



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PREVALÊNCIA DE PORTADORES DE *Neisseria meningitidis* EM ESTUDANTES
DE 18 A 24 ANOS DE UM CENTRO UNIVERSITÁRIO EM SALVADOR, BRASIL**

VIVIANE DE MATOS FERREIRA

**Salvador – Bahia
2018**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

**PREVALÊNCIA DE PORTADORES DE *Neisseria meningitidis* EM ESTUDANTES
DE 18 A 24 ANOS DE UM CENTRO UNIVERSITÁRIO EM SALVADOR, BRASIL**

VIVIANE DE MATOS FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Leila Carvalho Campos

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

Salvador – Bahia

2018

PREVALÊNCIA DE PORTADORES DE *Neisseria meningitidis* EM ESTUDANTES
DE 18 A 24 ANOS DE UM CENTRO UNIVERSITÁRIO EM SALVADOR, BRASIL

VIVIANE DE MATOS FERREIRA

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora



Dr. Pablo Ivan Pereira Ramos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Cristiane Wanderley Cardoso
Diretora de Vigilância à Saúde
SMSS



Dra. Soraia Machado Cordeiro
Professora adjunta
UFBA

FONTE DE FINANCIAMENTO

(CNPq)

(Processo No. 407558/2016-0)

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais esta oportunidade de trabalho, pela qual me permitiu exercitar e aprimorar meus conhecimentos, minha paciência, tolerância e autoconfiança.

Aos meus pais, Suely de Matos Ferreira e Nilton José Costa Ferreira, pelo incentivo e apoio em todos os meus planos e por constituírem o meu alicerce de vida.

Aos meus irmãos pela presença fundamental, pelo carinho e por terem acreditado em meus sonhos e terem contribuído de forma intensa para que eu pudesse realizá-los.

A minha adorada Co-orientadora, Dr^a Leila Carvalho Campos, que acreditou em meu potencial e sempre me apoiou em todos os momentos, mostrando de maneira verdadeira meus erros e fraquezas, em prol do meu crescimento. Reconhecendo minhas qualidades, me ensinando e estimulando a buscar sempre mais, sendo um exemplo pelo carinho e preocupação com sua equipe.

Ao meu orientador, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pela motivação e inspiração em me tornar uma profissional dedicada à saúde pública.

Aos meus avós, Verbena Barbosa, Norberto Barbosa, Vandira Ferreira e Nilton Ferreira, que sempre estimularam à procura pelo saber, mostrando que o sacrifício em prol do conhecimento acadêmico contribui para que sejamos pessoas melhores e mais ativas na nossa comunidade.

A meu tio Maurício Costa Ferreira e minha tia Maria do Socorro Reis da Costa Barbosa pelo apoio e incentivo durante minha vida acadêmica.

Ao meu namorado Pablo Ribeiro, companheiro fiel de todas as horas, por depositar todo amor, compreensão, sendo uma das principais fontes de apoio e incentivo.

Às minhas colegas Suzana Ferrer e Vanessa Brito por todo apoio, amizade e por, muitas vezes, terem se sacrificado para que eu pudesse cumprir com minhas responsabilidades acadêmicas.

Ao meu querido amigo Adriano Alcântara que, por diversos momentos, compartilhou comigo as alegrias, preocupações, frustrações, dificuldades e conquistas ao longo da minha vida acadêmica.

Ao meu querido professor Dr. Geraldo Argolo Ferraro que sempre me motivou, apoiou e compartilhou comigo a felicidade das minhas realizações.

Ao professor Dr. Guilherme Sousa Ribeiro, pelo auxílio na concepção do projeto.

Ao nosso grupo de pesquisa, nas pessoas de Ítalo Ferreira, Amélia Nunes, Ana Rafaela Moura, Ellen Pimentel, Lara Macedo, José Neto e Juliana Santos que dividiram comigo o aprendizado, alegrias, frustrações e conquistas dessa etapa tão importante da minha vida.

À minha querida amiga Laise Eduarda Paixão por todo apoio e auxílio durante o desenvolvimento desse trabalho.

À minha querida amiga Carolina Feitosa, que por diversas vezes, apesar de suas atribuições, me auxiliou na análise estatística dos meus resultados, sendo primordial para o desenvolvimento da minha dissertação.

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

Aos meus queridos amigos Galileu Costa, Georgia Taylor, Fernanda Leal, Mariangela L' Episcopia e Joel Barrat por todo apoio e ensinamentos durante minha estadia em Atlanta.

A Cleiton Guimarães e toda a equipe do Laboratório LPBM por proporcionar bons momentos de trabalho e tranquilidade.

À FIOCRUZ, em especial ao Instituto Gonçalo Moniz, pela oportunidade de compor, como discente, o programa de pós graduação de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

À equipe da biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz, pelo auxílio prestado na elaboração da minha dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que viabilizou a realização desta pesquisa.

Aos coordenadores do centro universitário selecionado por colaborar e proporcionar a realização deste estudo.

Aos estudantes que aceitaram voluntariamente participar do estudo, doando seu tempo e compartilhando informações preciosas sobre suas vidas.

E por fim, aos amigos, pelo companheirismo e suporte, e a todos que participaram de forma direta e indireta nesta caminhada.

“O importante é não parar de questionar; a curiosidade tem sua própria razão de existir “.

Albert Einstein

FERREIRA, Viviane de Matos. Prevalência de portadores de *Neisseria meningitidis* em estudantes de 18 a 24 anos de um centro universitário em Salvador, Brasil. 89 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Em 2010, o governo da Bahia introduziu a vacina conjugada meningocócica C (MCC) para crianças <5 anos de idade em consequência do aumento da incidência da doença meningocócica (DM). Em Salvador, houve uma ampliação da campanha para a faixa etária de 10 a 24 anos, pretendendo atingir os indivíduos mais afetados. No final de 2010, o Brasil introduziu a vacina MCC no programa de vacinação de rotina para crianças <5 anos de idade. A investigação do papel dos portadores saudáveis na disseminação da doença meningocócica na comunidade pode contribuir com informações úteis para subsidiar condutas apropriadas de vacinação. **OBJETIVO:** Determinar a prevalência de portadores de *Neisseria meningitidis* (Nm) e caracterizar molecularmente os isolados coletados de adultos jovens em um centro universitário em Salvador, após 6 anos de introdução da MCC. **MATERIAL E MÉTODOS:** Entre agosto e novembro de 2016, foram coletados swabs da orofaringe de 407 estudantes entre 18 e 24 anos. A identificação das cepas de Nm foi realizada a partir de métodos clássicos e qPCR. A caracterização molecular dos isolados foi realizada através do sequenciamento do genoma total (WGS). Foram analisados os principais potenciais fatores de associados a colonização. **RESULTADOS:** A prevalência de portadores foi de 12,3% (50/407). O estado de portador foi associado ao gênero masculino (RP_A: 1,88 IC95% 1,05 - 3,38; $p=0,034$) e a frequência a festas/bares pelo menos uma vez por mês (RP_A: 3,22 95% IC 1,43 - 7,25; $p = 0,005$). Um total de 221 (54,3%) indivíduos relataram terem sido imunizados pela MCC. Não houve diferença na colonização por Nm entre indivíduos vacinados e não vacinados. Dos 50 portadores de Nm, 46 isolados foram identificados pela cultura e 4 foram detectados apenas por qPCR. A maioria dos isolados (92%; 46/50) apresentou-se como não grupável (WGS e qPCR), 6% (3/50) pertenciam ao genogrupo B (WGS) e 2% (1/50) foi classificado como genogrupo C (qPCR). Um total de 58% (29/50) dos isolados apresentaram deleção da cápsula (*cnf*). Foram identificadas 25 sequências tipo (STs), incluindo 19 STs pertencentes a 11 complexos clonais definidos (CCs) e 6 novos STs. O complexo clonal mais frequente foi cc198, representando 26% dos isolados. As variantes PorA e FetA mais predominantes foram P1.18,25-37 (17,4%) e F5-5 (45,7%), respectivamente. Todos os isolados apresentaram proteína PorB classe 3 e FHbp, sendo a subfamília A / v2-3 da FHbp presente em 87% dos isolados. Apenas um isolado possuiu a variante NadA-6.177. Todos os isolados apresentaram NHBA, com p010 e p0912 representando 28,26% e 13,04% dos isolados, respectivamente. **CONCLUSÕES:** Os nossos resultados demonstraram que a colonização por Nm consistiu principalmente de cepas não-agrupáveis com alto grau de diversidade genética. A identificação de apenas um indivíduo colonizado pelo genogrupo C pode ter sido uma consequência da imunização pela MCC em 2010, o que pode ter contribuído para a redução da circulação do sorogrupo C.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*, portador, colonização, vacina, doença meningocócica.

FERREIRA, Viviane de Matos. Prevalence of *Neisseria meningitidis* in students aged 18 to 24 from a university center. 89 f. il. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Oswaldo Cruz Foundation. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: In 2010, the government of Bahia introduced meningococcal C conjugate vaccine (MCC) for children <5 years due to the high incidence of meningococcal disease (DM). In the city of Salvador, a catch-up campaign for individuals 10-24 years of age was also included. At the end of 2010, Brazil introduced the MCC vaccine into the routine immunization program targeting children <5 years-old. Meningococcal carriage studies are important to improve our understanding of disease epidemiology, as well as to support appropriate vaccination strategies. **AIM:** The aim of this study was to determine the prevalence of meningococcal carriage and genotypic characteristics of isolates collected from young adults attending a private college center in Salvador, Brazil after 6 years of introduction of MCC. **MATERIALS AND METHODS:** Between August and November 2016, oropharyngeal swabs were collected from 407 students aged 18-24 years attending a private college in Salvador, Brazil. *N. meningitidis* was identified by standard microbiology methods and qPCR. Genetic characteristics of isolates were assessed by whole genome sequencing (WGS). We also analyzed potential associated factors for carriage. **RESULTS:** The overall meningococcal carriage prevalence was 12.3% (50/407) by culture and PCR. Carriage was associated with male gender ($\text{APR: } 1.88$ 95% CI 1.05 – 3.38; $p=0.034$) and visiting bars or attending parties at least once per month ($\text{APR: } 3.22$ 95%IC 1.43 – 7.25; $p=0,005$). A total of 221 (54.3%) individuals reported having been immunized by MCC. There was no difference in Nm carriage between vaccinated and nonvaccinated individuals. Of the 50 *N. meningitidis* carrier, 46 isolates recovered and 4 were detected only by qPCR, 92% (46/50) were nongroupable by WGS and qPCR, 6% (3/50) were genogrouped as B by WGS and 2% (1/50) were genogrouped C by qPCR. A total of 58% (29/50) of the isolates had capsule null genotype (*cnI*). The isolates were assigned to 25 sequence types (STs), including 19 STs belonging to 11 defined clonal complexes (CCs) and 6 new STs. The most frequent CC was CC198, accounting for 26% of the isolates. The most predominant PorA and FetA types were P1.18,25-37 (17.4%) and F5-5 (45.7%), respectively. All isolates had PorB class 3 protein and a FHbp, with FHbp subfamily A/v2-3 present in 87% of the isolates. Only one isolate harbored NadA-6.177. All isolates contained an intact NhbA, with p010 and p0912 accounting for 28.26% and 13.04% of the isolates, respectively. **CONCLUSIONS:** Our study showed that meningococcal carriage consisted mostly of nongroupable strains with high degree of genetic diversity. The identification of only one genogroup C carrier may have been a consequence of the MCC catch-up campaign in 2010, which may have contributed for reduction of the serogroup C circulation.

Keywords: *Neisseira meningitidis*, carrier colonization, vaccine, meningococcal disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação circular do genoma de <i>Neisseria meningitidis</i>	20
Figura 2. Estrutura celular da membrana externa de <i>N. meningitidis</i> . Adaptado de SADARANGANI; POLLARD, 2010.....	24
Figura 3. Organização genética da cápsula de <i>N. meningitidis</i> dos sorogrupos A, B, C, Y, W e X, e da <i>N. meningitidis</i> que não possuem o <i>locus</i> da cápsula (<i>cps</i>), denominada <i>capsule null (cni)</i> . Adaptado TZENG et al., 2016.....	25
Figura 4. Processo da invasão da <i>N. meningitidis</i> . Adaptado de VAN DE BEEK et. al., 2016.....	27
Figura 5. Ilustração simplificada do papel dos adolescentes na epidemiologia da doença meningocócica, comparado a outros micro-organismos causadores de doença invasiva. Adaptado de VETTER et al., 2016.....	32
Figura 6. Fluxograma das etapas do estudo.....	48
Figura 7. Identificação dos genogrupos de <i>N. meningitidis</i> através do sequenciamento do genoma total (WGS) e pelo PCR em tempo real (qPCR)	64
Figura 8. Alinhamento e comparação do antígeno vacinal FHbp dos isolados com os antígenos das vacinas Bexsero® e Trumenba®.....	66
Figura 9. <i>Status</i> vacinal e situação decolonização dos indivíduos em relação aos genogrupos identificados.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição das variantes da proteína PorA de acordo com os complexos clonais identificados.....	57
Gráfico 2. Distribuição das variantes da proteína PorB de acordo com os complexos clonais identificados.....	58
Gráfico 3. Distribuição das variantes da proteína FetA de acordo com os complexos clonais.....	59
Gráfico 4. Distribuição das variantes da proteína NHBA de acordo com os complexos clonais.....	60
Gráfico 5. Distribuição das variantes da proteína FetA de acordo com os complexos clonais.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos indivíduos que participaram do estudo.....	49
Tabela 2. Prevalência e fatores associados com o estado de portador de <i>Neisseria meningitidis</i> em estudantes de um centro universitário em Salvador, Brasil, 2016.....	52
Tabela 3. Caracterização molecular dos isolados de <i>Neisseria meningitidis</i> de portadores de um centro universitário em Salvador, Bahia, Brasil.....	55
Tabela 4. Análise da estrutura genética da região capsular e identificação dos genogrupos/sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> através do sequenciamento do genoma total, soroglutinação e PCR em tempo real.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro	1.	Esquema quimioprolático indicado para Doença Meningocócica.....	35
---------------	-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4CMenB	Bexsero®
BHI	Caldo infusão cérebro- coração
BIGSdb	Banco de dados de sequências do genoma de isolados bacterianos
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cc	Complexo clonal
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
<i>cnl</i>	Do inglês, <i>capsule null locus</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>cps</i>	Do inglês, <i>capsule biosynthesis</i>
Ct	Do inglês, <i>cycle threshold</i>
CTA	Cisteína triplice Áagar
DM	Doença meningocócica
DNA	Do inglês, <i>desoxiribonucleic acid</i>
FetA	Proteína reguladora de ferro
FHbp	Proteína de ligação ao fator H
HCl	Cloreto de hidrogênio
HiMenC	Vacina para o MenC com <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
IC	Intervalo de confiança
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IS	Do inglês, <i>insertion sequence</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LOS	Lipooligossacarídeo
MATS	Do inglês, <i>Meningococcal antigen typing system</i>
MCC	Vacina meningocócica do sorogrupo C conjugada
MenB	Meningococo sorogrupo B
MenC	Meningococo sorogrupo C
MenNZB	Cepa do meningococo B da Nova Zelândia
NadA	Do inglês, <i>Neisseria surface protein A</i>
NHBA	Antígeno de ligação à heparina
Nm	<i>Neisseria meningitidis</i>

OMV	Vesícula de membrana externa
pb	Pares de bases
PNI	Programa Nacional de Imunização
PorA	Porina A
PorB	Porina B
qPCR	PCR em tempo real
REDCap	Do inglês, <i>Research electronic data capture</i>
RP	Razão de prevalência
RP _A	Razão de prevalência ajustada
<i>sodC</i>	Superóxido dismutase C
ST	Sequência tipo
STGG	<i>Skim milk</i> , triptona, glicose e glicerina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VCNT	Vancomicina, colistina, nistatina e trimetropim
VR	Do inglês, <i>variable region</i>
WGS	Do inglês, <i>whole genome sequencing</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	19
2.1.1 Fatores de virulência e componentes da membrana externa de <i>N. meningitidis</i>	20
2.1.1.1 Lipooligossarídeo - endotoxina (LOS).....	21
2.1.1.2 Principais proteínas de membrana externa da <i>N. meningitidis</i>	21
2.1.1.3 Cápsula polissacarídica.....	23
2.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA	25
2.2.1 Patogênese da Doença Meningocócica	27
2.2.2 Epidemiologia da Doença Meningocócica	28
2.3 O ESTADO DE PORTADOR.....	31
2.4. VACINAS MENINGOCÓCICAS	32
2.5 QUIMIOPROFILAXIA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	37
4.2 COLETA DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E DAS AMOSTRAS	38
4.2.1 Coleta dos dados epidemiológicos	38
4.2.2 Coleta das amostras	38
4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS DE <i>N. meningitidis</i>	39
4.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE <i>N. meningitidis</i>	39
4.4.1 Extração do DNA genômico	40
4.5 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL.....	40
4.6 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO CAPSULAR DAS CEPAS DE <i>N. meningitidis</i>	42
4.7 CONFIRMAÇÃO DOS GENOGRUPOS DE <i>N. meningitidis</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	42
4.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>N. meningitidis</i> A PARTIR DO MEIO DE TRANSPORTE STGG	43

4.8.1 Extração e Purificação do DNA bacteriano	43
4.8.2 Identificação de <i>N. meningitidis</i> através da técnica de PCR em tempo real (qPCR).....	44
4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS	44
4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E COMPORTAMENTAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	46
5.2 PREVALÊNCIA DE COLONIZAÇÃO POR <i>N. meningitidis</i>	50
5.3 FATORES ASSOCIADOS AO ESTADO DE PORTADOR	50
5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE <i>Neisseria meningitidis</i> ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL.....	53
5.4.1 Determinação da sequencias tipo e dos complexos clonais	53
5.4.2 Caracterização das proteínas de membrana externa	53
5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS GENOGRUPOS/SOROGRUPOS DE <i>N. meningitidis</i>	62
5.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GENÉTICA DA REGIÃO CAPSULAR	62
5.7. IDENTIFICAÇÃO DOS GENOGRUPOS A PARTIR DO MEIO DE STGG	64
5.8 ANÁLISE DO STATUS VACINAL DOS INDIVÍDUOS EM RELAÇÃO AOS GENOGRUPOS IDENTIFICADOS.....	65
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE 1	83
APÊNDICE 2	86
ANEXO 1.....	88

1. INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis (Nm) ou meningococo é um agente patogênico, oportunista de distribuição global, que acomete apenas o ser humano e coloniza habitualmente a mucosa do trato respiratório superior sem causar sintoma, fenômeno conhecido como estado de portador assintomático (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012; PICCINI et al., 2016). Apesar da baixa sobrevivência no meio ambiente, o meningococo pode ser transmitido de pessoa a pessoa através de gotículas respiratórias ou pelo contato com secreções de portadores saudáveis ou doentes (ROSENSTEIN et al., 2001).

A doença meningocócica (DM) permanece como um dos principais problemas de saúde pública acometendo 500 mil indivíduos e causando 135 mil mortes por ano no mundo, atingindo tipicamente crianças menores de cinco anos, particularmente lactentes e jovens. Entretanto, durante as epidemias e surtos de DM por cepas emergentes, observa-se um desvio da faixa etária de maior incidência da doença para adolescentes e adultos jovens. No Brasil, a DM é considerada endêmica, exibindo períodos de hiperendemicidade e coeficientes de incidência mais elevados em relação a todo o continente americano, com taxas de letalidade em torno de 20% (SÁFADI et al., 2013; SÁFADI et al., 2014; BORROW et al., 2016).

Alguns fatores podem ser associados ao estado de portador, dentre eles, a idade é considerada um dos mais relevantes, apresentando taxas muito baixas nos primeiros anos de vida, aumentando dramaticamente em adolescentes e atingindo o pico máximo entre 20 e 24 anos (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007). Estudos em portadores de meningococos são essenciais para aprimorar o conhecimento da epidemiologia da doença meningocócica.

Considerando que os estudos de portadores podem fornecer informações sobre a distribuição de sorogrupos e fatores de risco associados à transmissão do patógeno. A investigação do papel dos portadores saudáveis na disseminação da doença na comunidade pode contribuir com informações úteis para subsidiar condutas apropriadas de vacinação (RODRIGUEZ et al., 2014)

Na América Latina, existem poucos estudos sobre a prevalência de Nm em portadores (SÁFADI et al., 2013). No Brasil, destacamos dois estudos recentes. O

primeiro foi realizado em Campinas, em 2012, entre escolares de 11 a 19 anos de idade apresentando uma prevalência de colonização de 9,9% e uma maior frequência de isolamento do sorogrupo C (DE MORAES et al., 2013). O segundo estudo foi realizado entre estudantes de 11 a 19 anos de escolas públicas de Salvador, em 2014, observando uma prevalência de 4,9%, sendo o sorogrupo B o mais frequente (NUNES et al., 2016).

Como a literatura evidencia que o pico de colonização de *N. meningitidis* em adultos jovens ocorre até 24 anos de idade (CHRISTENSEN et al., 2010), este estudo teve com o objetivo incluir indivíduos da faixa etária de 18 a 24 anos a fim de observar a prevalência de colonização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Neisseria meningitidis*

O agente etiológico da doença meningocócica foi identificado pela primeira vez em 1887, por Anton Weichselbaum, no líquido cefalorraquidiano (LCR) de um paciente com meningite, sendo denominado como *Diplococcus intracelulares meningitidis* e, posteriormente como *Neisseria meningitidis* (STEPHENS, 2009; MOHAMMED; ILIYASU; HABIB, 2017).

Integrante da Família Neisseriaceae, onde alguns membros são comensais do trato respiratório humano, o meningococo se destaca por poder ocasionar um amplo espectro de sintomas clínicos, desde uma infecção benigna ao choque séptico (KOYFMAN; TAKAYESU, 2011; PICCINI et al., 2016).

N. meningitidis compõe um grupo de cocos Gram negativos dispostos aos pares com lados adjacentes planos ou côncavos, denominados como diplococo Gram negativo, apresentando um genoma de cerca de 2,1- 2,2 milhões de bases e com aproximadamente 2000 genes (Figura 1) (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). É uma bactéria aeróbia estrita, fastidiosa, com baixa sobrevivência quando fora do seu habitat e pode ser diferenciada através da utilização de carboidratos, no caso a glicose e a maltose, mediante testes bioquímicos que avaliam a metabolização destes carboidratos pela via oxidativa (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012; WHO, 2011).

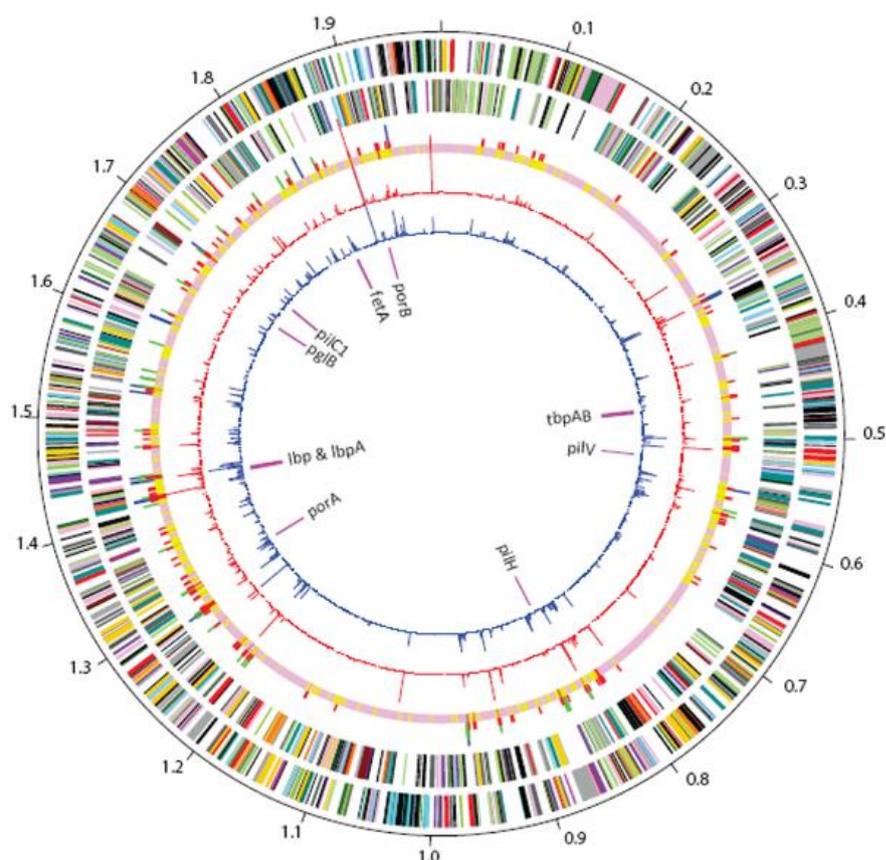


Figura 1. Representação circular do genoma de *Neisseria meningitidis*. Krauland et al., 2012.

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

Diversos fatores podem influenciar o processo de colonização do microrganismo à superfície da mucosa da nasofaringe e a invasão do hospedeiro, dentre eles estão: a cápsula polissacarídica, várias proteínas de membrana externa (porinas PorA e PorB, NadA, NHBA, FHbp e FetA, por exemplo), endotoxinas como o LOS, além de mecanismos genéticos que podem interferir na expressão desses componentes (STEPHENS, 2009; VIRJI, 2009; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

2.1.1.1 Lipooligossacarídeo - endotoxina (LOS)

Estrutura que protege a Nm do sistema imune inato e desempenha papel na aderência do meningococo. O LOS consiste em três compartimentos: lipídio A, um oligossacarídeo central e uma heptose e oligossacarídeos curtos altamente variáveis (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Essa composição auxilia no potencial inflamatório do meningococo, promovendo a sinalização pró-inflamatória, a inibição da capacidade bactericida dos neutrófilos e o aumento da adesão às células humanas (JOHN et al., 2016; JOHN et al., 2017).

2.1.1.2 Principais proteínas de membrana externa da *N. meningitidis*

Diversas proteínas foram identificadas na membrana externa do meningococo, incluindo a proteína porina A (PorA), proteína porina B (PorB), NadA, NHBA, FHbp e FetA, entre outras (Figura 2). Muitas dessas mostraram poder imunogênico, sendo consideradas como componentes candidatos para a confecção de vacinas (PANATTO et al., 2013).

A PorB é caracterizada como poro aniônico e a PorA como poro seletivo. Todos os meningococos expressam PorB de classe 2 ou classe 3 e a grande maioria das cepas de *N. meningitidis* expressa a PorA de classe 1. Essas porinas possuem uma barreira anfipática com sequências de aminoácidos que formam alças, que se projetam da superfície bacteriana para o ambiente circundante (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; FEAVERS; PIZZA, 2009; PANATTO et al., 2013).

A PorA consiste em duas regiões variáveis (VRs), definidas como VR1 e VR2, enquanto as proteínas de classe 2 e 3 são produtos de dois alelos do *locus* do gene exclusivo da PorB. Entretanto, é importante salientar que a alta variabilidade dos antígenos de PorA e PorB dificultam o desenvolvimento de vacinas associadas a essas proteínas (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; FEAVERS; PIZZA, 2009; PANATTO et al., 2013).

A *Neisseria* adesina A ou GNA1994, NadA, é um componente da família de adesinas de um autotransportador trimérico bacteriano, que auxilia a adesão e a

invasão do meningococo na mucosa. Essa proteína apresenta 6 variantes: NadA-1, NadA-2, NadA-3, NadA-4, NadA-5 e NadA-6, sendo que as três primeiras apresentam atividade antibactericida cruzada e as variantes 4 e 5 estão mais associadas a cepas de colonização. Entretanto, a NadA é frequentemente associada a cepas invasivas, sendo imunogênica durante a DM (SERRUTO et al., 2012; GREEN et al., 2018).

A FetA ou FrpB é uma proteína de membrana externa regulada pelo ferro, que apresenta uma possível conformação de barril expondo 13 voltas na superfície da célula. Essa conformação, mas precisamente a quinta alça, exposta à superfície, apresenta uma alta diversidade. No entanto, apesar da diversidade, um número pequeno de variantes FetA pode induzir proteção contra cepas hipervirulentas (FEAVERS; PIZZA, 2009; JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007).

A NHBA (do inglês *Neisserial Heparin Binding Antigen* ou GNA2132) é uma lipoproteína exposta à superfície específica do gênero *Neisseria* que pode desenvolver um papel de proteção de meningococos não grupáveis contra o sistema complemento. Essa resistência à atividade bactericida acontece através da ligação da heparina ao microrganismo causador da DM, inibindo a ativação do sistema complemento (SERRUTO et al., 2012).

A FHbp ou LP2086 é uma lipoproteína que atua como regulador negativo da via alternativa do sistema complemento, sendo caracterizada como importante fator de virulência para a sobrevivência do meningococo no organismo invadido (FEAVERS; PIZZA, 2009; MCNEIL et al., 2018). A FHbp se enquadra em três grupos de variantes ou duas subfamílias: V1 (subfamília B), V2 e V3 (ambas subfamília A) (HOLLINGSHEAD et al., 2018). Além disso, esta proteína é classificada por três sistemas de nomenclatura: identificador numérico Oxford, subfamília Pfizer (A e B) e variante Novartis (RODRIGUES et al., 2018).

Além das proteínas de membrana externa, as cepas de Nm podem ser caracterizadas através da técnica do MLST, analisando a sequência de sete genes constitutivos (*abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*) (MAIDEN et al., 1998), no qual os alelos de cada um dos sete *loci* formam um perfil alélico, também denominado de sequência tipo, do inglês *Sequence Type* (ST) (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

Essa sequência tipo é identificada através de um número arbitrário que corresponde a um tipo eletroforético (ET) (BREHONY; JOLLEY; MAIDEN, 2007). Se um grupo de STs compartilhar até quatro alelos em comum com um ST central,

caracteriza-se um complexo clonal que é então nomeado a partir desse ST central. (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

O grande potencial desses antígenos como novos alvos vacinais levou a mudanças na nomenclatura dos genótipos do meningococo que, de acordo com a designação de cepa recomendada pela Sociedade Europeia de Doença Meningocócica (EMGM), agora incluem o sorogrupo, seguido das duas variantes do gene *porA* e da variante de FetA, além da sequência tipo (ST) e do complexo clonal (cc), como no esquema a seguir: Sorogrupo: PorA (VR1, VR2): FetA: ST (cc) (JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007).

2.1.1.3 Cápsula polissacarídica

N. meningitidis pode ou não ser revestida por uma cápsula de natureza polissacarídica (Figura 2), utilizada na categorização de 12 grupos capsulares ou sorogrupos com base na sua variação antigênica: A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y e Z, (KOYFMAN; TAKAYESU, 2011; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012; KUHDARI et al., 2016).

A cápsula está presente na maioria das cepas invasivas e é o principal fator de virulência do meningococo que, durante o processo de invasão, atua protegendo a bactéria da resposta do sistema imunológico, inibindo a fagocitose e a ativação do sistema complemento. Este fato facilita a sobrevivência da bactéria no ambiente e torna o meningococo mais resistente aos mecanismos de defesa do hospedeiro (VIRJI, 2009; HARRISON et al., 2013).

Além dessa característica, a cápsula pode influenciar na capacidade do meningococo de colonizar as vias respiratórias, pois encobre algumas estruturas responsáveis pela adesão da bactéria às células do trato respiratório (*pili*), facilitando assim, a transmissão do microrganismo (STEPHENS, 2009).

De modo geral, a metodologia empregada para a caracterização dos sorogrupos consiste no método de soroaglutinação/ aglutinação em látex. Entretanto, fatores como baixa concentração de massa bacteriana e subjetividade na interpretação dos resultados podem influenciar os resultados obtidos (WHO, 2011). Deste modo, métodos de biologia molecular tais como reação da cadeia de

polimerase(PCR), PCR em tempo real e o sequenciamento do genoma completo (WGS) podem ser empregados para a identificação do tipo capsular.

Os genes da cápsula, responsáveis pela caracterização dos sorogrupos, são localizados em um único *locus* chamado de *locus* de síntese polissacarídeo capsular (*cps*) e é dividido em três regiões: A, B e C (Figura 3), as quais são envolvidas na biossíntese de polissacarídeos e na translocação da superfície celular. Os genes na região A codificam enzimas para a biossíntese e polimerização do polissacarídeo capsular e os genes nas regiões B e C contém genes associados a translocação dos polissacarídeos de alto peso molecular para a superfície celular (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012; HARRISON et al., 2013; TZENG et al., 2016).

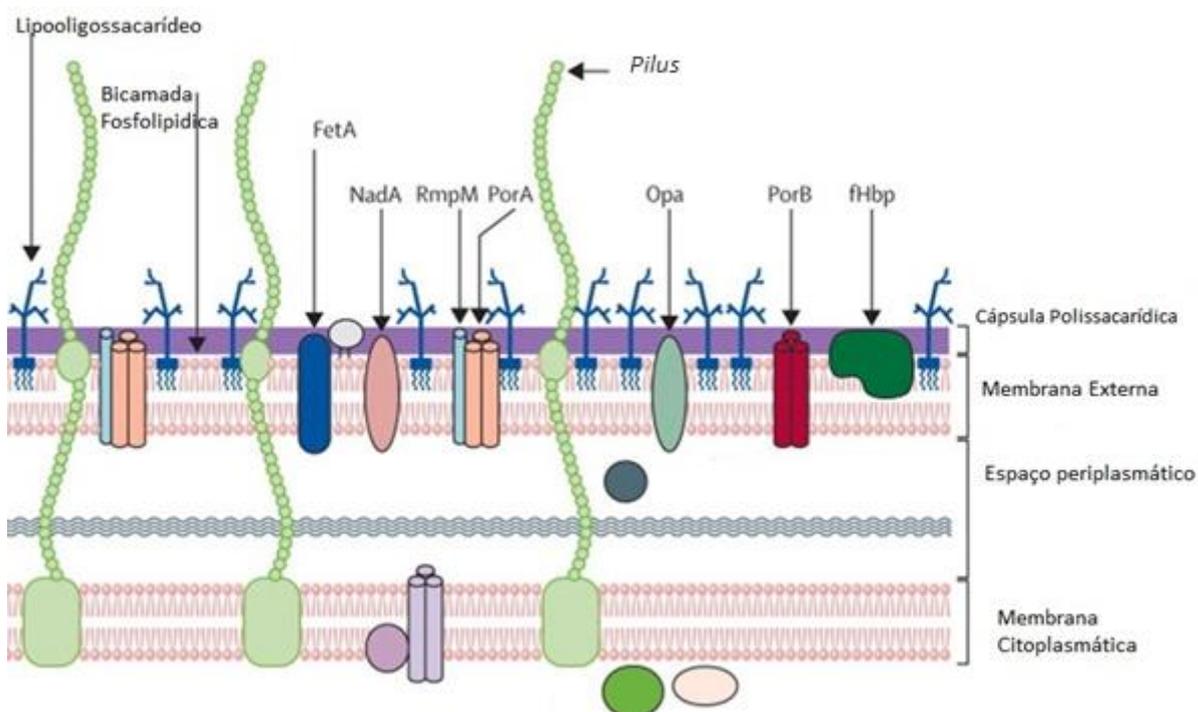


Figura 2 . Estrutura celular da membrana externa de *N. meningitidis*. Adaptado de SADARANGANI; POLLARD, 2010.

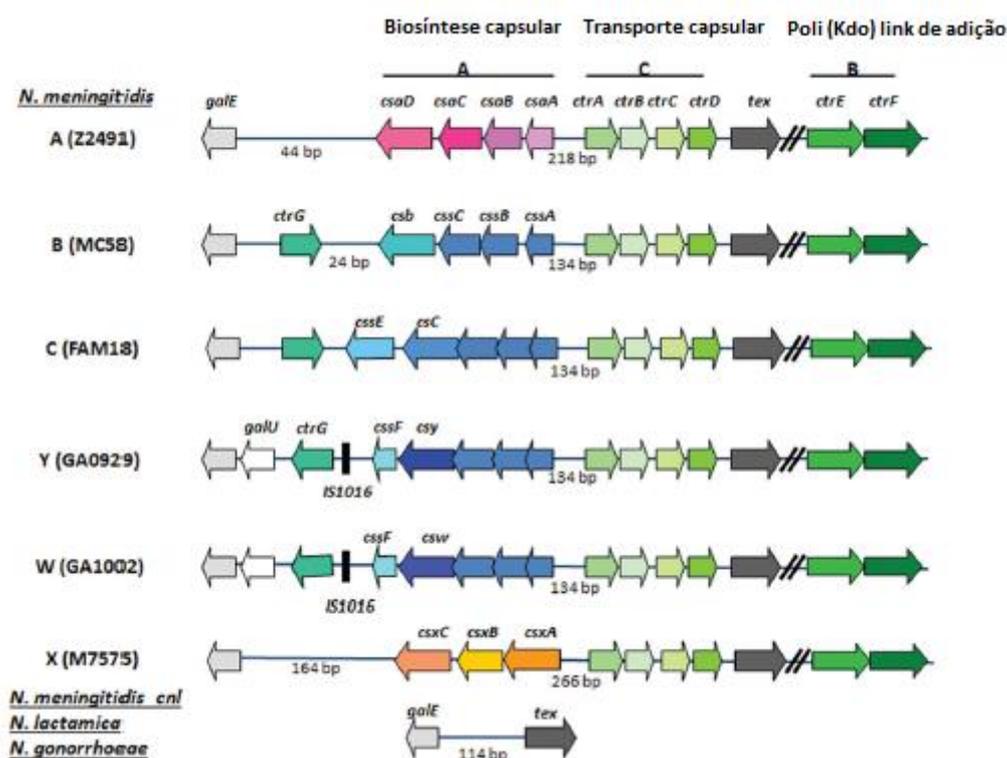


Figura 3. Organização genética da cápsula de *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B, C, Y, W e X, e da *N. meningitidis* que não possui o locus da cápsula (*cps*), denominada *capsule null (cni)*. Adaptado TZENG et al., 2016.

Estudos indicam que uma alta porcentagem das cepas de *N. meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos são denominadas como não-capsuladas ou não grupáveis (NG) (HARRISON et al., 2015; BARNES et al., 2017). Isto pode ocorrer devido a uma regulação da expressão da cápsula (variação de fase), ao bloqueio dos genes envolvidos na sua expressão (presença de “stop codon” ou de elemento de inserção) ou à ausência destes, que são substituídos por uma região não codificante denominada “*capsule null locus (cni)*” (CLAUS et al., 2002; MOTHERSHED et al., 2004; GASPARINI et al., 2014; TZENG et al., 2016).

2.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA

A doença meningocócica (DM) foi descrita pela primeira vez por Vieusseux, em 1805, durante um surto na Suíça que ocasionou 33 mortes. A doença é uma

patologia potencialmente fatal que atinge anualmente 500 mil indivíduos e causa 135 mil mortes de pessoas por ano no mundo (MOHAMMED, ILIYASU, HABIB, 2017). Apresenta uma mortalidade de aproximadamente 10% em países desenvolvidos e de 20% em países em desenvolvimento (PICCINI et al., 2016; BORROW et al., 2016; ATAEE et al., 2016; MOHAMMED, ILIYASU, HABIB, 2017).

A DM pode afetar pessoas em qualquer faixa etária, entretanto, os indivíduos mais atingidos são as crianças menores de 5 anos e em casos de surtos, os adolescentes e adultos jovens (CAUGANT; MAIDEN, 2009; KOYFMAN; TAKAYESU, 2011). A doença exibe um amplo espectro clínico, podendo se apresentar como meningite, meningococemia ou ambos, manifestando os sintomas clássicos como dor de cabeça, febre e rigidez do pescoço, assim como, em alguns casos, sintomas atípicos como dor de garganta e sintomas gastrointestinais (BRANCOL; AMORETTI; TASKER, 2007; KOYFMAN; TAKAYESU, 2011; ATAEE et al., 2016; CAMPBELL et al., 2016).

Na primeira década do século XX, antes do desenvolvimento do tratamento e das medidas de prevenção, a doença apresentava uma taxa de letalidade entre 75-85% dos casos (DE SOUZA; SEGURO, 2008). Os avanços com o tratamento e das medidas de prevenção contribuíram para uma redução do índice de letalidade, para aproximadamente 10-15 %, que se manteve estabilizada ao longo dos anos (BORROW et al., 2016). Contudo, nas formas grave da doença, esta continua progredindo para o óbito rapidamente mantendo as taxas de morbidade e de mortalidade entre 10% e 20% (BRANCOL; AMORETTI; TASKER, 2007; BORROW et al., 2016).

Os sobreviventes de DM podem desenvolver sequelas, tais como, surdez, danos cerebrais, amputações de membros, perda de audição e deficiência visual (PICCINI et al., 2016; ATAEE et al., 2016). Essas complicações demonstram a importância do diagnóstico e tratamento precoce da doença. De um modo geral, o processo de identificação da DM é considerado complexo devido ao aparecimento em alguns casos de sinais e sintomas incomuns ou semelhantes a infecções menos graves, como dor de garganta e sintomas gastrointestinais (BRANCOL; AMORETTI; TASKER, 2007; CAMPBELL et al., 2016). Essas sintomatologias não específicas são mais frequentes em crianças mais jovens, o que dificulta ainda mais o diagnóstico em indivíduos nessa faixa etária (PICCINI et al., 2016).

2.2.1 Patogênese da Doença Meningocócica

Os seres humanos são os únicos hospedeiros do meningococo e a transmissão ocorre de pessoa a pessoa através de secreções respiratórias ou contato com secreções de portadores saudáveis ou doentes (GABUTTI, STEFANATI, KUHDARI, 2015; VETTER et al., 2016). Esse microrganismo coloniza a nasofaringe aderindo-se à superfície da mucosa, podendo permanecer por dias, semanas ou meses, o que pode auxiliar a proteção contra futuras infecções invasivas. No entanto, essa interação, na maioria das vezes, não é danosa para o portador devido as adaptações que o meningococo desenvolveu para sobreviver na mucosa nasofaríngea (CRUMCIANFLONE; SULLIVAN, 2016; GIANCACCCHI et al., 2017).

Em raros momentos, o meningococo pode atravessar o epitélio da nasofaringe e invadir a corrente sanguínea causando septicemia e/ou a barreira hematoencefálica, atingindo as meninges (Figura 4) (KOYFMAN; TAKAYESU, 2011; VAN DE BEEK et. al., 2016; GIANCACCCHI et al., 2017).

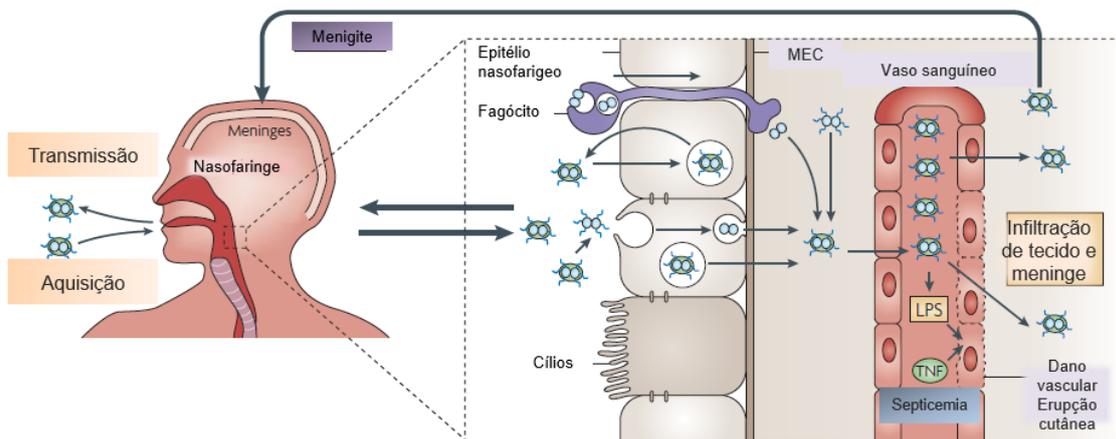


Figura 4. Processo de invasão da *N. meningitidis*. Adaptado de VAN DE BEEK et. al., 2016.

A invasão das meninges acontece quando a resposta imunológica não foi suficiente para evitar a ocorrência da doença meningocócica. Esta resposta inadequada pode proporcionar a disseminação bacteriana normalmente associada a vários fatores de virulência do meningococo, dentre eles a presença da cápsula (GABUTTI; STEFANATI; KUHDARI, 2015; GIANCACCCHI et al., 2017).

2.2.2 Epidemiologia da Doença Meningocócica

O perfil epidemiológico da doença meningocócica possui uma variação regional quanto a sua incidência e ao sorogrupo relatado. Entretanto, seis sorogrupos (A, B, C, W, X e Y) são responsáveis por ocasionar a maior porcentagem dos casos da DM no mundo (TROTTER; MAIDEN, 2009; BORROW et al., 2016). Alguns grupos específicos possuem maior probabilidade de desenvolver a doença, tais como os lactantes, adolescentes, pessoas com asplenia, com deficiência do sistema complemento e aqueles indivíduos que vivem em ambientes com aglomeração de pessoas, como por exemplo, em dormitórios de faculdades (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016).

A DM apresenta taxas de incidência que variam de 1 a 1000 casos por 100.000 indivíduos em diferentes partes do mundo (CAUGANT; MAIDEN, 2009; CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016) e pode ser classificada como uma patologia endêmica, porém com baixa incidência global, apresentando picos sazonais e pequenos aglomerados de casos da doença (CAUGANT; MAIDEN, 2009; BORROW et al., 2016).

Devido à epidemiologia dinâmica da DM, a distribuição global pode ser modificada ao longo dos anos. Na região subsaariana africana, conhecida como “cinturão da meningite”, que compreende do leste da Etiópia ao oeste do Senegal, a DM provocava periodicamente epidemias frequentes do sorogrupo A do complexo clonal ST5, com incidência entre 1000 -1200 casos por 100.000 habitantes, e, atualmente, dos sorogrupos C (ST-10217), W (ST11) e X (ST181) (ABIO; NEAL; BECK, 2013; KRISTIANSEN; JORGENSEN; CAUGANT,2015; BORROW et al., 2017).. Não obstante, em países industrializados, durante o período da Segunda Guerra Mundial, também ocorreram surtos desse sorogrupo (ABIO; NEAL; BECK,

2013; STEFANELLI; REZZA, 2016). Atualmente, os sorogrupos B e C são as causas comuns de surtos nos países industrializados, possuindo um pico na incidência durante a infância, depois na adolescência e, em alguns estudos, foi relatado um aumento da incidência entre os indivíduos maiores do que 65 anos de idade (GABUTTI; STEFANATI; KUHDARI, 2015; STEFANELLI; REZZA, 2016; VETTER et al., 2016).

No continente europeu, Austrália e na América do Norte, casos esporádicos da doença invasiva são relatados, causados pelos sorogrupos B (cc41/44, cc269, cc213 e cc32), seguido por C e Y, porém com baixa incidência (CAUGANT; MAIDEN, 2009; BORROW et al., 2016; PICCINI et al., 2016). Na Europa, o sorogrupo B predomina, seguido pelo sorogrupo C nos países sem programa de vacinação para o sorogrupo específico. Na Escandinávia prevalece o sorogrupo Y. Além disso, na Inglaterra e no país de Gales, surtos associados ao sorogrupo W associado ao cc11 mostram crescente tendência devido à peregrinação do Hajj (SÁFADI et al., 2013; LADHANI et al., 2015; CAMPBELL et al., 2016; VETTER et al., 2016).

Nos Estados Unidos, os sorogrupos B (cc32), C e Y (cc23) são responsáveis por cerca de um terço dos casos reportados (COHN et al., 2013; STEFANELLI; REZZA, 2016), observando-se uma redução na incidência global da DM, com uma incidência estimada de 0,14 por 100.000 habitantes em 2014 (VETTER et al., 2016).

Na América Latina, embora a notificação seja obrigatória, a incidência da doença é subestimada na maioria dos países. Atualmente, o sorogrupo B associado aos complexos clonais cc32 e cc41/44, e o sorogrupo C aos complexos clonais cc103 e cc11 são dominantes, contudo, foi possível observar o aumento da incidência do sorogrupo W (cc11) nessa região, particularmente nos países do Cone Sul (Argentina, Chile e Uruguai) e no Brasil (SÁFADI et al., 2013; SÁFADI et al., 2015a; GENTILE et al., 2017; CORDEIRO et al., 2018; RODRIGUES; MAIDEN, 2018).

A distribuição dos sorogrupos na América Latina é extremamente variável apresentando incidências de <0,1 casos por 100 000 habitantes em países como a Bolívia, Cuba, México, Paraguai e Peru e quase 2 casos por 100.000 habitantes no Brasil (SÁFADI et al., 2015a; GENTILE et al., 2017). Além disto, é importante salientar que os dados são muito limitados na região andina, no México e na América Central (SÁFADI et al., 2015a).

No Brasil, a epidemiologia da DM sofreu variações ao longo dos anos. Entre o primeiro caso relatado em 1906 e o final da década de 60, a maioria dos casos

estava relacionada ao sorogrupo A. A partir de 1971, foi possível observar, além do sorogrupo A (complexo clonal ST-5/subgrupo III), a associação do sorogrupo C aos casos de DM no país. Entretanto, a partir de 1980, observou-se uma frequência crescente do tipo capsular B, tornando-o mais prevalente, porém com circulação simultânea com o sorogrupo C associado (DE MORAES; BARATA, 2005; SÁFADI; BEREZIN; OSELKA, 2012).

A partir de 2002, houve uma mudança significativa na frequência dos sorogrupos B e C, notando-se o sorogrupo C como o tipo capsular mais prevalente. Desde 2000, o sorogrupo C associado ao complexo clonal ST-103 (cc103) tem contribuído para a maioria dos surtos de DM no país (DE LEMOS et al., 2007; ANDRADE et al., 2017; CORDEIRO et al., 2018). Esse aumento da frequência do sorogrupo C, agregado aos diversos surtos do cc103, levou à introdução da vacina conjugada contra o meningococo do sorogrupo C, em 2010, (MCC) no Programa Nacional de Imunização (PNI) para crianças com idade inferior a 2 anos. O Brasil foi o primeiro país da América Latina a apresentar essa rotina no calendário vacinal, incluindo três doses: uma aos 3 meses, outra aos 5 meses e um reforço aos 12-15 meses de idade (SÁFADI; BEREZIN; OSELKA, 2012; SÁFADI et al., 2015a; CARDOSO et al., 2015; ANDRADE et al., 2017).

Na Bahia, entre 2007 e 2009, houve um aumento significativo do número de casos da DM, iniciando um surto da doença meningocócica na cidade de Salvador, quarta cidade mais populosa do Brasil, em 2008, com o pico da epidemia em 2010 (CARDOSO et al., 2015; CORDEIRO et al., 2018; MACEDO et al., 2018).

Com a finalidade de combater essa epidemia, o governo estadual introduziu a MCC para crianças menores de 5 anos antes da introdução nacional pelo PNI. Entretanto, a incidência permaneceu elevada entre crianças em uma faixa etária maior e em adolescentes. Em decorrência disso, houve uma ampliação gradual da campanha para os indivíduos entre 10 a 24 anos, pretendendo atingir as faixas etárias mais afetadas. Como consequência, foi possível obter o controle da incidência do sorogrupo C (CARDOSO et al., 2015).

Em 2017, o Ministério da Saúde através do PNI atualizou o esquema vacinal, incluindo uma dose de reforço da MCC para adolescentes entre 12 a 13 anos com o propósito de ampliar gradativamente a faixa etária até incluir crianças e adolescentes de 9 a 13 anos. Essa proposta tem o intuito de atingir uma meta de cobertura vacinal

de 80% até 2020, podendo proporcionar uma proteção direta e indireta (no casos dos não vacinados) para a população (BRASIL, 2017).

A implementação de campanhas de vacinação aliada à introdução de vacinas mais eficazes contra diferentes tipos capsulares com maior capacidade imunogênica, tem contribuído para mudanças na epidemiologia da DM (STEFANELLI; REZZA, 2016; VAN DE BEEK et al., 2016; RODRIGUES; MAIDEN, 2018).

2.3 O ESTADO DE PORTADOR

Os seres humanos são os únicos reservatórios reconhecidos de *N. meningitidis*. Esse microrganismo geralmente proporciona uma relação de comensalismo no trato respiratório superior dos humanos, mais precisamente na nasofaringe (PICCINI et al., 2016; KUHDARI et al., 2016).

Estudos demonstram relação direta entre o estado de portador e a idade, proporcionando uma baixa prevalência nos primeiros anos de vida e uma elevada taxa em adolescente e adultos jovens (CHRISTENSEN et al., 2010). Ao contrário do que acontece em relação a outras bactérias causadoras de doença invasiva, tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo *b*, os adolescentes e adultos jovens são considerados os reservatórios e principais transmissores de *N. meningitidis* para outros grupos etários (Figura 5)(VETTER et al., 2016).

Estima-se uma prevalência de 10% de portadores assintomáticos na população, podendo variar entre 3 a 25 % a depender das características da população estudada (CHRISTENSEN et al., 2010; GIOGIA et al., 2015; CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016; KUHDARI et al., 2016; GIANCACCCHI et al., 2017).

Fatores como exposição à fumaça, infecções respiratórias virais ou bacterianas, *status* socioeconômico e condições de aglomeração, como alojamento em quartéis e estudantes universitários podem favorecer o estado de portador do meningococo (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016; KUHDARI et al., 2016; ATAEE et al., 2016).



Figura 5. Ilustração simplificada do papel dos adolescentes na epidemiologia da doença meningocócica, comparado a outros microrganismos causadores de doença invasiva. Adaptado de VETTER et al., 2016.

2.4.VACINAS MENINGOCÓCICAS

Em 1960, Gotschlich e colaboradores desenvolveram uma metodologia que possibilitou a confecção de vacinas a partir de antígenos polissacarídicos, sendo um grande passo para o controle da DM. As vacinas polissacarídicas baseiam sua ação na reação imunogênica do hospedeiro a antígenos capsulares derivados de meningococos e seus respectivos sorogrupos. A apresentação desse tipo vacinal inclui a forma bivalente (A e C), trivalente (A, C e W) e quadrivalente (A, C, W e Y) (NADEL, 2012; SÁFADI et al., 2015b; YEZLI et al., 2016).

Atualmente, as vacinas polissacarídicas disponíveis são limitadas na indução de memória imunológica, possuem baixa imunogenicidade em crianças menores de 2 anos, podem ocasionar tolerância imunogênica, com acentuada depleção na resposta imune após doses repetidas, além de não apresentarem eficácia na prevenção de portadores e na promoção da proteção de rebanho (NADEL, 2012; SÁFADI et al., 2015b; CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016). Esse fato impede a utilização rotineira desse tipo de vacina, sendo indicada apenas para grupos de alto risco ou na presença de surtos ou epidemias (SÁFADI; BARROS, 2006). Contudo,

devido as deficiências descritas, as vacinas polissacarídicas foram substituídas pelas vacinas polissacarídicas conjugadas em diversos países.

As vacinas meningocócicas conjugadas baseiam-se na conjugação de polissacarídeos com proteínas carreadoras (toxina diftérica mutante atóxica – CRM197- ou toxóide tetânico). Essa associação altera a resposta antipolissacarídica para uma resposta T dependente, proporcionando melhor resposta em crianças menores de 2 anos, memória imunológica e proteção contra a colonização. Dentre elas existem as vacinas monovalentes (A ou C) e quadrivalentes (A, C, W e Y), além da combinação da vacina para o tipo capsular C com *Haemophilus influenzae* tipo b (HibMenC) (SÁFADI; BARROS, 2006; YEZLI et al., 2016).

No final da década de 90, o licenciamento das vacinas meningocócicas C conjugadas (MCC) representou um enorme avanço no controle da DM causada pelo tipo capsular C. Diferentes programas de imunização de rotina foram utilizadas em diversos países da Europa, no Canadá e na Austrália, tendo como consequência uma redução significativa da incidência da doença causada pelo sorogrupo C. Este fato foi associado à capacidade da MCC proporcionar proteção direta contra a doença aos vacinados e indireta aos não vacinados (proteção de rebanho) (BORROW et al., 2017)

No Brasil, conforme já foi mencionado, a MCC foi introduzida em 2010 fazendo parte do programa de vacinação nacional, contemplando os menores de dois anos de idade e, atualmente, adolescentes de 12 a 13 anos de idade (BRASIL, 2017).

O terceiro tipo de vacina meningocócica foi desenvolvida devido à semelhança estrutural da cápsula do meningococo B com estruturas neuronais humanas e a baixa imunogenicidade associada ao polissacarídeo (DONALD et al., 2017). Essa vacina é denominada como vacina recombinante e emprega proteínas de membrana externa do meningococo como a proteína de ligação do fator H (FHbp) (DONALD et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018).

A primeira vacina para o sorogrupo B foi derivada de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* e utilizada apenas para epidemias causadas por cepas definidas pelo sorogrupo-específicas. No entanto, essa vacina foi incapaz de fornecer uma ampla proteção devido à diversidade das cepas responsáveis pela DM, sugerindo a necessidade de vacinas alternativas. A partir de 2013, duas vacinas foram licenciadas: 1) 4CMenB (Bexsero; GlaxoSmithKline, Brentford, Reino Unido) para crianças a partir dos 2 meses de idade na Europa e posteriormente no Chile, Canadá, Austrália e EUA; 2) e a vacina da lipoproteína recombinante bivalente

rLP2086 (Trumenba; Pfizer, Nova York, NY, EUA) para pessoas entre 10 e 25 anos nos Estados Unidos (GASPARINI et al., 2015; DONALD et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018; VUOCOLO et al., 2018).

Ambas as vacinas são constituídas de proteínas de membranas externa, sendo a 4CMenB composta de múltiplas proteínas: proteína de ligação ao fator H (FHbp; variante v1.1); antígeno de ligação à heparina de *Neisseria* (NHBA; variante 2); *Neisseria adhesin A* (NadA-3); e PorA P1.4 da OMV de uma cepa da Nova Zelândia (MeNZB). A vacina lipoproteína recombinante bivalente, rLP2086, é composta por duas variantes representativas de FHbp, 1 da subfamília A (A05/ v3.45) e 1 subfamília B (B01/ v1.55) (GASPARINI et al., 2015; HOLLINGSHEAD et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018). É importante salientar que a imunização com uma FHbp específica induz proteção cruzada contra cepas que expressam o mesmo grupo variante, embora possa haver proteção cruzada entre os grupos variante FHbp 2 e 3 (subfamília A) (HOLLINGSHEAD et al., 2018).

Em maio de 2015, a 4CMenB foi licenciada no Brasil, sendo a primeira vacina contra o meningococo B no país, indicada para indivíduos de 2 meses até 50 anos (SÁFADI et al., 2017).

2.5 QUIMIOPROFILAXIA

A DM pode ser transmitida de pessoa para pessoa através de secreções respiratórias de portadores assintomáticos ou doentes. Entretanto, em casos de surto, o risco de colonização e infecção pode ser de 500 a 800 vezes maior nos indivíduos contactantes dos casos da DM do que na população em geral (BRASIL, 2017).

Nesse contexto, a quimioprofilaxia com antibióticos é recomendada rotineiramente para os contactantes de indivíduos com suspeita ou diagnosticados com a doença meningocócica, com intuito de interromper a propagação da doença (BRASIL, 2017; VAN DE BEEK et al, 2016; MCNAMARA et al., 2018).

O risco do desenvolvimento da DM nos contatos próximos é aumentado durante os primeiros dias após o início da doença, por isso é necessário que a quimioprofilaxia seja administrada rapidamente independente do *status* vacinal (BRASIL, 2017).

Diretrizes da saúde pública de vários países diferem em suas recomendações de quimioprofilaxia para o controle de surtos, sendo indicados antibióticos como a rifampicina, ceftriaxona e ciprofloxacina (BRASIL, 2017, MCNAMARA et al., 2018).

No Brasil, a recomendação inicial é o uso da rifampicina até 48 horas após a exposição, considerando os aspectos de patogenicidade da doença. Entretanto, esse antibiótico tem o uso restrito para evitar a seleção de cepas resistentes, além de ter contra indicação para gestantes, por não existir evidências sobre a ocorrência ou não de possíveis efeitos teratogênicos. Nesses casos, é indicado o uso da ceftriaxona ou da ciprofloxacina (Quadro 1) (BRASIL, 2017).

Quadro 1. Esquema quimioprofilático indicado para Doença Meningocócica.

Droga	Idade	Dose	Intervalo	Duração
Rifampicina	< 1 mês	5mg/kg/dose	12 em 12 horas	2 dias
	Criança ≥ 1 mês e adultos	10mg/kg/dose (máximo de 600mg)	12 em 12 horas	
Ceftriaxona	< 12 anos	125 mg; intramuscular	Dose única	
	≥ 12 anos	250 mg; intramuscular		
Ciproflaxacino	>18 anos	500 mg; uso oral	Dose única	

Fonte: Adaptado BRASIL, 2017.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a prevalência de portadores saudáveis da *Neisseria meningitidis* em estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade de um centro universitário da cidade de Salvador, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as taxas de colonização em universitários saudáveis por cepas genogrupáveis e não-genogrupáveis de *N. meningitidis*;
- Analisar a prevalência da colonização por *N. meningitidis* de acordo com os fatores de associação .
- Determinar a sequencia tipo e o complexo clonal das cepas de *N. meningitidis*;
- Caracterizar as proteínas externas de membrana (PorA, PorB e FetA), os antígenos da vacina contra o sorogrupo B (FHbp, NadA e NhbA) e o tipo capsular das cepas de *N. meningitidis* isoladas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Um estudo de corte transversal foi conduzido em uma amostra de estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade, residentes na cidade de Salvador, Bahia. O período de coleta das amostras e dos dados epidemiológicos foi de 27 de agosto a 16 de novembro de 2016. Os participantes do estudo foram estudantes matriculados em um centro universitário da rede privada da cidade de Salvador, Bahia.

O tamanho da amostra necessária para o estudo foi calculado em 456 participantes, com base na estimativa hipotética de prevalência de colonização por *N. meningitidis* de 4,9% (a mesma prevalência obtida em um estudo realizado recentemente em escolares de Salvador, Bahia, com estudantes de 11 a 19 anos de idade da rede pública municipal e estadual de ensino) (NUNES et al., 2016), com precisão de +/-2% para uma confiança de 95%.

Inicialmente foi solicitado a secretaria geral da graduação a lista de todos os alunos matriculados para o segundo período letivo de 2016. Do universo de 2712 alunos matriculados, foram selecionados aleatoriamente 1.000 participantes, através de um programa de computação gerador de números aleatórios (<https://www.invertexto.com/numeros-aleatorios>), levando-se em consideração a não elegibilidade e a não aceitação em participar do estudo por alguns universitários.

Como critérios de inclusão do estudo, os universitários deveriam estar matriculados na Instituição selecionada e pertencer a faixa etária de 18 a 24 anos. Aqueles participantes que apresentassem sintomas de qualquer doença infecciosa no momento do recrutamento/coleta não foram incluídos do estudo.

4.2 COLETA DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E DAS AMOSTRAS

4.2.1 Coleta dos dados epidemiológicos

Após a assinatura do Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1), os participantes foram entrevistados para a coleta de dados demográficos (sexo, idade, cor da pele e escolaridade da mãe), sociais (número de pessoas que residem no mesmo local e quantidade de cômodos utilizados para dormir por residência) e comportamentais (como frequência a festas e exposição a fumaça do cigarro) (Apêndice 2).

4.2.2 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de um abaixador de língua para que o *swab* de Rayon pudesse ser pressionado e rolado sobre a mucosa da parte posterior da orofaringe dos participantes. O material foi semeado imediatamente em meio ágar chocolate PolyVitex VCAT3 (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France), meio descrito por Thayer e Martin modificado com VCNT (vancomicina, colistina, nistatina e trimetoprim) (THAYER; MARTIN, 1966) e transportados até o laboratório em uma jarra com vela, em temperatura ambiente, no período máximo de 4 horas. Cada amostra foi devidamente etiquetada de acordo com o código de identificação do participante.

Após a semeadura em meio específico, o *swab* foi introduzido em um tubo plástico (capacidade de 2,0 mL), com tampa de rosca, contendo o 1,0 mL do meio de transporte STGG (Skim Milk, triptona, glicose, glicerina). Sua haste foi cortada com uma tesoura de forma que a ponta contendo a parte do algodão ficasse totalmente submersa no meio de transporte.

O tubo de transporte identificado com o código de identificação do participante foi mantido em caixa térmica (4-8°C) com gelo, acondicionado adequadamente segundo as normas de biossegurança, para garantir a viabilidade das amostras até o encaminhamento ao Instituto Gonçalo Moniz (IGM). No laboratório, as placas

semeadas foram incubadas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de CO_2 a 5% e os tubos de STGG foram acondicionados a -70°C para futura análise.

4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS DE *N. meningitidis*

As colônias crescidas no meio ágar chocolate PolyVitex VCAT3 (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France) que apresentavam características morfológicas correspondentes ao gênero *Neisseria* foram subcultivadas em ágar Columbia enriquecido com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France) para obtenção de culturas puras.

As colônias isoladas foram avaliadas microscopicamente quanto a sua característica morfotintorial através da coloração de Gram e apenas os isolados que se apresentaram como diplococos Gram negativos foram submetidos ao teste da oxidase e prova dos açúcares através do meio CTA (Cysteine Triplice Agar) (Becton Dickinson and Company, BD, EUA) (WHO, 2011).

As cepas identificadas como *N. meningitidis* foram conservadas e congeladas a -70°C em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) (Becton Dickinson and Company, BD, EUA) acrescido de 20% de glicerol.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *N. meningitidis*

A caracterização molecular das cepas de *N. meningitidis* isoladas foi realizada mediante sequenciamento do genoma total (WGS), realizado no Laboratório de Meningite, do Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), Atlanta, EUA, sob a coordenação da Dr^a. Xin Wang.

4.4.1 Extração do DNA genômico

As cepas de *N. meningitidis* armazenadas em BHI foram reativadas, plaqueando 10 µL da suspensão bacteriana em ágar triptona soja enriquecido com 5% de sangue carneiro (Becton Dickinson and Company, BD, EUA) e mantida a 37±2°C, em estufa de CO₂ a 5%, por 18-24 horas. Em seguida, com o auxílio de swabs estéreis, o crescimento bacteriano foi removido da placa e resuspenso em tubos de 1,5mL contendo 1mL de Tris-HCl (10mM; pH=7,5). Essas suspensões foram então centrifugadas por 5 minutos a 13.000 -16.000 x g para a formação de pellets. O sobrenadante foi descartado de modo que todo o resíduo do tampão Tris-HCl fosse removido.

Para cada tubo foram adicionados 828µl do tampão de lise celular Master Mix composto 800µl de tampão de lise (Prepito Cyto Pure Kit CMG-2034, PerkinElmer, Waltham, EUA), 20 µl proteinase K (Prepito Cyto Pure Kit CMG-2034, PerkinElmer, Waltham, EUA) e 8µl de RNase A (QIAGEN, Valencia, California, EUA). Em seguida as amostras foram incubadas em uma placa agitadora a 250 rpm a 56°C por 30 minutos.

Após esta etapa, as amostras foram novamente incubadas a 80°C por 5 minutos para garantir a inativação da bactéria. Posteriormente, as bactérias lisadas foram transferidas para uma placa contendo 96 poços que foi inserida no Chemagic Prepito®-D para a extração automatizada do DNA.

Após a extração, a concentração do DNA extraído foi avaliada pelo Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) e a qualidade foi analisada através do Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) no qual deveria apresentar uma relação A260/280 entre 1,8 – 2,1.

4.5 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL

O DNA extraído foi fragmentado através do sonicador Covaris M220 Focused-ultrasonicator™ (BioLogics Inc. Manassas, Virginia, EUA), seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante para um volume de 50µl e para a obtenção de fragmentos de DNA de até 550 pares de bases (pb).

Para a construção da biblioteca genômica, 50µl do DNA fragmentado foi transferido para uma placa de 96 poços da estação de trabalho Zephyr® G3 NGS Workstation (PerkinElmer, Massachusetts, EUA), onde foram eliminados os fragmentos de DNA com o tamanho diferente ao previamente selecionado. Após esse procedimento, foram utilizados os kits NEBNext® Ultra™ DNA library e NEBNext® Multiplex Oligo (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) para o Illumina®, seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante.

Para a avaliação do controle de qualidade da biblioteca genômica preparada, foi realizada a determinação da concentração do DNA através do Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) e do tamanho dos fragmentos do DNA através do Agilent 2200 TapeStation (Santa Clara, Califórnia, EUA), sendo considerado adequados, fragmentos de DNA entre 500-800 bp.

Os resultados do Qubit foram utilizados para o cálculo de diluição de cada biblioteca com Tris a 10mM, resultando em uma concentração final de 4nM. Após esse procedimentos, 5µl de cada biblioteca foi misturada as demais amostras formando um *pool*.

O sequenciamento da biblioteca foi efetuado na plataforma Illumina MiSeq (kit v2 500 ciclos PE, San Diego, CA).

As leituras do Illumina foram avaliadas através do Trim Galore versão 0.3.7 (Babraham Bioinformática, Cambridge, Reino Unido) para remover as leituras abaixo de Q28, 100 pb e com uma taxa de erro de 0,03. Essa leituras foram então mapeadas através do Bowtie versão 2.1.0 e para a identificação de erros de base e *indels* foi utilizado o Freebayes versão 0.9.16 (<https://github.com/ekg/freebayes>) com qualidade de base > 20, contagem alternada > 20 e cobertura > 100 (KRETZ et al., 2016).

Após a análise do sequenciamento, foram identificados os alelos de tipificação de seqüências multilocus (MLST) com base em uma pesquisa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), em comparação com as listas de alelos PubMLST. Para isto foi utilizado o banco de dados de seqüências do genoma de isolados bacterianos (BIGSdb) (<http://pubmlst.org/software/database/bigfdb/>).

As seqüências de proteínas foram igualmente tipificadas de acordo com a coleção de seqüências do PubMLST, classificando as proteínas de membrana externa (FetA, PorA e PorB) de acordo com suas respectivas regiões variáveis. A proteína NadA foi categorizada pela convenção de variante e identificador de peptídeos da Novartis. NhbA foi denominada através do identificador de peptídeo PubMLST e a

proteína FHbp foi categorizada pelo identificador de peptídeo PubMLST, de acordo com o identificador do peptídeo Pfizer/ variante Novartis (A/v2-3 e B/v1) e o identificador numérico Oxford (KRETZ et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018).

Os antígenos vacinais FHbp encontrados nas cepas de portadores foram avaliados quanto à similaridade frente aos três peptídeos FHbp presentes na vacinas Bexsero® (FHbp1) (SERRUTO et al., 2012) e Trumenba® (FHbp 45 e FHbp 55) (JIANG et al., 2010.). Para isso foi utilizado o programa CLC Genomics Workbench 11.0.

4.6 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO CAPSULAR DAS CEPAS DE *N. meningitidis*

Os isolados identificados como *N. meningitidis* e que apresentaram a deleção do *locus* capsular (*cnI*) mediante sequenciamento do genoma total, tiveram a expressão capsular confirmada pelo teste de soroadglutinação em lâmina, empregando-se antissoros para os sorogrupos A, B, C, E, W, X e Y (BD DIFCO; Franklin Lakes, NJ; Thermo Scientific Remerl; Waltham, MA). Foram denominados como não grupáveis os isolados que apresentaram autoaglutinação ou que não aglutinaram frente aos anti-soros empregados.

4.7 CONFIRMAÇÃO DOS GENOGRUPOS DE *N. meningitidis* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

As cepas que apresentaram alguma estrutura associada ao *locus* capsular dos sorogrupos A, B, C, W, X e Y através do WGS foram submetidas ao qPCR, no qual foram utilizados *primers* e sondas fluorescentes para os genes *sacB* (MenA), *siaD* (MenB), *siaD* (MenC), *synG* (MenW), *xcbB* (MenX) e *synF* (MenY), para a caracterização dos genogrupos de *N. meningitidis* (Anexo 1).

Para cada reação de PCR em tempo real (qPCR) (Agilent Stratagene Mx3005P® Real-Time PCR Systems, Califónia, EUA) foram utilizados os seguintes componentes: 12,5µl de PCR Master Mix (2X Quanta PerfeCTa ToughMix, Low

ROX®); 2,0µl (concentração final de 0,4 µM) de cada conjunto de *primer* direto, reverso e da sonda (Anexo 1); 4,5µL de água de PCR e 2µL do DNA molde para completar 25µL (volume final da reação). Em paralelo, para cada reação, foi utilizado um volume de 2µL água para PCR para completar um total de 25µL sem adição do DNA molde, como controle negativo. Cepas padrão de *N. meningitidis* foram empregadas como controles positivos (*N.meningitidis* sorogrupo W ATCC 35559, *N.meningitidis* sorogrupo A ATCC13077, *N.meningitidis* sorogrupo B ATCC13090, *N.meningitidis* sorogrupo C ATCC13102, *N.meningitidis* sorogrupo X ATCC35560, *N.meningitidis* sorogrupo Y ATCC 35561)

As reações foram realizadas em Mx3005P® Real-Time PCR Systems (Agilent Stratagene, Califórnia, EUA), com o seguinte ciclo: 1) 50°C por 2 minutos; 2) 95°C por 10 minutos; 3) 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (50 ciclos).

Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um Ct (*cycle threshold*) ≤ 35 (DOLAN THOMAS et al., 2011). Para aqueles que apresentaram um valor de Ct entre >35 e ≤40 foram realizadas diluições de 1:4 e 1:10 em água para PCR, para minimizar os potenciais inibidores, repetindo-se em seguida a reação. Os valores com Ct acima de 35 foram considerados negativos (DOLAN THOMAS et al., 2011).

4.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *N. meningitidis* A PARTIR DO MEIO DE TRANSPORTE STGG

4.8.1 Extração e Purificação do DNA bacteriano

Um total de 200µl do STGG previamente congelado a -70°C foi utilizado para a extração e purificação do DNA bacteriano, empregando-se o kit QIAmp DNA miniKit (QIAGEN, Valencia, California, EUA), seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante.

4.8.2 Identificação de *N. meningitidis* através da técnica de PCR em tempo real (qPCR)

Para esta etapa foram utilizados *primers* e sondas fluorescentes para o gene *sodC* (superóxido dismutase C), de acordo com a metodologia descrita por DolanThomas e colaboradores (2011).

Para cada reação de PCR em tempo real (qPCR) (Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems, Califórnia, EUA) foram utilizados os seguintes componentes: 12,5µl de GoTaq ®G2 Hot Start Green MasterMix (Promega); 0,5µL (concentração final de 0,4 µM) de cada conjunto de *primer* direto e reverso (Quadro 1); 7,5µL de água de PCR e mais o DNA molde e água deionizada esterilizada em quantidade suficiente para completar 25 µL (volume final da reação). Em paralelo, para cada reação, foi utilizado um volume total de 25µL sem adição do DNA molde, como controle negativo. Cepas padrão de *N. meningitidis* foram empregadas como controles positivos.

As reações foram realizadas no termociclador em tempo real 7500 (AppliedBiosystems®, Califórnia, EUA), empregando-se os mesmos padrões de amplificação descritos no item 4.7.

Foram considerados os mesmos parâmetros de positividade, negatividade e presença de inibidores da PCR mencionados no item 4.7

As amostras em STGG que foram positivas para o gene *sodC* e negativas na cultura, foram submetidas à caracterização dos genogrupos de *N. meningitidis* através da qPCR, nas mesmas condições.

4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

As informações obtidas nos questionários físicos foram duplamente digitadas, validadas e organizadas, empregando-se o programa REDCap (Research Electronic Data Capture). Posteriormente, as análises foram realizadas com o auxílio do sistema de análise estatística STATA versão12 (College Station, Texas).

A prevalência de portadores de *N. meningitidis* foi calculada no total, por sexo, idade (categorizada em três faixas etárias), raça /cor/, nível educacional dos participantes (categorizada em quatro grupos e posteriormente dicotomizada),

aglomeração (razão de pessoas por comôdo na residencia), frequência a festas e possíveis fatores associados. As razões de prevalência (RP) foram calculadas com os respectivos intervalos de confiança (95%). Análise bivariada foi realizada para determinar possíveis associações com o estado de portador, , calculado pelo Chi-quadrado. Para estimar a razão de prevalência (RP), ajustando por possíveis variáveis de confusão, a análise multivariada foi realizada, utilizando a regressão de Poisson, inserindo no modelo de ajuste todas as variáveis que associaram-se estatisticamente com o desfecho nas análises bivariadas. ou aquelas descritas previamente na literatura como fortemente associadas ao estado de portador (CHRISTENSEN et al., 2010; CAUGANT;TZANAKAKI; KRIZ, 2007; NUNES et al., 2016) Para todas as análises, considerou-se um nível de significância $\leq 0,05$.

O *status* vacinal dos participantes foi analisado em relação aos genogrupos de *N. meningitidis* identificados.

4. 10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia (CAAE 54392116.3.0000.0040) e foi conduzido de acordo com as Normas e Resoluções que norteiam a pesquisa envolvendo seres humanos, em especial a resolução CNS 466/2012.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E COMPORTAMENTAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

De um total de 1000 alunos selecionadas aleatoriamente, 711 foram elegíveis, pois apresentavam a idade entre 18 e 24 anos e eram residentes na cidade de Salvador. Entretanto, apenas 407 universitários (57,2%) aceitaram participar do estudo e tiveram amostras de orofaringe coletadas (Figura 5).

Após a categorização dos grupos etários foi possível observar que 31,2% ($n=127$) dos participantes pertenciam a faixa etária de 18-19 anos; 38,3% ($n=156$) a faixa etária de 20-21 anos e 30,5% ($n=124$) a faixa etária de 22-24 anos, sendo a maioria do sexo feminino ($n=300$; 73,7%). Em relação a raça/cor auto referida, 181 (44,5%) indivíduos se consideravam pardos, 162 (39,8%) brancos, 44 (10,8%) pretos e 20 (4,9%) se declararam amarelos, indígenas ou não souberam informar a sua cor/raça. Quanto ao nível educacional da mãe, os participantes informaram que 64,6% ($n=263$) das mães apresentavam nível superior completo, 24,3% ($n=99$) apresentavam ensino médio completo, enquanto apenas 3,2% ($n=13$) apresentavam menos do que o ensino fundamental e 1,7% ($n=7$) não souberam informar o nível de escolaridade da mãe (Tabela 1).

Foi possível observar que 245 participantes (60,2%) possuíam entre três a quatro moradores em suas residências e 53,6% dos participantes ($n=218$) relataram ter entre três e quatro residentes por cômodo. Em relação à imunização contra o meningococo C (MenC), 54,3% ($n=221$) dos estudantes relataram terem sido vacinados há mais de cinco anos, através da carteira de vacinação (37/221; 16,7%) e/ou informação oral (184/221; 83,3%). Um total de 32 (7,9%) participantes não foram imunizados e 154 (37,8%) não souberam informar se haviam sido vacinados contra MenC.

Quanto à exposição a fumaça de cigarro, 355 (87,2%) universitários afirmaram não serem expostos, enquanto 16 (3,9%) e 43 (10,6%) afirmaram,

respectivamente, serem fumantes ou serem expostos ao fumo de maneira passiva. Em relação à frequência a festas/bares, 267 (65,6%) dos universitários afirmaram frequentar esses tipos de eventos, com frequência de uma a duas vezes ao mês ($n=170$; 63,9%) e três a quatro vezes ao mês ($n=76$; 28,6%). Apenas 20 estudantes (7,5%) afirmaram frequentar festas/bares mais de cinco vezes ao mês (Tabela 1).

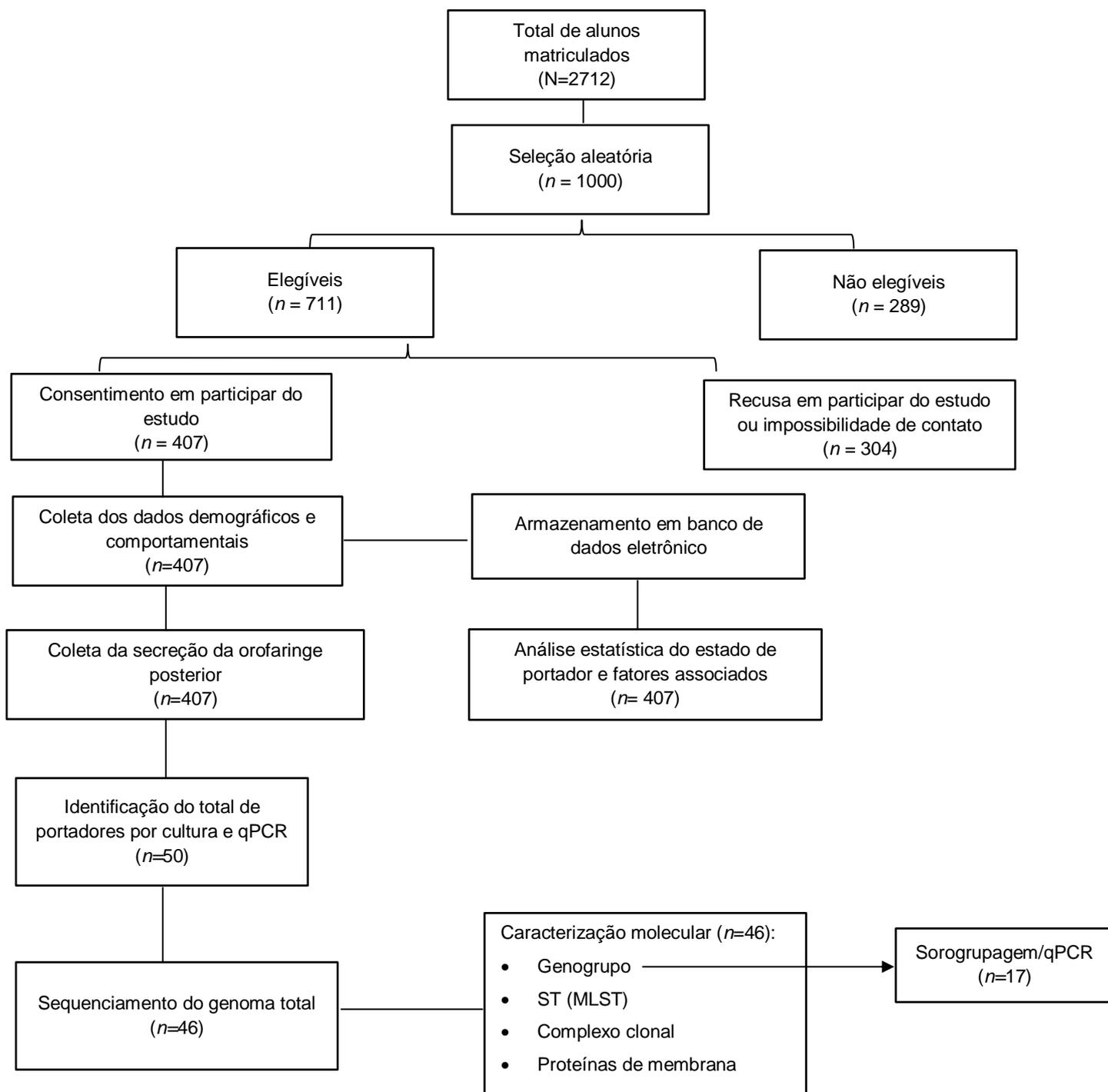


Figura 6. Fluxograma das etapas do estudo.

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos estudantes que participaram do estudo.

Características	Nº (%)
Gênero feminino	300 (73,7)
Grupo etário, anos	
18 – 19	127 (31,2)
20 – 21	156 (38,3)
22 – 24	124 (30,5)
Cor da pele auto referida	
Branco	162 (39,8)
Preto	44 (10,8)
Pardo	181 (44,5)
Outros	20 (4,9)
Duração da residência em Salvador	
<1 ano	18 (4,4)
1 a 2 anos	32 (7,9)
2 a 5 anos	53 (13,0)
>5 anos	284 (69,8)
Não informado	20 (4,9)
Nível educacional da mãe	
Menos do que o ensino fundamental	13 (3,2)
Ensino médio completo	99 (24,3)
Mais do que o ensino médio	25 (6,1)
Nível superior completo	263 (64,6)
Não sabe informar	7 (1,7)
Número de moradores por casa	
1 – 2	107 (26,3)
3 – 4	245 (60,2)
≥ 5	55 (13,5)
Número de residentes por cômodo	
1 – 2	177 (43,5)
3 – 4	218 (53,6)
≥ 5	11 (2,7)
Não informado	1 (0,25)
Vacinação por MenC	
Não	32 (7,9)
Sim	221 (54,3)
Não soube informar	154 (37,8)
Exposição a fumaça de cigarro*	
Não	355 (87,2)
O participante é fumante	16 (3,9)
O pai é fumante	17 (4,2)
A mãe é fumante	16 (3,9)
O irmão ou a irmã é fumante	1 (0,3)
Exposição por outro indivíduo	9 (2,2)
Frequenta festas/bares	
Não	139 (34,1)
Sim	267 (65,6)
Não informado	1 (0,3)
Frequência a festas/bares por mês[§]	
1 a 2 vezes por mês	170 (63,9)
3 a 4 vezes por mês	76 (28,6)
≥ 5 vezes por mês	20 (7,5)

* Em relação a exposição à fumaça de cigarro, sete participantes informaram mais de um meio de exposição à fumaça de cigarro.

§ Um participante não soube informar a frequência a festas/bares.

5.2 PREVALÊNCIA DE COLONIZAÇÃO POR *N. meningitidis*

De um total de 407 indivíduos que participaram do estudo, 50 apresentaram-se como portadores de *N. meningitidis*, com uma prevalência de 12,3% (IC 95%: 9,1%-15,5%). Entre os 50 positivos para colonização por *N. meningitidis*, 46 amostras foram positivas na cultura e 4 foram positivas apenas pelo qPCR a partir do STGG.

5.3 FATORES ASSOCIADOS AO ESTADO DE PORTADOR

A prevalência de portadores de *N. meningitidis* foi duas vezes superior em indivíduos do sexo masculino (RP: 2,03 95% IC 1,21 – 3,40; $p= 0,0071$; RP_A : 1,88 95% IC 1,05 – 3,38; $p=0,034$) (Tabela 2). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos etários, apesar da faixa etária de 22 a 24 anos apresentar uma razão de prevalência de 1,46, mostrando uma maior frequência de portadores nessa categoria (16,1%). Quanto ao nível de escolaridade da mãe, os indivíduos que informaram que as mães possuíam um nível educacional superior ao segundo grau apresentaram prevalência 36% menor em relação aos participantes cujas as mães possuíam nível educacional até o segundo grau (RP: 0,64 95% IC 0,33 – 1,24; $p= 0,18$) (Tabela 2).

Observa-se uma diferença de quase 40% na frequência de colonização nos indivíduos vacinados e naqueles que não souberam informar o *status* vacinal, quando comparados aos indivíduos não vacinados. No entanto, vale ressaltar que essas associações não foram estatisticamente significantes (RP: 0,63 95% IC 0,28 – 1,41; $p= 0,27$; RP_A : 0,62 95% IC 0,27 – 1,45; $p= 0,28$, respectivamente).

Quanto ao contato prévio com indivíduos diagnosticados com meningite bacteriana, o estudo demonstrou que esse tipo de exposição aumentou em mais de duas vezes a prevalência de colonização por *Neisseria meningitidis* do que os indivíduos que informaram não terem sido expostos (RP: 2,69 95%IC 1,15 – 6,30, $p= 0,0341$; RP_A : 2,00 95%IC 0,69 – 5,18, $p= 0,200$), entretanto essa associação não apresentou significância estatística (Tabela 2).

A frequência a festas/bares por pelo menos uma vez ao mês aumentou em aproximadamente 3 vezes a prevalência de colonização pelo meningococo (RP=3,19 95%IC 1,47 – 6,92; $p=0,0013$; RP_A : 3,22 95%IC 1,43 – 7,25; $p=0,005$).

O presente estudo não identificou uma associação positiva para colonização por Nm entre as variáveis aglomeração (razão entre o número de pessoas por cômodo da mesma residência), exposição à fumaça do cigarro e presença de sintomas de gripe nos últimos 15 dias (RP: 0,88 95%IC 0,52 – 1,47; $p=0,62$; RP: 0,76 95%IC 0,32 – 1,82; $p=0,52$; RP: 0,92 95%IC 0,51 – 1,69; $p=0,81$, respectivamente) (Tabela 2).

Não foi possível calcular a RP da variável uso de antibiótico porque nenhum indivíduo que informou o uso do medicamento obteve um resultado positivo para a colonização.

Tabela 2. Prevalência e fatores associados com o estado de portador de *Neisseria meningitidis* em estudantes de um centro universitário em Salvador, Brasil, 2016.

	% (n/N)	RP	IC 95%	Valor de p	RP _A	IC 95%	Valor de p
Sexo							
Feminino	9,7 (29/300)	Ref.					
Masculino	19,6 (21/107)	2,03	1,21-3,40	0,0071	1,88	1,05 – 3,38	0,034
Idade							
18 - 19	11,3 (14/127)	Ref.					
20 - 21	10,3 (16/156)	0,93	0,47 – 1,75	0,87	1,0	0,47 – 2,09	0,992
22 – 24	16,1 (20/124)	1,46	0,77- 2,76	0,24	1,66	0,78 – 3,52	0,191
Nível educacional da mãe[§]							
Até o 2º grau	8,9 (10/112)	Ref.					
Superior ao 2º grau	13,9 (40/288)	0,64.	0,33 – 1,24	0,18	0,66	0,31 – 1,39	0,271
Aglomeracão*[‡]							
≤ 1 morador por cômodo	13,2(24/182)	Ref.					
>1 morador por cômodo	11,6(26/225)	0,88	0,52 – 1,47	0,62	0,85	0,48 – 1,51	0,590
Exposição a fumaça do cigarro							
Não	12,3 (45/355)	Ref.					
Sim	9,6 (5/52)	0,76	0,32 – 1,82	0,53	0,74	0,29 – 1,89	0,531
Frequência a festas/bares ≥ 1 vez por mês[€]							
Não	5,0 (7/139)	Ref.					
Sim	16,1(43/267)	3,19	1,47 – 6,92	0,0013	3,22	1,43 – 7,25	0,005
Vacinação contra MenC							
Não	18,8 (6/32)	Ref.					
Sim	11,8 (26/221)	0,63	0,28 – 1,41	0,27	0,68	0,27 – 1,65	0,383
Não soube informar	11,7 (18/154)	0,62	0,27 – 1,45	0,28	0,72	0,28 – 1,88	0,503
Contato com alguém com meningite?							
Não	12,4 (42/340)	Ref.					
Sim	33,3 (4/12)	2,69	1,15 – 6,30	0,0341	2,00	0,69 – 5,81	0,200
Não sabe	7,2 (4/55)	0,59	0,21 – 1,58	0,28	0,66	0,23 – 1,88	0,433
Apresentou sintomas de gripe nos últimos 15 dias?[‡]							
Não	12,3 (36/291)	Ref.					
Sim	11,5 (13/113)	0,92	0,51 – 1,69	0,81	0,97	0,51 – 1,85	0,931

§Sete participantes não souberam informar o nível de escolaridade das mães; *Um participante não soube informar quantos cômodos eram utilizados para dormir; [‡] Variável= nº de moradores por casa/nº de residentes por cômodo; [€]Um participante não soube informar; [‡]Três participantes não souberam informar. Legenda: RP= razão de prevalência; RP_A= razão de prevalência ajustada; IC= intervalo de confiança.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *Neisseria meningitidis* ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL

5.4.1 Determinação da sequências tipo e dos complexos clonais

Através do sequenciamento do genoma total, realizado para as 46 amostras de *N. meningitidis* disponíveis, foi possível a identificação de 25 sequências tipo (ST), das quais seis foram consideradas novas. Essas sequências foram agrupadas em 11 complexos clonais (Tabela 3).

O complexo clonal mais frequente foi o cc198, seguido pelo cc1136 representando 26,1% ($n=12$) e 17,4% ($n=8$) do total de isolados, respectivamente. Todos os isolados pertencentes aos complexos clonais cc198 e cc1136 apresentaram deleção dos genes da cápsula, sendo caracterizados como *cnI* (Tabela 3).

Também foram encontrados complexos clonais de linhagens hiperinvasivas como o cc41/44 ($n=4$; 8,7%) e o cc269 ($n=1$; 2,2%). Dentre estes, apenas um isolado pertencia ao genogrupo B (cc41/44; $n=1$) e os outros isolados foram classificados como não grupáveis (Tabela 3).

5.4.2 Caracterização das proteínas de membrana externa

No que se refere à caracterização molecular das proteínas de membrana externa das 46 cepas de *N. meningitidis*, foram identificadas 27 variantes de PorA (P1.VR1, VR2). Deste total, foram encontradas 18 variantes VR1 e 23 variantes VR2, sendo que 6,5% ($n=3$) dos isolados apresentaram uma nova variante da VR1. O peptídeo VR2 estava ausente em 8,7% ($n=4$) dos isolados identificados, sendo um classificado como uma nova variante para PorA [NG:Novo:F5-5:ST 7129 (cc não determinado)]. Além disso, quatro isolados (8,7%) apresentaram uma nova variante VR2. O subtipo P1.18,25-37 ($n=8$; 17,4%) foi o mais prevalente (Gráfico 1), sendo associado ao cc198.

Em relação as variantes de PorB, todos os isolados apresentaram proteínas de classe 3, com prevalência da PorB 3-84 ($n=15$; 32,61%) e PorB 3-671 ($n=6$; 13,04%). Além disto, cinco novas variantes foram identificadas (Gráfico 2).

Foram encontradas 15 variantes de FetA, sendo F5-5 ($n=21$; 45,7%) e F4-66 ($n=5$; 10,87%) as mais predominates. O cc198 foi o complexo clonal mais associado à variante F5-5 (Gráfico 3).

Apenas um isolado (NG:P1.12-6,13-13:F5-5:ST7129: cc não determinado) apresentou variante para o NadA (NadA – 6.177) (Tabela 3), enquanto os demais apresentaram NHBA (Tabela 3 e Gráfico 4). Foram identificadas 21 subvariantes NHBA, sendo a subvariante 10 ($n=13$; 28,26%) e a subvariante 912 ($n=6$; 13,04%) as mais predominates.

Também foi possível observar que 87% ($n=40$) dos isolados pertenciam à subfamília A/v2-3 e 13 % ($n=6$) à subfamília B/v1 da FHbp (Gráfico 5), segundo a nomenclatura da subfamília Pfizer e variante Novartis, respectivamente. De acordo com a nomenclatura da Oxford, foram encontrados 17 identificadores numéricos, sendo o 627 ($n=8$; 17,4%), o 4 ($n=9$; 19,6%) e 94 ($n=8$; 17,4%) os mais prevalentes (Tabela 3). O cc198 e o cc1136 foram os complexos clonais mais associados à subfamília FHbp A/v2-3, entretanto, não houve prevalência entre os complexos clonais em relação à subfamília B/v1 (Tabela 3; Gráfico 5).

Entre as 46 cepas de *N. meningitidis* analisadas através do WGS não foi identificada nenhuma das variantes antigênicas que compõem as vacinas 4CMenB (FHbp1.1; NadA-3; NHBA 2 e PorA P1.4) e Trumenba (FHbp45 e Fhbp55). Por outro lado, foi realizada uma análise de similaridade com as variantes de FHbp presentes nas duas vacinas. Com relação à variante FHbp1, foram identificadas duas variantes com similaridade >95%. Dez variantes apresentaram similaridade superior a 83% com a variante FHbp45, sendo que três apresentaram um percentual de similaridade superior a 94%. Por fim, oito variantes mostraram um percentual >86% de similaridade com a FHbp55 (Figura 8).

De acordo com a designação de cepa recomendada pela Sociedade Europeia de Doença Meningocócica (EMGM), foram identificados 42 padrões genotípicos, entre os quais os padrões NG:P1.5-1,10-62:F1-5:ST409 (cc41/44) ($n=2$; 4,35%) e NG:P1.18,25-37:F5-5:ST823 (cc198) ($n=3$; 6,52%) foram os mais prevalentes. Entre os clones invasivos, foram identificados os seguintes genótipos: B:P1.22-1,14:F5-2:ST437 (cc41/44), B:P1.20,23:F1-4:ST3200 (cc4821) e B:P1.19,15-1:F1-7:ST11827 (cc35)

Tabela 3. Caracterização molecular das 46 cepas de *N. meningitidis*.

Tipo capsular	Número de isolados	Complexo Clonal	ST	PorA	PorB	FetA	FHbp		NHbA	NadA
							Subfamília/variante	Oxford		
B	1	CC41/44	437	P1.22-1,14	3-1	F5-2	A/v2-3	19	p0001	-
	1	CC4821	3200	P1.20,23	3-229	F1-5	A/v2-3	16	p0669	-
	1	CC35	11827	P1.19,15-1	3-45	F1-7	A/v2-3	24	p0021	-
NG[£]	1	CC41/44	437	P1.22-1,14	Novo	F5-2	A/v2-3	19	p0001	-
	1	Nd*	13102	Novo	3-64	F5-7	A/v2-3	22	Novo	-
	1	Nd	13103	P1.18-1, [§]	3-38	F5-7	A/v2-3	16	p0101	-
	1	CC269	269	P1.19-1,15	3-25	F5-1	B/v1	15	p0021	-
	1	Nd	5953	P1.18-1,30-1	3-64	F5-7	B/v1	456	p0601	-
	1	Nd	13104	P1.21,4	3-16	F3-9	A/v2-3	21	p0053	-
	1	CC750	2160	P1.22,1	Novo	F5-7	A/v2-3	16	p0239	-
	1	CC254	10220	Novo	Novo	F3-9	B/v1	Novo-BLAST [†]	p0145	-
	1	CC865	3327	P1.7,30	3-106	F5-8	A/v2-3	499	p0024	-
	2	CC41/44	409	P1.5-1,10-62	3-82	F1-5	A/v2-3	19	p0010	-
	1	Nd	1572	P1.7-12,14	3-1	F1-7	B/v1	260	p0020	-
	1	Nd	6119	P1.18-4,25	3-64	F5-81	A/v2-3	Novo-BLAST [#]	p1172	-
	1	CC1157	1157	P1.21-7,16	3-81	F5-36	B/v1	13	p0114	-
cnl[*]	1	CC1136	1136	P1.18-1, [§]	3-84	F4-66	A/v2-3	94	Novo	-
	1	Nd	7129	Novo	3-671	F5-5	A/v2-3	627	p0912	-
	1	CC198	3876	P1.22,14	3-84	F5-5	B/v1	4	p0010	-
	1	Nd	11312	P1.22-1,1	3-730	F5-5	B/v1	544	Novo	-
	1	CC1136	1136	P1.18-1,3	3-640	F4-66	A/v2-3	94	Novo	-
	1	CC198	823	P1.18,25-37	3-286	F5-5	A/v2-3	499	p0010	-
	1	Nd	7129	P1.12-6,13-70	3-671	F5-5	A/v2-3	627	p0912	-

Tipo capsular	Número de isolados	Complexo Clonal	ST	PorA	PorB	FetA	FHbp		NHbA	NadA
							Subfamília/Variante	Oxford		
<i>cnl</i> [‡]	1	CC1136	1136	P1.18-1,3	3-84	F4-66	A/v2-3	94	Novo	-
	1	Nd	7129	P1.12-6,13-13	3-671	F5-5	A/v2-3	627	p0912	NadA-6.177
	1	Nd	7129	Novo	3-671	F5-5	A/v2-3	627	Novo	-
	1	CC198	823	P1.18,25-37	3-84	F5-5	B/v1	4	p0010	-
	1	CC1136	13105	P1.19-2,15	3-84	F1-225	A/v2-3	94	Novo	-
	1	Nd	7129	P1.12-6,13-70	3-671	F5-5	A/v2-3	627	p0912	-
	1	CC1136	13106	Novo	3-84	F4-66	A/v2-3	94	Novo	-
	1	CC198	823	P1.18,25-37	3-84	F5-5	B/v1	4	p0010	-
	1	Nd	7129	Novo	Novo	F5-5	A/v2-3	627	Novo	-
	1	Nd	13107	P1.12-6, [§]	3-671	F5-5	A/v2-3	627	p0912	-
	3	CC198	823	P1.18,25-37	3-84	F5-5	B/v1	4	p0010	-
	1	CC198	823	P1.12-6,13-70	3-84	F5-5	A/v2-3	499	Novo	-
	1	CC198	3876	P1.22,14	3-84	F5-5	B/v1	4	p0010	-
	1	CC198	823	P1.18,25-37	3-718	F5-5	B/v1	4	p0010	-
	1	Nd	7129	P1.12-6,13-22	Novo	F5-5	A/v2-3	627	p0912	-
	1	CC1136	1136	P1.18-4,14	3-84	F4-1	A/v2-3	94	p0145	-
	1	CC198	823	P1.18,25-37	3-286	F5-5	A/v2-3	499	p0010	-
	1	CC1136	10238	P1.18-4,25-33	3-84	F5-9	A/v2-3	94	Novo	-
	1	CC198	823	P1.18,25-78	3-84	F5-5	B/v1	4	p0010	-
	1	CC53	53	P1.7-2,30	3-64	F1-7	A/v2-3	102	p0613	-

[‡]NG= não grupável; [‡]Novo-BLAST do alelo 4; *Nd = não definido; [§]Variante VR2 não encontrada; [#]Novo-BLAST do alelo 16; ^{*}*cnl* = *capsule null locus*. Os números em negrito representam os novos STs que foram descritos pela primeira vez através do nosso estudo.

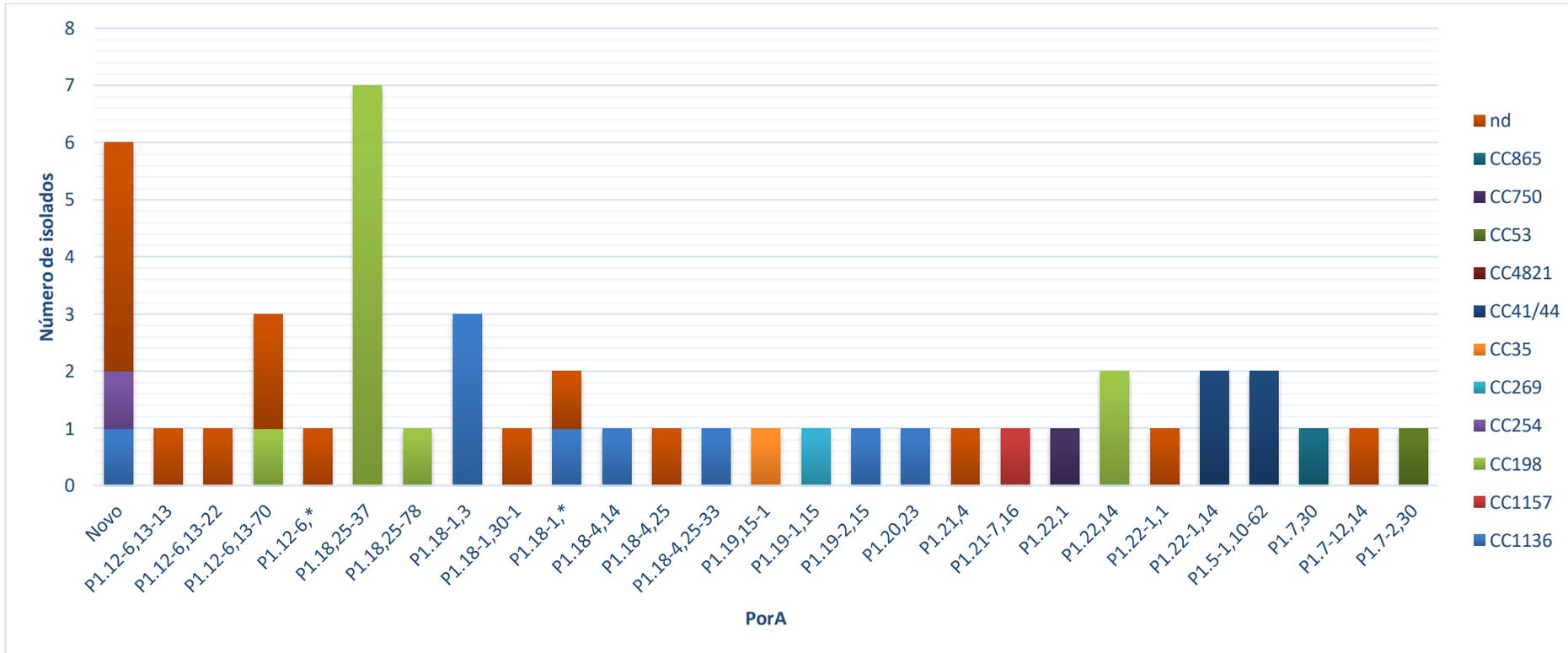


Gráfico 1. Distribuição das variantes da proteína PorA de acordo com os complexos clonais identificados

Legenda: nd = não definido; * variante VR2 não encontrada.

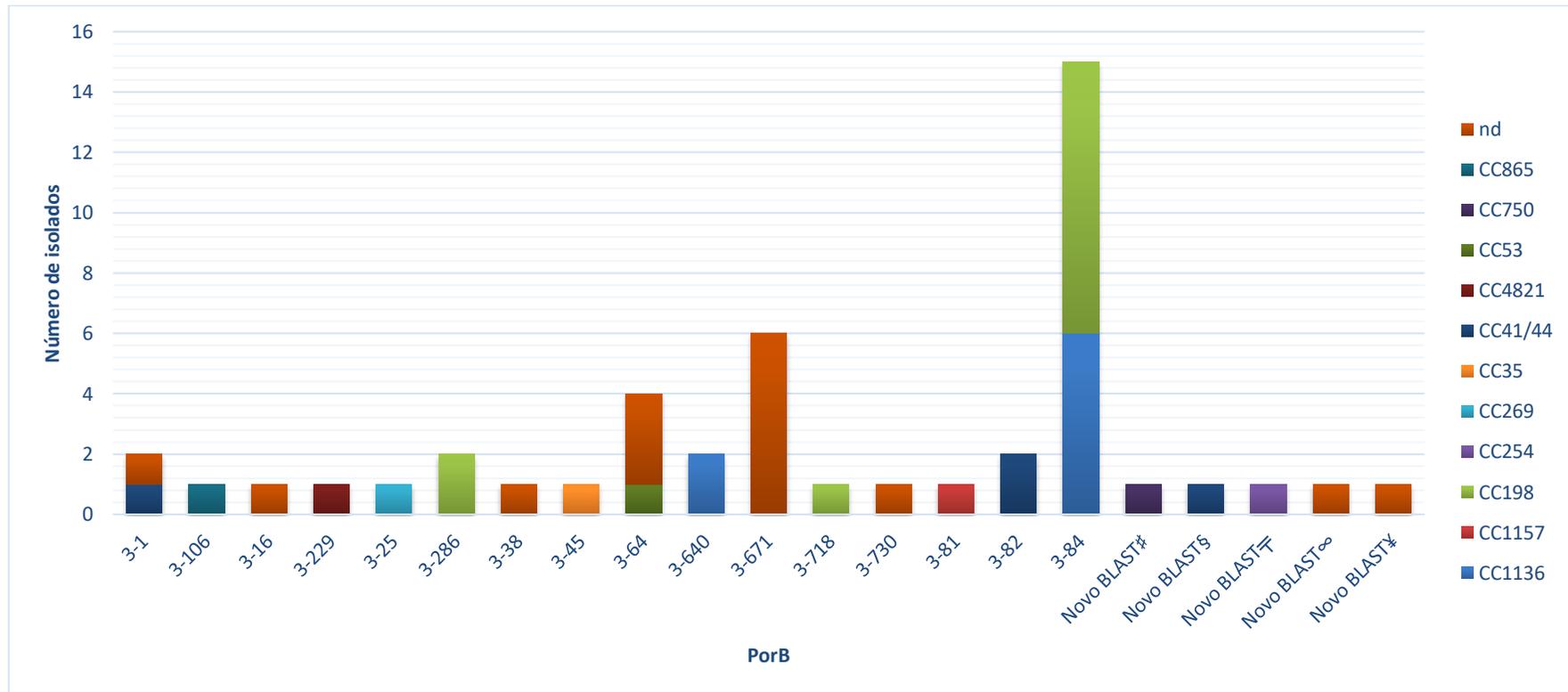


Gráfico 2. Distribuição das variantes da proteína PorB de acordo com os complexos clonais identificados.

Legenda: nd = não definido; #Novo BLAST do alelo 3-666; § Novo BLAST do alelo 3-373; ¶ Novo BLAST do alelo 3-38; ∞ Novo BLAST do alelo 3-671; * Novo BLAST do alelo 3-671.

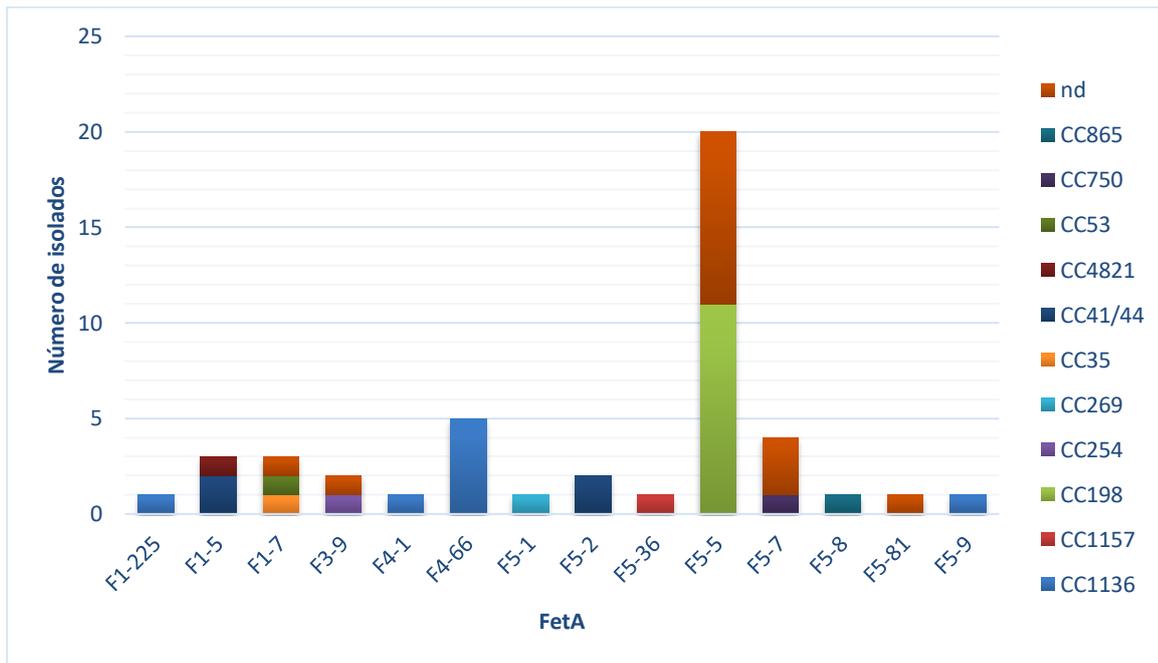


Gráfico 3. Distribuição das variantes da proteína FetA de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido.

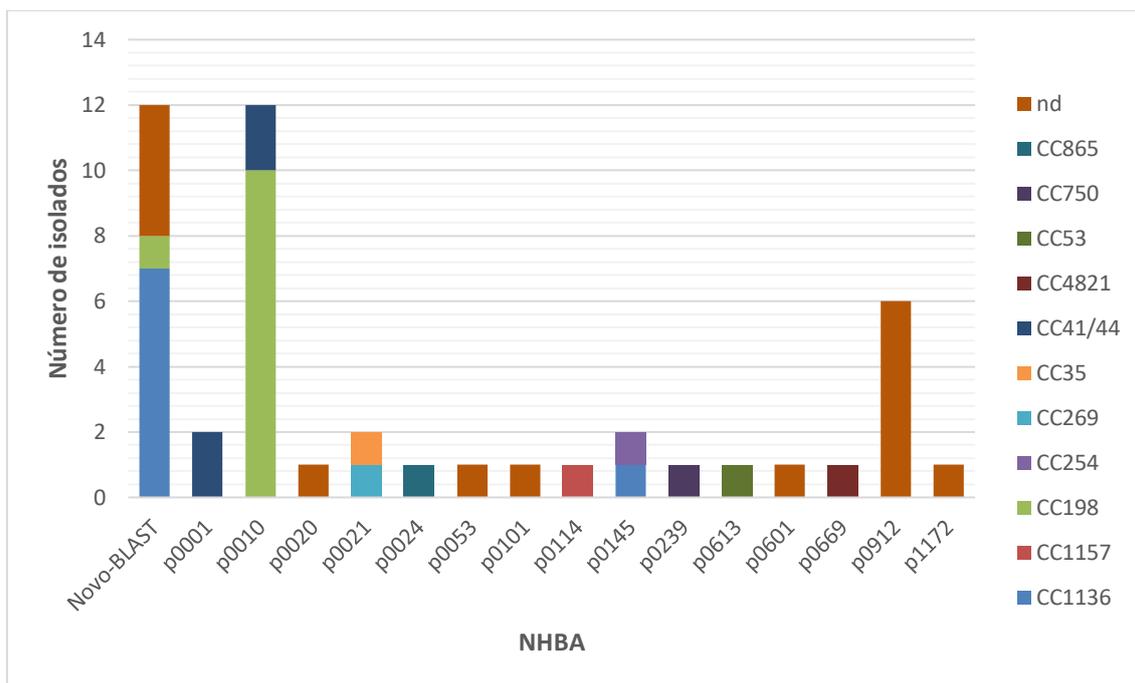


Gráfico 4. Distribuição das variantes da proteína NHBA de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido.

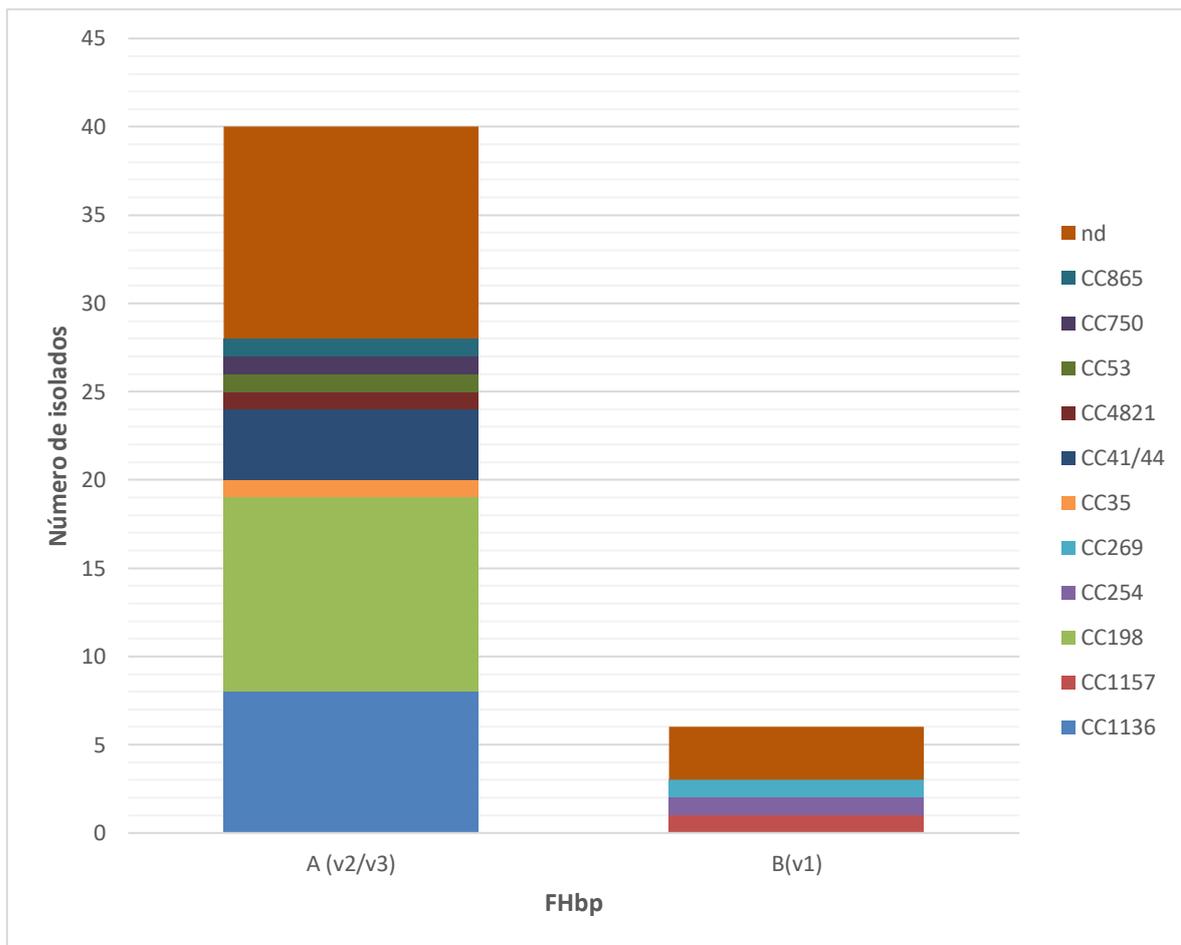


Gráfico 5. Distribuição das variantes da proteína FHbp de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS GENOGRUPOS/SOROGRUPOS DE *N. meningitidis*

A caracterização dos genogrupos a partir do WGS mostrou que 93,5% ($n=43/46$) das cepas eram não-grupáveis e 63% ($n=29/46$) apresentaram o operon não codificante, *capsule null locus (cni)*. Além disto, 3 cepas foram classificadas como sendo do genogrupo B.

As amostras identificadas como não-grupáveis e *cni* negativas ($n=14$) e as 3 cepas dos genogrupo B foram submetidas à soroglutinação em lâmina, para confirmação. Duas cepas não-grupáveis identificadas pelo WGS, apresentaram aglutinação positiva para o sorogrupo B. Por outro lado, duas cepas do genogrupo B (WGS) foram negativas para este sorogrupo no teste de soroglutinação (Tabela 4).

Todas as cepas ($n=11$) que apresentaram alguma estrutura gênica associada aos sorogrupos B e W através do WGS também foram confirmadas através do qPCR (Tabela 4), com exceção de uma cepa que foi não grupável pelo sequenciamento e B através da soroglutinação.

5.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GENÉTICA DA REGIÃO CAPSULAR

Na análise das sequências obtidas pelo WGS, dez cepas apresentaram uma estrutura gênica do genogrupo B, das quais, apenas três isolados continham todos os genes (*cps*) da cápsula intactos. As outras sete cepas, mostraram algum tipo de interrupção, como por exemplo, a presença de um elemento de inserção (IS1301), uma parada interna (“*stop-códon*”) ou uma variação de fase “off” (Tabela 4).

Seis amostras não-grupáveis pelo WGS apresentaram uma estrutura gênica para os genogrupos Z e E e uma amostra foi compatível para o genogrupo W. Entretanto, todas as sete cepas mostraram alguma interrupção na sua sequência interna.

Tabela 4. Análise da estrutura genética da região capsular e identificação dos genogrupos/sorogrupos de *N. meningitidis* através do sequenciamento do genoma total, soroglutinação e PCR em tempo real.

N° da Amostra	Método de identificação			Análise da estrutura genética por WGS
	WGS	SA	qPCR	
M42426	B	NG	B	Estrutura genética de B: todos os genes da cápsula presentes e intactos
M42458	B	NG	B	Estrutura genética de B: todos os genes da cápsula presentes e intactos
M42480	B	B	B	Estrutura genética de B: todos os genes da cápsula presentes e intactos
M42461	NG	B	B	Estrutura genética de B: variação de fase <i>OFF</i> no <i>csb</i>
M42471	NG	B	NG	Estrutura genética de B: variação de fase <i>OFF</i> no <i>csb</i>
M42413	NG	NG	B	Estrutura genética de B: parada interna em <i>cssA</i> , variação de fase <i>OFF</i> no <i>csb</i>
M42430	NG	NG	B	Estrutura genética de B: parada interna em <i>cssA</i>
M42445	NG	NG	B	Estrutura genética de B: <i>csb</i> interrompido pela inserção do IS1301; parada interna em <i>csb</i> ; ausência de <i>cssA</i>
M42470	NG	NG	B	Estrutura genética de B: <i>csb</i> interrompido pela inserção do IS1301; parada interna no <i>csb</i> , variação de fase <i>OFF</i> no <i>csb</i>
M42476	NG	NG	B	Estrutura genética de B: <i>csb</i> interrompido pela inserção do IS1301; parada interna no <i>csb</i> , variação de fase <i>OFF</i> no <i>csb</i>
M42473	NG	NG	-	Estrutura genética de E: <i>cseG</i> e <i>ctrA</i> fragmentados; parada interna em <i>cseG</i> , ausência de <i>cseA-cseE</i>
M42460	NG	NG	-	Estrutura genética de E: <i>cseG</i> e <i>ctrA</i> fragmentados; parada interna em <i>cseG</i> ; ausência de <i>cseA-cseE</i>
M42477	NG	NG	-	Estrutura genética de E: parada interna no <i>cseG</i> , variação de fase <i>OFF</i> no <i>cseA</i>
M42443	NG	NG	W	Estrutura genética de W: <i>cssA</i> interrompido pela inserção do IS1301; parada interna em <i>cssA</i>
M42418	NG	NG	-	Estrutura genética de Z: <i>cszD</i> interrompido pela inserção do IS1301; ausência do <i>cszA, cshA; cszB, cshB</i> e <i>cszC</i>
M42424	NG	NG	-	Estrutura genética de Z: parada interna em <i>cszB, cshB</i>
M42441	NG	NG	-	Estrutura genética de Z: <i>cszD</i> interrompido pela inserção do IS1301; ausência do <i>cszA, cshA; cszB, cshB</i> e <i>cszC</i>

Legenda: WGS = sequenciamento do genoma total; SA= soroglutinação; qPCR= PCR em tempo real; NG= não-grupável; IS1301 = sequência de inserção 1301; B = sorogrupo/genogrupo B; E = sorogrupo/genogrupo E; W = sorogrupo/genogrupo W; Z = sorogrupo/genogrupo Z; Genes responsáveis pela biossíntese capsular= *cssA, csb, cseG, cseA-cseE, cszA - cszD, cshA, cshB, cszC*; Gene responsável pelo transporte capsular= *ctrA*.

5.7. IDENTIFICAÇÃO DOS GENOGRUPOS A PARTIR DO MEIO DE STGG

As quatro amostras positivas para *N meningitidis* que foram identificadas pelo qPCR a partir do STGG foram submetidas à genogrupagem através da mesma técnica. Três amostras apresentaram-se como não grupáveis e uma mostrou resultado positivo para o genogrupo C.

Em conjunto, esses resultados mostraram que 92% (46/50) dos participantes eram portadores de cepas não-grupáveis, 6% (3/50) estavam colonizados pelo genogrupo B e apenas um indivíduo (2%; 1/50) mostrou ser portador do genogrupo C (Figura 7).

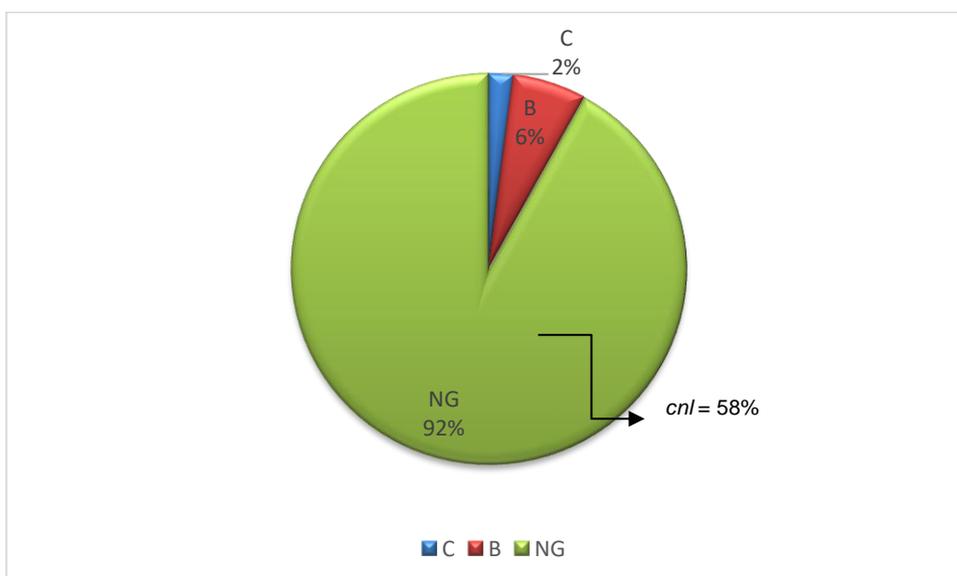


Figura 7. Identificação dos genogrupos de *N. meningitidis* através do sequenciamento do genoma total (WGS) e pelo PCR em tempo real. Legenda: NG = cepas não grupáveis; C = genogrupo C; B = genogrupo B; *cni* = *capsule null locus*

5.8 ANÁLISE DO STATUS VACINAL DOS INDIVÍDUOS EM RELAÇÃO AOS GENOGRUPOS IDENTIFICADOS

Entre os participantes imunizados para MenC, foi possível observar que 11,8% (26/221) apresentaram resultado positivo para colonização por Nm. Um total de 25 indivíduos (11,3%; 25/221) estavam colonizados por cepas não grupáveis, 16 (7,2%; 16/221) continham cepas *cnI* e um (0,5%; 1/221) apresentou o genogrupo B. Em relação aos indivíduos não vacinados, 12,5% (4/32) estavam colonizados por cepas não grupáveis, 3,1% (1/32) apresentaram o genogrupo B e 3,1% (1/32) o genogrupo C (Figura 9).

Dos 18 indivíduos que não souberam informar o *status* vacinal, 94,4% (17/18) estavam colonizados por cepas não grupáveis, 61,1% (11/18) foram *cnI* positivos e um (5,6%; 1/18) apresentou o genogrupo C.

	102	21	22	24	16	Novo BLAST*	19	499	94	627	45	4	Novo BLAST ^a	1	544	13	260	456	15	55	
102	100																				
21	98,82	100																			
22	98,03	99,21	100																		
24	96,85	98,03	98,43	100																	
16	95,67	95,28	94,88	94,09	100																
Novo BLAST*	95,28	94,88	94,49	93,7	99,61	100															
19	94,49	95,67	96,46	94,88	98,43	98,03	100														
499	85,11	84,73	83,97	84,35	88,55	88,17	87,4	100													
94	86,77	86,38	85,6	85,99	90,27	89,88	89,11	97,33	100												
627	85,99	87,16	87,16	87,55	89,49	89,11	90,66	96,56	98,44	100											
45	83,21	84,35	84,35	84,35	87,02	86,64	87,79	97,33	94,66	95,42	100										
4	69,41	69,02	68,63	67,84	72,16	71,76	71,76	62,36	63,57	67,57	60,84	100									
Novo BLAST ^a	69,8	69,41	69,02	68,24	72,55	72,16	72,16	62,74	63,93	63,95	61,22	99,61	100								
1	69,8	69,41	69,02	68,24	72,55	72,16	72,16	63,5	64,73	64,73	61,98	96,08	95,69	100							
544	69,02	68,63	68,24	67,45	71,76	71,37	71,37	62,74	63,95	63,95	61,6	94,9	94,51	96,86	100						
13	69,8	69,8	69,41	68,63	72,94	72,55	72,94	63,88	65,12	65,5	62,72	94,9	95,29	93,73	94,12	100					
260	70,2	70,2	69,8	69,02	73,33	72,94	73,33	63,5	64,73	65,12	62,36	95,29	95,69	93,33	93,73	99,61	100				
456	69,02	69,02	68,83	67,84	72,16	71,76	72,16	64,26	65,5	65,89	63,12	93,33	93,73	92,16	92,16	97,65	97,25	100			
15	61,22	60,84	60,84	60,46	65,02	64,64	64,26	70,72	68,82	68,82	69,58	87,07	86,69	85,93	85,17	86,31	85,93	86,31	100		
55	63,46	63,46	63,46	63,08	67,31	66,92	66,92	68,82	66,16	66,54	68,44	86,15	86,54	86,15	85,77	88,08	87,69	88,08	91,63	100	

Figura 8. Alinhamento e comparação do antígeno vacinal FHbp dos isolados com os antígenos das vacinas Bexsero® e Trumenba®. Legenda: *Novo-BLASTp do alelo 16; ^a Novo-BLASTp do alelo 4; Os tons de rosa demonstram uma maior similaridade entre os peptídeos de FHbp comparados, enquanto os tons de azul representam uma menor similaridade.

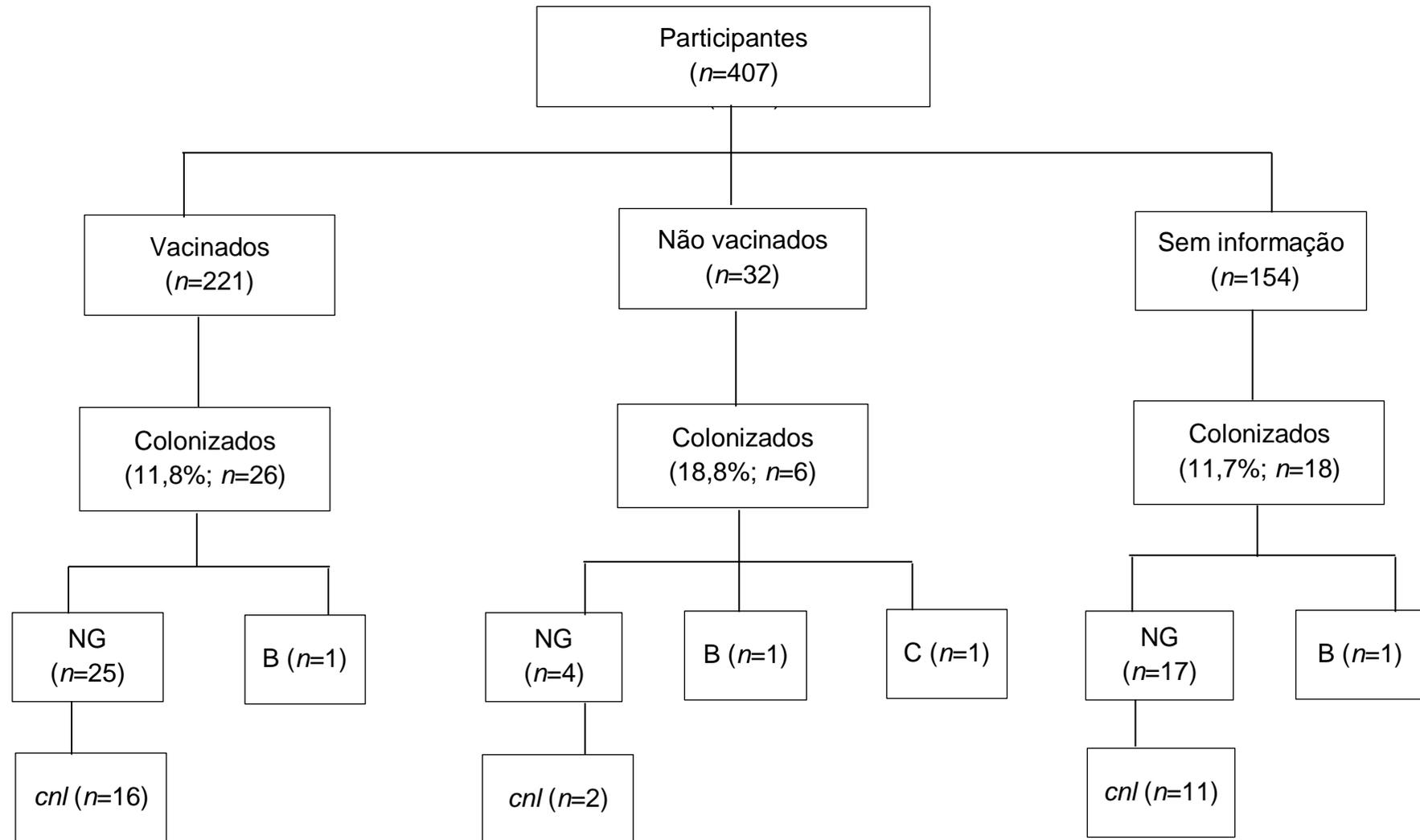


Figura 9. Análise do *status* vacinal dos indivíduos em relação aos genogrupos identificados.

6 DISCUSSÃO

Este estudo evidenciou uma prevalência de colonização, em indivíduos de 18 a 24 anos, por Nm de 12,3%, apresentando aproximadamente uma taxa 2,5 vezes superior ao estudo realizado, anteriormente, no mesmo município (4,9%; 11-19 anos) (NUNES et al., 2016). Essa diferença entre as prevalências pode está diretamente ligada aos fatores de risco associados aos indivíduos de cada estudo, como a idade dos participantes, onde a literatura indica o pico de colonização entre 20 e 24 anos (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; CHRISTENSEN et al., 2010), bem como o fator imunização que interfere diretamente na taxa de portadores (ANDRADE et al., 2017; VUOCOLO et al., 2018).

O trabalho apresentou uma taxa de colonização superior aquela encontrada em um estudo realizado em Embu das Artes, São Paulo, demonstrando uma prevalência total de 9%, sendo 12,6% na faixa etária entre 15 - 19 anos e 9% na faixa etária entre 20-24 anos de idade (WECKX et al., 2017). Esse resultado também foi semelhante a prevalência de outros estudos realizados em indivíduos de faixa etária equivalente no Estados Unidos (12,7–14,6%; 19-21 anos) (BREAKWELL et al., 2018), no Brasil (12,9%; 17 – 19 anos) (DE MORAES et al., 2015), em Portugal (13,3%; 18 – 32 anos,) (RODRIGUES et al., 2015), na Itália (12,1%) (GASPARINI et al., 2014) e na Turquia (9,1%; 21- 24 anos) (TEKIN et al., 2017).

Apesar do estudo utilizar uma amostra de conveniência, sendo realizado em único centro universitário, com uma frequência maior de estudantes do sexo feminino, foi possível observar que a prevalência ajustada de portadores foi quase duas vezes superior em indivíduos do sexo masculino. Segundo Caugant e colaboradores (2007), o estado de portador de Nm é mais frequente em indivíduos do sexo masculino, fato evidenciado em diversos estudos como o de Olea e colaboradores (2017) no Chile, o de Breakwell e colaboradores (2018) nos EUA e o de Kim e colaboradores (2017) na Coréia. Contudo, essa associação não foi demonstrada em outros estudos realizados no Brasil (DE MORAES et al., 2015; NUNES et al., 2016).

Foi possível identificar o fator de proteção em relação ao nível educacional da mãe, mostrando uma redução de 36% do risco de colonização dos participantes que informaram que as mães apresentavam um alto grau de escolaridade, semelhante ao

estudo publicado por Nunes e colaboradores (2016). Diversos estudos apontam o baixo nível social como um fator de risco para o desenvolvimento do estado de portador, usando, em sua maioria, o nível de escolaridade dos pais como indicador social.

Em relação ao contato prévio com indivíduos diagnosticados com meningite bacteriana, o estudo demonstrou uma razão de prevalência ajustada igual a 2 ($p=0,200$) para esse tipo de exposição. Apesar desse dado não ser estatisticamente significativo, estudos como o de Olea e colaboradores (2017), demonstram que o contato prévio com indivíduos com meningite bacteriana pode ser um fator associado à colonização por Nm, corroborando as indicações de quimioprofilaxia entre os indivíduos contactantes de pacientes com diagnóstico de DM (KOYFMAN; TAKAYESU, 2011; VAN DE BEEK et al., 2016)

É importante salientar que a frequência a festas/bares por pelo menos uma vez ao mês foi um dos principais fatores de risco encontrados em nosso estudo, aumentando em aproximadamente 3 vezes a prevalência de colonização do meningococo. Estudos realizados em diversas localidades e, em diferentes faixas etárias, também mostram essa associação com o estado de portador (GIOIA et al., 2015; MORENO et al., 2015; NUNES et al., 2016; BREAKWELL et al., 2018). Este resultado pode estar associado à aglomeração de indivíduos nesses ambientes, facilitando a transmissão do meningococo.

Não foi possível avaliar a variável “uso de antibiótico” devido a ausência de portadores que relataram o uso do medicamento. Contudo, outra pesquisa como a de Breakwell e colaboradores (2018) apresentou uma associação positiva entre o uso de antibiótico e o estado de portador.

Apesar de diversos estudos demonstrarem a existência de outros fatores relacionados ao risco de ser portador da Nm, como por exemplo: infecções respiratórias, tabagismo ativo ou passivo e principalmente convivência em ambientes populosos (ROSENSTEIN et al., 2001; SÁFADI et al., 2013), esse estudo não identificou uma associação positiva para colonização por Nm entre as variáveis aglomeração (razão entre o número de pessoas por cômodo da mesma residência), exposição à fumaça do cigarro e presença de sintomas de gripe nos últimos 15 dias.

Em relação ao sequenciamento do genoma total das cepas de *N. meningitidis* identificadas neste estudo, os resultados mostraram uma alta diversidade de

genótipos, em concordância com outros estudos (BREAKWELL et al., 2018; MOURA et al., 2017). Entre os complexos clonais identificados, o cc198 (26,1%) e o cc1136 (17,8%) foram os mais prevalentes, semelhante a outros trabalhos envolvendo portadores que demonstraram uma alta prevalência do cc198 associado a isolados *cnI* positivos (CAUGANT, 2008; GASPARINI et al., 2014; HARRISON et al., 2015; MOURA et al., 2017).

O estudo também encontrou outros complexos clonais associados a cepas de portadores presentes em diversas regiões do mundo, dentre eles o cc750 (Reino Unido), cc53 (Reino Unido e Grécia) e os complexos clonais cc35 e cc254 (várias regiões do mundo) (CAUGANT, 2008; TRYFINOPOULO et al., 2016; BREAKWELL et al., 2018). Também foi observada a presença de complexos clonais associados a cepas invasivas como o cc4821 (China, EUA e Europa), cc269 (Reino Unido) e cc41/44 (várias regiões do mundo) (CAUGANT, 2008; BREAKWELL et al., 2018; CORDEIRO et al., 2018).

Em relação as cepas do cc41/44 identificadas, sugere-se que não existe uma associação com as cepas do genogrupo B relacionadas à DM, identificadas em outros estudos com a população de Salvador (CORDEIRO et al., 2007; CORDEIRO et al., 2018).

Foi encontrada uma alta variabilidade das proteínas de membrana em relação aos genogrupos e aos complexos clonais, em concordância com as investigações de Gasparini e colaboradores (2014) e Moura e colaboradores (2017). Assim como os estudos desses autores, todos os isolados da presente investigação apresentaram as variantes FHbp e NHBA. Além disto, nosso estudo exibiu uma taxa similar da variante F5-5, da subvariante 10 da NHBA e da PorB da classe 3 em relação ao estudo de Moura e colaboradores (2017), realizado no mesmo município. Entretanto, é importante salientar que ainda existem poucos estudos que descrevem a caracterização de proteínas de membranas em cepas de portadores.

Apenas um isolado deste estudo apresentou a variante NadA corroborando os achados descritos por Serruto e colaboradores (2012) que afirmaram ser mais comum a presença dessa proteína de membrana em cepas invasivas do que em isolados de portadores.

Apesar do Brasil ter licenciado apenas a 4CMenB (Bexsero®) como vacina contra o meningococo B e o Sistema de Tipagem de Antígenos Meningocócicos

(MATS) ter indicado uma previsão de cobertura de 81% das cepas MenB que causam DM no Brasil (MEDINI;STELLA; WASSIL, 2015; SÁFADI et al., 2017), o nosso estudo mostrou uma ausência das proteínas recombinantes que compõem a vacina 4CMenB (Bexsero®). Por outro lado, foi observada uma alta similaridade antigênica com os componentes da vacina Trumenba®. Além disto, é importante ressaltar que alguns estudos mostram que a vacina 4CMenB possui pouco ou nenhum efeito na redução da colonização por *N. meningitidis* (READ et al., 2014; BREAKWELL et al., 2018).

A técnica de qPCR utilizada a partir do STGG para a identificação de *N. meningitidis* permitiu a identificação de mais 4 amostras que não foram identificadas pela cultura. Este resultado demonstra a maior sensibilidade do qPCR em detectar a Nm em relação à cultura, sugerindo a utilização dos dois métodos em conjunto para uma melhor detecção do meningococo. Fato também identificado no estudo de Sáfadi e colaboradores (2014).

Outra constatação importante está relacionada a alta porcentagem de cepas não grupáveis (92%) encontrada, sendo, superior àquela observada em um estudo anterior do nosso grupo, com estudantes de 11-19 anos de idade (MOURA et al., 2017). Esse achado é característico de estudos com portadores assintomáticos (RODRIGUEZ et al., 2014; HARRISON et al., 2015; MORENO et al., 2015; BARNES et al., 2017; BREAKWELL et al., 2018), uma vez que a perda da expressão do polissacarídeo capsular, por deleção do *locus* da cápsula ou por regulação negativa da expressão, parece aumentar a capacidade de colonização dos meningococos (DOLAN-LIVENGOOD et al., 2003; MORENO et al., 2015).

A identificação de cepas de MenB entre a população estudada está de acordo com a literatura, mostrando que é comum o encontro deste sorogrupo entre portadores (GASPARINI et al., 2014; MORENO et al., 2015; BREAKWELL et al., 2018; MOURA et al., 2017; SOETERS et al., 2017). Por outro lado, a alta taxa de cepas não grupáveis e a baixa porcentagem de indivíduos do genogrupo C podem estar relacionadas ao *status* vacinal dos participantes do estudo, assim como nos estudos de Ramsay e colaboradores (2001), Harrison e colaboradores (2015), Tryfinopoulo e colaboradores (2016) e Breakwell e colaboradores (2018).

Apesar do nosso trabalho apresentar uma porcentagem de 54,3% para a imunização contra o MenC, com uma redução de aproximadamente 40% da RP para colonização, nossos participantes informaram terem sido vacinados há mais de 5 anos, o que poderia reduzir a ação protetora da vacina, segundo estudos como o de Vesikari e colaboradores (2015). Por outro lado, Quiambao e colaboradores (2017) demonstraram a persistência de anticorpos após 5 anos de imunização pela vacina tetravalente em adolescentes. Associado a este fato, Macedo e colaboradores (2018) indicaram a presença de proteção de rebanho, na cidade de Salvador, relatando uma redução de 69% na incidência de DM por MenC após a implantação da MCC no PNI e da campanha de reforço realizada em 2010. Tais fatos ratificam o achado do presente estudo, já que a proteção direta ou indireta pode justificar a menor taxa de portadores desse tipo capsular.

É importante salientar que o único participante que apresentou colonização para o genogrupo C não havia sido imunizado contra o MenC. Por outro lado, como este resultado foi encontrado através da técnica de qPCR a partir do STGG, ou seja, foi detectado o gene do tipo capsular C e não a sua expressão. Esse fato permite a existência de uma regulação da expressão da cápsula (variação de fase) ou o bloqueio dos genes envolvidos na sua expressão, o que possibilita existir uma variação da expressão capsular do isolado para o *status* de não grupável.

Nosso estudo também revelou discrepâncias entre os resultados do WGS e da soroaglutinação dos isolados com estrutura gênica para o tipo capsular B. Dois isolados foram caracterizados como não grupáveis através da soroaglutinação, mesmo apresentando todos os genes da cápsula intactos do genogrupo B, através do WGS. Com relação a este fato é importante ressaltar os trabalhos de Van der Ende e colaboradores (1995) e Mothershed e colaboradores (2004) demonstrando que a sensibilidade e a especificidade variável dos kits comerciais para soroaglutinação, podem ser a causa da identificação de MenB como cepas não grupáveis.

Em relação aos isolados que foram caracterizados como não grupáveis pelo WGS e como MenB pelo método da soroaglutinação, ambos apresentaram em sua estrutura gênica uma variação de fase OFF no *csb*, que é o gene associado à biossíntese capsular. A variação de fase ON/OFF é um mecanismo de regulação reversível (MOTHERSHED et al., 2004; TZENG et al., 2016; BARNES et al., 2017),

sugerindo a necessidade de métodos capazes de avaliar elementos transcricionais da expressão capsular para a confirmação da caracterização do genogrupo.

7 CONCLUSÕES

- O estudo apresentou uma prevalência de portadores de *N. meningitidis* entre estudantes de 18-24 anos de idade semelhante a de outros trabalhos da literatura;
- As cepas de *N. meningitidis* identificadas foram primordialmente não grupáveis e apresentaram um alto grau de diversidade genética;
- A identificação de apenas um isolado do genogrupo C pode estar relacionada à implantação da MCC no Programa Nacional de Imunização e a campanha de reforço para adolescentes e adultos jovens realizada em Salvador;
- Foram encontradas cepas pertencentes a complexos clonais relacionados com cepas invasivas e de portadores;
- Os dados deste trabalho mostraram a relevância da utilização da técnica de qPCR associada a cultura para a identificação de *N. meningitidis* para aumentar a capacidade de detecção do microrganismo;
- As discrepâncias entre as metodologias utilizadas para a caracterização capsular de *N. meningitidis* sugere a necessidade de novos estudos para elucidar as possíveis interferências na identificação dos sorogrupos/genogrupos;
- Estudos de segmento mais duradouros e um maior número de amostras são necessários para ampliar conhecimento sobre a colonização/portadores de *N. meningitidis* .

REFERÊNCIAS

- ABIO, A.; NEAL, K.R.; BECK, C.R. An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years. **Pathogens and Global Health**, v.107, p.373–380, 2013.
- ANDRADE, A. L. et al. Impact of meningococcal C conjugate vaccination four years after introduction of routine childhood immunization in Brazil. **Vaccine**, v. 35, p.2025–2033, 2017.
- ATAEE, R.A. et al. Carriage rates of *Neisseria meningitidis* serogroups: determination among freshmen conscripts before vaccination. **Iran J. Microbiol.**, v.8, p. 203-209, 2016.
- BARNES, G.K. et al. Whole genome sequencing reveals within-host genetic changes in paired meningococcal carriage isolates from Ethiopia. **BMC Genomics**, v. 18, 2017.
- BORROW, R. et al. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. **Exp. Rev. Vaccines**, v.16, p. 3131-328, 2016.
- BORROW, R. et al. Meningococcal disease in the Middle East and Africa: Findings and updates from the Global Meningococcal Initiative. **J. Infect.**, v. 75, p. 1-11, 2017.
- BRANCOL, R. G., AMORETTI, C. F., TASKER, R. C. Doença meningocócica e meningite. **J. Pediatr.**, v. 83, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Calendário vacinal**. Disponível em : <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27742-ministerio-da-saude-amplia-vacinacao-em-todas-as-faixas-etarias>. Acesso em: 15 jun 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doença meningocócica. In: SAÚDE, M. d. (ed.). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 2ª ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017. cap. 1, p. 32-41.
- BREAKWELL, L. et al. Meningococcal carriage among a university student population – United States, 2015. **Vaccine**, v. 36, p. 29–35, 2018.
- CAMPBELL, H. et al. Presentation with gastrointestinal symptoms and high case fatality associated with group W meningococcal disease (MenW) in teenagers, England. **Euro Surveill**, v. 21, p. 1560-7917, 2016.
- CARDOSO, C. W. et al. Effectiveness of Meningococcal C Conjugate Vaccine in Salvador, Brazil: A Case-Control Study. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

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

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

CAUGANT, D. A.; MAIDEN, M.C. J. Meningococcal carriage and disease—Population biology and evolution. **Vaccine**, v. 27, 2009.

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

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

COHN, A.C. et al. Prevention and control of meningococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR**, v.62, p.1–28, 2013.

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

CORDEIRO, S. M. et al. Dissemination of the ST-103 clonal complex serogroup C meningococci in Salvador, Brazil. **Microb. Infect.**, v.20, p.19 – 24, 2018.

CHRISTENSEN, H. et al. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect. Dis.**, v.10, p.853-61, 2010.

CRUM-CIANFLONE, N.; SULLIVAN, E. Meningococcal Vaccinations. **Infect. Dis. Ther.** v.5, p. 89-112, 2016.

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, p. 1266-1273, 2007.

DE MORAES, J. C. et al. Prevalence of meningococcal carriage among adolescents in Campinas, Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.34, p.1197-202, 2015.

DE MORAES, J. C.; BARATA, R.B. A doença meningocócica em São Paulo, Brasil, no século XX: características epidemiológicas. **Cad. Saúde Públ.**, v.21, p.1458-1471, 2005.

DELLICOUR, S ; GREENWOOD, B. Systematic review: Impact of meningococcal vaccination on pharyngeal carriage of meningococci. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12, p. 1409–1421, 2007.

DE SOUZA, A., L.; SEGURO, A. C. Two centuries of meningococcal infection: from Vieusseux to the cellular and molecular basis of disease. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 1313–1321, 2008.

DOLAN THOMAS, J.D. et al. *sodC*-Based Real-Time PCR for Detection of *Neisseria meningitidis*. **PLoS ONE**, v.6, 2011.

DOLAN-LIVENGOOD, J.M. et al. Genetic Basis for Nongroupable *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, v.187, p.1616–28, 2003.

DONALD, R.G.K. et al. Meningococcal serogroup B vaccines: Estimating breadth of coverage. **Human Vaccines & Immunotherap.**, v. 13, p. 255-265, 2017.

FEAVERS, I. M.;PIZZA, M. Meningococcal protein antigens and vaccines. **Vaccine**, v.27, p. 42–50, 2009.

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, p. 116-120, 2015.

GANESH, K. et al. Molecular characterization of invasive capsule null *Neisseria meningitidis* in South Africa. **BMC Microbiol.**, v.17, 2017.

GASPARINI, R. et al. Meningococcal B vaccination strategies and their practical application in Italy. **J. Prev. Med. Hyg.**, v.56, p.133–139, 2015.

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, p.1901-1910, 2014.

GENTILE, A. et al. Meningococcal Disease in Children in Argentina A 3-year Active Sentinel Hospital Surveillance Study . **Pediat. Infect. Dis. J.**, v.36, p. 296-300, 2017.

GIANCIECCHI, E. et al. An unwanted guest: *Neisseria meningitidis* - carriage, risk for invasive disease and the impact of vaccination with insights from Italy incidence. **Exp. Rev. Anti-infect. Ther.**, v.15, p.689-701, 2017.

GIOIA, A.C.C. et al. Detection of *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers in a university hospital from Brazil. **Rev Argent. Microbiol.**, v.47, p. 322-327, 2015.

GREEN, L.R. et al. Phase Variation of *NadA* in Invasive *Neisseria meningitidis* Isolates Impacts on Coverage Estimates for 4C-MenB, a MenB vaccine. **J. Clin. Microbiol.**, 2018.

HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **J. Biomed. Inform.**, v. 42, p. 377-81, 2009.

HARRISON, L. H. et al. Meningococcal carriage among Georgia and Maryland high school students. **J. Infect. Dis.**, v.211, p. 1761–1768, 2015.

HARRISON, O. B. et al. Description and Nomenclature of *Neisseria meningitidis* Capsule Locus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, 2013.

HOLLINGSHEAD, S. et al. Structure-based design of chimeric antigens for multivalent protein vaccines. **Nat. Commun.**, v. 9, 2018.

JIANG, H-Q et al. Broad vaccine coverage predicted for a bivalent recombinant factor H binding protein based vaccine to prevent serogroup B meningococcal disease. **Vaccine**, v.28, p.6086–93, 2010.

JOHN, C.M. Lipooligosaccharide Structures of Invasive and Carrier Isolates of *Neisseria meningitidis* Are Correlated with Pathogenicity and Carriage. **J. Biol. Chem.**, v. 291, p. 3224–3238, 2016.

JOHN, C.M. et al. Innate immune response to lipooligosaccharide: pivotal regulator of the pathobiology of invasive *Neisseria meningitidis* infections. **Pathog. Dis.**, v.75, 2017.

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.; MAIDEN, M.C.J. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinf.**, v.11, 2010.

KRAULAND, M. G. et al. Whole Genome Sequencing to Investigate the Emergence of Clonal Complex 23 *Neisseria meningitidis* Serogroup Y Disease in the United States. **PLOS One**, v. 7, 2012.

KIM, H.W. et al. Characterization of Oropharyngeal Carriage Isolates of *Neisseria meningitidis* in Healthy Korean Adolescents in 2015. **J. Korean Med. Sci.**, v. 32, p.1111-1117, 2017.

KOYFMAN, A.; TAKAYESU, J.K. Meningococcal disease. **Afr. J. Emerg. Med.**, v. 1, p. 174–178, 2011.

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.22, p.1762-1768, 2016.

KRISTIANSEN, P. A.; JORGENSEN, H. J.; CAUGANT, D. A. Serogroup A meningococcal conjugate vaccines in Africa. **Exp. Rev. Vaccine**, v. 14, p.1441-58, 2015.

KUHDARI, P. et al. Meningococcal B vaccination: real-world experience and future perspectives. **Pathog. Global Health**, v. 110, p. 148-56, 2016.

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, p. 578-585, 2015.

MACEDO, L. E. N. et al. Impact of meningococcal C conjugate vaccination programs with and without catch-up campaigns in adolescents: Lessons learned from Bahia, Brazil. **Human vaccines & Immunotherap.**, p. 1–7, 2018.

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. J. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nat. Rev.Microbiol.**, v.11, p.728–736, 2013.

MCNEIL, L. K. et al. Predicting the Susceptibility of Meningococcal Serogroup B Isolates to Bactericidal Antibodies Elicited by Bivalent rLP2086, a Novel Prophylactic Vaccine. **MBio**, v.9, 2018.

MCNAMARA, L. A. et al. Mass chemoprophylaxis for control of outbreaks of meningococcal disease. **Lancet Infect. Dis.**, v.18, p. 30124-5, 2018.

MEDINI, D., STELLA, M., WASSIL, J. MATS: Global coverage estimates for 4CMenB, a novel multicomponent meningococcal B vaccine. **Vaccine**, v. 33, p. 2629–2636, 2015.

MOHAMMED, I.; ILIYASU, G.; HABIB, A. B. Emergence and control of epidemic meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa. **Pathog. Global Health**, v. 111, p. 1-6, 2017.

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

MOTHERSHED, E. A. et al. Use of Real-Time PCR To Resolve Slide Agglutination Discrepancies in Serogroup Identification of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.42 p. 320–328, 2014.

MOURA, A. R. S. S. et al. Molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates recovered from 11-19- year-old meningococcal carriers in Salvador, Brazil. **PLoS One**, v. 12, 2017.

NADEL, S. Prospects for eradication of meningococcal disease. **Arch. Dis. Child.**, v.97, p. 993–998, 2012.

NUNES, A. M. et al. Meningococcal Carriage among Adolescents after Mass Meningococcal C Conjugate Vaccination Campaigns in Salvador, Brazil. **PLoS One**, v.11, 2016.

OLEA, A. et al. Case–Control Study of Risk Factors for Meningococcal Disease in Chile. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 23, 2017.

PANATTO, D. et al. New versus old meningococcal Group B vaccines: How the new ones may benefit infants & toddlers. **Ind. J. Med. Res.**, v.138, p. 835–846, 2013.

PICCINI, G. et al. Fighting *Neisseria meningitidis*: past and current vaccination strategies. **Exp. Rev. Vaccines**, v.15, p.1393-1407, 2016.

QUIAMBAOA, B. P. et al. Antibody persistence up to 5 y after vaccination with a quadrivalent meningococcal ACWY-tetanus toxoid conjugate vaccine in adolescents. **Human Vaccines & Immunotherap.**, v.13, p. 636–644, 2017.

RAMSAY, M. E. et al. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. **Lancet**, v.357, p.195-6, 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, p. 2123–31, 2014.

ROBERTS, J.; GREENWOOD, B; STUART, J. Sampling methods to detect carriage of *Neisseria meningitidis*; literature review. **J. Infect.**, v. 58, p. 103 – 107, 2009.

RODRIGUES, C. M. C.; MAIDEN, M.C.J. A world without bacterial meningitis: how genomic epidemiology can inform vaccination strategy. **F1000Research**.v. 7, 2018.

RODRIGUES, C.M.C. et al.. Genomic Surveillance of 4CMenB Vaccine Antigenic Variants among Disease-Causing *Neisseria meningitidis* Isolates, United Kingdom, 2010–2016. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 24, p. 673-682, 2018.

RODRIGUES, F. et al. Oropharyngeal carriage of meningococcus in Portugal by group and clonal complex 6 years after adolescent vaccine campaign. **Pediat. Infect. Dis. J.**, v. 34, p. 1267-1269, 2015.

RODRIGUEZ, P. et al. Meningococcal carriage prevalence in university students, 18–24years of age in Santiago, Chile. **Vaccine**, v.32, p.5677-80, 2014.

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

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

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

SADLER, F. et al. Genetic analysis of capsular status of meningococcal carrier isolates. **Epidemiol. Infect.**, v. 130, p. 59–70, 2003.

- SÁFADI, M. A. P. et al. Carriage rate and effects of vaccination after outbreaks of serogroup C meningococcal disease, Brazil, 2010. **Emerg. Infect. Diseases**. v. 20, p. 806-811, 2014.
- SÁFADI, M. A. P. et al. The current situation of meningococcal disease in Latin America and updated Global Meningococcal Initiative (GMI) recommendations. **Vaccine**, v. 33, p. 6529-36, 2015.
- SÁFADI, M. A. P. et al. Evolving meningococcal immunization strategies. **Expert Rev. Vaccines**, v. 14, p. 505–517, 2015.
- SÁFADI, M. A. P. et al. Immunogenicity and safety of concomitant administration of meningococcal serogroup B (4CMenB) and serogroup C (MenC-CRM) vaccines in infants: A phase 3b, randomized controlled trial. **Vaccine**, v.35, p. 2052-2059, 2017.
- SÁFADI, M. A. P. et al. The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945- 2010: an unpredictable and changing landscape. **Epidemiol. Infect.** v. 141, p. 447-458, 2013.
- SÁFADI, M. A. P.; BEREZIN, E. N.; OSELKA, G.W. A critical appraisal of the recommendations for the use of meningococcal conjugate vaccines. **J. Pediatr.**, v. 88, 2012.
- SÁFADI, M.A.P; BARROS, A.P. Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações. **J. Pediatr.**, v.82, 2006.
- SERRUTO, D. et al. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: Immunological, functional and structural characterization of the antigen. **Vaccine**, v.30, p.B87–97, 2012.
- SOETERS, H. M. et al. Meningococcal carriage evaluation in response to a serogroup B meningococcal disease outbreak and mass vaccination campaign at a college—rhode island, 2015–2016. **Clin. Infect. Dis.** v.64, p.1115-1122, 2017.
- STEFANELLI, P.; REZZA, G. Impact of vaccination on meningococcal epidemiology. **Human Vaccines & Immunotherap.**, v.12, p. 1051-1055, 2016.
- STEPHENS, D. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v.27, p. B71-77, 2009.
- STEPHENS, D. S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. **Lancet**, v.369, p. 2196–210, 2007.
- TEKIN, R.T. et al. The prevalence, serogroup distribution and risk factors of meningococcal carriage in adolescents and young adults in Turkey. **Human Vaccines & Immunotherap.**, v.13, p.1182–1189, 2017.
- THAYER J.D.; MARTIN J.E. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. **Publ. Health. Rep.** v. 81, p. 559-562, 1966.

TRYFINOPOULO et al. Meningococcal Carriage in Military Recruits and University Students during the Pre MenB Vaccination Era in Greece (2014-2015). **PLoS One**, v.11, 2016.

TROTTER, C.L; MAIDEN, M.C.J. Meningococcal vaccines and herd immunity: lessons learned from serogroup C conjugate vaccination programmes. **Exp. Rev. Vaccines**, v.8, p. 851–861, 2009.

TZENG, Y.L; THOMAS, J.; STEPHENS, D.S. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.42, p.759-72, 2016.

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.

VAN DE BEEK, D. et al. Community-acquired bacterial meningitis. **Nature Rev.**, v.2, p. 1-20, 2016.

VAN DER ENDE, A. et al. Comparison of commercial diagnostic tests for identification of serogroup antigens of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p. 3326–3327, 1995.

VESIKARI, T. et al. Immunogenicity, safety and antibody persistence of a booster dose of quadrivalent meningococcal acwy-tetanus toxoid conjugate vaccine compared with monovalent meningococcal serogroup c vaccine administered four years after primary vaccination using the same vaccines. **Pediat. Infect. Dis. J.**, v.34, p.298-307, 2015.

VETTER, V. et al. Routinely vaccinating adolescents against meningococcus: targeting transmission & disease. **Exp. Rev. Vaccines**, v. 15, p.641–658, 2016.

VUOCOLO, S. et al. Vaccination strategies for the prevention of meningococcal disease. **human vaccines & immunotherapeutics**. p.1-13, 2018.

WECKX, L. Y. et al. A cross-sectional study assessing the pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in subjects aged 1–24 years in the city of Embu das Artes, São Paulo, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.21, p. 587-595, 2017.

WHO. **Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae***. 2nd ed, 2011.

YAZDANKHAH, S. P.; CAUGANT, D. A. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p. 821–832, 2004.

YEZLI, S. et al. Prevention of meningococcal disease during the Hajj and Umrah mass gatherings: past and current measures and future prospects. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 47, p.71–78, 2016.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prevalência de portadores de *Neisseria meningitidis* em estudantes de 18 a 24 anos de idade

Prezado jovem _____

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Prevalência de portadores de *Neisseria meningitidis* em estudantes de 18 a 24 anos de idade”.

Para ser lido por todos os estudantes : As informações que se seguem descrevem o estudo de pesquisa e do seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo de pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

A meningite causada pelo meningococo é uma doença grave, que se transmite de pessoa a pessoa, por meio de contato direto com portadores (saudáveis ou doentes). O portador saudável é uma pessoa colonizada pela bactéria e que não apresenta nenhum sintoma e na maioria das vezes nunca apresentará, mas pode transmiti-la para outras pessoas na comunidade. No Brasil, não conhecemos o número de portadores da bactéria nas vias aéreas, mas sabemos que durante surtos o percentual de pessoas colonizadas aumenta substancialmente e, quanto maior o número de portadores, maior é o risco da disseminação da bactéria que causa meningite. Este estado de portador pode durar alguns meses e se usarmos antibiótico a bactéria pode retornar quando acaba o efeito do mesmo. Nós desconhecemos o papel dos adolescentes e adultos jovens na transmissão da doença no Brasil, assim como desconhecemos o percentual de colonização entre os adolescentes e adultos jovens (indivíduos entre 18 a 24 anos de idade).Este conhecimento poderá contribuir para mudanças na política de vacinação, com ampliação da faixa etária alvo da vacinação. Por esse motivo, o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ, propôs realizar uma investigação sobre a taxa de portadores de meningococo entre os indivíduos de 18 a 24 anos matriculados em um centro universitário da rede privada em Salvador e residentes nesta cidade.

Procedimentos a serem seguidos: A coleta de material da orofaringe (garganta) será realizada por profissionais de saúde treinados, é bastante simples e rápida. Para isto, o profissional vai passar um algodão para coletar a secreção da sua garganta. Ocasionalmente, algumas pessoas podem sentir um pouco de náusea (enjôo) no momento da coleta da amostra de secreção da orofaringe (garganta).

Se você concordar em participar deste estudo, você irá também responder a um questionário simples sobre o histórico vacinal (será solicitado a apresentação do cartão de vacinação), antecedente recente de doenças respiratórias, uso de antibióticos, hábitos que podem contribuir para aumentar a taxa de portadores e número de pessoas que habitam a mesma casa e dormem no mesmo quarto.

O objetivo desta pesquisa é de interesse para a saúde coletiva e não implica em mudança de conduta individual, não havendo indicação de se vacinar ou revacinar uma pessoa saudável previamente vacinada e nem mesmo administrar antibiótico mesmo que ela seja portadora da bactéria. Os resultados podem auxiliar as autoridades de saúde pública na decisão por mudanças nas condutas de bloqueio de surtos ou ampliação da faixa etária que utilizará a vacina.

Confidencialidade: Suas respostas durante a entrevista serão confidenciais. Apenas você e os investigadores do grupo da pesquisa terão acesso a estas informações. Você não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa.

Participação Voluntária: A participação nesta pesquisa é voluntária. Você pode recusar ou interromper a participação em qualquer momento. Também, a equipe de estudo pode optar por encerrar a sua participação durante ou no fim da pesquisa. Neste caso, você será avisado. Durante a entrevista, se houver alguma pergunta que você ache que não é própria e não queira responder, você tem o direito de não respondê-la. A recusa em participar de todo ou de parte desta pesquisa não afetará o seu rendimento e/ou suas atividades na Faculdade. Não existe nenhum custo para participar do estudo e você não terá nenhum tipo de benefício imediato, mas ao participar deste estudo estará ajudando outras pessoas, pois os resultados podem mudar as condutas de vacinação. Sua participação é completamente voluntária. Você receberá uma via deste termo de consentimento.

Grupo de Contato: Se no futuro você tiver qualquer questão sobre sua participação ou sobre seus direitos como participante na pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Leila Campos, Pesquisadora do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2350, ou com o Comitê de Ética em Pesquisas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Autorização para Banco de Amostras Biológicas: Caso você autorize, o material da orofaringe que sobrar deste estudo após a realização dos exames, será armazenado em um banco de amostras biológicas na Fiocruz em até três anos após o término do projeto, quando, após o término deste prazo, serão descartadas através

de autoclavagem. Este material guardado na Fiocruz poderá ser também utilizado, no futuro, em outros projetos de pesquisa que ajudarão a compreender melhor a meningite bacteriana ou no desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas. Nenhum material será utilizado sem a sua autorização prévia, através de um novo contato, e a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz. Sua identidade será mantida em sigilo.

Sobre a autorização para banco de amostras biológicas:

() Eu autorizo que o material da orofaringe que sobrar deste estudo seja incluído no banco de amostras biológicas da Fiocruz.

() Eu não autorizo, o material da orofaringe que sobrar deste estudo deverá ser jogado fora.

Sobre a autorização para utilização da amostra biológica em projetos de pesquisas futuras:

() Eu autorizo que o material da orofaringe guardado na FIOCRUZ seja utilizado, no futuro, em outros projetos de pesquisa.

() Eu não autorizo que o material da orofaringe guardado na FIOCRUZ seja utilizado, no futuro, em outros projetos de pesquisa.

Consentimento:

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que aceito participar deste projeto de pesquisa, pois fui informado de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, desconfortos e benefícios todos acima descritos.

Investigador responsável pela entrevista

Telefone _____ e data __/__/____

Se você compreendeu tudo e quer participar, por favor assine na linha abaixo

Assinatura _____ data __/__/____

Nome por extenso

APÊNDICE 2

Prevalência de portadores de *Neisseria meningitidis* em estudantes de 18 a 24 anos de idade

Nome do aluno _____
Data de nascimento ___/___/___ Sexo () Masculino () Feminino
Residência: Rua/Av/Al _____, Número _____
Complemento: _____ CEP _____ - _____ Município: Salvador
Telefone de contato: fixo: _____ celular: _____
Curso: _____
Semestre: _____

Data da coleta ___/___/___ hora ___:___
Data da entrada na FIOCRUZ ___/___/___ hora ___:___
Observação:

Tempo de residência em Salvador em anos ____
Escolaridade da mãe :
Nível Concluído: () Nenhum () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto () 2º grau completo () 3º grau incompleto () 3º grau completo () Não sabe informar
Quantas pessoas vivem em sua casa ____
Quantos cômodos são usados para dormir ____

Teve algum contato recente com um caso de Meningite () Sim () Não

Foi vacinado contra meningite: () Não () Sim

Qual o tipo de vacina? _____

Informação () Documentada () Oral

Se Sim, para informação documental, em que data foi realizada a vacinação

___/___/___

Em sua casa alguém fuma () Sim () Não

Se sim Quem (múltiplas respostas)

() Você, () Pai () Mãe () Irmão/ã () outro parente

Você costuma frequentar festa/ shows () Sim () Não

Com que frequência mensal ____

Teve síndrome gripal nos últimos 15 dias? () Não () Sim

Tomou antibiótico nos últimos 15 dias? () Não () Sim Qual? _____

Quantas pessoas residem no mesmo endereço? _____

Quantos cômodos são usados para dormir? _____

Quantas pessoas compartilham o mesmo cômodo para dormir? _____

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>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	GCTACCCCATTTTCAGATGATTTGT	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	TTGCTAAAATCATTGCTCCATAT	600
	Pb1099i	TATGGTG"T"ACGATATCCCTATCCTTGCCTATAAT 5' FAM; 3' SpC6; "T" BHQ1	100