An endgame for meningitis? **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 368, n. 1623, p. 20120147, 2013.

MAIDEN, M. C. Population genomics: Diversity and virulence in the *neisseria*. **Curr Opin. Microbiol.**, v. 11, n. 5, p. 467-471, 2008.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MAIDEN, M. C. et al. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 5, p. 737-743, 2008.

MAIDEN, M. C.; MALORNY, B.; ACHTMAN, M. A global gene pool in the *neisseriae*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, n. 6, p. 1297-1298, 1996.

MAIDEN, M. C.; STUART, J. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. **The Lancet**, v. 359, n. 9320, p. 1829-1830, 2002.

MAMELI, C. et al. The multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): Origin, composition, health impact and unknown aspects. **Future Microbiol.**, v. 10, n. 10, p. 1579-1598, 2015.

MARSH, J. W. et al. Deletion of feta gene sequences in serogroup B and C *Neisseria meningitidis* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1333-1335, 2007.

MARTIN, N. G.; SNAPE, M. D. A multicomponent serogroup B meningococcal vaccine is licensed for use in Europe: What do we know, and what are we yet to learn? **Expert Rev. Vaccines**, v. 12, n. 8, p. 837-858, 2013.

MASIGNANI, V. et al. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein gna1870. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 6, p. 789-799, 2003.

MAYER, L. W. et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: Not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 11, p. 1596-1605, 2002.

MCINTYRE, P. B. et al. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. **Lancet**, v. 380, n. 9854, p. 1703-1711, 2012.

MEDINI, D.; STELLA, M.; WASSIL, J. Mats: Global coverage estimates for 4cmenb, a novel multicomponent meningococcal B vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 23, p. 2629-2636, 2015.

MERZ, A. J.; SO, M. Interactions of pathogenic *neisseriae* with epithelial cell membranes. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 16, n., p. 423-457, 2000.

MILAGRES, L. G. et al. Bactericidal antibody response to neisseria meningitidis serogroup B in patients with bacterial meningitis: Effect of immunization with an outer membrane protein vaccine. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 28, n. 4, p. 319-327, 2000.

MORAES, C. Perfil epidemiológico da meningite brasil & mundo Disponível em: <[http://www.saude.rs.gov.br/upload/1437759444\\_Perfil%20Epidemiol%C3%B3gico%20da%20Meningite%20Brasil%20&%20Mundo.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1437759444_Perfil%20Epidemiol%C3%B3gico%20da%20Meningite%20Brasil%20&%20Mundo.pdf)>. Acesso em: Date Accessed

MORAN, E. et al. **Immunogenicity of the meningitis vaccine project's pentavalent MenACWYX polysaccharide conjugate vaccine mcv-5**. 20th International Pathogenic Neisseria Conference Manchester, UK, 2016. p.

MORENO, J. et al. Characterization of carriage isolates of *Neisseria meningitidis* in the adolescents and young adults population of Bogota (Colombia). **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135497, 2015.

MRF, M. R. F. Meningococcal W meningitis and septicaemia: A new, virulent strain Disponível em: <<http://www.meningitis.org/menw>>. Acesso em: Date Accessed

MURRAY, P. R.; BARON, E. J. **Manual of clinical microbiology**. In: PATRICK, R. M.; BARON, E. J.O. et al.. 9th ed. Washington, D.C.: ASM; Oxford : Blackwell, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 6th ed. Philadelphia, PA.: Mosby Elsevier, 2009

MUSTAPHA, M. M.; MARSH, J. W.; HARRISON, L. H. Global epidemiology of capsular group W meningococcal disease (1970-2015): Multifocal emergence and persistence of hypervirulent sequence type (ST)-11 clonal complex. **Vaccine**, v. 34, n. 13, p. 1515-1523, 2016.

MUSTAPHA, M. M. et al. Genomic epidemiology of hypervirulent serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis*. **EBioMed.**, v. 2, n. 10, p. 1447-1455, 2015.

NUNES, A. M. et al. Meningococcal carriage among adolescents after mass meningococcal C conjugate vaccination campaigns in Salvador, Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166475, 2016.

PASTOR, J. M. et al. Meningococcal meningitis caused by *Neisseria meningitidis* of the X serogroup. **Med. Clin.** v. 85, n. 5, p. 208-209, 1985.

PELTON, S. I. The global evolution of meningococcal epidemiology following the introduction of meningococcal vaccines. **J. Adolesc. Health**, v. 59, n. 2 Suppl, p. S3-S11, 2016.

PEREZ-LOSADA, M. et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infect. Genet. Evol.**, v. 16, n., p. 38-53, 2013.

PETTERSSON, A. et al. Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron-regulated protein of neisseria meningitidis are bactericidal and strain specific. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 9, p. 3036-3041, 1990.

POLLARD, A. J.; PERRETT, K. P.; BEVERLEY, P. C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 213-220, 2009.

PUTONTI, C. et al. Where does *Neisseria* acquire foreign DNA from: An examination of the source of genomic and pathogenic islands and the evolution of the *Neisseria* genus. **BMC Evol. Biol.**, v. 13, n., p. 184, 2013.

RACLOZ, V. N.; LUIZ, S. J. The elusive meningococcal meningitis serogroup: A systematic review of serogroup B epidemiology. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, n., p. 175, 2010.

RAMSAY, M. et al. Changing patterns of case ascertainment and trends in meningococcal disease in England and Wales. **Commun. Dis. Rep. CDR Rev.**, v. 7, n. 4, p. R49-54, 1997.

RAMSAY, M. E. et al. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. **Lancet**, v. 357, n. 9251, p. 195-196, 2001.

RAMSAY, M. E. et al. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: Database analysis. **BMJ**, v. 326, n. 7385, p. 365-366, 2003.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2688-2691, 2001.

READ, R. C. et al. Effect of a quadrivalent meningococcal ACWY glycoconjugate or A serogroup B meningococcal vaccine on meningococcal carriage: An observer-blind, phase 3 randomised clinical trial. **Lancet**, v. 384, n. 9960, p. 2123-2131, 2014.

RODRIGUEZ, P. et al. Meningococcal carriage prevalence in university students, 18-24 years of age in Santiago, Chile. **Vaccine**, v. 32, n. 43, p. 5677-5680, 2014.

ROSENSTEIN, N. E. et al. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 6, p. 1894-1901, 1999.

ROSENSTEIN, N. E. et al. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 18, p. 1378-1388, 2001.

ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. *Neisseria meningitidis*: Biology, microbiology, and epidemiology. **Methods Mol. Biol.**, v. 799, n., p. 1-20, 2012.

RYAN, N. J.; HOGAN, G. R. Severe meningococcal disease caused by serogroups X and Z. **Am. J. Dis. Child.**, v. 134, n. 12, p. 1173, 1980.

SADARANGANI, M.; POLLARD, A. J. Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, n. 2, p. 112-124, 2010.

SAFADI, M. A. **Prevenção da doença meningocócica**. *Pediatria, S. B. d.: Sociedade Brasileira de Pediatria*, 2: 8 p. 2015.

SAFADI, M. A.; BEREZIN, E. N.; ARLANT, L. H. Meningococcal disease: Epidemiology and early effects of immunization programs. **J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.**, v. 3, n. 2, p. 91-93, 2014.

SAFADI, M. A. et al. The current situation of meningococcal disease in Latin America and recommendations for a new case definition from the global meningococcal initiative. **Expert Rev. Vaccines**, v. 12, n. 8, p. 903-915, 2013a.

SAFADI, M. A. et al. The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945-2010: An unpredictable and changing landscape. **Epidemiol. Infect.**, v. 141, n. 3, p. 447-458, 2013b.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, M. V. D. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas invasivas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo Y isoladas no Brasil durante o período de 2007 a 2011.** Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SES SP, 2015. 114 p.

SCHORK, S. et al. Genome sequence of a *Neisseria meningitidis capsule null locus* strain from the clonal complex of sequence type 198. **J. Bacteriol.**, v. 194, n. 18, p. 5144-5145, 2012.

SCHWARTZ, B.; MOORE, P. S.; BROOME, C. V. Global epidemiology of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2 Suppl, n., p. S118-124, 1989.

SEIB, K. L. et al. *Neisseria meningitidis* factor h-binding protein fhbp: A key virulence factor and vaccine antigen. **Expert Rev. Vaccines**, v. 14, n. 6, p. 841-859, 2015.

SHAN, X. et al. Genetic diversity of *Neisseria meningitidis* serogroup C ST-4821 in China based on multiple-locus variable number tandem repeat analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111866, 2014.

SJOHOLM, A. G.; BRACONIER, J. H.; SODERSTROM, C. Properdin deficiency in a family with fulminant meningococcal infections. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 50, n. 2, p. 291-297, 1982.

SMITH, J. M. et al. How clonal are bacteria? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 10, p. 4384-4388, 1993.

SORHOUE-PEREIRA, C. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Neisseria meningitidis* disease-causing strains in Argentina, 2010. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58065, 2013.

STEPHENS, D.; APICELLA, M. *Neisseria meningitidis*. In: SAUNDERS, E. (ed.). **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015. cap., p. 2425-2445

STEPHENS, D. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 27 Suppl 2, n., p. B71-77, 2009.

STEPHENS, D. S. Conquering the meningococcus. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, n. 1, p. 3-14, 2007.

STEPHENS, D. S. Uncloaking the meningococcus: Dynamics of carriage and disease. **The Lancet**, v. 353, n. 9157, p. 941-942, 1999.

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

SWARTLEY, J. S. et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 1, p. 271-276, 1997.

TAHA, M. K.; DEGHMANE, A. E. Vaccines targeting serogroup B meningococci. **Lancet Infect. Dis.**, v. 12, n. 8, p. 578-579, 2012.

THOMPSON, E. A.; FEAVERS, I. M.; MAIDEN, M. C. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor *fetA*, a vaccine component. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 7, p. 1849-1858, 2003.

TONEATTO, D. et al. The first use of an investigational multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) in humans. **Hum. Vaccin**, v. 7, n. 6, p. 646-653, 2011.

TORPDAHL, M. et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. **J. Microbiol. Meth.**, v. 63, n. 2, p. 173-184, 2005.

TROTTER, C. L.; GAY, N. J.; EDMUNDS, W. J. The natural history of meningococcal carriage and disease. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, n. 3, p. 556-566, 2006.

TROTTER, C. L.; MAIDEN, M. C. Meningococcal vaccines and herd immunity: Lessons learned from serogroup C conjugate vaccination programs. **Expert Rev. Vaccines**, v. 8, n. 7, p. 851-861, 2009.

TSANG, R. S. et al. Genetic and antigenic analysis of invasive serogroup Y *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1999 to 2003 in Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 1753-1758, 2007.

TSANG, R. S. et al. Potential capsule switching from serogroup Y to B: The characterization of three such *Neisseria meningitidis* isolates causing invasive meningococcal disease in Canada. **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 171-174, 2005.

TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 6, p. 687-700, 2000.

ULLOA, D. V., PS. **Boletín epidemiológico trimestral enfermedad meningocócica** Ministerio de Salud de Chile. División de Planificación Sanitaria, 2016. p.2

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

URWIN, R. et al. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: Implications for vaccine design. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 10, p. 5955-5962, 2004.

URWIN, R. M., M. C. Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

VALENZUELA, M. T. et al. Emergence of W135 meningococcal serogroup in Chile during 2012. **Rev. Med. Chile**, v. 141, n. 8, p. 959-967, 2013.

VIRJI, M. Meningococcal disease: Epidemiology and pathogenesis. **Trends Microbiol.**, v. 4, n. 12, p. 466-469; discussion 469-470, 1996.

VOGEL, U.; CLAUS, H.; FROSCH, M. Genetic lineages and their traits in *Neisseria meningitidis*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 294, n. 2-3, p. 75-82, 2004.

VOGEL, U.; CLAUS, H. Rapid serogroup switching in *Neisseria meningitidis*. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, n. 3, p. 219-220, 2000.

VOGEL, U.; FROSCH, M. Mechanisms of Neisserial serum resistance. **Mol. Microbiol.**, v. 32, n. 6, p. 1133-1139, 1999.

VOGEL, U. et al. Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: A qualitative and quantitative assessment. **Lancet Infect. Dis.**, v. 13, n. 5, p. 416-425, 2013.

VON GOTTEBERG, A. et al. Emergence of endemic serogroup W135 meningococcal disease associated with a high mortality rate in South Africa. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 3, p. 377-386, 2008.

WASKO, I. et al. High predicted strain coverage by the multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) in Poland. **Vaccine**, v. 34, n. 4, p. 510-515, 2016.

WEBER, M. V. et al. Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, n. 7, p. 475-484, 2006.

WEDEGE, E. et al. Emergence of a new virulent clone within the electrophoretic type 5 complex of serogroup B meningococci in Norway. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 314-321, 1995.

WEIDLICH, L. et al. High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W 135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. **J. Infect.**, v. 57, n. 4, p. 324-331, 2008.

WELSCH, J. A.; RAM, S. Factor h and neisserial pathogenesis. **Vaccine**, v. 26 Suppl 8, n., p. I40-45, 2008.

WHALEN, C. M. et al. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. **JAMA**, v. 273, n. 5, p. 390-394, 1995.

WHITNEY, A. M. et al. Genotypic comparison of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup Y isolates from the United States, South Africa, and Israel, isolated from 1999 through 2002<sup>∇</sup>. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n., p. 2787-2793, 2009.

WHO. Meningococcal disease Disponível em:  
<<http://www.who.int/csr/disease/meningococcal/en/>>. Acesso em: Date Accessed

WINN, W. C.; KONEMAN, E. W. C. A.; TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC, M. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. In: WASHINGTON, C.; WINN, J.R. et al. 6th ed. Philadelphia, Pa.; London: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. cap. 11, p. 561-603.

XU, X. H. et al. Emergence of serogroup C meningococcal disease associated with a high mortality rate in Hefei, China. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, n., p. 205, 2012.

XU, Z. et al. First case of *Neisseria meningitidis capsule null locus* infection in china. **Infect. Dis.**, v. 47, n. 8, p. 591-592, 2015.

YAZDANKHAH, S. P.; CAUGANT, D. A. *Neisseria meningitidis*: An overview of the carriage state. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 9, p. 821-832, 2004.

YAZDANKHAH, S. P. et al. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 5146-5153, 2004.

ZHANG, J. et al. Molecular characteristics of *Neisseria meningitidis* isolated during an outbreak in a jail: Association with the spread and distribution of ST-4821 complex serogroup C clone in China. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 26, n. 5, p. 331-337, 2013.

ZHOU, H. et al. Distribution of serogroups and sequence types in disease-associated and carrier strains of *Neisseria meningitidis* isolated in China between 2003 and 2008. **Epidemiol. Infect.**, v. 140, n. 7, p. 1296-1303, 2012.

ZLOTNICK, G. W. et al. The discovery and development of a novel vaccine to protect against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. **Hum. Vaccin Immunother.**, v. 11, n. 1, p. 5-13, 2015.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

Relação dos *primers* e sondas utilizados na reação de qPCR para identificação dos isolados de *N. meningitidis* e dos genogrupos

Alvo		Sequência de Nucleotídeos	Conc. Final (nM)
<i>sodC</i>	F351	GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT	300
	R478	CCACCCGTGTGGATCATAATAGA	600
	Pb387	CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTTT 5' FAM, 3' BHQ1	100
<i>ctrA</i>	F753	TGTGTTCCGCTATACGCCATT	300
	R846	GCCATATTCACACGATATACC	900
	Pb820i	AACCTTGAGCAA" T"CCATTTATCCTGACGTTCT 5' FAM, BHQ1 on "T", 3' SpC6	100
<i>sacB</i> MenA	F2531	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA	300
	R2624	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG	900
	Pb25291i	CTAAAAG" T"AGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT 5' FAM; 3' SpC6; "T" BHQ1	100
<i>siaD</i> (MenB)	F737	GCTACCCCATTTTCAGATGATTGT	300
	R882	ACCAGCCGAGGGTTTATTTCTAC	300
	Pb839i	AAGAGATGGGYAACAAC "T" ATGTAATGTCTTTATTT 5' FAM, 3' SpC6, "T" BHQ1,	100
<i>siaD</i> (MenC)	F478	CCCTGAGTATGCGAAAAAATT	900
	R551	TGCTAATCCCGCCTGAATG	300
	Pb495i	TTTCAATGC" T"AATGAATACCACCGTTTTTTTGC 5' FAM; 3' SpC6; "T" BHQ1	100
<i>synG</i> (MenW)	F857	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG	100
	R964	TTGCCATTCCAGAAATATCACC	900
	Pb907i	AATATGGAGCGAA" T"GATTACAGTAACTATAATGAA 5' FAM, 3' SpC6, "T" BHQ1	200
<i>xcbB</i> (MenX)	F173	TGTCCCAACCGTTTATTGG	900
	R237	TGCTGCTATCATAGCCGCC	900
	Pb196	TGTTTGCCACATGAATGGCGG 5' FAM; 3' BHQ	100
<i>synF</i> (MenY)	F787	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC	900
	R929	TTGCTAAAATCATTTCGCTCCATAT	600
	Pb1099i	TATGGTG" T"ACGATATCCCTATCCTTGCCTATAAT 5' FAM; 3' SpC6; "T" BHQ1	100

## ANEXO 2

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados na amplificação dos genes do MLST.

Gene	Nome do primer	Primer direto (5'-3')	Nome do primer	Primer reverse (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
<i>abcZ</i>	abcZ-P1C	TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC	abcZ-P2C	TCCCCGTCGTAAAAACAATC	433
<i>adk</i>	adk-P1B	CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC	adk-P2B	TGCCAATGCGCCAATAC	465
<i>aroE</i>	aroE-P1B	TTTGAAACAGGCGGTTGCGG	aroE-P2B	CAGCGGTAATCCAGTGCGAC	490
<i>fumC</i>	fumC-P1B	TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG	fumC-P2B	GCCCGTCAGCAAGCCCAAC	465
<i>gdh</i>	gdh-P1B	CTGCCCCGGGGTTTTCATCT	gdh-P2B	TGTTGCGGTTATTTCAAAGAAGG	501
<i>pdhC</i>	pdhC-P2B	CCGGCCGTACGACGCTGAAC	pdhC-P2B	GATGTCGGAATGGGGCAAACA	480
<i>pgm</i>	pgm-P1	CTTCAAAGCCTACGACATCCG	pgm-P2	CGGATTGCTTTCGATGACGGC	450

pb – pares de bases

Conjunto alternativo de *primers* para amplificação dos genes do MLST.

Gene	Nome do <i>primer</i>	<i>Primer</i> direto (5'-3') <sup>1,2</sup>	Nome do <i>primer</i>	<i>Primer</i> reverse (5'-3')
<i>abcZ</i>	abcZ-S1A	AATCGTTTATGTACCGAGR	abcZ-S2	GAGAACGAGCCGGGATAGGA
<i>adk</i> <sub>-</sub>	adk- S1A	AGGCWGGCAGCCCTTG	adk- S2	CAATACTTCGGCTTTCACGG
<i>aroE</i>	aroE- S1A	TCGGTCAAYACGCTGRK	aroE- S2	ATGATGTTGCCGTACACATA
<i>fumC</i>	fumC-S1	TCCGGCTTGCCGTTTGTCAG	fumC- S2	TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC
<i>gdh</i> <sub>-</sub>	gdh- S3	CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC	gdh-S4	RCGCACGGATTCATRYGG
<i>pdhC</i>	pdhC-S1	TCTACTACATCACCTGATG	pdhC- S2	ATCGGCTTGAATGCCGTATTT
<i>pgm</i> <sub>-</sub>	pgm- S1	CGGCGATGCCGACCGTTGG	pgm-S2A	GGTGATGATTTCCGGTYGCRCC

pb – pares de bases. 1- Nucleotídeos designados de acordo com a IUCAC: R=A ou G; W= T ou A; K=T ou G; Y=C ou T; N= A,T, G ou C. 2- Neste set de *primers* foi utilizado R= uma mistura equivalente de A e G; W= uma mistura equivalente de T e A; etc. O conjunto de *primers* alternativos deve ser utilizado quando não houver amplificação dos produtos ao utilizar os primeiros *primers*

Ciclos utilizados para a amplificação dos genes do MLST

Nº de Ciclos <sup>1</sup>	Temperatura	Tempo
1	94°C	4 min
35	94°C	1 min
	72°C	1 min
1	72°C	5 min
Nº de Ciclos <sup>2</sup>	Temperatura	Tempo
1	95°C	4 min
30*	94°C	1 min
	65°C	1 min
	72°C	1 min
10	94°C	1 min
	50°C	1 min
	72°C	2 min
1	72°C	5 min

1- ciclo para genes do MLST. 2-ciclo apenas para o gene *pgm*. \*Temperatura de anelamento é reduzida em 0,5°C/ciclo

### ANEXO 3

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados na amplificação dos genes da proteína membrana externa PorA

Gene	Grupo	Primer Direto (5'-3')	Primer Reverso (5'-3')	Fragmento amplificado
<i>porA</i>	1	P14 GGGTGTTTGCCCGATGTTTTAGG	P22 TTAGAATTTGTGGCGCAAACCGAC	1236
<i>porA</i>	2 <sup>1</sup>	P21 CTGTACGGCGAAATCAAAGCCGG CGT	P22 TTAGAATTTGTGGCGCAAACCGAC	1115
<i>porA</i>	3 <sup>2</sup>	U23 GTGTTTGCCCGATGTTTTAGGT	L24 TGCTGTCTTTATTGCCGTTTTTCT	1368

1,2 – conjunto alternativo de *primers* que podem ser utilizados caso não ocorra amplificação com os primeiros

Ciclos utilizados para a amplificação de PorA

Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 min
30	95°C	1 min
	60°C	30 s
	72°C	5 min

## ANEXO 4

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados na amplificação dos genes da proteína membrana externa PorB.

Gene	Primer Direto (5'-3')	Primer Reverso (5'-3')	Fragmento amplificado
<i>porB</i>	PB-A1 TAAATGCAAAGCTAAGCGGCTTG	PB-A2 TTTGTTGATACCAATCTTTTCAG	1755

Ciclos utilizados para a amplificação de PorB

Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	5 min
35	94°C	1 min
	60°C	30 s
	72°C	1 min
1	72°C	5 min

**ANEXO 5**

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados na amplificação dos genes da proteína membrana externa FetA

<b>Gene</b>	<b>Primer Direto (5'-3')</b>	<b>Primer Reverso (5'-3')</b>	<b>Fragmento amplificado</b>
<i>fetA</i>	S1 CGGCGCAAGCGTATTCGG	S8 CGCGCCCAATTCGTAACCGTG	1189

Ciclos utilizados para a amplificação de FetA

<b>Nº de Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	95°C	5 min
40	95°C	1 min
	55°C	1 min
	72°C	2:30 min
1	72°C	7 min

## ANEXO 6

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados na amplificação dos genes da proteína membrana externa FHbP

Gene	Primer Direto (5'-3') <sup>1</sup>	Primer Reverso (5'-3') <sup>1</sup>	Fragmento amplificado
<i>fHbp</i>	CDC3UNI GTCCGAACGGTAAATTATYGTG	CDC5UNI CTATTCTGVGTATGACTAG	895

<sup>1</sup>-Designações da IUCAC Y = C or T; V = A, C or G.

Ciclos utilizados para a amplificação de FHbP

Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	5 min
40	94°C	15s
	50°C	15s
	72°C	1:30 min
1	72°C	7 min

**ANEXO 7**

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados na amplificação dos genes da proteína membrana externa NadA

<b>Gene</b>	<b>Primer Direto (5'-3')</b>	<b>Primer Reverso (5'-3')</b>
<i>nadA</i>	nadA-A1 GTGGACGTACTCGACTACGAAGG	nadA-B2 CGAGGCGATTGTCAAACCGTTC

Ciclos utilizados para a amplificação de NadA

<b>Nº de Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	94°C	3 min
10	94°C	30s
	56°C	30s
	68°C	3 min
20	94°C	30s
	56°C	30s
	68°C	

**ANEXO 8**

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados na amplificação dos genes da proteína membrana externa NHBA

<b>Gene</b>	<b>Primer Direto (5'-3')</b>	<b>Primer Reverso (5'-3')</b>
<i>nhbA</i>	nhbA-F GCGTTCAGACGGCATATTTTTACA	nhbA-R GGTTTATCAACTGATGCGGACTTGA

Ciclos utilizados para a amplificação de NHBA

<b>Nº de Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	95°C	1 min
40	95°C	30s
	50°C	30s
	72°C	2 min
1	72°C	5 min

## ANEXO 9

Relação dos *primers* e parâmetros de ciclos em termociclador utilizados no sequenciamento dos genes do MLST e das proteínas de membrana externa PorA, PorB, FetA, FHbP, NadA e NHBA

Gene	Nome do primer	Primer direto (5'-3') <sup>1,2</sup>	Nome do primer	Primer reverso (5'-3') <sup>1,2</sup>
<i>abcZ</i>	abcZ-S1A	AATCGTTTATGTACCGCAGR	abcZ-S2	GAGAACGAGCCGGGATAGGA
<i>adk</i>	adk-S1A	AGGCWGGCACGCCCTTGG	adk-S2	CAATACTTCGGCTTTCACGG
<i>aroE</i>	aroE-S1A	TCGGTCAAYACGCTGRTK	aroE-S2	ATGATGTTGCCGTACACATA
<i>fumC</i>	fumC-S1	TCCGGCTTGCCGTTTGTTCAG	fumC-S2	TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC
<i>gdh</i>	gdh-S3	CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC	gdh-S4C	RCGCACGGATTCATRYGG
<i>pdhC</i>	pdhC-S1	TCTACTACATCACCCCTGATG	pdhC-S2	ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>pgm</i>	pgm-S1	CGGCGATGCCGACCGCTTGG	pgm-S2A	GGTGATGATTTCCGGTYGCRCC
<i>porA</i>	VR1-U86	GCCCTCGTATTGTCCGCACTG	VR1-R435	TTGCTGTCCCAAGGATCAATG GC
<i>porA</i>	VR2-F435	GCCATTAATCCTTGGGACAGCA A	VR2-R773	GGCATAGTTCCCGGCAAAACC GCCAT
<i>porB</i>	PB-S1	GCAGCCCTTCCTGTTGCAGC	PB-S2	TTGCAGATTAGAATTTTGTG
<i>porB</i>	8U	TCCGTACGCTACGATTCTCC	8L	GGAGAATCGTAGCGTACGGA
<i>porB</i>	244U	CGCCCCGCGTTTCTTACG	244L	CGTAAGAAACGCGGGGCG
<i>porB</i>			PB260	AGTGCGTTTGGAGAAGTCGT
<i>fetA</i>	S12	TTCAACTTCGACAGCCGCCTT	S15	TTGCAGCGCGTCRITACAGGCG
<i>fHbp</i>	CDC3U NI	GTCCGAACGGTAAATTATYGTG	CDC5UNI	CTATTCTGVGTATGACTAG
<i>fHbp</i> subfamily A <sup>3</sup>	581F	CCGCCGAACTCAAAGCAGAT	310R	TGTAGGGCAACGACGGCGGA
<i>fHbp</i> subfamily B <sup>3</sup>	540F	AATCGAACATTTGAAATCGC	205R	CGGCTGACCTTGTTCGTTCTT

1- Nucleotídeos designados de acordo com a IUPAC: R=A ou G; W= T ou A; K=T ou G; Y=C ou T; N= A,T, G ou C. 2- Neste set de primers foi utilizado R= uma mistura equivalente de A e G; W= uma mistura equivalente de T e A; etc. 3- conjunto alternativo de primers caso não seja obtido o sequenciamento

Gene	Nome do primer	Primer direto (5'-3') <sup>1,2</sup>	Nome do primer	Primer reverso (5'-3') <sup>1,2</sup>
<i>nadA</i>	nadA-A1	GTGGACGTACTCGACTACGAAGG	nadA-B2	GAGGCGATTGTCAAACCGTTC
<i>nadA</i>	nadA-1	TATGTAAACAACTTGGTGGGG	nadA-4	TTTCGAGGTGGCGGTTCCGGG
<i>nadA</i>	nadA-2	GAAATAGAAAAGTTAACAACCAAGTT	nadA-5	GTAGCGATATCAGCTTTGATGTC
<i>nadA</i>	nadA-3	GACATCAAAGCTGATATCGCTAC	nadA-6	CTTGGTTGTAACTTTTCTATTC
<i>nadA</i>	nadA-A1	GTGGACGTACTCGACTACGAAGG	nadA-B1	CGAGGCGATTGTCAAACCGTTC
<i>nhbA</i>	nhbA-F	GGCGTTCAGACGGCATATTTTTACA	nhbA-R	GGTTTATCAACTGATGCGGACTTGA
<i>nhbA</i>	nhbA-S2	GCGGACACGCTGTCAAAACC	nhbA-S7 R	AATGCAGTACTTCGCCGTTGT
<i>nhbA</i>	nhbA-S3	GCAAATGCCGGCAATACGC	nhbA-S8	CCTCGACCGTGCAGAACGCC
<i>nhbA</i>	nhbA-S4	GGCGTTCGACGGTCGAGG		
<i>nhbA</i>	nhbA-S5	ATGGGTACGCAAAAATTCAA		

1- Nucleotídeos designados de acordo com a IUPAC: R=A ou G; W= T ou A; K=T ou G; Y=C ou T; N= A,T, G ou C. 2- Neste set de *primers* foi utilizado R= uma mistura equivalente de A e G; W= uma mistura equivalente de T e A; etc.

#### Ciclos utilizados no sequenciamento (reação *Big Dye*)

Nº de Ciclos <sup>1</sup>	Temperatura	Tempo
1	95°C	10s
25	52°C	5s
	60°C	4 min
Nº de Ciclos <sup>2</sup>	Temperatura	Tempo
1	95°C	10s
25	56°C	5s
	60°C	4 min
Nº de Ciclo <sup>3</sup>	Temperatura	Tempo
1	95°C	10s
25	55°C	5s
	60°C	4 min

1- ciclo utilizado para o sequenciamento dos genes do MLST e os genes das proteínas de membrana *porA*, *porB*, *fetA*, e *fhbP*

2- ciclo utilizado na reação *Big Dye* do gene *nadA*. 3- ciclo utilizado na reação *Big Dye* do gene *nhbA*

## ANEXO 10

Relação dos *primers* e parâmetros utilizados na reação de PCR e sequenciamento do operon *capsule null locus (cni)*

Gene	Nome do primer	Primer direto (5'-3')	Nome do primer	Primer reverso (5'-3')	pb
Cni	HC344 F	GGATTGGACGAGCGAGAC	GH26R	GGTCGTCTGAAAGCTTGCCCTTGCTC	400

Ciclos utilizados para a amplificação do *cni*

Nº de Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	10 min
40	94°C	25s
	55°C	40s
	72°C	1 min
1	72°C	5 min

## ANEXO 11

Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz Vice Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde Rede de Plataformas Tecnológicas Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 - Rio de Janeiro		
<b>Sistema de Gestão da Qualidade</b>		
Reação de sequenciamento de DNA e Precipitação	CÓDIGO POP-RPT01A-001	REVISÃO 06
ELABORADOR Aline dos Santos Moreira	REVISOR Renata Almeida de Souza	APROVADOR Marcelo Alves-Ferreira
		DATA 26/06/2012

**Reação de Sequenciamento – RPT1A**

- Distribuir as amostras de DNA, devidamente purificadas, na placa de 96 poços (Applied Biosystems- PN.:N8010560-cx c/10placas), ou em microtubos de 0,2mL. Veja abaixo as concentrações de DNA sugeridas pelo fabricante:

Template	Quantity
PCR product:	
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
>2000bp	40-100 ng
Singe-stranded	50-100 ng
Double-stranded	200-500 ng
Cosmid, BAC	0.5-1.0 ug
Bacterial genomic DNA	2-3 ug

- Adicionar os iniciadores (primers) e água milliQ (quando necessário), totalizando um volume final 7,5 µL por poço (ou por tubo);
- Calcular a mistura para a reação de sequenciamento de DNA, de acordo com o número de amostras. A quantidade necessária para uma placa é de 100 µL de BigDye (Applied Biosystems- PN.:4336917- kit de 100 rçs) e 150 µL de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems – PN:4336699). A placa deve ser coberta com adesivo para placa para PCR ou a tampa de borracha da Axygen (AxyMat - Código CM-96-RD).

Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz Vice Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde Rede de Plataformas Tecnológicas Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 - Rio de Janeiro		
<b>Sistema de Gestão da Qualidade</b>		
Reação de sequenciamento de DNA e Precipitação	CÓDIGO POP-RPT01A-001	REVISÃO 06

- Adicionar 2,5 µL da mistura de reação em cada poço da placa (1ul de BigDye + 1,5 de tp 5x).
- Centrifugar brevemente (spin) a placa.
- No termociclador é utilizado o seguinte protocolo: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos; 40 repetições desse mesmo ciclo. Após a reação de sequenciamento é feita uma precipitação das amostras para retirada de ddNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA no analisador de DNA.

#### Precipitação da Reação de Sequenciamento

Após ciclagem da reação de sequenciamento, os produtos deverão passar pelo processo de precipitação que consiste em:

- Centrifugar brevemente (spin) a placa;
- Adicionar 30 µL (3x volume) de Isopropanol 75% (somente MERCK) em cada poço da placa ou microtubo;
- Vortexar as amostras por 10 segundos;
- Manter a placa em repouso, por 15 minutos, sob abrigo da luz;
- Centrifugar por 45 minutos a 4.000 rpm (no caso de microtubos, a rotação da centrífuga deve estar acima de 13.000 rpm);

Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz Vice Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde Rede de Plataformas Tecnológicas Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 - Rio de Janeiro		
<b>Sistema de Gestão da Qualidade</b>		
Reação de sequenciamento de DNA e Precipitação	CÓDIGO POP-RPT01A-001	REVISÃO 06

- Descartar sobrenadante usando papel-toalha. Verter a placa sobre o papel-toalha e, através de movimentos circulares, apoiada sobre uma bancada, descartar o sobrenadante;
- Adicionar 50 µL (5x volume) de Etanol 75% (MERCK) em cada poço da placa;
- Centrifugar por 15 minutos a 4.000 rpm (no caso de microtubos, a rotação da centrífuga deve estar acima de 13.000 rpm);
- Descartar sobrenadante usando papel-toalha, de acordo como descrito anteriormente;
- Centrifugar a placa invertida ("spin down"), utilizando papel-toalha para absorção do etanol. Deixar chegar até 600 rpm e interromper a centrifugação;
- Colocar a placa em um bloco aquecido a 60°C por 10 minutos, sob abrigo da luz;  
A placa seca pode ser armazenada sob abrigo da luz à -20°C, pelo tempo máximo de 30 dias, aproximadamente.

#### Desnaturação da Reação de Sequenciamento em placa

- Adicionar 10µL de formamida Hi-Di ( Applied Biosystems P/N:4311320) em cada poço da placa seca;
- Centrifugar brevemente;

Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz Vice Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde Rede de Plataformas Tecnológicas Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 - Rio de Janeiro		
<b>Sistema de Gestão da Qualidade</b>		
Reação de sequenciamento de DNA e Precipitação	CÓDIGO POP-RPT01A-001	REVISÃO 06

- Colocar a placa em um bloco aquecido a 95°C por 3 minutos, sob abrigo da luz, e em seguida, colocar imediatamente no gelo por 5 a 10 minutos;
- Centrifugar brevemente para permitir que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços concentrem-se ao fundo.

Levar a placa para eletroforese de capilar (ABI 3730x/ ou ABI3130x/). Caso a placa não seja submetida à eletroforese imediatamente após o processo de desnaturação, as amostras poderão ser armazenadas a 4°C por até 2 dias, ou a -20°C por 20 dias, no máximo.