

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Talita Coelho de Souza

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE
NEISSERIA MENINGITIDIS ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS
DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2020

Talita Coelho de Souza

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *NEISSERIA*
MENINGITIDIS ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA REGIÃO
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Ivano R. V. de Filippis Capasso
Beatriz Meurer Moreira

Rio de Janeiro

2020

Catologação na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Souza, Talita Coelho

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Neisseria meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos da região metropolitana do Rio de Janeiro./ Talita Coelho de Souza. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2020.

115 f.: il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2020.

Orientadores: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso; Beatriz Meurer Moreira

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Portador Sadio. 3. Gene *rplF*. 4. Capsule null locus. 5. MLST. 6. Fatores de risco. I. Título

Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* from asymptomatic carriers in Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Talita Coelho de Souza

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *NEISSERIA*
MENINGITIDIS ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA REGIÃO
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Célia Maria C. Pereira Araujo Romão (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Sergio Eduardo Longo Fracalanza (Doutor)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Ianick Souto Martins (Doutora)

Universidade Federal Fluminense (UFF)

ORIENTADORES

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Beatriz Meurer Moreira (Doutora)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dedico aos meus pais Francisco e Rute pelo cuidado, pelo suporte, pelo carinho e por serem exemplo de amor e integridade. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me ajudado e capacitado para chegar até aqui.

À minha família pelo incentivo, suporte, carinho e paciência, que foram essenciais para que eu concluísse mais esta etapa da vida. Essa conquista é NOSSA!

Ao Dr. Ivano de Filippis por todo apoio e orientação, pela oportunidade de participar de sua linha de pesquisa e por compartilhar sua experiência com *Neisseria meningitidis*

À querida Prof^a. Beatriz Meurer Moreira a quem sou grata por toda paciência, dedicação, orientação, conselhos e assistência. Sou grata a Deus pela oportunidade de aprender e conviver com você durante todos esses anos.

À Claudia Andrade que sempre esteve disponível para ajudar nos experimentos e coletas. Muito obrigada!

Aos professores Rafael Duarte, Alexander Cardoso, Katia Leandro, Felipe Piedade e Daniel Vieira Silva por me auxiliarem na realização das coletas.

A todos os voluntários do presente estudo, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade e confiança!

Ao Sr. Luiz e à dona Carla pela hospitalidade e confiança.

À minha querida amiga Paulinha pela amizade, incentivo e pelas experiências compartilhadas.

Aos amigos que a Fiocruz me apresentou: Renata Cavallero, Bruna Guedes e Heleninha, Carlos Nascimento, Nathália Caldeira, Rafael Vasconcelos, João Veras e Catia Chaia. Vocês tornaram essa jornada muito mais leve e alegre. Obrigada!

Aos companheiros do Departamento de Microbiologia por toda ajuda e momentos de descontração!

Aos queridos membros do Setor de Saneantes por me acolherem em um momento tão delicado de minha vida. Vocês não fazem ideia do quanto foram importantes!

Aos colegas Antônio Gaspar e Eliana Duarte pelo acolhimento no Setor de Vacinas/BCG e pela ajuda na reta final do Doutorado.

À professora Ianick Martins pela preciosa ajuda na análise dos dados deste estudo. Muito obrigada!

À Dra. Célia Romão pela revisão dessa tese.

À coordenação do curso de Pós-graduação na pessoa da coordenadora Dra. Katia Christina Leandro.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na pessoa do diretor Dr. Antônio Eugênio de Almeida.

Aos membros do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, em especial à Larissa Botelho pela ajuda na utilização do MALDI-TOF.

À Dra. Ana Caroline Nunes Botelho por me ensinar a coleta de “swab” de orofaringe, procedimento essencial para realização desse trabalho.

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS/FIOCRUZ) pelo uso do serviço de sequenciamento de DNA.

Quanto mais aumenta nosso conhecimento
mais evidente fica nossa ignorância.

John F. Kennedy

RESUMO

A Doença Meningocócica (DM) representa um problema de saúde pública mundial. No Brasil a DM é endêmica e a maioria dos casos da doença é causada pelo sorogrupo C. Em situações endêmicas, estima-se que 10% da população saudável carrega *N. meningitidis* (Nm) na nasofaringe. A identificação de grupos de risco, especialmente os portadores de cepas hipervirulentas, é importante para avaliar a necessidade e viabilidade de intervenção. O desenvolvimento e o uso eficaz das vacinas dependem do conhecimento do seu efeito sobre os portadores. Os objetivos do presente estudo foram estimar a prevalência de portadores assintomáticos de Nm entre adultos jovens na região metropolitana do Rio de Janeiro, e caracterizar as amostras quanto à composição clonal, sorogrupos, proteínas de membrana e suscetibilidade aos antimicrobianos. A coleta de dados foi realizada entre maio/2016 e maio/2018 com a aplicação de questionário com dados demográficos e clínicos e coleta de espécime de orofaringe. Foram incluídos no estudo voluntários de 18 a 35 anos de quatro instituições de ensino do Rio de Janeiro e de Niterói. A identificação das amostras foi realizada por MALDI-TOF e sequenciamento de *rplF*. A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada por disco-difusão para azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacino, cloranfenicol, meropenem, minociclina, rifampicina e trimetoprim-sulfametoxazol, e por difusão em gradiente de concentração para ampicilina, levofloxacino e penicilina. Os genogrupos foram detectados por PCR para A, B, C, E, W, X, Y e Z, e a tipificação realizada por MLST. A presença de “capsule null locus” (*cnl*) foi investigada nas amostras não genogrupáveis (NG), e as variantes das proteínas PorA e FetA foram determinadas para todas as amostras. Dentre os 373 voluntários incluídos no estudo, 51 (13,67%) estavam colonizados por Nm. O genogrupo mais prevalente foi B (3,48%), seguido por C (1,07%), E (0,80%), Z (0,53%) e Y (0,26%). Mais de metade das amostras foram classificadas como *cnl* (*cnl*-2, *cnl*-3 e *cnl*-12) ou NG. As variantes da PorA mais frequentes foram VR1 22, VR2 13-70, VR2 23 e VR3 35-1, e a F5-5 da FetA. Suscetibilidade reduzida ou resistência à penicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina e rifampicina foi observada em 76,4%, 70,5%, 65,2% e 3,9% das amostras, respectivamente. As mutações A510V, F504L, H541N, I515V e I566V em *penA* foram detectadas em quatro amostras com resistência intermediária à ampicilina e penicilina. Seis complexos clonais (CC) foram detectados em mais de uma amostra, sendo CC53 e CC198 predominantes entre as amostras *cnl*. Linhagens hipervirulentas (CC11, CC32, CC41/44, CC103, CC213, CC269 e CC4821) foram identificadas em 27,5% das amostras. Foi observada uma associação independente entre a colonização por Nm e homens homossexuais, frequência

a bares/boates/escolas de samba ≥ 1 vez/mês e sexo masculino, bem como risco reduzido para colonização em indivíduos de cor parda/preta.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*. Portadores assintomáticos. Gene *rplF*. Capsule null locus. MLST. Fatores de risco.

ABSTRACT

Meningococcal disease (MD) is a worldwide public health. In Brazil, MD is endemic and most of the recent cases of the disease was caused by serogroup C. In endemic situations, about 10% of the healthy population carries *N. meningitidis* (Nm) in the nasopharynx. Identifying risk groups for carriage, especially carriers of hypervirulent strains, is important to assess the need and feasibility of intervention. Development and effective use of meningococcal vaccines depend on the knowledge of their effect on carriers. This study aimed to estimate the prevalence of asymptomatic carriers of Nm among young adults from the metropolitan area of Rio de Janeiro, and to classify the isolates in serogroups, determine membrane proteins variants, antimicrobial susceptibility, and clonal composition. A cross-sectional study was conducted between May/2016 and May/2018 with oropharyngeal swab sampling. Demographic data and potential risk factors were assessed by a self-administered questionnaire. Participants were recruited among students aged 18–35 years attending four public educational institutions. Bacterial identification was assessed by MALDI-TOF and sequencing of the *rplF* gene. Susceptibility to antimicrobial agents was determined by disk-diffusion for azithromycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, chloramphenicol, meropenem, minocycline, rifampicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole, and by diffusion in a concentration gradient for ampicillin, levofloxacin, and penicillin. Isolates were classified in genogroups A, B, C, E, W, X, Y and Z by PCR, and typing by MLST. The capsule null locus (*cnl*) was investigated in the nongroupable (NG) isolates, and the variants of the PorA and FetA proteins were determined for all isolates. Among the 373 volunteers included in the study, 51 (13.67%) were colonized by Nm. The most prevalent genogroup was B (3.48%), followed by C (1.07%), E (0.80%) %, Z (0.53%) and Y (0.26%). More than half of the isolates were classified as *cnl* (*cnl*-2, *cnl*-3 and *cnl*-12) or NG. The most frequent PorA variants were VR1 22, VR2 13-70, VR2 23 and VR3 35-1, and F5-5 from FetA. Reduced susceptibility or resistance to penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin and rifampicin was observed in 76.4%, 70.5%, 65.2% and 3.9% of the isolates, respectively. The A510V, F504L, H541N, I515V and I566V mutations in *penA* were detected in four intermediate resistant isolates to ampicillin and penicillin. Six clonal complexes (CC) were detected in more than one isolate, with predominance of CC53 and CC198 among *cnl* isolates. Hypervirulent strains (CC11, CC32, CC41/44, CC103, CC213, CC269 and CC4821) were identified in 27.5% of isolates. An independent association was observed between colonization by Nm and homosexual men, attendance to

bars/nightclubs/samba clubs ≥ 1 time/month and male sex, as well as decreased risk for colonization in black people.

Keywords: *Neisseria meningitidis*. Asymptomatic carriers. *rplF* gene. Capsule null locus. MLST. Risk factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Descrição das regiões, funções e composição genética do “capsular polysaccharide locus” (<i>cps</i>) de <i>Neisseria meningitidis</i> | 26 |
| Quadro 2 - Estudos brasileiros sobre portadores assintomáticos de <i>Neisseria meningitidis</i> | 36 |
| Quadro 3 - Descrição da data de coleta, local de estudo e número de voluntários das 10 amostragens realizadas entre maio de 2016 e maio de 2018..... | 41 |
| Quadro 4 - Descrição dos valores de “score” determinados pelo software Biotyper versão 3.1 de acordo com a probabilidade de identificação da amostra bacteriana | 44 |
| Figura 1 - Frequência de portadores de <i>N. meningitidis</i> e média de idade dos participantes por coleta. As colunas cinzas representam a idade média (anos) dos participantes e as barras pretas representam o desvio padrão da média (eixo esquerdo). A linha preta pontilhada indica a frequência de portadores de <i>N. meningitidis</i> (eixo direito). Foram incluídos 373 participantes em dez coletas distintas: 1 (n=22), 2 (n=25), 3 (n=42), 4 (n=19), 5 (n=53), 6 (n=32), 7 (n=54), 8 (n=28), 9 (n=13), 10 (n=85) | 63 |
| Figura 2 - Razão de possibilidades (OR) e intervalo de confiança (95% CI) de 10 variáveis associadas à colonização por <i>Neisseria meningitidis</i> em análise univariada. Os marcadores indicam o valor de “OR” e a linha preta representa o intervalo de confiança. A linha preta pontilhada sinaliza o valor 1 do eixo X..... | 68 |
| Figura 3 - Razão de possibilidades (OR) e intervalo de confiança (95% CI) de quatro variáveis associadas à colonização por <i>Neisseria meningitidis</i> no modelo final ajustado da análise multivariada. Os marcadores indicam o valor de “OR” e a linha preta representa o intervalo de confiança. A linha preta pontilhada sinaliza o valor 1 do eixo X..... | 68 |
| Figura 4 - Árvore filogenética derivada do concatenado dos setes genes do MLST de 34 amostras de <i>Neisseria meningitidis</i> gerada pelo método de “Neighbor-joining”, utilizando o modelo “Jukes-Cantor”. A significância do arranjo dos ramos foi avaliada por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas e os números na árvore indicam a ocorrência (%) destes arranjos; apenas valores $\geq 50\%$ são mostrados | 73 |
| Figura 5 - Distribuição dos complexos clonais de 51 amostras de <i>Neisseria meningitidis</i> de acordo com o genogrupo | 74 |
| Figura 6 - Frequência de amostras de <i>Neisseria meningitidis</i> não suscetíveis a ampicilina, penicilina e trimetoprim-sulfametoxazol por complexos clonais hipervirulentos e não hipervirulentos | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>rplF</i> em <i>N. meningitidis</i> conforme proposto por Bennett e colaboradores (2014) | 45 |
| Tabela 2 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos gênicos específicos para os sorogrupos A, B, C, W, Y (Taha, 2000), E (Zhu <i>et al.</i> , 2012), X (Yaro <i>et al.</i> , 2012) e Z (Diallo <i>et al.</i> , 2018) | 48 |
| Tabela 3 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de <i>N. meningitidis</i> “capsule null locus” (<i>cnl</i>) conforme proposto por Claus e colaboradores (2002) | 49 |
| Tabela 4 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>porA</i> em <i>N. meningitidis</i> conforme proposto por Urwin (2001) | 50 |
| Tabela 5 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>fetA</i> em <i>N. meningitidis</i> conforme proposto por Thompson e colaboradores (2003) | 50 |
| Tabela 6 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no MLST conforme descrito no banco de dados “Neisseria Sequence Typing Home Page” (http://pubmlst.org/neisseria/) | 53 |
| Tabela 7 - Número, sexo e idade dos participantes por Instituição de ensino | 58 |
| Tabela 8 - Identificação de 101 amostras bacterianas pela técnica de MALDI-TOF | 59 |
| Tabela 9 - Identificação da genoespécie de 61 amostras bacterianas pelo sequenciamento do gene <i>rplF</i> | 60 |
| Tabela 10 - Frequência de genogrupos entre 51 amostras de <i>N. meningitidis</i> isoladas de adultos jovens da região metropolitana do Rio de Janeiro | 60 |
| Tabela 11 - Distribuição de genogrupos, variantes da PorA e tipo de FetA entre 51 amostras de <i>N. meningitidis</i> isoladas de adultos jovens da região metropolitana do Rio de Janeiro | 62 |
| Tabela 12 - Análise univariada de características demográficas dos participantes do estudo e prevalência de <i>N. meningitidis</i> | 63 |
| Tabela 13 - Análise univariada de dados socioeconômicos e outras características dos participantes do estudo e a colonização por <i>N. meningitidis</i> | 65 |
| Tabela 14 - Modelo final ajustado da análise multivariada para fatores associados com a colonização por <i>N. meningitidis</i> entre os voluntários do estudo | 67 |

| | |
|--|----|
| Tabela 15 - Suscetibilidade à ampicilina e à penicilina, CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e variação das CIM observadas entre as amostras do estudo | 69 |
| Tabela 16 - Definição do complexo clonal, “sequence type” e perfil genotípico de 34 amostras de <i>N. meningitidis</i> | 71 |
| Tabela 17 - Definição do complexo clonal, dos perfis alélico e genotípico de 17 amostras de <i>N. meningitidis</i> | 72 |
| Tabela 18 - Características da montagem e anotação do genoma de quatro amostras de <i>N. meningitidis</i> submetidas ao WGS | 76 |
| Tabela 19 - Variantes dos genes <i>fHbp</i> , <i>nhba</i> e <i>nadA</i> , e determinantes de resistência extraídos do WGS de quatro amostras de <i>N. meningitidis</i> | 76 |

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4CMenB - “four-component MenB vaccine” (Bexsero)
°C - graus Celsius
β - beta
mL - mililitro
mM - nanomolar
mg/L - miligrama por litro
mg/ml - miligrama por mililitro
ng - nanograma
μL - microlitro
μM - micromolar
μmol - micromol
μg - micrograma
μg/mL - micrograma por mililitro
rpm - rotação por minuto
U/L - unidade por litro
ABC - “ATP-binding cassette”
abcZ - “ABC transporter ATP-binding protein”
adk - adenosina quinase
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aroE - “shikimate dehydrogenase (NADP(+))”
ATCC - “American Type Culture Collection”
catP - “chloramphenicol acetyltransferase”
CC - complexo clonal
CCS - Centro de Ciências da Saúde
CEP - código de endereçamento postal
CEP-IOC - Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz
CIM - concentração inibitória mínima
CLSI - “Clinical & Laboratory Standards Institute”
CRIE - Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais
cnl - “capsule null locus”
cps - “capsular polysaccharide locus”
argA - proteína de divisão celular

CT - Centro de Tecnologia

ctrA - “cell cycle transcriptional regulator”

CO₂ - dióxido de carbono

DM - doença meningocócica

DNA - ácido desoxirribonucleico (“deoxyribonucleic acid”)

EMGM - Sociedade Europeia de Doença Meningocócica (“European Meningococcal Disease Society”)

EPSJV - Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio

FDA - “Food and Drug Administration”

FetA - “iron export ATP-binding protein”

fHbp - “factor H binding protein”

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

folP - “dihydropteroate synthase”

FrpB - “iron-regulated outer membrane protein”

fumC - “fumarate hydratase class II”

galE - “UDP-glucose 4-epimerase”

GC - guanina-citosina

gdh - “glutamate dehydrogenase”

gyrA - “DNA gyrase subunit A”

HCCA - ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HSH - homens que fazem sexo com homens

IAL - Instituto Adolfo Lutz

IC - intervalo de confiança

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

IST - infecções sexualmente transmissíveis

LOS - lipooligossacarídeo

MALDI-TOF - “matrix assisted laser desorption/ ionization time of flight”

Mbp - mega pares de bases

metA - “homoserine O-acetyltransferase”

MLST - “multilocus sequence typing”

n^o - número

NadA - “Neisseria adhesin A”

NHBA - “Neisseria heparin-binding antigen”
nspA - “surface protein A”
OR - razão de chances (“odds ratio”)
pb - pares de bases
PBP-2 - “penicillin-binding protein 2”
PCR - reação em cadeia da polimerase
pdhC - “pyruvate dehydrogenase subunit C”
PDTIS/FIOCRUZ - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
penA - “penicillin binding protein”
PGAP - “Prokaryotic Genome Annotation Pipeline”
pgm - fosfoglucomutase
PNI/MS - Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde
PorA - proteína de membrana externa de classe 1
PorB - porina
rplF - “50S ribosomal protein L6”
rpoB - “beta subunit of RNA polymerase”
rRNA - RNA ribossomal
SBIm - Sociedade Brasileira de Imunizações
SBP - Sociedade Brasileira de Pediatria
shlA - hemolisina
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIREVA - Sistema Regional de Vacinas (OPAS/OMS)
SMS/RJ - Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro
sodC - “superoxide dismutase [Cu-Zn]”
ST - “sequence type”
tauE - “membrane transporter protein”
TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido
tex - “transcriptional accessory protein”
TMM - Thayer-Martin modificado
Tn4451 - “chloramphenicol-resistance transposon”
TonB - proteína de transporte
UEZO - Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
UFF - Universidade Federal Fluminense
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

U - unidade

UV - radiação ultravioleta

VCNT - vancomicina, colistina, nistatina, lactato de trimetoprim

VR - região variável

WGS - “whole genome sequencing”

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 <i>Neisseria meningitidis</i> | 21 |
| 1.1.1 Identificação | 22 |
| 1.1.1.1 <i>Cápsula</i> | 24 |
| 1.1.1.2 <i>Proteínas de membrana</i> | 24 |
| 1.2 Epidemiologia da Doença Meningocócica | 27 |
| 1.2.1 Mundo | 27 |
| 1.2.2 Brasil | 28 |
| 1.2.3 Município do Rio de Janeiro | 29 |
| 1.3 Prevenção e tratamento da Doença Meningocócica | 29 |
| 1.3.1 Vacinação | 30 |
| 1.3.1.1 <i>Vacinação no Brasil</i> | 31 |
| 1.3.2 Antibioticoterapia | 31 |
| 1.4 Resistência aos antimicrobianos em <i>N. meningitidis</i> | 32 |
| 1.5 Portadores assintomáticos | 33 |
| 1.5.1 Estudos brasileiros | 34 |
| 2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO | 38 |
| 3 OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 Objetivo geral | 39 |
| 3.2 Objetivos específicos | 39 |
| 3.3 Objetivo secundário | 39 |
| 4 METODOLOGIA | 40 |
| 4.1 Desenho do estudo | 40 |
| 4.2 População de estudo e tamanho amostral | 40 |
| 4.3 Coleta e processamento do espécime clínico | 40 |
| 4.3.1 Coleta da secreção de orofaringe | 41 |
| 4.3.2 Cultivo do espécime clínico | 41 |
| 4.4 Identificação bacteriana | 42 |
| 4.4.1 Identificação fenotípica | 43 |
| 4.4.1.1 <i>Observação das características coloniais em ágar sangue</i> | 43 |
| 4.4.1.2 <i>Observação das características morfo-tintoriais</i> | 43 |
| 4.4.1.3 <i>Teste da produção de citocromo-oxidase</i> | 43 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.4.2 | Identificação por espectrometria de massas | 43 |
| 4.4.3 | Sequenciamento do gene <i>rplF</i> | 44 |
| 4.4.3.1 | <i>Extração do DNA genômico</i> | 44 |
| 4.4.3.2 | <i>Amplificação</i> | 45 |
| 4.4.3.3 | <i>Sequenciamento</i> | 46 |
| 4.4.4 | Genogrupagem | 47 |
| 4.4.5 | Caracterização do “cluster” gênico capsular | 48 |
| 4.4.6 | Caracterização da PorA | 49 |
| 4.4.7 | Caracterização da FetA | 50 |
| 4.5 | Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos | 51 |
| 4.5.1 | Método de disco-difusão | 51 |
| 4.5.2 | Método de difusão em gradiente de concentração | 51 |
| 4.6 | Tipificação | 52 |
| 4.6.1 | “Multilocus sequence typing” (MLST)..... | 52 |
| 4.6.1.1 | <i>Análise das sequências</i> | 53 |
| 4.6.2 | “Whole genome sequencing” (WGS) | 54 |
| 4.6.2.1 | <i>Análise das sequências</i> | 55 |
| 4.7 | Questionário | 55 |
| 4.8 | Análise estatística | 56 |
| 4.9 | Aspectos éticos | 56 |
| 5 | RESULTADOS | 58 |
| 5.1 | População do estudo | 58 |
| 5.2 | Caracterização das amostras bacterianas | 59 |
| 5.2.1 | Genogrupagem | 59 |
| 5.2.2 | Caracterização da PorA e FetA | 61 |
| 5.3 | Prevalência de portadores e fatores associados à colonização | 61 |
| 5.4 | Suscetibilidade aos antimicrobianos | 68 |
| 5.5 | Tipificação | 70 |
| 5.5.1 | “Multilocus sequence typing” (MLST)..... | 70 |
| 6 | DISCUSSÃO | 77 |
| 6.1 | Fatores associados à colonização | 77 |
| 6.2 | Caracterização das amostras bacterianas | 80 |
| 6.2.1 | Genogrupos | 81 |
| 6.2.2 | Perfil genotípico | 82 |

| | |
|---|-----------|
| 6.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos..... | 85 |
| 6.4 Limitações do estudo..... | 86 |
| REFERÊNCIAS | 88 |

1 INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis é um dos principais agentes da meningite bacteriana, juntamente com *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (MAIDEN, 2013). Segundo Leimkugel e colaboradores, a carga da doença (do inglês “burden of disease”), que mensura o impacto de morte prematura e incapacidade causada por doenças e injúrias, associada à meningite bacteriana é comparável à carga da doença de várias infecções tropicais (tripanossomíase, doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose, filariose linfática, oncocercose, hanseníase e dengue) combinadas (LEIMKUGEL *et al.*, 2009). Quadros infecciosos invasivos causados pela bactéria *N. meningitidis* são comumente denominados como doença meningocócica (DM). A DM representa um problema de saúde pública mundial e pode se apresentar na forma de meningite, sepse, ou ambas, além de outras infecções menos comuns (LECA *et al.*, 2015; PACE, POLLARD, 2012). Estima-se que em 2017 mais de 400 mil casos da doença ocorreram em todo mundo, sendo que aproximadamente 30 mil casos culminaram em óbito (“Institute for Health Metrics and Evaluation”, 2020 - <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>). Além da significativa taxa de letalidade que pode chegar a 20% em países em desenvolvimento, a DM pode deixar sequelas permanentes em 12 a 20% dos sobreviventes como danos neurológicos, distúrbios psicológicos, surdez, cegueira, convulsão, paralisia e amputação de membros (ABIO *et al.*, 2013; PACE, POLLARD, 2012; STEPHENS *et al.*, 2007).

1.1 *Neisseria meningitidis*

Os primeiros relatos de epidemia de meningite meningocócica datam do início do século XIX, tendo sido registrados em Genebra (Suíça) no ano de 1805 (VIEUSSEUX, 1805 apud ROUPHAEL, STEPHENS, 2012) e em Massachusetts (Estados Unidos da América) no ano seguinte (DANIELSON, MANN, 1806 apud ROUPHAEL, STEPHENS, 2012). Porém, só em 1887, o patologista austríaco Anton Weichselbaum isolou pela primeira vez a bactéria *N. meningitidis* do liquor de um paciente com meningite (WEICHSELBAUM, 1887 apud ROUPHAEL, STEPHENS, 2012). A colonização da nasofaringe de indivíduos saudáveis por *N. meningitidis* foi reconhecida no início do século XX (GLOVER, 1918 apud ROUPHAEL, STEPHENS, 2012; KIEFER, 1896 apud ROUPHAEL, STEPHENS, 2012).

N. meningitidis é um diplococo Gram-negativo pertencente à família Neisseriaceae, juntamente com os gêneros *Kingella*, *Eikenella*, dentre outros (LIU *et al.*, 2015). É um

microrganismo fastidioso, podendo ser capsulado ou não, produtor de ácido a partir da oxidação da glicose e da maltose, oxidase e catalase positivo. A cultura de *N. meningitidis* em ágar sangue se apresenta na forma de colônias convexas acinzentadas, ocasionalmente mucoides (ELIAS *et al.*, 2015).

N. meningitidis é classificado em sorogrupos por testes sorológicos baseados na variação antigênica do polissacarídeo capsular. Adicionalmente, as amostras podem ser classificadas em sorosubtipo, sorotipo e imunotipo, a partir da caracterização das proteínas de membrana externa PorA, PorB e do lipoolissacarídeo (LOS), respectivamente (ROUPHAEL, STEPHENS, 2012). A Sociedade Europeia de Doença Meningocócica (“European Meningococcal Disease Society”, EMGM) recomenda que a designação de amostras de *N. meningitidis* inclua o sorogrupo, as regiões variáveis da PorA (sorosubtipo), a região variável da proteína de membrana externa FetA, o “sequence type” (ST) e o complexo clonal (CC) definidos pela técnica de “multilocus sequence typing” (MLST) (JOLLEY *et al.*, 2007). Até o momento, o microrganismo *N. meningitidis* é classificado em 12 sorogrupos: A, B, C, E (29E), H, I, K, L, W (W-135), X, Y e Z. No entanto, mais de 90% dos casos da DM no mundo são causados por amostras capsuladas pertencentes a apenas seis sorogrupos: A, B, C, W, Y e X (RACLOZ, LUIZ, 2010; STEPHENS, 2007; YAZDANKHAH, CAUGANT, 2004). A classificação das linhagens de *N. meningitidis* conforme recomendado pela EMGM representa uma importante informação epidemiológica tendo em vista que a maioria dos casos de DM é causada por um número limitado de sorogrupos, consequentemente a definição do sorogrupo não é suficiente para constatação de surtos, e que entre os antígenos avaliados estão alguns alvos vacinais (JOLLEY *et al.*, 2007).

N. meningitidis possui um genoma circular de aproximadamente 2,2 Mbp com centenas de cópias de elementos de repetição. As células de *N. meningitidis* são poliploides, contendo de dois a cinco genomas equivalentes por célula em crescimento e duas cópias do cromossomo por unidade celular (ROTMAN, SEIFERT, 2014).

1.1.1 Identificação

A identificação fenotípica da espécie *N. meningitidis* inclui observação da morfologia colonial, observação das características morfotintoriais com auxílio da técnica de coloração de Gram, produção da enzima oxidase, produção de ácido a partir de açúcares (glicose, maltose, lactose, sacarose e frutose), redução do nitrato e produção de polissacarídeo a partir da sacarose. Ocasionalmente, *N. meningitidis* pode não acidificar o meio contendo açúcar (BROOKS *et al.*,

2020; ELIAS *et al.*, 2015). Por esse motivo, existe a necessidade de se utilizar outras metodologias para confirmação da espécie. A identificação bacteriana por espectrometria de massas no sistema “matrix assisted laser desorption/ ionization time of flight” (MALDI-TOF) representa uma opção rápida e simples quando comparada à identificação por testes bioquímicos. Na análise por espectrometria de massas no sistema MALDI-TOF, proteínas estruturais, tais como proteínas ribossômicas, são extraídas a partir de uma colônia bacteriana e ionizadas por um laser. Os íons gerados formam espectros de massa únicos com picos de razão massa-carga (m/z) de intensidades variáveis. Os espectros de massa da amostra testes são comparados àqueles depositados em um banco de dados de espectros de referência para identificação do microrganismo (GE *et al.*, 2017). Embora a ocorrência de erro na identificação de *N. meningitidis* já tenha sido descrita (CUNNINGHAM, MAINELLA, PATEL, 2014; HONG, BAKHALEK, TAHA, 2019; MOREL *et al.*, 2018; UNALAN-ALTINTOP, KARAGOZ, HAZIROLAN, 2020), a detecção de amostras dessa espécie por MALDI-TOF tem se mostrado satisfatória (ELIAS *et al.*, 2015).

A identificação molecular também representa uma alternativa para a confirmação de amostras como *N. meningitidis*. Além do sequenciamento do gene 16S rRNA (ELIAS *et al.*, 2015) e de um fragmento do gene *rplF*, que codifica a proteína L6 da subunidade ribossômica 50S (BENNETT *et al.*, 2014), a detecção de genes específicos da espécie também tem sido empregada. Dentre os genes pesquisados estão: *ctrA* (FROSCH *et al.*, 1992), *crgA* (TAHA, 2000), *nspA* (DE FILIPPIS *et al.*, 2005) e *sodC* (DOLAN THOMAS *et al.*, 2011). A pesquisa do gene *ctrA*, que codifica uma proteína de transporte localizada na membrana externa, pode resultar em resultados falso-negativos para detecção de *N. meningitidis*, já que o “locus” que contém esse gene pode sofrer rearranjos resultando na ausência do *ctrA* em 16 a 28% das amostras. Adicionalmente, estima-se que o gene *ctrA* pode faltar em até 60% das amostras não sorogrupáveis, geralmente oriundas de portadores assintomáticos. Hou e colaboradores demonstraram que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção do gene *crgA* que codifica um regulador transcricional, em *N. meningitidis*, também são capazes de amplificar este gene em amostras não-tipáveis de *H. influenzae* (HOU *et al.*, 2014). O gene *nspA*, que codifica uma proteína de membrana externa com atividade de porina, é conservado nas duas espécies de importância clínica do gênero *Neisseria*, *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* (DE FILIPPIS *et al.*, 2005), mas já foi detectado em *N. lactamica* (BENNETT *et al.*, 2010). Em uma análise comparativa de 183 genomas de *N. meningitidis* observou-se que o gene *sodC*, que codifica a enzima superóxido dismutase, não era conservado em todos os genomas, o que inviabiliza a utilização desse gene como marcador para detecção de *N. meningitidis*. Neste

estudo demonstrou-se ainda que os genes *tauE* (codifica uma das subunidades da DNA polimerase), *metA* (codifica uma transferase) e *shlA* (codifica uma proteína de transporte) estavam presentes em todos os genomas analisados, não tendo sido descrito em outras espécies, e podem ser utilizados como alvos para identificação da espécie *N. meningitidis* (DIENE *et al.*, 2016).

1.1.1.1 Cápsula

A cápsula polissacarídica é associada à virulência em cepas de *N. meningitidis* (SCHOEN *et al.*, 2008). Nessa espécie a cápsula é produzida via transportadores “ATP-binding cassette” (ABC). A polimerização do polissacarídeo ocorre na membrana interna bacteriana, sendo o polissacarídeo posteriormente transportado através da membrana e translocado para a superfície da célula (CLEMENCE; MAIDEN; HARRISON, 2018). A cápsula é codificada por genes do “capsular polysaccharide locus” (*cps*), organizados em cinco regiões distintas ordenadas como D-A-C-E-D'-B (HARRISON *et al.*, 2013), conforme descrito no Quadro 1.

A região D do locus *cps* contém os genes associados à síntese de LOS, enquanto a região D' é uma duplicação da região D composta por uma cópia truncada do gene *galE* (PETERING *et al.*, 1996). A região A está envolvida na síntese capsular e pode se apresentar em 12 variantes distintas. Essa região é formada por genes que codificam glicosiltransferases, polimerases e proteínas envolvidas em modificações da cápsula. As regiões B e C são compostas por genes responsáveis pela translocação e transporte de cápsulas, respectivamente. A região E é composta pelo gene *tex* e duas pseudo-citosina metiltransferases de função desconhecida (CLEMENCE; MAIDEN; HARRISON, 2018; HARRISON *et al.*, 2013). Amostras de *N. meningitidis* que não contêm as regiões A, B e C são denominadas como “capsule null locus” (*cnl*) e possuem uma sequência de 113-118 pb localizada entre as regiões D e E (CLAUS *et al.*, 2002).

1.1.1.2 Proteínas de membrana

Proteínas de membrana externa são estruturas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro, desenvolvendo funções de adesão, invasão, evasão e aquisição de nutrientes, além de serem possíveis alvos vacinais em *N. meningitidis* (TOMMASSEN; ARENAS, 2017). A PorA, também conhecida como proteína de membrana externa de classe 1, tem sequências de aminoácidos relativamente conservadas entre as espécies de *Neisseria*, formato similar a um

barril e sequências variáveis formando “loops”, que se projetam da superfície bacteriana para o ambiente externo (VAN DER LEY *et al.*, 1991). A maior parte das variações ocorre no primeiro, quarto e quinto “loops”, conhecidos como regiões variáveis (VR) 1, 2 e 3 (VR1, VR2 e VR3), respectivamente (FEVEARES; PIZZA, 2009). Sequências de aminoácidos compartilhando ao menos 80% de similaridade são incluídas na mesma família de VR (RUSSELL *et al.*, 2004).

A FetA é uma proteína reguladora de ferro, também conhecida como FrpB, pertencente à família de receptores dependentes de TonB. Possui conformação de β -barril e 13 “loops” expostos na superfície celular, sendo o quinto “loop” altamente diverso entre cepas de *N. meningitidis* (FEVEARES; PIZZA, 2009).

A proteína fHbp é uma lipoproteína que está presente na membrana externa de todas as cepas de *N. meningitidis* e atua na modulação da atividade da via alternativa do sistema complemento mediante interação com a proteína reguladora fator H (fH). *N. meningitidis* evita a lise mediada por complemento pela ligação de fHbp ao fH. A proteína fHBP é classificada em três variantes denominados 1, 2 e 3 (classificação Novartis) ou em duas famílias A e B (classificação Pfizer), onde a família A corresponde às variantes 2 e 3, e a família B corresponde à variante 1 (FEVEARES; PIZZA, 2009).

NadA (Neisseria adhesin A) é uma adesina capaz de induzir uma forte resposta bactericida desempenha um papel importante na virulência de *N. meningitidis*. Estima-se que essa proteína está presente em 50% das amostras clínicas de *N. meningitidis*, sendo frequentemente associado a cepas pertencentes a clones hipervirulentos (FEVEARES; PIZZA, 2009).

A lipoproteína NHBA (Neisserial Heparin-Binding protein) é uma adesina presente em espécies do gênero *Neisseria* e tem como função recrutar a heparina para a superfície da célula aumentando assim a resistência ao soro humano. Adicionalmente, NHBA já foi associada com formação de biofilme e danos vasculares (VACCA *et al.*, 2016; PANTANO *et al.*, 2019). NHBA apresenta alta diversidade de variantes peptídicas, identificadas numericamente, que possuem entre 430 e 500 resíduos de aminoácidos PANTANO *et al.*, 2019).

Quadro 1 - Descrição das regiões, funções e composição genética do “capsular polysaccharide locus” (*cps*) de *Neisseria meningitidis*

| Região | Função | Genes | <i>cnl</i> |
|---------------|-------------------------|---|---|
| D | Síntese de LOS | <i>rfbC, rfbA, rfbB, galE</i> | Presente |
| A | Síntese da cápsula | <i>csaD, csaC, csaB, csaA</i> (sorogrupo A) | Ausente |
| | | <i>ctrG, csb, cssC, cssB, cssA</i> (sorogrupo B) | |
| | | <i>ctrG, cssE, csc, cssC, cssB, cssA</i> (sorogrupo C) | |
| | | <i>cseG, cseF, cseE, cseD, cseC, cseB, cseA, IS1301</i> (sorogrupo E) | |
| | | <i>galU, ctrG, cssF, csw, cssC, cssB, cssA</i> (sorogrupo W) | |
| | | <i>csxC, csxB, csxA, IS1016</i> (sorogrupo X) | |
| | | <i>galU, ctrG, cssF, csy, cssC, cssB, cssA</i> (sorogrupo Y) | |
| | | <i>cszD, cszC, cszB, cszA, IS1301</i> (sorogrupo Z) | |
| C | Transporte da cápsula | <i>ctrA, ctrB, ctrC, ctrD</i> | Ausente |
| E | Função desconhecida | <i>tex</i> , duas pseudo-citosina metiltransferases | Incompleta (contém apenas o gene <i>tex</i>) |
| D' | Síntese de LOS | <i>galE2</i> (truncado), <i>rfbB2, rfbA2, rfbC2</i> | Ausente |
| B | Translocação da cápsula | <i>ctrE, ctrF</i> | Ausente |

cnl: “capsule null locus”; LOS: lipoolissacarídeo

Fonte: A autora, 2020.

1.2 Epidemiologia da Doença Meningocócica

Contextos demográficos, assim como tendências e comportamentos sociais, podem influenciar significativamente na transmissão de doenças infecciosas (SUK *et al.*, 2014). Embora seja extremamente rara, mas devastadora, viajantes internacionais estão expostos ao risco de adquirir a doença durante a viagem a países onde a DM é endêmica, podendo agir como reservatório de cepas epidêmicas e atuar na dispersão dessas linhagens (MEMISH, 2002). Estudos sugerem que a migração pode representar um importante papel na dispersão de cepas invasivas de *N. meningitidis*, e apontam para a necessidade de especial atenção para este grupo de indivíduos (BARNETT; WALKER, 2008). A imigração pode contribuir para mudanças na epidemiologia das cepas circulantes, e sorogrupos pouco comuns podem se tornar mais frequentes (STEFANELLI *et al.*, 2017; TAFURI *et al.*, 2012). O crescente número de imigrantes do continente africano foi apontado como o responsável pela introdução de cepas e sorogrupos na Europa, e pela ocorrência de surtos devido a linhagens incomuns em países como França e Reino Unido (TAHA *et al.*, 2013; STEFANELLI *et al.*, 2015).

1.2.1 Mundo

N. meningitidis é um microrganismo comensal em humanos. Neste hospedeiro, coloniza a mucosa da nasofaringe (YAZDANKHAH, CAUGANT, 2004). A DM é um raro desfecho da colonização por *N. meningitidis*, ocorrendo mais frequentemente logo após a aquisição da bactéria pelo hospedeiro suscetível (CAUGANT *et al.*, 2007). Crianças, adolescentes e adultos jovens estão sob maior risco de desenvolver a doença (GAMMELGAARD *et al.*, 2011; BLACK *et al.*, 2012). A incidência anual da DM varia de <2 casos por 100.000 habitantes em países como França, Alemanha, Itália, Suécia, Polônia, Estados Unidos e China, a >10 casos por 100.000 habitantes em alguns países africanos (READ, 2014). Burkina Faso, Camarões, Chade, Costa do Marfim, Eritreia, Etiópia, Gâmbia, Gana, Guiné, Guiné-Bissau, Mali, Mauritânia, Níger, Nigéria, Quênia, República Centro-Africana, República Democrática do Congo, Senegal, Sudão, Sudão do Sul, Togo e Uganda, que compõem a região da África Subsaariana conhecida como cinturão da meningite, epidemias da DM são recorrentes desde 1905, onde a incidência anual da doença durante os períodos epidêmicos pode chegar a 1200 casos por 100.000 habitantes (STEPHENS *et al.*, 2007; HARRISON *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2017).

A distribuição geográfica dos sorogrupos de *N. meningitidis* é díspar. Casos esporádicos da DM são mais frequentemente causados pelo sorogrupo B, enquanto os sorogrupos A e C têm sido associados com surtos da doença. O sorogrupo Y emergiu recentemente como um importante agente da DM na América do Norte. No continente africano, grandes epidemias da DM são comuns, sendo frequentemente causadas pelo sorogrupo A e, mais recentemente, também pelo sorogrupo W (YOGEV; TAN, 2011). Embora as cepas acapsuladas ou não sorogrupáveis sejam consideradas não patogênicas, alguns casos de DM ocasionados por essas linhagens foram descritos (VOGEL *et al.*, 2004; HOANG *et al.*, 2005; FINDLOW *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2015).

Alguns complexos clonais (CC) foram relacionados a uma maior propensão em causar DM, sendo, portanto, denominados como linhagens hiperinvasivas (GIANCHECCHI *et al.*, 2015). Os CC11, CC32, CC269 e CC41/44 estão incluídos entre essas linhagens (YAZDANKHAH *et al.*, 2004; WATKINS; MAIDEN, 2012; READ, 2014).

1.2.2 Brasil

N. meningitidis é o principal agente etiológico da meningite bacteriana no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016). A DM é endêmica e a maioria dos casos recentes da doença foi ocasionada pelo sorogrupo C (SÁFADI *et al.*, 2014; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016). Segundo o Boletim Epidemiológico emitido pela Secretaria de Vigilância em Saúde, foram registrados 18.756 casos confirmados de DM em todo o país entre 2007 e 2013, representando uma taxa de incidência média de 1,4 casos por 100.000 habitantes por ano. Neste mesmo período ocorreram 4.156 óbitos relacionados à DM, resultando em uma taxa de mortalidade média de 0,3 por 100.000 habitantes por ano e uma taxa de letalidade média de 22,2%. Embora tenha ocorrido uma redução na taxa de incidência da doença a partir de 2011, a taxa de letalidade aumentou no período de 2007 (21,6%) a 2013 (22,9%). Durante o período estudado, houve registro de DM em todos os meses, com um aumento do número de casos de maio a setembro. A maioria dos casos registrados (58,4%) ocorreu em residentes dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016).

Apesar do decréscimo observado nas taxas de incidência e de mortalidade entre crianças de até 4 anos de idade a partir do ano de 2011, as crianças nessa faixa etária representam o principal grupo acometido pela DM no país. Os casos de DM se apresentam principalmente na forma de meningite meningocócica (39,1%), seguida de meningite meningocócica associada a

meningococemia (30,9%) e meningococemia (30,0%). A taxa de letalidade média associada às formas clínicas da DM é de 39,4%, 18,6% e 11,8% para meningococemia, meningite meningocócica associada a meningococemia e meningite meningocócica, respectivamente. De 2007 a 2013, os casos de DM notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) foram ocasionados pelos sorogrupos A, B, C, E, W e Y. O sorogrupo C foi o mais prevalente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste, enquanto o sorogrupo B predominou na região Sul (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016).

Dados da Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (SES/RJ) apontam para uma incidência anual inferior a 1% desde o ano de 2015, mas a taxa de letalidade da doença se manteve alta (superior a 20%). Embora o sorogrupo C seja prevalente no estado do Rio de Janeiro, desde 2017 há um aumento do percentual de casos causados pelo sorogrupo B e uma tendência de diminuição da ocorrência de casos relacionados ao sorogrupo C (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2019).

1.2.3 Município do Rio de Janeiro

Epidemias da DM foram registradas na cidade do Rio de Janeiro no início dos anos 1970 e na década de 1990. No ano de 1995, a incidência da doença na cidade ultrapassou 10 casos por 100.000 habitantes. No período de 1984 a 2005, o sorogrupo B foi responsável pela maioria dos casos de DM na cidade do Rio de Janeiro, com exceção do ano de 1995, quando o sorogrupo C foi o mais prevalente. A partir de 2005 o sorogrupo C se tornou a principal causa da doença no município do Rio de Janeiro (BARROSO *et al.*, 2010). Dados da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (SMS/RJ) apontam para uma incidência anual de 1,6 a 3,9 casos de DM por 100.000 habitantes no período de 2000 a 2014 (SMS/RJ). Conforme análise dos dados do SINAN realizada por Azevedo e colaboradores, a incidência da DM no Brasil tem variado de 2,2 (anos de 2000 a 2002), 1,8 (anos de 2003 a 2005), 1,4 (anos de 2006 a 2008) e 1,5 (anos de 2009 e 2010) casos por 100.000 habitantes (AZEVEDO *et al.*, 2013). Entretanto, a incidência da doença no município do Rio de Janeiro tem sido de 3,1 (2000 a 2002), 3,2 (2003 a 2005), 2,3 (2006 a 2008) e 3,1 (2009 e 2010) casos por 100.000 habitantes (SMS/RJ).

1.3 Prevenção e tratamento da Doença Meningocócica

A soroterapia foi introduzida como tratamento da DM em 1913 (FLEXNER, 1913 apud ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Posteriormente, em 1937, iniciou-se a utilização de

sulfonamidas, que foi utilizada até a década de 60 (SCHWENTKER *et al.*, 1937 apud ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Em decorrência da emergência da resistência às sulfonamidas, deu-se início ao desenvolvimento das primeiras vacinas contra o *N. meningitidis* (ARTENSTEIN *et al.*, 1970 apud ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

1.3.1 Vacinação

A vacinação contra *N. meningitidis* consiste em uma importante intervenção para a prevenção da DM (LECA *et al.*, 2015).

As vacinas polissacarídicas foram inicialmente desenvolvidas para combater o sorogrupo C, e posteriormente os sorogrupos A, W e Y. Apesar de segura, a vacina constituída do polissacarídeo capsular bacteriano purificado não induz o desenvolvimento de memória imunológica, tornando-se eficaz apenas a curto prazo em populações restritas, não sendo indicada para imunização em crianças abaixo de dois anos e massiva da população (MAIDEN, 2013).

Nos anos 1980, foram desenvolvidas as vacinas conjugadas, que contêm uma molécula polissacarídica conjugada a um antígeno proteico capaz de estimular células T. O recrutamento de células T resulta na indução de memória imunológica (MAIDEN, 2013), o que torna as vacinas conjugadas imunogênicas tanto em crianças quanto em adultos. Além disso, essas vacinas atuam em portadores assintomáticos estabelecendo imunidade de rebanho, e também estão disponíveis para os sorogrupos A, C, W e Y (ALI *et al.*, 2014).

O sorogrupo B de *N. meningitidis* possui em sua estrutura capsular o α -2,8 ácido N-acetilneuramínico, molécula antígenicamente similar ao ácido presente em tecidos humanos. Essa característica inviabiliza a utilização do polissacarídeo capsular no desenvolvimento vacinal (HARRISON, 2015), devido à sua pobre imunogenicidade e à possibilidade do surgimento de resposta autoimune (LECA *et al.*, 2015). Com auxílio da vacinologia reversa, foram selecionadas três proteínas potencialmente imunogênicas para o estabelecimento de uma vacina contra o sorogrupo B de *N. meningitidis*. Após uma série de estudos, formulou-se a vacina 4CMenB (Bexsero[®], GSK Vaccines), composta pelos antígenos “factor H binding protein” (fHbp), “Neisseria adhesin A” (NadA) e “Neisseria heparin-binding antigen” (NHBA), além da PorA P1.4 oriunda da vesícula de membrana externa da cepa australiana NZ98/254 (LECA *et al.*, 2015). A vacina 4CMenB foi licenciada pelo “Food and Drug Administration” (FDA), dos Estados Unidos, em janeiro de 2015 (FOLARANMI *et al.*, 2015), foi registrada no Brasil e está disponível em clínicas particulares. Uma nova vacina contra o sorogrupo B que

pode proteger contra outros sorogrupos, aprovada pela agência FDA é composta por duas subfamílias da proteína fHbp, conhecida como MenB-fHbp (Trumenba[®], Wyeth Pharmaceuticals). A vacina, licenciada em outubro de 2014, foi formulada a partir da cepa causadora de surto em Nova Jersey e na Califórnia, Estados Unidos, em 2013 (FOLARANMI *et al.*, 2015).

1.3.1.1 Vacinação no Brasil

Em 2010, uma vacina meningocócica conjugada ao toxoide diftérico contra o sorogrupo C foi introduzida no calendário de vacinação da criança do Programa Nacional de Imunização (PNI/MS) para administração de três doses em crianças de até 12-15 meses de idade. A partir de janeiro de 2016, a vacinação com a vacina meningocócica foi ampliada para crianças menores de 5 anos de idade. Em 2018, o PNI/MS incluiu a vacinação de adolescentes de 11 e 14 anos no calendário vacinal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A vacina também é disponibilizada nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE) para portadores de asplenia anatômica ou funcional, pacientes com imunodeficiência congênita da imunidade humoral, menores de 13 anos com aids, pacientes com implante de cóclea e doenças de depósito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). No ano de 2020, a vacina meningocócica conjugada ACWY foi incluída no PNI/MS para adolescentes de 11 e 12 anos de idade, independentemente da situação vacinal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a), e nos CRIE para pacientes a partir de 14 anos de idade com hemoglobinúria paroxística noturna em uso de eculizumabe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b). A Sociedade Brasileira de Imunizações (SBIIm) e a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) recomendam ainda a administração em crianças das vacinas meningocócica conjugada ACWY e a 4CMenB, disponibilizadas em clínicas particulares de imunização (SBIIm, 2015; SBP, 2015).

1.3.2 Antibioticoterapia

O rápido início da DM e a possibilidade de ser fatal dentro de poucas horas torna necessária uma imediata e efetiva antibioticoterapia (BORROW, 2012; BERTRAND *et al.*, 2012). O tratamento de escolha para casos da doença consiste na administração parenteral de beta-lactâmicos (HILL *et al.*, 2010), tais como penicilina, ampicilina, ou penicilina em combinação com cloranfenicol (ARREAZA *et al.*, 2000). No caso de amostras resistentes à penicilina, recomenda-se a administração de cefotaxime ou ceftriaxona. Cefepime,

fluoroquinolonas e meropenem podem ser utilizados como alternativas terapêuticas (VAN DE BEEK *et al.*, 2016). Os contactantes íntimos de pacientes com DM estão sob maior risco de adquirir a doença e devem ser submetidos à quimioprofilaxia, que frequentemente inclui a prescrição de rifampicina, ciprofloxacina ou ceftriaxona (WU *et al.*, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o uso de penicilina, ampicilina ou ceftriaxona para tratamento de crianças diagnosticadas com DM, e a administração de ceftriaxona em adultos. Rifampicina, ceftriaxona ou ciprofloxacina são indicados para a quimioprofilaxia, que deve ser aplicada a todos os contatos de casos primários de DM, independentemente do estado vacinal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

1.4 Resistência aos antimicrobianos em *N. meningitidis*

Embora *N. meningitidis* permaneça suscetível aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento e quimioprofilaxia da DM (VAZQUEZ, 2001), a emergência de amostras resistentes ou com suscetibilidade diminuída à penicilina, ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina e rifampicina tem sido descrita nos últimos anos (ARREAZA *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2009; BERTRAND *et al.*, 2012; IBARZ-PAVO'N *et al.*, 2012; MOUNCHETROU NJOYA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015). Com a intenção de incentivar o desenvolvimento de novos compostos antibacterianos para o tratamento da DM, a agência americana FDA incluiu *N. meningitidis* na lista dos patógenos qualificados (“qualifying pathogens”) por representar uma séria ameaça para a saúde pública devido ao surgimento da resistência antimicrobiana (FDA, 2014).

Os primeiros relatos de amostras de *N. meningitidis* não-suscetíveis à penicilina datam das décadas de 1970 e 1980 (PEREZ-TRALLERO *et al.*, 1990 apud OPPENHEIM, 1997; RILEY *et al.*, 1991). A resistência ou suscetibilidade diminuída a este antimicrobiano é frequentemente relacionada à presença de mosaicos no gene *penA* resultando na produção de formas alteradas da “penicillin-binding protein 2” (PBP-2) (SPRATT, 1988 apud SPRATT *et al.*, 1989; ANTIGNAC *et al.*, 2001; TAHA *et al.*, 2007), enquanto que a presença de β -lactamases é raramente descrita (DILLON *et al.*, 1983 apud SPRATT *et al.*, 1989; FONTANELS *et al.*, 1989 apud SPRATT *et al.*, 1989; OPPENHEIM, 1997).

A resistência à ciprofloxacina está associada com a presença de mutações no gene *gyrA* (CASTANHEIRA *et al.*, 2012), enquanto a resistência à rifampicina é decorrente de mutações na região central do gene *rpoB* (CARTER *et al.*, 1994). Inserções e/ou substituições de aminoácidos em códons do gene *folP*, responsável pela codificação da enzima di-hidropteroato

sintase, foram associadas com resistência às sulfonamidas (FIEBELKORN, CRAWFORD, JORGENSEN, 2005). A aquisição do gene *catP*, que codifica a cloranfenicol acetiltransferase e integra o transpóson *Tn4451* em amostras de *Clostridium perfringens*, resulta na resistência ao cloranfenicol em *N. meningitidis* (GALIMAND *et al.*, 1998).

1.5 Portadores assintomáticos

N. meningitidis é um microrganismo comensal obrigatório humano e coloniza a nasofaringe sem causar sintomas, evento conhecido como estado de portador (YAZDANKHAH, CAUGANT, 2004). Acredita-se que o portador assintomático é imunizado pelo desenvolvimento de anticorpos bactericidas, evento desencadeado pela colonização (ALA'ALDEEN *et al.*, 2010). Entretanto, os portadores são considerados a principal fonte de transmissão de cepas patogênicas de *N. meningitidis* (CAUGANT *et al.*, 1994) e os responsáveis pela manutenção da espécie na natureza (BARROSO *et al.*, 1998). Não-portadores são considerados como grupo de risco para aquisição da DM, pois a capacidade de manter uma relação comensal com *N. meningitidis* é desconhecida (GRIFFISS, 1995 apud YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004).

Em situações endêmicas, estima-se que 10% da população saudável carrega *N. meningitidis* nas vias aéreas superiores (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004). O estado de portador é dependente da idade (CAUGANT *et al.*, 1994) e pode se manter por alguns dias ou meses (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). A frequência de portadores é baixa em crianças menores de cinco anos de idade e entre os idosos, aumenta ao longo da infância e da idade adulta, alcançando as mais elevadas frequências entre indivíduos de 15 a 24 anos. O aumento no percentual de portadores entre adolescentes e adultos jovens tem sido associado com a maior atividade social praticada por esses grupos (CAUGANT *et al.*, 1994). A presença de espécies bacterianas anaeróbias produtoras de ácido propiônico na microbiota do trato respiratório superior também foi associada à elevada taxa de portadores entre jovens (MOIR, 2015).

Além da faixa etária, indivíduos do sexo masculino, indivíduos com infecções do trato respiratório, fumantes passivos ou ativos (RIORDAN *et al.*, 1998) e pessoas de baixo nível sócio-econômico estão sob maior risco de carrear *N. meningitidis* (CAUGANT *et al.*, 1994). Estudos demonstram altas frequências de portadores entre militares (BLACKWELL *et al.*, 1992; ANDERSEN *et al.*, 1998; RIORDAN *et al.*, 1998; ROHANI *et al.*, 2007) e estudantes universitários (ALA'ALDEEN *et al.*, 2011; BIDMOS *et al.*, 2011).

Amostras obtidas de portadores assintomáticos diferem de amostras isoladas de pacientes com DM em características fenotípicas e genotípicas. Estudos demonstram que o percentual de amostras não-sorogrupáveis pode variar entre cerca de 17% (CLAUS *et al.*, 2002) a aproximadamente 50% (CAUGANT *et al.*, 1994) ou até 80% (CLEARY *et al.*, 2016). A ausência de genes envolvidos na síntese e transporte da cápsula foi apontada como a causa para a ausência de polissacarídeo capsular entre amostras de portadores (CLAUS *et al.*, 2002). A presença de amostras acapsuladas parece favorecer a colonização da nasofaringe e permitir que *N. meningitidis* escape do sistema imune do hospedeiro (CAUGANT *et al.*, 2007). Análises realizadas com auxílio da técnica de MLST demonstram que amostras de portadores apresentam maior diversidade genética quando comparadas com amostras obtidas de pacientes e raramente representam clones hiperinvasivos (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; CAUGANT *et al.*, 2007).

1.5.1 Estudos brasileiros

Existem poucos dados sobre portadores de *N. meningitidis* nos países da América Latina (SÁFADI *et al.*, 2013). No Brasil, os únicos estudos que investigaram o estado de portador foram realizados na Bahia, São Paulo e Rio Grande do Sul (Quadro 1).

Em 2010, Sáfadi e colaboradores investigaram a presença de portadores entre trabalhadores de duas refinarias de óleo das cidades de Cosmópolis e São José dos Campos (São Paulo). O estudo foi conduzido após a ocorrência de surtos causados pelo sorogrupo C com objetivo de determinar a prevalência de portadores e o efeito do uso da vacina meningocócica polissacarídica A/C. Aproximadamente 21% dos indivíduos investigados eram portadores de *N. meningitidis*. O sorogrupo C foi o mais recuperado entre os portadores, seguido dos sorogrupos B, E, Y e W. Cerca de 46% das amostras não foram sorogrupáveis. O baixo nível educacional foi significativamente associado com o estado de portador. A frequência de portadores do sorogrupo C entre trabalhadores vacinados e não vacinados foi similar, sugerindo a ineficácia da vacina polissacarídica sobre os portadores (SÁFADI *et al.*, 2014).

Coch Gioia e colaboradores investigaram a presença de portadores assintomáticos entre funcionários e estudantes de um hospital universitário do Rio Grande do Sul durante o ano de 2011. Dentre os 200 indivíduos incluídos no estudo, 9% eram portadores de *N. meningitidis*. As amostras isoladas pertenciam aos sorogrupos B, E, ou foram classificadas como não-sorogrupáveis. Idade média de 27 anos, sexo masculino, comparecimento a bares e um maior

número de pessoas por domicílio foram associados com maior risco para o estado de portador (COCH GIOIA *et al.*, 2015).

Em meados de 2012, de Moraes e colaboradores conduziram uma pesquisa para estimar a frequência de portadores entre adolescentes, de 11 a 19 anos de idade, de escolas públicas e privadas da cidade de Campinas (2015). Entre os 1208 estudantes incluídos no estudo, 10% eram portadores de *N. meningitidis*. O sorogrupo mais frequente foi o C, seguido por B, E, Y, W e Z, e cerca de 60% das amostras não foram sorogrupáveis. O número de portadores foi significativamente maior entre alunos de escolas públicas, e o baixo nível educacional dos pais foi associado com alto risco para o estado de portador (DE MORAES *et al.*, 2015).

Em 2014, Nunes e colaboradores realizaram um estudo de coorte para estimar a frequência de portadores entre estudantes, de 11 a 19 anos de idade, de escolas públicas e privadas da cidade de Salvador (2016). Entre os 1200 estudantes incluídos no estudo, 5% eram portadores do *N. meningitidis* e o sorogrupo mais frequente foi o B. Cerca de 60% das amostras não foram sorogrupáveis, e os sorogrupos Y, E, Z, C e W também foram detectados no estudo. Presença de um único quarto no domicílio, mãe fumante e comparecimento a festas mais de 5 vezes/mês foram associados ao estado de portador (NUNES *et al.*, 2016). As amostras isoladas nesta coorte foram posteriormente caracterizadas geneticamente. Dentre essas amostras detectou-se a presença de linhagens hiperinvasivas: B:P1.19,15:F5-1:ST-639 (CC32), C:P1.22,14-6:F3-9:ST-3780 (CC103) e W:P1.5,2:F1-1:ST-11 (CC11) (MOURA *et al.*, 2017).

Weckx e colaboradores investigaram a prevalência de portadores assintomáticos entre indivíduos atendidos em unidades básicas de saúde e estudantes de escolas do município de Embu das Artes, de 1 a 24 anos de idade, entre outubro de 2011 e maio de 2012. Dentre os 967 indivíduos incluídos no estudo, 9% eram portadores de *N. meningitidis*. A maioria das amostras isoladas pertencia aos sorogrupos C, B ou foi classificada como não grupáveis. Os sorogrupos E, W, Y e X também foram detectados. O estado de portador foi associado com o número de pessoas por domicílio em indivíduos de 15 – 19 anos de idade (WECKX *et al.*, 2017).

Quadro 2 - Estudos brasileiros sobre portadores assintomáticos de *Neisseria meningitidis*.

| Local | Período | Número | Faixa etária, anos | Prevalência, % (95% IC) | Sorogrupos (% de prevalência) | Referência |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|---|---------------------------------|
| Cosmópolis e São José dos Campos/SP | Dezembro/2010 | 483 | 18 - 39 | 21,5 (18 – 25,5) | B (1,9), C (5,6), E (1,7), W (1,0), Y (1,4), NG (9,9) | Sáfadi <i>et al.</i> , 2014 |
| Campinas/SP | Maio a Julho/2012 | 1208 | 11 - 19 | 9,9 (8,3 – 11,8) | B (0,99), C (1,32), E (0,74), W (0,25), Y (0,49), Z (0,08), NG (6,04) | de Moraes <i>et al.</i> , 2015 |
| Salvador/BA | Setembro a Dezembro/2014 | 1200 | 11 - 19 | 4,9 (3,6 – 6,1) | B (0,58), C (0,17), E (0,33), W (0,17), Y (0,41), Z (0,25), NG (3,0) | Nunes <i>et al.</i> , 2016 |
| Rio Grande/RS | Janeiro a Dezembro/2011 | 200 | 18 - 63 | 9,0 (5,0 – 13,0) | B (1,5), E (0,5), NG (7,0) | Coch Gioia <i>et al.</i> , 2015 |
| Embu das Artes/SP | Outubro/2011 a Maio/2012 | 967 | 1 - 24 | 9,0 (7,3 – 11,0) | B (1,13), C (1,65), E (0,10), W (0,10), Y (0,41), X (0,10), NG (5,68) | Weckx <i>et al.</i> , 2017 |
| Salvador/BA | Agosto a Novembro/2016 | 407 | 18 - 24 | 12,3 (9,1 – 15,5) | B (0,74), C (0,25), NG (10,56) | Ferreira <i>et al.</i> , 2020 |
| São Paulo/SP | Outubro a Novembro/2010 | 375 | 18 - 39 | 15,4 (12,4 – 19,6) | B (7,2), C (3,2), NG (5,06) | Luiz, 2018 |

IC: intervalo de confiança; BA: Bahia; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo.

Fonte: A autora, 2020.

Em 2016, Ferreira e colaboradores conduziram um estudo de coorte para investigar a frequência de portadores de *N. meningitidis* após seis anos de uma campanha de vacinação de repescagem (“catch-up”) com vacina meningocócica C na cidade de Salvador. Foram incluídos no estudo 407 indivíduos de 18 a 24 anos de idade de uma faculdade privada, sendo observado um total de 50 portadores (12,3%). Mais de 90% das amostras foi classificada como não genogrupável, embora os sorogrupos B e C também tenham sido detectados. O estado de portador foi associado ao sexo masculino e à frequência a bares/festas ao menos 1x/mês (FERREIRA *et al.*, 2020).

A prevalência de portadores de *N. meningitidis* entre estudantes (18 a 39 anos) de medicina da Universidade de São Paulo foi investigada no final do ano de 2010. Um total de 375 indivíduos foi incluído no estudo, sendo 15,6% considerado portador assintomático. As amostras foram classificadas nos sorogrupos B, C ou foram não-grupáveis. Nenhum dos fatores de risco avaliados foi relacionado ao estado de portador (LUIZ, 2018).

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Vigilância Epidemiológica é definida pela Lei nº 8.080/90 como “um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos”. Segundo a Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016), a DM está incluída na relação nacional de doenças de notificação compulsória e todos os casos suspeitos devem ser notificados imediatamente aos serviços de saúde pública (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016). Embora a importância do estudo e vigilância contínua dos portadores assintomáticos de *N. meningitidis* seja conhecida (CAUGANT *et al.*, 2009), o Brasil ainda não possui um sistema de vigilância dos portadores. A identificação de grupos de risco para o estado de portador, especialmente os portadores de cepas hipervirulentas, é importante para avaliar a necessidade e viabilidade de intervenção (CAUGANT *et al.*, 1994). O desenvolvimento e o uso eficaz das vacinas anti-meningocócicas dependem do conhecimento do seu efeito sobre os portadores (CAUGANT *et al.*, 2009).

A DM representa um grave problema de saúde pública, ocasionando elevadas frequências de morbidade e letalidade. A vacina meningocócica conjugada C foi introduzida no Brasil para combater o aumento desta doença causada por este sorogrupo. Vacinas contra o sorogrupo B também estão disponíveis em clínicas particulares do país. Estudos realizados em países da Europa e na América do Norte mostraram a importância da avaliação do impacto da vacinação sobre os portadores de *N. meningitidis*, pois estes constituem o reservatório de *N. meningitidis*, e a eficácia da vacinação sobre os portadores promove imunidade de rebanho diminuindo a transmissão do patógeno na população. A determinação dos grupos sob maior risco para o estado de portador também permite a implantação de esquemas de vacinação para comunidades específicas (CAUGANT *et al.*, 1994; YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; CAUGANT *et al.*, 2007; BIDMOS *et al.*, 2011; ALI *et al.*, 2014). A prevalência de portadores assintomáticos de *N. meningitidis* e a composição clonal das amostras desses indivíduos ainda não são conhecidas na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Desta forma, foi proposto um estudo com obtenção de dados importantes para melhorar o conhecimento sobre portadores de *N. meningitidis* na região metropolitana do Rio de Janeiro. As informações inéditas produzidas, sobre portadores assintomáticos e suas amostras, poderão servir de base para discussão dos rumos do programa de vacinação contra esse microrganismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estimar a prevalência de portadores assintomáticos de *N. meningitidis* entre adultos jovens de instituições de ensino da região metropolitana do Rio de Janeiro, e caracterizar as amostras quanto à composição clonal, sorogrupos, proteínas de membrana e suscetibilidade aos antimicrobianos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estimar a prevalência de portadores assintomáticos de *N. meningitidis* entre adultos jovens de instituições de ensino da região metropolitana do Rio de Janeiro.
- b) Identificar as amostras por meio de testes fenotípicos, sorológicos e moleculares.
- c) Descrever a suscetibilidade das amostras de *N. meningitidis* aos antimicrobianos, ampicilina, azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, levofloxacino, meropenem, minociclina, penicilina, rifampicina e trimetoprim-sulfametoxazol.
- d) Investigar a composição genética da cápsula das amostras não sorogrupáveis.
- e) Caracterizar a diversidade genética das amostras de *N. meningitidis* utilizando a técnica de MLST.

3.3 Objetivo secundário

- a) Descrever potenciais fatores associados ao estado de portador de *N. meningitidis* na população estudada.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado estudo de corte transversal, onde uma população de voluntários foi avaliada. Cada participante, incluído uma única vez, foi convidado a preencher um questionário (APÊNDICE A), e dele foi colhido espécime de orofaringe. Todos os procedimentos são explicados detalhadamente a seguir.

4.2 População de estudo e tamanho amostral

Estudos anteriores demonstraram que a prevalência de portadores de *N. meningitidis* na faixa etária de 15 a 35 anos pode variar de 8 a 32% (CARTWRIGHT *et al.*, 1987; CAUGANT *et al.*, 1994; GASPARINI *et al.*, 2014). Com base nessas informações, realizamos o cálculo do tamanho amostral com auxílio do programa OpenEpi (Versão 3 - <http://www.openepi.com>; SULLIVAN *et al.*, 2009), considerando a prevalência estimada como $18 \pm 5\%$ e um intervalo de confiança de 95%. Dessa forma, o tamanho amostral calculado foi de 227 indivíduos.

O estudo foi realizado com estudantes de instituições de ensino dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói. Foram incluídos alunos voluntários com idade entre 18 e 35 anos em uma amostragem de conveniência nos seguintes locais: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV)/Fiocruz, Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Centro de Tecnologia (CT)/UFRJ e Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (UFF). Os locais de estudo foram selecionados considerando-se questões logísticas e a disponibilidade de contato pessoal para autorização da realização do estudo. Os voluntários foram abordados em sala de aula mediante autorização prévia do professor responsável ou nos corredores das instituições.

4.3 Coleta e processamento do espécime clínico

A coleta do espécime clínico e a aplicação do Questionário foram realizadas em quatro instituições de ensino dos municípios do Rio de Janeiro e de Niterói no período de maio de

2016 a maio de 2018. Foram incluídos 374 voluntários em 10 amostragens conduzidas na primavera ou no outono, conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3 - Descrição da data de coleta, local de estudo e número de voluntários das 10 amostragens realizadas entre maio de 2016 e maio de 2018

| Amostragem | Data da coleta | Local de estudo | Número de voluntários |
|-------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| 1 | Maio/2016 | UFRJ | 22 |
| 2 | Maio/2016 | FIOCRUZ | 25 |
| 3 | Outubro/2016 | UFRJ | 42 |
| 4 | Dezembro/2016 | UFRJ | 19 |
| 5 | Abril/2017 | UEZO | 54 |
| 6 | Maio/2017 | UFRJ | 32 |
| 7 | Setembro/2017 | UFRJ | 54 |
| 8 | Outubro/2017 | FIOCRUZ | 28 |
| 9 | Maio/2018 | FIOCRUZ | 13 |
| 10 | Maio/2018 | UFF | 85 |
| Total | 2 anos | 4 | 374 |

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz; UEZO: Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste; UFF: Universidade Federal Fluminense; UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Fonte: A autora, 2020.

4.3.1 Coleta da secreção de orofaringe

A coleta do espécime clínico foi realizada com auxílio de “swab” estéril (Copan, Brescia, Itália) por profissional previamente treinado. O “swab” foi inserido na porção superior da faringe (atrás da úvula) e nas amígdalas, e foram realizados movimentos circulares para obter secreção da mucosa. O contato do “swab” com qualquer outra parte da cavidade oral foi evitado (ESPOSITO *et al.*, 2014). Em seguida o “swab” foi introduzido em tubo plástico, identificado com o código do participante do estudo, contendo meio de transporte Amies com carvão (Copan, Brescia, Itália) e mantido em temperatura ambiente até o processamento no laboratório, que ocorreu em até 5 horas após a coleta.

4.3.2 Cultivo do espécime clínico

O meio de cultura utilizado para isolamento de *N. meningitidis* foi o Thayer-Martin modificado (TMM), preparado com base GC (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Estados Unidos), acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, adicionado de suplemento VCNT (Laborclin, Pinhais, Brasil) - 3 mg/L de vancomicina, 7,5 mg/L de colistina, 12,5 U/L de nistatina, 5 mg/L de lactato de trimetoprim, e suplementado com 1% de VX (Laborclin, Pinhais, Brasil) (BASTA *et al.*, 2013). Cepas de *Candida albicans* INCQS 40178 (ATCC 60193), *Proteus mirabilis* INCQS 00343 (ATCC 43071), *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00016 (ATCC 12228), *H. influenzae* INCQS 00367 (ATCC 9006), *N. gonorrhoeae* INCQS 00267 (ATCC 19424), *N. lactamica* INCQS 00302 (ATCC 23970), *N. meningitidis* INCQS 00163 (ATCC 13090), *N. meningitidis* INCQS 00148 (ATCC 13077), *N. meningitidis* INCQS 00164 (ATCC 13102), *N. meningitidis* INCQS 00357 (ATCC 35559), *N. meningitidis* INCQS P374, *N. meningitidis* INCQS 00165 (ATCC 13113), *N. meningitidis* INCQS 00751 (IAL 3434) e *N. perflava* INCQS 00117 (ATCC 11076) foram inoculadas em TMM para controle de qualidade do meio. O meio foi considerado adequado para uso quando o crescimento dos microrganismos *C. albicans*, *P. mirabilis*, *S. epidermidis*, *H. influenzae* e *N. perflava* foi inibido pelos antimicrobianos presentes no TMM, e os demais microrganismos testados foram capazes de crescer (ZIMBRO *et al.*, 2009).

Os “swabs” com os espécimes foram semeados em placas contendo TMM, que foram incubadas a 35-37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 24-48 horas. Após a incubação, as culturas foram inspecionadas e colônias com características típicas de *N. meningitidis* (colônia lisa, redonda, convexa, incolor à cinzenta) foram semeadas em ágar sangue e incubadas por 18-24 horas nas mesmas condições descritas acima. O crescimento obtido em ágar sangue foi armazenado em criotubo contendo caldo Tríplico de soja (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Estados Unidos) com 20% de glicerol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e estocado a aproximadamente -70 °C para análises posteriores.

4.4 Identificação bacteriana

Foram realizados testes fenotípicos para identificação do gênero *Neisseria*, que incluíram observação das características morfo-tintoriais e produção da enzima oxidase (VEDROS, 1984 apud KNAPP, 1988). A identificação das amostras em espécie foi confirmada por espectrometria de massas e sequenciamento de um fragmento do gene *rplF*. Os testes de identificação são descritos a seguir.

4.4.1 Identificação fenotípica

4.4.1.1 *Observação das características coloniais em ágar sangue*

As amostras foram semeadas pela técnica de esgotamento em placas de Petri contendo ágar sangue e incubadas a 35-37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 18-24 horas para obtenção de cultura pura e observação das características coloniais. As colônias de *N. meningitidis* se apresentaram convexas, mucoides, elevadas e brilhantes, transparentes ou opacas, não-pigmentadas e não-hemolíticas.

4.4.1.2 *Observação das características morfo-tintoriais*

A observação de características morfo-tintoriais foi realizada em esfregaços corados pelo método de Gram (WINN *et al.*, 2008). Após a coloração, as lâminas foram examinadas por microscopia, utilizando-se lente de imersão, com um aumento final de 1.000 vezes.

4.4.1.3 *Teste da produção de citocromo-oxidase*

Para a determinação da produção da enzima citocromo-oxidase, uma colônia da amostra bacteriana crescida em ágar chocolate foi removida utilizando material não-metálico (alça de plástico). A colônia foi depositada sobre uma fita impregnada com N, N-dimetil-1,4- cloreto de fenileno diamônio (0,1 µmol) e 1-naftol (1,0 µmol) (Bactident Oxidase – Merck, Darmstadt, Alemanha). O desenvolvimento da cor violeta forte no período de até 10 segundos foi indicativo de teste positivo. O desenvolvimento da cor violeta fraca após este período foi considerado falso positivo (WINN *et al.*, 2008). As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 27853) e *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.4.2 Identificação por espectrometria de massas

A identificação das amostras bacterianas foi realizada por espectrometria de massa do tipo ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF do inglês “Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight”) (Bruker Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanha). As amostras foram semeadas por técnica de esgotamento em

placas de Petri contendo ágar sangue e incubadas a 35-37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 18-24 horas para obtenção de cultura pura. Posteriormente, uma colônia bacteriana foi aplicada na placa do MALDI-TOF em duplicata. Em seguida, foi aplicado 1,0 µL de ácido fórmico a 70% (Tedia, Estados Unidos). Após a secagem à temperatura ambiente, 1,5 µL da solução matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha) diluída na concentração de 10 mg/ml em solvente orgânico composto por 50% acetonitrila (Tedia, Ohio, Estados Unidos) e 2,5% ácido trifluoroacético (Tedia, Ohio, Estados Unidos) foi adicionada sobre cada uma das amostras. Após este tratamento, a mistura foi novamente deixada secar em temperatura ambiente antes da análise no equipamento. A cepa *E. coli* J53 foi utilizada como calibrante. A análise dos dados foi realizada pelo software MALDI Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanha). Para cada amostra foi determinado um valor de “score” entre 0,000 e 3,000, de acordo com a probabilidade de identificação, conforme descrito no Quadro 4. Para cada amostra, foi considerado o maior valor de score obtido entre as duplicatas.

4.4.3 Sequenciamento do gene *rplF*

O sequenciamento de um fragmento do gene *rplF* foi utilizado como ferramenta para confirmação da espécie em todas as amostras classificadas no gênero *Neisseria* pelo sistema MALDI-TOF.

Quadro 4 - Descrição dos valores de “score” determinados pelo software Biotyper versão 3.1 de acordo com a probabilidade de identificação da amostra bacteriana

| Valor de score | Descrição |
|----------------|---|
| 2,300 – 3,000 | Identificação da espécie altamente provável |
| 2,000 – 2,299 | Identificação segura do gênero, identificação provável da espécie |
| 1,700 – 1,999 | Identificação provável do gênero |
| 0,000 – 1,699 | Identificação não confiável |

Fonte: A autora, 2016.

4.4.3.1 Extração do DNA genômico

Três a cinco colônias bacterianas, obtidas a partir de cultura pura em ágar sangue, foram inoculadas em caldo Trípico de soja (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Estados

Unidos). Os tubos contendo o inóculo bacteriano foram então incubados a 35-37 °C por 18-24 horas. Decorrido o tempo de incubação, o crescimento foi homogeneizado em agitador do tipo vórtex, uma alíquota de 1 mL foi transferida para microtubo e utilizada para extração de DNA. A extração do DNA genômico das cepas de referência e das amostras isoladas foi realizada com auxílio do “DNeasy Blood & Tissue Kit” (QIAGEN Sciences Inc., Germantown, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante, utilizando o protocolo de pré-tratamento para bactéria Gram-negativa. O DNA genômico foi analisado por eletroforese em gel de agarose e visualizado em transiluminador UV.

4.4.3.2 Amplificação

Um fragmento do gene *rplF* foi amplificado em reação de PCR com volume final de 25 µL, contendo 8,5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1) a 50 µM e 3 µL de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos, e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos (BENNETT *et al.*, 2014). As cepas de *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00267 (ATCC 19424), *Neisseria lactamica* INCQS 00302 (ATCC 23970) e *N. meningitidis* INCQS 00148 (ATCC 13077) foram utilizadas como controles.

Tabela 1 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *rplF* em *N. meningitidis*

| Gene | Nome do iniciador | Sequência oligonucleotídica (5'→3') | Tamanho do produto (pb) |
|-------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>rplF</i> | rplF-F | CAGTGACTGTTCCCGCTGGTGT | 413 |
| | rplF-R | AGGYTCAGGAGKWC GGAAHG | |

pb: pares de bases; Y = C ou T; K = G ou T; W = A ou T; H = A ou C ou T.

Fonte: A autora, 2017, baseado em BENNETT *et al.*, 2014.

Os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose. O gel foi tratado com solução de GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e visualizado em transluminador UV. Como marcador de tamanho de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado “100 bp DNA ladder” (Sinapse Inc, Hollywood, Estados Unidos). Posteriormente, os produtos foram purificados com a utilização do FastAP em conjunto com Exonuclease I

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) seguindo instruções do fabricante, e a concentração determinada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).

4.4.3.3 Sequenciamento

A reação de sequenciamento, contendo 1,0 μL de BigDye (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), 1,5 μL de tampão BigDye 5X, 1,0 μL de primer a 3,2 μM e 5,5 μL de produto purificado (aproximadamente 9 ng), foi preparada em microplaca de 96 poços e submetida ao seguinte programa: ciclo inicial de 96 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Em seguida, a placa foi brevemente centrifugada e submetida à precipitação conforme descrito a seguir: (i) adicionou-se 2,5 μL de EDTA 125 mM (Promega, Madison, Estados Unidos) em cada poço; (ii) centrifugou-se a placa brevemente; (iii) adicionou-se 25 μL de etanol absoluto (Isofar, Duque de Caxias, Brasil) em cada poço e homogeneizou-se a mistura com auxílio de micropipeta; (iv) incubou-se a placa à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos; (v) centrifugou-se a placa por 40 minutos sob rotação de 4000 rpm a 4 °C; (vi) a placa foi invertida com um movimento único, desprezando-se o líquido presente no interior dos poços; (vii) centrifugou-se a placa invertida sobre duas folhas de papel absorvente, sob rotação de 100 rpm durante 30 segundos; (viii) adicionou-se 30 μL de etanol 70% (Isofar, Duque de Caxias, Brasil) em cada poço; (ix) centrifugou-se a placa por 15 minutos sob rotação de 1650 rpm a 4 °C; (x) a placa foi invertida com um movimento único, desprezando-se o líquido presente no interior dos poços; (xi) centrifugou-se a placa invertida sobre duas folhas de papel absorvente, sob rotação de 600 rpm durante 30 segundos; (xii) trocou-se as folhas de papel absorvente e repetiu-se o passo anterior; (xiii) secou-se a placa, coberta com papel alumínio, em termociclador sob temperatura de 65 °C durante 5 minutos. A placa contendo a mistura para sequenciamento foi protegida da luz com auxílio de papel alumínio, sempre que possível, durante o processo de preparo, amplificação e precipitação. Após a etapa de precipitação a placa foi mantida a aproximadamente -20 °C até o envio para sequenciamento.

Os produtos precipitados foram sequenciados na Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ, no sequenciador automático ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). As sequências obtidas foram submetidas à página “Neisseria Sequence

Typing Home Page” (JOLLEY *et al.*, 2018; <https://pubmlst.org/neisseria/>) para definição da espécie.

4.4.4 Genogrupagem

A classificação das amostras em sorogrupo foi realizada para todas as amostras pela amplificação de fragmentos gênicos específicos para os sorogrupos A, B, C, W e Y (TAHA, 2000), E (ZHU *et al.*, 2012), X (YARO *et al.*, 2012) e Z (DIALLO *et al.*, 2018).

A amplificação dos fragmentos dos sorogrupos A, B, C, W e Y foi realizada em reação de PCR multiplex com volume final de 25 μ L, contendo 0,5 μ L de água livre de nuclease, 12,5 μ L de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 0,8 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2) a 10 μ M e 4 μ L de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 92 °C por 40 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 20 segundos, e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

A amplificação dos fragmentos dos sorogrupos E e Z foi realizada em reação de PCR simples com volume final de 25 μ L, contendo 8,5 μ L de água livre de nuclease, 12,5 μ L de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2) a 25 μ M e 3 μ L de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 95 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 50 °C (sorogrupo E) ou 57 °C (sorogrupo Z) por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos.

A amplificação dos fragmentos do sorogrupo X foi realizada em reação de PCR com volume final de 25 μ L, contendo 7,5 μ L de água livre de nuclease, 12,5 μ L de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 1,0 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2) a 25 μ M e 3 μ L de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 95 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos.

As cepas *N. meningitidis* INCQS 00148 (ATCC 13077), *N. meningitidis* INCQS 00163 (ATCC 13090), *N. meningitidis* INCQS 00164 (ATCC 13102), *N. meningitidis* INCQS 00357 (ATCC 35559), *N. meningitidis* INCQS P374 e *N. meningitidis* INCQS 00751 (IAL 3434) foram utilizadas como controle positivo dos sorogrupos A, B, C, W, Y e X, respectivamente. A cepa *N. lactamica* INCQS 00302 (ATCC 23970) foi utilizada como controle negativo.

Tabela 2 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos gênicos específicos para os sorogrupos A, B, C, W, Y

| Gene | Nome do iniciador | Sequência oligonucleotídica (5'→3') | Tamanho do produto (pb) | Sorogrupo |
|----------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------|
| <i>orf-2</i> | orf-2F | CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC | 400 | A |
| | orf-2R | CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT | | |
| <i>siaD</i> | siaD-Bf | GGATCATTTTCAGTGTTTTCCACCA | 450 | B |
| | siaD-Br | GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA | | |
| <i>siaD</i> | siaD-Cf | TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT | 250 | C |
| | siaD-Cr | CAATCACGATTTGCCCAATTGAC | | |
| <i>siaD</i> | siaD-Wf | CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA | 120 | W |
| | siaD-Wr | CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT | | |
| <i>siaD</i> | siaD-Yf | CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA | 120 | Y |
| | siaD-Yr | CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA | | |
| <i>cap29EH</i> | 29E aF | TTGGCGGTTGAAACCTTAC | 694 | E |
| | 29E aR | GCGTATCATGCTCCATTACCA | | |
| <i>cszC</i> | ZF | AGGTTTCATCTGCTGGGATTACGCT | 301 | Z |
| | ZR | AAGCGATTAATGGCCTGTTGCTGG | | |
| <i>csxA</i> | X-10 | ACAGCCCATAAAAACACCCGTATCATC | 202 | X |
| | X-11 | GTGATTGGAATCTTCCAATATCGGT | | |

pb: pares de bases

Fonte: A autora, 2018, baseado em TAHA, 2000; ZHU *et al.*, 2012; YARO *et al.*, 2012; DIALLO *et al.*, 2018.

A detecção dos produtos amplificados foi realizada conforme descrito no item 4.4.3.2.

4.4.5 Caracterização do “cluster” gênico capsular

A caracterização de genes que compõem o “cluster” gênico *cps* foi determinada, segundo protocolo descrito por Claus e colaboradores (2002), para todas as amostras para as quais o genogrupo não pôde ser determinado pela amplificação de fragmentos gênicos específicos. A extração do DNA foi realizada conforme descrito no item 4.4.3.1. A amplificação foi realizada em reação de PCR com volume final de 25 µL, contendo 8,5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 3) a 25 µM e 3 µL de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 95 °C durante 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 60 segundos, 68 °C por 60 segundos, e um ciclo final de 68 °C por 5 minutos. A detecção, purificação e quantificação dos produtos foram realizadas

como descrito no item 4.4.3.2. O sequenciamento foi realizado conforme descrito no item 4.4.3.3, utilizando-se cerca de 12 ng do produto purificado. As sequências obtidas foram submetidas ao banco “Neisseria Sequence Typing Home Page” (JOLLEY *et al.*, 2018; <http://pubmlst.org/neisseria/>) para designação das variantes *cnl*.

Tabela 3 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de *N. meningitidis* “capsule null locus” (*cnl*)

| Gene | Nome do iniciador | Sequência oligonucleotídica (5'→3') | Tamanho do produto (pb) |
|-------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>cps</i> ^a | GH26R | GGTCGTCTGAAAGCTTGCCCTTGCTC | 700 |
| | HC287 | CGCGCCATTCTTCCGCC | |

pb: pares de bases; ^a região intergênica entre as regiões E e D do cluster *cps*.

Fonte: A autora, 2018, baseado em CLAUS *et al.*, 2002.

4.4.6 Caracterização da PorA

As regiões variáveis da PorA foram determinadas para todas as amostras. A extração do DNA foi realizada conforme descrito no item 4.4.3.1. A amplificação foi realizada em reação de PCR com volume final de 25 µL, contendo 9,5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 4) a 50 µM e 2 µL de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 57 °C por 60 segundos, 72 °C por 2 minutos, e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos. A amplificação do gene *porA* foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores 210 e 211 (Tabela 4), e o sequenciamento foi realizado com os oligonucleotídeos iniciadores 211 e 122L (Tabela 4) (URWIN, 2001). A detecção, purificação e quantificação dos produtos foram realizadas como descrito no item 4.4.3.2. O sequenciamento foi realizado conforme descrito no item 4.4.3.3, utilizando-se cerca de 15 ng do produto purificado. As sequências foram submetidas ao banco de dados “Neisseria PorA typing” (JOLLEY *et al.*, 2018; <http://pubmlst.org/neisseria/PorA/>) para definição das regiões variáveis.

Tabela 4 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *porA* em *N. meningitidis*

| Gene | Nome do iniciador | Sequência oligonucleotídica (5'→3') | Tamanho do produto (pb) |
|-------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>PorA</i> | 210 | ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTC | 1200 |
| | 211 ^a | AATGAAGGCAAGCCGTCAAAAACA | |
| | 122L | GGCGAGATTCAAGCCGCC | Sequenciamento |

pb: pares de bases; ^a o oligonucleotídeo iniciador 211 também foi utilizado para a reação de sequenciamento. Fonte: A autora, 2016, baseado em URWIN, 2001.

4.4.7 Caracterização da FetA

A variante da FetA foi determinada para todas as amostras (THOMPSON *et al.*, 2003). A extração do DNA foi realizada conforme descrito no item 4.4.3.1. A amplificação foi realizada em reação de PCR com volume final de 25 µL, contendo 9,5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 5) a 50 µM e 2 µL de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 55 °C por 60 segundos, 72 °C por 90 segundos, e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos. A amplificação do gene *fetA* foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores S1 e S8 (Tabela 5), e o sequenciamento foi realizado com os oligonucleotídeos iniciadores S12 e S15 (Tabela 5). A detecção, purificação e quantificação dos produtos foram realizadas como descrito no item 4.4.3.2. O sequenciamento foi realizado conforme descrito no item 4.4.3.3, utilizando-se cerca de 15 ng do produto purificado. As sequências foram submetidas ao banco de dados “Neisseria FetA Typing” (JOLLEY *et al.*, 2018; <http://pubmlst.org/neisseria/FetA/>) para definição da região variável.

Tabela 5 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *fetA* em *N. meningitidis*

| Gene | Nome do iniciador | Sequência oligonucleotídica (5'→3') | Tamanho do produto (pb) |
|-------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>fetA</i> | S1 | CGGCGCAAGCGTATTCGG | 1200 |
| | S8 | CGCGCCCAATTCGTAACCGTG | |
| | S12 | TTCAACTTCGACAGCCGCCTT | Sequenciamento |
| | S15 | TTGCAGCGCGTCRTACAGGCG | |

pb: pares de bases; R= A ou G.

Fonte: A autora, 2016, baseado em THOMPSON *et al.*, 2003.

4.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada para todas as amostras utilizando-se dois métodos, cada um para diferentes grupos de drogas: método de disco-difusão e método de difusão em gradiente de concentração.

4.5.1 Método de disco-difusão

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em ágar, segundo recomendações do CLSI (CLSI, 2012), para os seguintes antimicrobianos (Laborclin, Pinhais, Brasil) (conteúdo dos discos): azitromicina (15 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), meropenem (10 µg), minociclina (30 µg), rifampicina (5 µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), e para ampicilina (10 µg) e penicilina (10 U) segundo Jorgensen e colaboradores (2005). A partir de uma amostra bacteriana crescida em ágar chocolate a 35-37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 20-24 horas, suspensões bacterianas foram preparadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland em solução de cloreto de sódio 0,85% estéril com auxílio do densitômetro DensiCHEK Plus (bioMérieux, Durham, Estados Unidos). Posteriormente, as suspensões foram semeadas em placas contendo meio de Mueller-Hinton (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Estados Unidos) acrescido de 5% de sangue de carneiro, com auxílio de “swabs” estéreis. Em seguida, os discos de papel filtro impregnados com os antimicrobianos a serem testados foram aplicados sobre o meio de cultura. As culturas foram então incubadas a 35-37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 20-24 horas. Como controles foram utilizadas as cepas *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) e *Streptococcus pneumoniae* INCQS 00440 (ATCC 49619). Os resultados foram interpretados segundo o CLSI (CLSI, 2020) e Jorgensen e colaboradores (2005).

4.5.2 Método de difusão em gradiente de concentração

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos ampicilina, levofloxacino e penicilina foi determinada pelo método de difusão em gradiente de concentração conforme as recomendações do fabricante (bioMérieux, Askim, Suécia). As suspensões foram obtidas como já descrito no item 4.5.1. Em seguida foi feita a inoculação bacteriana com auxílio de “swabs” estéreis em ágar Mueller-Hinton (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Estados Unidos) acrescido de 5% de sangue de carneiro. Logo após, foram depositadas sobre a superfície do

ágar as fitas contendo gradientes de concentração do antimicrobiano. As culturas foram então incubadas a 35-37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 20-24 horas. Como controles foram utilizadas as cepas *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) e *S. pneumoniae* INCQS 00440 (ATCC 49619). Os resultados foram interpretados segundo o CLSI (CLSI, 2020).

Considerando o método de difusão em gradiente de concentração como referência, a discordância entre as duas técnicas utilizadas para determinação da suscetibilidade à ampicilina e à penicilina foi classificada como erro muito grave (amostra definida como resistente difusão em gradiente de concentração, mas suscetível por disco-difusão), erro grave (amostra definida como suscetível por difusão em gradiente de concentração, mas resistente por disco-difusão) ou erro mínimo (amostra definida como resistente ou suscetível por um dos métodos testados, mas intermediária pelo outro método). A performance do teste de disco-difusão foi considerada aceitável se a frequência total de erro foi inferior a 10%, incluindo até 1,5% de erro muito grave e 3% de erro grave (KULAH *et al.*, 2009).

4.6 Tipificação

As amostras foram tipificadas com auxílio da técnica de MLST. Adicionalmente, quatro amostras foram caracterizadas por “whole genome sequencing” (WGS).

4.6.1 “Multilocus sequence typing” (MLST)

A tipificação das amostras foi realizada pela técnica do MLST. Foram analisadas sequências dos genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*, segundo o protocolo descrito por Maiden e colaboradores (1998) e complementado por Feil e colaboradores (FEIL *et al.*, 1999), descrito no banco de dados “Neisseria Sequence Typing Home Page” (JOLLEY *et al.*, 2018; <http://pubmlst.org/neisseria/>). A extração do DNA foi realizada conforme descrito no item 4.4.3.1. Os oligonucleotídeos iniciadores são descritos na Tabela 6.

A amplificação dos genes foi realizada em reação de PCR com volume final de 25 µL, contendo 7,5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Master Mix (2x) (Promega, Madison, Estados Unidos), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 6) a 50 µM e 3 µL de DNA bacteriano. As condições de amplificação utilizadas foram: ciclo inicial de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 58 °C por 60 segundos, 72 °C por 2 minutos, e um ciclo final de 72 °C por 2 minutos.

A detecção, purificação e quantificação dos produtos foram realizadas como descrito no item 4.4.3.2. O sequenciamento foi realizado conforme descrito no item 4.4.3.3, utilizando-se entre 12 e 15 ng do produto purificado dependendo do tamanho do produto a ser sequenciado.

4.6.1.1 Análise das sequências

As sequências foram editadas a fim de se igualar o tamanho dos fragmentos aos alelos moldes disponíveis no “Neisseria Sequence Typing Home Page”, com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.0.5.3 (HALL, 1999). As sequências finais dos genes foram então submetidas à página “Neisseria Sequence Typing Home Page” para definição dos ST e alocação nos CC. Os ST foram obtidos automaticamente para alelos já conhecidos, e sequências de novos alelos encontrados foram submetidas ao curador do banco para designação de um novo ST.

As sequências dos sete genes de cada amostra foram concatenadas para produzir um alinhamento de 3284 pb. O programa MEGA versão 7.0.9 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) foi utilizado para a análise da relação de evolução entre os concatenados alinhados, com a construção de árvores filogenéticas. As distâncias entre os ramos foram inferidas utilizando-se o método de “neighbor-joining” (SAITOU, NEI, 1987) e a significância dos arranjos dos ramos foi avaliada por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias de evolução foram computadas utilizando-se o método “Jukes-Cantor”. A cepa de *N. gonorrhoeae* S081 (PubMLST id 27133) foi utilizada como “outgroup”.

Tabela 6 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no MLST conforme descrito no banco de dados “Neisseria Sequence Typing Home Page” (<http://pubmlst.org/neisseria/>) (continua)

| Gene | Nome do iniciador | Sequência oligonucleotídica (5'→3') | Tamanho do produto (pb) |
|-------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>abcZ</i> | abcZ-P1C | TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC | 900 |
| | abcZ-P2C | TCCCCGTCGTAAAAACAATC | |
| | abcZ-S1A (P1A) | AATCGTTTATGTACCGCAGR | Sequenciamento |
| | abcZ-S2 | GAGAACGAGCCGGGATAGGA | |
| <i>Adk</i> | adk-P1B | CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC | 800 |
| | adk-P2B | TGCCCAATGCGCCAATAC | |
| | adk-S1A | AGGCWGGCACGCCCTTGG | Sequenciamento |

Tabela 6 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no MLST conforme descrito no banco de dados “Neisseria Sequence Typing Home Page” (<http://pubmlst.org/neisseria/>) (conclusão)

| | | | |
|-------------|----------|--------------------------|----------------|
| | adk-S2 | CAATACTTCGGCTTTCACGG | |
| <i>aroE</i> | aroE-P1B | TTTGAAACAGGCGGTTGCGG | 900 |
| | aroE-P2B | CAGCGGTAATCCAGTGCGAC | |
| | aroE-S1A | GCGGTCAAYACGCTGR TK | Sequenciamento |
| | aroE-S2 | ATGATGTTGCCGTACACATA | |
| <i>fumC</i> | fumC-P1B | TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG | 900 |
| | fumC-P2B | GCCCCGTCAGCAAGCCCAAC | |
| | fumC-S1 | TCCGGCTTGCCGTTTGTCAG | Sequenciamento |
| | fumC-S2 | TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC | |
| <i>Gdh</i> | gdh-P1B | CTGCCCCCGGGGTTTTTCATCT | 700 |
| | gdh-P2B | TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG | |
| | gdh-S3 | CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC | Sequenciamento |
| | gdh-S4C | RCGCACGGATTCATRYGG | |
| <i>pdhC</i> | pdhC-P1B | CCGGCCGTACGACGCTGAAC | 800 |
| | pdhC-P2B | GATGTCGGAATGGGGCAAACA | |
| | pdhC-S1 | TCTACTACATCACCTGATG | Sequenciamento |
| | pdhC-S2 | ATCGGCTTTGATGCCGTATTT | |
| <i>Pgm</i> | pgm-P1 | CTTCAAAGCCTACGACATCCG | 1000 |
| | pgm-P2 | CGGATTGCTTTCGATGACGGC | |
| | pgm-S1 | CGGCGATGCCGACCGCTTGG | Sequenciamento |
| | pgm-S2A | GGTGATGATTTTCGGTYGCRCC | |

pb: pares de bases; K= G ou T; R= A ou G; W= A ou T; Y= C ou T.

Fonte: A autora, 2018, adaptado de MAIDEN *et al.*, 1998.

4.6.2 “Whole genome sequencing” (WGS)

Quatro amostras do presente estudo, pertencentes ao genogrupo B ou C, foram selecionadas aleatoriamente para caracterização por WGS. Após extração do DNA conforme descrito no item 4.4.3.1, alíquotas do DNA foram enviadas para Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos de Nova Geração do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). As bibliotecas foram construídas utilizando o “Nextera XT DNA Library Preparation Kit” (Illumina, San Diego, California, Estados Unidos) e sequenciadas no sequenciador HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, California, Estados Unidos).

4.6.2.1 *Análise das sequências*

Foram gerados quatro arquivos para cada genoma, sendo dois “reads” (R1 e R2) para cada “lane” (L1 e L2). Para a montagem e análise do genoma foram realizados os seguintes passos: (i) os arquivos R1 foram concatenados em um único arquivo de extensão “fastq”. O mesmo foi feito com os arquivos R2 utilizando o comando “cat” no sistema Linux; (ii) a qualidade dos arquivos concatenados foi avaliada usando o programa “FastQC” (ANDREWS, 2010), gerando relatórios contendo a qualidade das sequências por pares de base, índice GC, quantidade de “N” e níveis de duplicidade. O passo da montagem só foi realizado caso o arquivo mostrasse qualidade aceitável durante esta etapa; (iii) a montagem foi realizada utilizando o montador por pipeline “A5-miseq” (COIL *et al.*, 2015) que automatiza o processo de trimagem, filtro de qualidade, correção de erros, geração de “contigs” e “scaffolds”. Ao final do processo de montagem, foi gerado um arquivo de extensão “fastq” com todos os “scaffolds” montados; (iv) o arquivo foi aberto em um editor de texto e os maiores “scaffolds” foram selecionados para a realização de um alinhamento com auxílio da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde o genoma que apresentou maior similaridade foi selecionado como base para o alinhamento dos “contigs”; (v) o alinhamento foi realizado com auxílio do programa “Mauve” (DARLING *et al.*, 2004) que automatiza o alinhamento do arquivo gerado pelo programa “A5-miseq” com o genoma correspondente adquirido pelo BLAST. Ao final foram gerados vários arquivos com alinhamentos, sendo que o arquivo mais ordenado foi escolhido como base para futuras análises.

Os genomas montados foram submetidos à página “Neisseria Sequence Typing Home Page” para definição dos ST e alocação nos CC, e determinação de outras variantes gênicas. A anotação foi realizada segundo o “NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)” (TATUSOVA *et al.*, 2016; HAFT *et al.*, 2018) após submissão dos genomas no banco de dados “GenBank” (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genome/>).

4.7 Questionário

Foi aplicado um questionário com coleta de dados demográficos e clínicos para a descrição da população do estudo, assim como para explorar potenciais variáveis clínico-comportamentais em associação com a presença de colonização por *N. meningitidis*, sendo algumas já descritas (MACLENNAN *et al.*, 2006; SÁFADI *et al.*, 2014; CLEARY *et al.*, 2016; DE MORAES *et al.*, 2015) e outras por serem hábitos comuns entre jovens da cidade.

O Questionário incluiu perguntas sobre idade, sexo, CEP residencial, nível escolar do participante e dos pais, renda familiar, número de pessoas no domicílio, vacinação prévia com vacina meningocócica, uso de antimicrobianos, fumo ativo ou passivo, frequência de comparecimento a bares ou clubes ou bailes funk, contato com DM, viagem ao exterior, infecção do trato respiratório, consumo de álcool (APÊNDICE A).

Cada participante recebeu o Questionário contendo apenas o código do estudo. Após uma breve explicação sobre o estudo pelo membro da equipe de pesquisa, o próprio participante preencheu o Questionário. Ao término do preenchimento, o Questionário foi guardado em um envelope pelo membro da equipe de pesquisa. Após a transcrição para o banco de dados, os Questionários foram mantidos guardados em uma gaveta trancada à chave com um dos membros da equipe do Estudo.

4.8 Análise estatística

A prevalência de colonização foi calculada pelo quociente entre o número de indivíduos colonizados e a população estudada. As variáveis categóricas foram descritas pela frequência absoluta e percentual, e as numéricas foram descritas pela mediana e intervalo interquartil. As diferenças entre proporções foram comparadas por meio do teste exato de Fisher, e foram consideradas significativas diferenças com valores de $p < 0,05$ em análise bicaudada.

As covariáveis de significância clínica e que apresentaram valor de $p \leq 0,25$ na análise univariada foram incluídas na análise multivariada por regressão logística em modelo saturado utilizando-se o método “Backward” e avaliação do valor de “2-log-likelihood” do modelo gerado. As variáveis que quando retiradas do modelo foram relacionadas à diferença dos “2-log-likelihood” entre os modelos $\geq 3,84$ foram mantidas no modelo final ajustado.

Os dados foram armazenados em banco de dados construído com o software Microsoft Excel 365, e a análise estatística foi realizada com o programa EPI INFO versão 7.2.2.6 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Estados Unidos).

4.9 Aspectos éticos

A coleta e a aplicação do Questionário foram feitas apenas a partir de participantes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – APÊNDICE B). As informações de cada indivíduo foram codificadas e analisadas apenas em conjunto. O nome de cada participante consta apenas do TCLE que está mantido guardado em uma gaveta trancada

à chave com um dos membros da equipe do Estudo. Todos os outros documentos e a amostra colhida foram identificados apenas por meio de um código. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-IOC/FIOCRUZ) sob o parecer número 1.505.421 (CAAE 52531715.0.0000.5248).

5 RESULTADOS

5.1 População do estudo

No período de maio de 2016 a maio de 2018 quatro instituições de ensino das cidades do Rio de Janeiro e de Niterói foram incluídas no estudo, usando amostragem não probabilística por conveniência, totalizando 374 participantes. Um voluntário foi excluído do estudo por não pertencer à faixa etária de 18 a 35 anos (Tabela 7). As características demográficas da população estudada são descritas no Apêndice C.

Tabela 7 - Número, sexo e idade dos participantes por Instituição de ensino

| Instituição de Ensino | Número de Participantes (%) | Sexo Feminino (%) | Idade* |
|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------|
| FIOCRUZ | 67 (18,0) | 50 (74,6) | 26 (24 – 28) |
| UEZO | 53 (14,2) | 28 (52,8) | 22 (21 – 23) |
| UFF | 84 (22,5) | 64 (76,2) | 21 (20 – 22) |
| UFRJ | 169 (45,3) | 106 (62,7) | 21 (20 – 23) |
| Total | 373 (100) | 248 (66,5) | 22 (20 – 24) |

* Mediana (intervalo interquartil).

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz; UEZO: Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste; UFF: Universidade Federal Fluminense; UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Fonte: A autora, 2019.

Realizou-se um total de 10 coletas, no outono ou na primavera, incluindo 373 participantes. A maioria dos voluntários do estudo era do sexo feminino (66%) com idade mediana de 22 anos (intervalo interquartil, 20,5 – 24,5 anos), solteira (92%), branca (58%), heterossexual (79%) e residente da cidade do Rio de Janeiro (67%). Noventa e quatro por cento dos voluntários eram estudantes de graduação ou graduados, e mais da metade declarou que os pais tinham cursado o ensino superior. Ingestão de bebida alcoólica (43%), frequência a bares, boates, escolas de samba (51%) e a igrejas ou outras instituições religiosas (58%) foram os hábitos sociais mais frequentes na população estudada. Uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias foi observado em 12% dos voluntários, enquanto a ingestão de outros medicamentos foi reportada por 66% dos participantes. Imunização prévia com vacina meningocócica foi declarada por 14% dos voluntários (Apêndice C).

5.2 Caracterização das amostras bacterianas

Todos os “swabs” contendo espécimes clínicos foram cadastrados no Sistema de Gerenciamento de Amostras Laboratoriais - HARPYA como amostras especiais (apoio à pesquisa), mediante o envio de formulário de abertura de processo à Central de Recebimento de Amostras do INCQS/Fiocruz.

Dos 373 espécimes de orofaringe cultivados em TMM, 101 (27,1%) apresentaram crescimento suspeito de *Neisseria* sp. com teste positivo para oxidase e presença de diplococos Gram-negativos. Noventa e sete (96%) amostras foram classificadas em espécies distintas pela técnica de MALDI-TOF, e quatro (4%) amostras não foram identificadas (Tabela 8). O espécime MCRJ 218 apresentou três colônias distintas que foram classificadas como *N. lactamica*, *N. meningitidis* e *M. catarrhalis*.

Tabela 8 - Identificação de 101 amostras bacterianas pela técnica de MALDI-TOF

| Espécie | Número de amostras | “Score” |
|----------------------------------|---------------------------|----------------|
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 29 | 2,305 - 2,522 |
| | 21 | 2,045 - 2,296 |
| | 1* | 1,911 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | 26* | 2,322 - 2,547 |
| | 11 | 2,154 - 2,298 |
| <i>Neisseria lactamica</i> | 6* | 2,005 - 2,163 |
| | 2 | 1,887 - 1,973 |
| <i>Kingella denitrificans</i> | 2 | 1,743 - 1,885 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 1 | 2,226 |
| <i>N. flavescens/N. subflava</i> | 1 | 1,882/1,786 |
| Não determinado | 3 | 1,467 – 1,656 |

*Espécime MCRJ 218.

Fonte: A autora, 2018.

Todas as 61 amostras classificadas no gênero *Neisseria* por MALDI-TOF foram submetidas ao sequenciamento do gene *rplF* para confirmação da espécie (Tabela 9).

5.2.1 Genogrupagem

A classificação das amostras em genogrupos é descrita na Tabela 10. O genogrupo B (25,5%) foi o mais frequente, seguido dos grupos C (7,8%), E (5,9%), Z (3,9%) e Y (1,9%).

Os genogrupos A, W e X não foram detectados. Mais de metade das amostras foram classificadas como *cnl* (45,1%) ou não foram genogrupáveis (9,8%).

Tabela 9 - Identificação da genoespécie de 61 amostras bacterianas pelo sequenciamento do gene *rplF*

| Genoespécie (número) | Alelo (número) |
|-----------------------------|---------------------|
| <i>N. meningitidis</i> (51) | 1 (23) |
| | 2 (8) |
| | 4 (7) |
| | 98 (6)* |
| | 3 (5) |
| | Não determinado (2) |
| <i>N. lactamica</i> (9) | 6 (3) |
| | 51 (3)** |
| | 33 (2) |
| | 52 (1) |
| <i>N. gonorrhoeae</i> (1) | 7 (1) |

*Inclui a amostra bacteriana classificada como *N. flavescens/N. subflava* por Maldi-TOF

**Inclui duas amostras bacterianas isoladas do espécime MCRJ 218 e classificadas como *N. meningitidis* e *N. lactamica* por Maldi-TOF.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 10 - Frequência de genogrupos entre 51 amostras de *N. meningitidis* isoladas de adultos jovens da região metropolitana do Rio de Janeiro

| Genogrupo | Número (%) de amostras | Frequência (95% CI) |
|---------------|------------------------|---------------------|
| B | 13 (25,5) | 3,48 (2,0 – 5,8) |
| C | 4 (7,8) | 1,07 (0,4 – 2,7) |
| E | 3 (5,9) | 0,80 (0,2 – 2,3) |
| Y | 1 (1,9) | 0,26 (0,04 – 1,5) |
| Z | 2 (3,9) | 0,53 (0,1 – 1,9) |
| <i>Cnl</i> | 23 (45,1) | 6,16 (4,1 – 9,0) |
| <i>cnl-2</i> | 7 (13,7) | 1,87 (0,9 – 3,8) |
| <i>cnl-3</i> | 8 (15,7) | 2,14 (1,0 – 4,1) |
| <i>cnl-12</i> | 7 (13,7) | 1,87 (0,9 – 3,8) |
| NG | 5 (9,8) | 1,34 (0,5 – 3,0) |
| Total | 51 (100) | 13,67 (10,5 – 17,5) |

CI: intervalo de confiança; *cnl*: do inglês “capsule null locus”; NG: não genogrupável.

Fonte: A autora, 2020.

5.2.2 Caracterização da PorA e FetA

As amostras foram classificadas em 19 variantes da região variável 1, 38 variantes da VR2 e oito da VR3. As variantes mais frequentes foram VR1 22 (n=10), VR2 13-70 (n=3), VR2 23 (n=3) e VR3 35-1 (n=11). Cinco variantes novas foram detectadas entre as amostras do estudo: VR1 12-33, VR1 12-34, VR2 14-60, VR2 14-61 e VR2 16-166 (Tabela 11).

Foram observados 20 tipos de FetA, sendo a variante F5-5 a mais frequente (n=12) (Tabela 11). A combinação das informações de genogrupo, variantes da PorA e tipo de FetA resultou em 47 agrupamentos, três (B:P1.17-6,23-3,37:F3-36, n=2; *cnl*-2:P1.18,25-44,38-1:F5-5, n=2; *cnl*-3:P1.12-6,13-70,35-1:F5-5, n=3) deles encontrados em mais de uma amostra.

5.3 Prevalência de portadores e fatores associados à colonização

A prevalência geral de portadores de *N. meningitidis* foi de 13,6%, variando de 4% (Coleta 2) a 21% (Coleta 3) (Figura 1). A média \pm desvio padrão de idade dos participantes em cada uma das coletas é demonstrada na Figura 1. A prevalência de portadores declinou com o aumento da faixa etária, variando de 18,4% em indivíduos de 18 – 20 anos a 9,0% entre participantes de 30 – 32 anos de idade (p=0,535), e a média de idade dos voluntários foi menor nas coletas com maior prevalência de portadores (Figura 1; $R = -0,86$).

A análise univariada dos fatores relacionados à colonização por *N. meningitidis* demonstrou associação positiva significativa para as seguintes variáveis: sexo masculino (p<0,0001), indivíduos solteiros (em comparação com aqueles casados, separados ou divorciados, p=0,022), e homens que fazem sexo com homens (HSH, p<0,0001). Cor parda/preta (p=0,044) e heterossexualidade (p=0,001) foram considerados fatores protetores (Tabela 12).

Com relação aos hábitos sociais, observou-se associação positiva de colonização por *N. meningitidis* com consumo de bebida alcoólica ao menos uma vez por semana (p=0,026) e frequência a bares/boates/escolas de samba pelo menos uma vez ao mês (p=0,0004). Frequência a igrejas ou outras instituições religiosas ao menos uma vez por semana foi considerada protetora (p=0,039) (Tabela 13). Não se observou associação entre os fatores analisados e a colonização pelos genogrupos B ou *cnl*. A razão de possibilidades (“OR”, 95% IC) dos fatores relacionados à colonização por *N. meningitidis* na análise univariada é resumida na Figura 2.

No modelo final ajustado da análise multivariada, foi observada uma associação independente entre a colonização por *N. meningitidis* e HSH, frequência a bares/boates/escolas

de samba pelo menos uma vez ao mês e sexo masculino. Indivíduos de cor parda/preta apresentaram risco reduzido para colonização por *N. meningitidis* (Tabela 14; Figura 3).

Tabela 11 - Distribuição de genogrupos, variantes da PorA e tipo de FetA entre 51 amostras de *N. meningitidis* isoladas de adultos jovens da região metropolitana do Rio de Janeiro

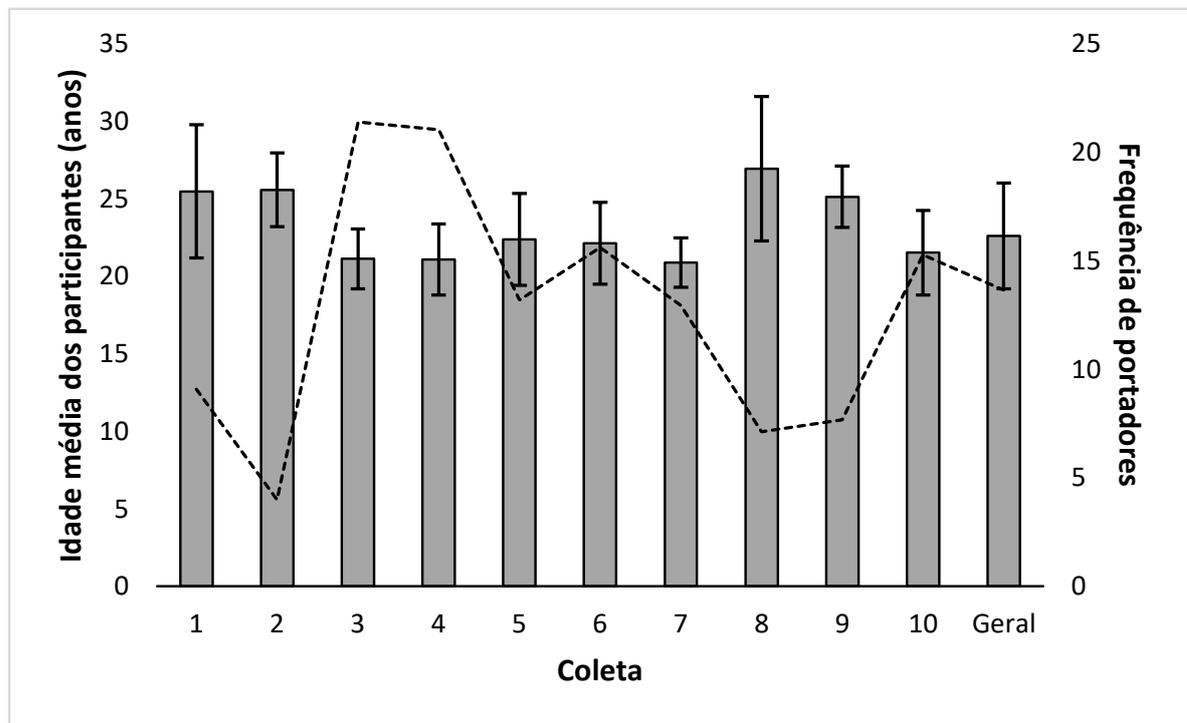
| Genogrupo (n/%) | PorA (n) | | | FetA (n) |
|---------------------------|--|--|---|---|
| | VR1 | VR2 | VR3 | |
| B (13/25,5) | 5 (1), 5-1 (1), 7-2 (1), 12 (2), 17-6 (3), 22 (5) | 1 (1), 14 (2), 14- 26 (1), 16 (1), 16-166 (1), 2 (2), 23 (2), 23-3 (2), 9 (1) | 35 (1), 35-1 (2), 36 (3), 36-2 (2), 37 (4), 37-1 (1) | F1-1 (1), F1-5 (1), F1-7 (1), F3-36 (3), F3-6 (1), F5- 148 (1), F5-2 (1), F5-6 (1), F5-9 (2), <i>fnl</i> (1) |
| C (4/7,8) | 5-1 (1), 21 (1), 22 (2) | 10-6 (1), 14-6 (1), 14-61 (1), 16-36 (1) | 36-2 (3), 37-1 (1) | F3-9 (2), F3-6 (1), F5-8 (1) |
| E (3/5,9) | 7-2 (1), 19-5 (1), 19-11 (1) | 9 (1), 15-23 (1), 15-1 (1) | 35-1 (1), 36 (1), 36-2 (1) | F5-2 (1), F5-7 (1), <i>fnl</i> (1) |
| Y (1/1,9) | 18-1 (1) | 3 (1) | 38 (1) | F3-4 (1) |
| Z (2/3,9) | 21 (1), 22 (1) | 13-9 (1), 14-60 (1) | 35-1 (1), 36-2 (1) | F5-7 (2) |
| <i>cnl</i> (1/1,9) | 12 (1) | 23 (1) | 37 (1) | F5-1 (1) |
| <i>cnl</i> 2 (7/13,7) | 18 (4), 22 (2), 18-1 (1) | 14 (1), 14-16 (1), 25-37 (1), 25-44 (2), 25-78 (1), ND (1) | 36 (1), 38 (1), 38-1 (4), ND (1) | F1-22 (1), F5-5 (6) |
| <i>cnl</i> 3 (8/15,6) | 12-6 (4), 7-2 (1), 12-33 (1), 18-1 (1), ND (1) | 13-70 (3), 1-5 (1), 3 (1), 4-1 (1), 13-27 (1), 23-2 (1) | 35-1 (5), 37 (1), 37-1 (1), 38 (1) | F5-5 (6), F1-7 (1), F5-148 (1) |
| <i>cnl</i> 12 (7/13,7) | 7 (4), 7-2 (1), 7-19 (1), 18-1 (1) | 30 (2), 30-2 (2), 30-3 (2), 30-1 (1) | 38 (7) | F1-2 (3), F1-7 (2), F1-5 (1), F3-7 (1) |
| NG (5/9,8) | 12-8 (2), 7-2 (1), 19-1 (1), 12-34 (1) | 13-2 (1), 16-8 (1), 16-119 (1), 26-1 (1), 23-26 (1) | 36-2 (2), 35-1 (2), 37 (1) | F5-81 (2), F1-7 (1), F3-9 (1), F5-7 (1) |

cnl, do inglês “capsule null locus; PorA, porina A; FetA, iron-regulated enterobactin; *fnl*, ausência do gene *fetA*; n, número; ND, indeterminado; NG, não genogrupável; VR, do inglês “variable region”

As novas variantes descritas nesse estudo estão destacadas em negrito.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 1 - Frequência de portadores de *N. meningitidis* e média de idade dos participantes por coleta.



As colunas cinza representam a idade média (anos) dos participantes e as barras pretas representam o desvio padrão da média (eixo esquerdo). A linha preta pontilhada indica a frequência de portadores de *N. meningitidis* (eixo direito). Foram incluídos 373 participantes em dez coletas distintas: 1 (n=22), 2 (n=25), 3 (n=42), 4 (n=19), 5 (n=53), 6 (n=32), 7 (n=54), 8 (n=28), 9 (n=13), 10 (n=85).

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 12 - Análise univariada de características demográficas dos participantes do estudo e prevalência de *N. meningitidis* (continua)

| Característica | Número (%) | | | OR (95% CI) | Valor de <i>p</i> |
|----------------------------|----------------|------------------|---------------------------|--------------------|-------------------|
| | Total N=373 | Portador N=51 | Não- portador N=322 | | |
| Faixa etária (anos) | | | | | |
| 18 – 20↓ | 114 (30,5) | 21 (41,1) | 93 (28,8) | | |
| 21 – 23 | 140 (37,5) | 18 (35,2) | 122 (37,8) | 0,65 (0,32 – 1,29) | 0,226 |
| 24 – 26 | 69 (18,4) | 8 (15,6) | 61 (18,9) | 0,58 (0,24 – 1,39) | 0,296 |
| 27 – 29 | 32 (8,5) | 3 (5,8) | 29 (9,0) | 0,45 (0,12 – 1,64) | 0,287 |
| 30 – 32 | 11 (2,9) | 1 (1,9) | 10 (3,1) | 0,44 (0,05 – 3,65) | 0,687 |
| 33 – 35 | 7 (1,8) | 0 | 7 (2,1) | 0,00 (<i>In</i>) | 0,603 |

Tabela 12 - Análise univariada de características demográficas dos participantes do estudo e prevalência de *N. meningitidis* (conclusão)

| | | | | | |
|-------------------------------|------------|-----------|------------|---------------------|---------|
| Sexo masculino | 125 (33,5) | 32 (62,7) | 93 (28,8) | 4,14 (2,23 - 7,68) | <0,0001 |
| Cidade de residência | | | | | |
| Rio de Janeiro | 249 (66,7) | 37 (72,5) | 212 (65,8) | 1,37 (0,71 - 2,64) | 0,424 |
| Niterói | 44 (11,8) | 4 (7,8) | 40 (12,4) | 0,60 (0,20 - 1,75) | 0,483 |
| Desconhecida | 19 (5,0) | 4 (7,8) | 15 (4,6) | 1,74 (0,55 - 5,47) | 0,309 |
| Duque de Caxias | 16 (4,2) | 3 (5,8) | 13 (4,0) | 1,48 (0,40 - 5,40) | 0,467 |
| Outras* | 45 (12,0) | 3 (5,8) | 42 (13,0) | 0,41 (0,12 - 1,39) | 0,170 |
| Raça | | | | | |
| Branca | 217 (58,1) | 34 (66,6) | 183 (56,8) | 1,51 (0,81 - 2,83) | 0,222 |
| Parada/Preta/Negra | 143 (38,3) | 13 (25,4) | 130 (40,3) | 0,50 (0,25 - 0,98) | 0,044 |
| Amarela | 4 (1,0) | 0 | 4 (1,2) | 0,00 (<i>In</i>) | 0,999 |
| Indígena | 3 (0,8) | 1 (1,9) | 2 (0,6) | 3,20 (0,28 - 35,94) | 0,357 |
| Estado civil | | | | | |
| Solteiro | 343 (91,9) | 51 (100) | 292 (90,6) | <i>In</i> | 0,022 |
| Casado | 25 (6,7) | 0 | 25 (7,7) | 0,00 (<i>In</i>) | 0,034 |
| Separado/Divorciado | 5 (1,3) | 0 | 5 (1,5) | 0,00 (<i>In</i>) | 0,999 |
| Pessoas por residência | | | | | |
| Uma,‡ | 18 (4,8) | 1 (1,9) | 17 (5,2) | | |
| Duas | 58 (15,5) | 8 (15,6) | 50 (15,5) | 2,72 (0,31 - 23,36) | 0,677 |
| Três | 101 (27,0) | 19 (37,2) | 82 (25,4) | 3,93 (0,49 - 31,45) | 0,302 |
| Quatro | 128 (34,3) | 15 (29,4) | 113 (35,0) | 2,25 (0,27 - 18,19) | 0,693 |
| Cinco ou mais | 64 (17,1) | 6 (11,7) | 58 (18,0) | 1,75 (0,19 - 15,63) | 0,999 |
| Orientação sexual | | | | | |
| Heterossexual | 296 (79,3) | 31 (60,7) | 265 (82,3) | 0,33 (0,17 - 0,62) | 0,001 |
| Bissexual | 37 (9,9) | 5 (9,8) | 32 (9,9) | 0,98 (0,36 - 2,65) | 0,999 |
| Homossexual | 29 (7,7) | 13 (25,4) | 16 (4,9) | 6,54 (2,92 - 14,64) | <0,0001 |
| HSH | 25 (6,7) | 13 (25,4) | 12 (3,7) | 8,83 (3,76 - 20,75) | <0,0001 |

CI, intervalo de confiança; HSH, homens que fazem sexo com homens; *In*, indefinido; OR, razão de possibilidades (do inglês “Odds Ratio”)

‡Usada como referência para análise comparativa

*Inclui: Belford Roxo (n=2), Japeri (n=1), Magé (n=1), Maricá (n=4), Mendes (n=1), Mesquita (n=2), Nilópolis (n=5), Nova Friburgo (n=1), Nova Iguaçu (n=6), Paraíba do Sul (n=1), Petrópolis (n=2), São Gonçalo (n=8), São João de Meriti (n=9), São Paulo (n=2).

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 13 - Análise univariada de dados socioeconômicos e outras características dos participantes do estudo e a colonização por *N. meningitidis* (continua)

| Característica | Número (%) | | | OR (95% CI) | Valor de <i>p</i> |
|-------------------------------------|----------------|------------------|---------------------------|--------------------|-------------------|
| | Total N=373 | Portador N=51 | Não- portador N=322 | | |
| Trabalha | 100 (26,8) | 10 (19,6) | 90 (27,9) | 0,62 (0,30 - 1,30) | 0,237 |
| Escolaridade | | | | | |
| Ensino fundamental.‡ | 5 (1,3) | 0 | 5 (1,5) | | |
| Ensino médio | 14 (3,7) | 2 (3,9) | 12 (3,7) | <i>In</i> | 0,999 |
| Ensino superior | 351 (94,1) | 48 (94,1) | 303 (94,1) | <i>In</i> | 0,999 |
| Escolaridade maternal | | | | | |
| Ensino fundamental.‡ | 25 (6,7) | 5 (9,8) | 20 (6,2) | | |
| Ensino médio | 126 (33,7) | 18 (35,2) | 108 (33,5) | 0,66 (0,22 - 2,00) | 0,541 |
| Ensino superior | 212 (56,8) | 27 (52,9) | 185 (57,4) | 0,58 (0,20 - 1,68) | 0,350 |
| Escolaridade paterna | | | | | |
| Ensino fundamental.‡ | 42 (11,2) | 4 (7,8) | 38 (11,8) | | |
| Ensino médio | 103 (27,6) | 14 (27,4) | 89 (27,6) | 1,49 (0,46 - 4,83) | 0,589 |
| Ensino superior | 211 (56,5) | 31 (60,7) | 180 (55,9) | 1,63 (0,54 - 4,90) | 0,469 |
| Fumante | 18 (4,8) | 4 (7,8) | 14 (4,3) | 1,87 (0,59 - 5,92) | 0,287 |
| Fumante passivo | 91 (24,4) | 8 (15,6) | 83 (25,7) | 0,53 (0,24 - 1,18) | 0,159 |
| Ingestão de bebida alcóolica | 161 (43,1) | 28 (54,9) | 133 (41,3) | 1,73 (0,95 - 3,13) | 0,093 |
| Nenhuma ou < 1 vez por semana | 235 (63,0) | 23 (45,1) | 212 (65,8) | 0,42 (0,23 - 0,77) | 0,007 |

| | | | | | |
|--|------------|-----------|------------|--------------------|--------|
| ≥ 1 vez por semana | 130 (34,8) | 25 (49,0) | 105 (32,6) | 1,98 (1,09 - 3,60) | 0,026 |
| Uso de drogas nos últimos 30 dias | 42 (11,2) | 8 (15,6) | 34 (10,5) | 1,57 (0,68 - 3,62) | 0,337 |
| Maconha | 38 (10,1) | 7 (13,7) | 31 (9,6) | 1,49 (0,61 - 3,59) | 0,329 |
| Frequenta bares/boates/escolas de samba | 192 (51,4) | 35 (68,6) | 157 (48,7) | 2,29 (1,22 - 4,31) | 0,010 |
| Nunca ou < 1 vez por mês | 189 (50,6) | 16 (31,3) | 173 (53,7) | 0,39 (0,20 - 0,73) | 0,003 |
| ≥ 1 vez por mês | 168 (45,0) | 35 (68,6) | 133 (41,3) | 3,10 (1,65 - 5,84) | 0,0004 |
| Frequenta bailes funk | 17 (4,5) | 3 (5,8) | 14 (4,3) | 1,37 (0,38 - 4,96) | 0,714 |
| Imunizado com vacina meningocócica | 51 (13,6) | 7 (13,7) | 44 (13,6) | 1,00 (0,42 - 2,37) | 0,999 |
| Uso de antibiótico nos últimos 30 dias | 46 (12,3) | 6 (11,7) | 40 (12,4) | 0,94 (0,37 - 2,34) | 0,999 |
| Uso de outros medicamentos nos últimos 30 dias* | 248 (66,4) | 37 (72,5) | 211 (65,5) | 1,39 (0,72 - 2,68) | 0,343 |
| Infecção respiratória nos últimos 30 dias | 64 (17,1) | 8 (15,6) | 56 (17,3) | 0,88 (0,39 - 1,98) | 0,844 |
| Diarreia nos últimos 30 dias | 80 (21,4) | 15 (29,4) | 65 (20,1) | 1,64 (0,85 - 3,19) | 0,143 |
| Viagem para o exterior no último ano | 53 (14,2) | 11 (21,5) | 42 (13,0) | 1,83 (0,87 - 3,85) | 0,128 |
| Tempo entre viagem e coleta | | | | | |
| ≤ 2 meses | 20 (5,3) | 6 (11,7) | 14 (4,3) | 2,40 (0,62 - 9,24) | 0,295 |
| > 2 meses | 33 (8,8) | 5 (9,8) | 28 (8,6) | 0,41 (0,10 - 1,60) | 0,295 |
| Frequência de escovação dos dentes | | | | | |
| 1 - 2 vezes por dia↓ | 106 (28,4) | 15 (29,4) | 91 (28,2) | | |
| ≥ 3 vezes por dia | 262 (70,2) | 35 (68,6) | 227 (70,4) | 0,93 (0,48 - 1,79) | 0,867 |
| Uso de enxaguante bucal | 130 (34,8) | 19 (37,2) | 111 (34,4) | 1,12 (0,61 - 2,08) | 0,752 |
| Nunca↓ | 243 (65,1) | 32 (62,7) | 211 (65,5) | | |
| 1 - 2 vezes por semana | 24 (6,4) | 2 (3,9) | 22 (6,8) | 0,59 (0,13 - 2,67) | 0,749 |
| 3 - 4 vezes por semana | 28 (7,5) | 3 (5,8) | 25 (7,7) | 0,79 (0,22 - 2,77) | 0,999 |

| | | | | | |
|---|------------|-----------|------------|--------------------|-------|
| ≥ 5 vezes por semana | 55 (14,7) | 9 (17,6) | 46 (14,2) | 1,29 (0,57 - 2,88) | 0,519 |
| Doença crônica | 90 (24,1) | 10 (19,6) | 80 (24,8) | 0,73 (0,35 - 1,54) | 0,484 |
| Frequenta igrejas/outras instituições religiosas | 218 (58,4) | 24 (47,0) | 194 (60,2) | 0,58 (0,32 - 1,06) | 0,092 |
| Nunca↓ | 155 (41,5) | 27 (52,9) | 128 (39,7) | | |
| Raramente | 76 (20,3) | 12 (23,5) | 64 (19,8) | 0,88 (0,42 - 1,86) | 0,852 |
| < 1 vez por semana | 42 (11,2) | 4 (7,8) | 38 (11,8) | 0,49 (0,16 - 1,51) | 0,243 |
| ≥ 1 vez por semana | 100 (26,8) | 8 (15,6) | 92 (28,5) | 0,41 (0,17 - 0,94) | 0,039 |
| Renda familiar mensal** | | | | | |
| < R\$ 5.280,00 | 142 (38,0) | 23 (45,1) | 119 (36,9) | 1,40 (0,77 - 2,54) | 0,280 |
| ≥ R\$ 5.280,00 | 138 (37,0) | 16 (31,3) | 122 (37,8) | 0,74 (0,39 - 1,41) | 0,436 |

CI, intervalo de confiança; OR, razão de possibilidades (do inglês “Odds Ratio”)

↓ Usada como referência para análise comparativa

*Não inclui agentes antimicrobianos

**326 voluntários foram questionados.

Fonte: A autora, 2019.

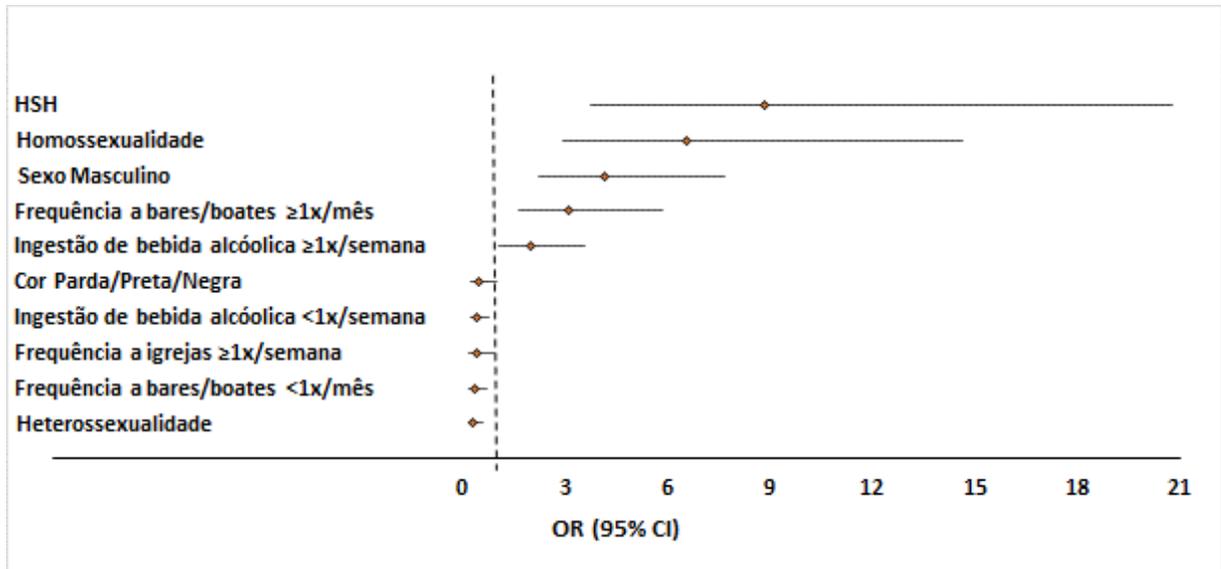
Tabela 14 - Modelo final ajustado da análise multivariada para fatores associados com a colonização por *N. meningitidis* entre os voluntários do estudo

| Variável | OR | 95% CI | Valor de p |
|---|------|--------------|------------|
| Cor parda/preta | 0,37 | 0,17 – 0,79 | 0,0107 |
| Sexo masculino | 3,52 | 1,71 – 7,25 | 0,0006 |
| Frequência a bares/boates/escolas de samba ≥1 vez/mês | 3,52 | 1,77 – 6,99 | 0,0003 |
| HSH | 5,05 | 1,84 – 13,85 | 0,0017 |

CI, intervalo de confiança; HSH, homens que fazem sexo com homens; OR, razão de possibilidades (do inglês “Odds Ratio”).

Fonte: A autora, 2019.

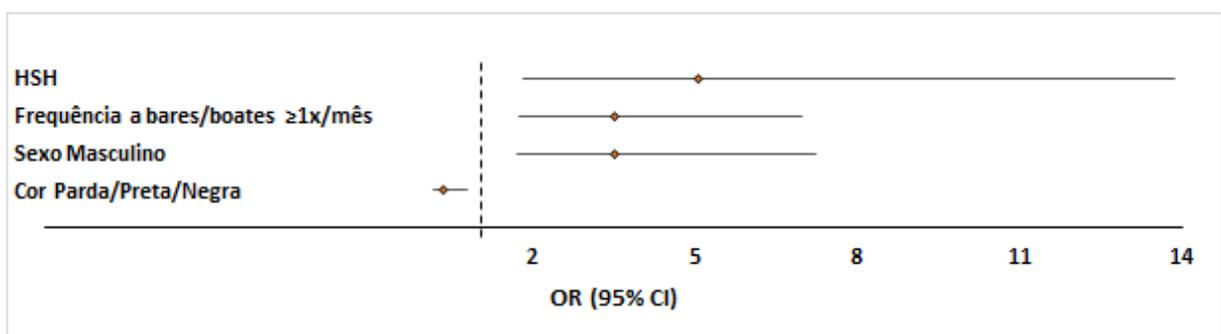
Figura 2 - Razão de possibilidades (OR) e intervalo de confiança (95% CI) de 10 variáveis associadas à colonização por *Neisseria meningitidis* em análise univariada. Os marcadores indicam o valor de “OR” e a linha preta representa o intervalo de confiança. A linha preta pontilhada sinaliza o valor 1 do eixo X



CI, intervalo de confiança; HSH, homens que fazem sexo com homens; OR, razão de possibilidades (do inglês “Odds Ratio”)

Fonte: A autora, 2020.

Figura 3 - Razão de possibilidades (OR) e intervalo de confiança (95% CI) de quatro variáveis associadas à colonização por *Neisseria meningitidis* no modelo final ajustado da análise multivariada. Os marcadores indicam o valor de “OR” e a linha preta representa o intervalo de confiança. A linha preta pontilhada sinaliza o valor 1 do eixo X



CI, intervalo de confiança; HSH, homens que fazem sexo com homens; OR, razão de possibilidades (do inglês “Odds Ratio”)

Fonte: A autora, 2020.

5.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos

Todas as 51 amostras de *N. meningitidis* foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacino, cloranfenicol, meropenem,

minociclina, rifampicina e trimetoprim-sulfametoxazol pelo método de disco-difusão, e ao levofloxacino por difusão em gradiente de concentração. Duas (3,9%) amostras apresentaram resistência intermediária à rifampicina. Um total de 35 (68,6%) amostras apresentou resistência e uma (1,9%) amostra mostrou resistência intermediária ao trimetoprim-sulfametoxazol. Todas as amostras foram suscetíveis ao levofloxacino, e apresentaram CIM entre 0,004 e 0,015 $\mu\text{g/mL}$ (CIM₅₀=0,008 $\mu\text{g/mL}$; CIM₉₀=0,015 $\mu\text{g/mL}$).

A suscetibilidade à ampicilina foi testada para 48 amostras por disco-difusão e para 46 amostras por difusão em gradiente de concentração, enquanto a suscetibilidade à penicilina foi testada para 43 amostras por disco-difusão e para todas as 51 amostras por difusão em gradiente de concentração. Os resultados da disco-difusão e da difusão em gradiente de concentração foram interpretados segundo Jorgensen e colaboradores (2005) e CLSI (CLSI, 2020), respectivamente. Pelo método de disco-difusão, duas (4,1%) amostras foram resistentes e quatro (8,3%) apresentaram resistência intermediária à ampicilina, e 11 (25,6%) amostras apresentaram resistência intermediária à penicilina. Os resultados da difusão em gradiente de concentração estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 - Suscetibilidade à ampicilina e à penicilina, CIM₅₀, CIM₉₀ e variação das CIM observadas entre as amostras do estudo

| Agente antimicrobiano | Perfil | N/total testado (%) | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | |
|-----------------------|--------|---------------------|--------------------------|-----------|
| | | | Varição | 50/90 |
| Ampicilina | I | 30/46 (65,2) | 0,25 – 1,0 | 0,5/1,0 |
| | S | 16/46 (34,8) | 0,06 – 0,12 | |
| Penicilina | I | 35/51 (68,6) | 0,12 – 0,25 | 0,25/0,25 |
| | S | 12/51 (23,5) | 0,015 – 0,06 | |
| | R | 4/51 (7,8) | 0,5 – 1,0 | |

CIM, concentração inibitória mínima; I, resistência intermediária; N, número; R, resistente; S, suscetível.
Fonte: A autora, 2019.

O resultado da suscetibilidade aos antimicrobianos ampicilina e penicilina obtidos pelos métodos de disco-difusão e de difusão em gradiente de concentração foi comparado. O resultado entre as duas técnicas foi concordante para 17 (36,9%) das 46 amostras testadas para ampicilina, e 16 (37,2%) de 43 amostras testadas frente à penicilina. Determinando-se a eficácia de ambos os métodos testados para ampicilina foram observados um (2,1%) erro grave e 28 (60,8%) erros mínimos, enquanto para penicilina foram observados 27 (62,8%) erros mínimos.

Considerando o percentual total de erro, a técnica de disco-difusão não foi considerada satisfatória para determinação da suscetibilidade à ampicilina e à penicilina.

5.5 Tipificação

5.5.1 “Multilocus sequence typing” (MLST)

Todas as 51 amostras de *N. meningitidis* foram submetidas à caracterização por MLST. A classificação pelo MLST foi concluída para 34 amostras, sendo identificados 24 ST, cinco descritos pela primeira vez (Tabela 16). Os CC mais frequentes foram CC198 (n=6), CC53 (n=5), CC213 (n=3) e CC41/44 (n=2). Onze amostras, agrupadas em oito ST, não foram alocadas em CC. Todas as amostras pertencentes ao CC198 eram *cnl-2*, as amostras do CC53 eram *cnl-12* e as amostras do CC213 eram do genogrupo B. Os CC, ST e perfis genotípicos estão descritos na Tabela 16.

A árvore filogenética das 34 amostras caracterizadas pelo MLST, gerada para análise da relação de evolução entre os concatenados alinhados, é apresentada na Figura 4. Dezoito amostras foram agrupadas em quatro clados A (n=5), B (n=6), C (n=4) e D (n=3). O clado A incluiu todas as amostras *cnl-12*, CC53, *rplF* alelo 4. As amostras agrupadas no clado B eram *cnl-2*, CC198, *rplF* alelo 1 e F5-5. O clado C foi formado por amostras *cnl-3*, CC indeterminado (ST 7129 e 15578), *rplF* alelo 98, F5-5, PorA VR1 12-6 e VR3 35-1. As amostras do clado D eram pertencentes ao genogrupo B, CC213 *rplF* alelo 2 e PorA VR1 22. Os clados A e B foram detectados apenas em indivíduos heterossexuais, enquanto os clados C e D foram observados em voluntários de um único local de coleta.

A definição de ST de 17 amostras não foi concluída devido à baixa qualidade das sequências obtidas para ao menos um alelo. Apesar do perfil alélico incompleto, oito amostras foram alocadas em sete CC. O CC4821 (n=2) foi o mais frequente e inclui apenas amostras pertencentes ao genogrupo B. Os perfis alélicos e as características genotípicas dessas amostras estão descritos na Tabela 17.

A distribuição dos CC de acordo com o genogrupo é representada na Figura 5. A associação entre CC hipervirulentos e não hipervirulentos com a frequência de amostras não suscetíveis a ampicilina, penicilina e trimetoprim-sulfametoxazol é apresentada na Figura 6.

Tabela 16 - Definição do complexo clonal, “sequence type” e perfil genotípico de 34 amostras de *N. meningitidis*

| Complexo Clonal (n) | Sequence type (n) | Perfil genotípico (n) |
|----------------------------|--------------------------|---|
| CC198 (6) | 823 (3) | <i>cnl</i> -2:P1.18,25-44,38-1:F5-5 (2) |
| | | <i>cnl</i> -2:P1.18,25-37,38-1:F5-5 (1) |
| | 3876 (2) | <i>cnl</i> -2:P1.22,14,ND:F5-5 (1) |
| | | <i>cnl</i> -2:P1.22,14-16,36:F5-5 (1) |
| | 15159 (1) | <i>cnl</i> -2:P1.18,25-78,38-1:F5-5 (1) |
| CC53 (5) | 53 (4) | <i>cnl</i> -12:P1.7,30,38:F1-2 (1) |
| | | <i>cnl</i> -12:P1.7,30-2,38:F1-5 (1) |
| | | <i>cnl</i> -12:P1.7,30-2,38:F1-7 (1) |
| | | <i>cnl</i> -12:P1.7,30-3,38:F1-7 (1) |
| | 7414 (1) | <i>cnl</i> -12:P1.7-19,30-1,38:F1-2 (1) |
| CC213 (3) | 3496 (2) | B:P1.22,14,36:F5-9 (1) |
| | | B:P1.22,16,37-1:F5-2 (1) |
| | 15167 (1) | B:P1.22,14-26,36:F5-9 (1) |
| CC41/44 (2) | 44 (1) | NG:P1.7-2,13-2,35-1:F1-7 (1) |
| | 13212 (1) | B:P1.5-1,2,36-2:F5-6 (1) |
| CC11 (1) | 11 (1) | C:P1.5-1,10-6,36-2:F3-6 (1) |
| CC35 (1) | 35 (1) | NG:P1.19-1,26-1,35-1:F3-9 (1) |
| CC103 (1) | 12020 (1) | C:P1.22,14-6,36-2:F3-9 (1) |
| CC269 (1) | 275 (1) | B:P1.22,9,35-1:F3-6 (1) |
| CC865 (1) | 3327 (1) | C:P1.21,16-36,37-1:F5-8 (1) |
| CC1136 (1) | 1136 (1) | <i>cnl</i> -2:P1.18-1,ND,38:F1-22 (1) |
| CC4821 (1) | 3200 (1) | B:P1.17-6,23-3,37:F3-36 (1) |
| Indeterminado (11) | 7129 (3) | <i>cnl</i> -3:P1.12-6,13-70,35-1:F5-5 (3) |
| | 6119 (2) | NG:P1.12-8,16-8,36-2:F5-81 (1) |
| | | NG:P1.12-8,16-119,36-2:F5-81 (1) |
| | 3015 (1) | Y:P1.18-1,3,38:F3-4 (1) |
| | 4221 (1) | B:P1.7-2,1,35-1:F5-148 (1) |
| | 8730 (1) | C:P1.22,14-61,36-2:F3-9 (1) |
| | 8930 (1) | B:P1.12,16-166,35:F1-5 (1) |
| | 15163 (1) | <i>cnl</i> -3:P1.7-2,1-5,35-1:F5-148 (1) |
| | 15578 (1) | <i>cnl</i> -3:P1.12-6,13-27,35-1:F5-5 (1) |

cnl, do inglês “capsule null locus; CC, complexo clonal; n, número; ND, não determinado; NG, não genogrupável; Perfil genotípico, Genogrupo: PorA (P1). VR1,VR2,VR3: FetA (F)VR

Os novos ST descritos nesse estudo estão destacados em negrito.

Fonte: A autora, 2020.

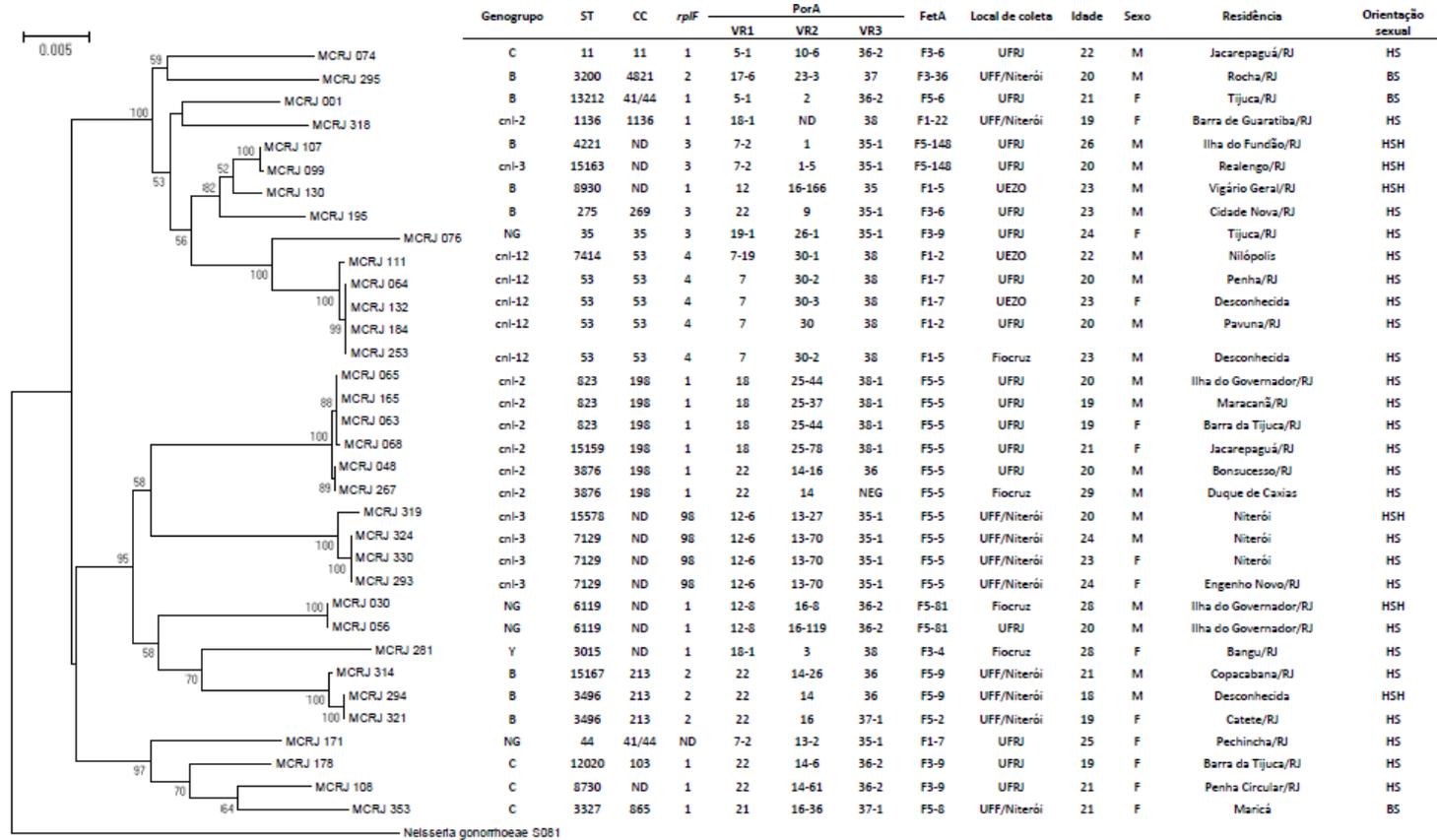
Tabela 17 - Definição do complexo clonal, dos perfis alélico e genotípico de 17 amostras de *N. meningitidis*

| Complexo clonal (n) | <i>abcZ</i> | <i>adk</i> | <i>aroE</i> | <i>fumC</i> | <i>gdh</i> | <i>pdhC</i> | <i>pgm</i> | Perfil genotípico |
|----------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|---------------------------|-------------------------------------|
| CC4821 (2) | 222 | 3 | - | 261 | 263 | 5 | 255 | B:P1.17-6,23-3,37:F3-36 |
| | - | 492 | 58 | 261 | 263 | 5 | 255 | B:P1.17-6,23,37:F3-36 |
| CC11 (1) | 2 | - | 4 | 3 | 8 | 4 | 6 | B:P1.5,2,36-2:F1-1 |
| CC32 (1) | - | 10 | 5 | 9 | 711 | 3 | 8 | <i>cnl</i> :P1.12,23,37:F5-1 |
| CC53 (1) | - | 2 | 6 | 25 | 17 | 25 | 22 | <i>cnl</i> -12:P1.7-2,30,38:F1-2 |
| CC178 (1) | 7 | 16 | - | - | 3 | 56 | 46 | E:P1.19-5,15-23,36: <i>fnl</i> |
| CC213 (1) | 7 | - | 1 | 3 | 36 | 53 | 15 | B:P1.22,14,36: <i>fnl</i> |
| CC1117 (1) | 16 | 2 | - | - | 77 | 25 | 112 | <i>cnl</i> -12:P1.18-1,30-3,38:F3-7 |
| Indeterminado (9) | 25 | - | 401 | 26 | 26 | 65 | 53 | <i>cnl</i> -3:P1.12-33,23-2,37:F1-7 |
| | - | - | 79 | 7 | 724 | 189 | 123 | <i>cnl</i> -3:P1.18-1,4-1,37-1:F5-5 |
| | 217 | - | 79 | 7 | 724 | 189 | 123 | <i>cnl</i> -3:P1.ND,3,38-1:F5-5 |
| | 46 | - | 4 | 215 | 6 | 11 | 18 | E:P1.7-2,9,35-1:F5-2 |
| | 2 | - | 2 | 9 | 9 | 65 | 17 | E:P1.19-11,15-1,36-2:F5-7 |
| | 13 | - | 2 | 17 | 26 | 65 | 53 | Z:P1.21,13-9,35-1:F5-7 |
| | 10 | - | 2 | 26 | 71 | 3 | 129 | Z:P1.22,14-60,36-2:F5-7 |
| | - | - | 401 | 15 | 26 | 65 | 7 | B:P1.12,23,37:F1-7 |
| -* | 3 | 2 | 26 | 26 | 15 | 112 | NG:P1.12-34,23-26,37:F5-7 | |

-, alelo não determinado; *cnl*, do inglês “capsule null locus”; CC, complexo clonal; *fnl*, ausência do gene *fetA*; n, número; ND, não determinado; NG, não genogrupável; Perfil genotípico, Genogrupo: PorA (P1). VR1,VR2,VR3: FetA (F)VR; *novo alelo.

Fonte: A autora, 2020.

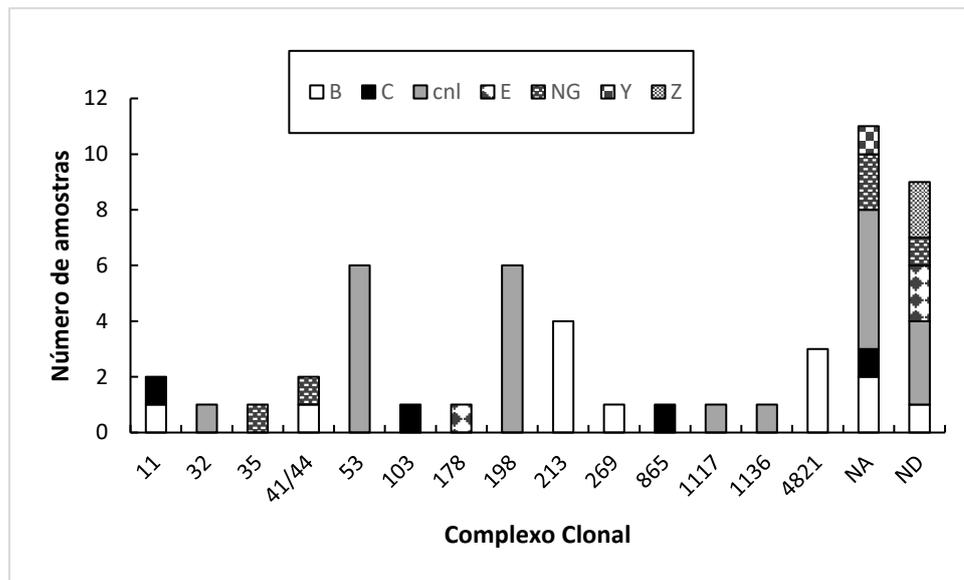
Figura 4 - Árvore filogenética derivada do concatenado dos setes genes do MLST de 34 amostras de *Neisseria meningitidis* gerada pelo método de “Neighbor-joining”, utilizando o modelo “Jukes-Cantor”. A significância do arranjo dos ramos foi avaliada por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas e os números na árvore indicam a ocorrência (%) destes arranjos; apenas valores $\geq 50\%$ são mostrados



ST: “sequence type”; CC: complexo clonal; NG: não genogrúvável; ND: indeterminado; NEG: negativo; F: feminino; M: masculino; RJ: cidade do Rio de Janeiro; BS: bissexual; HSH: homem que faz sexo com homem; HS: heterossexual.

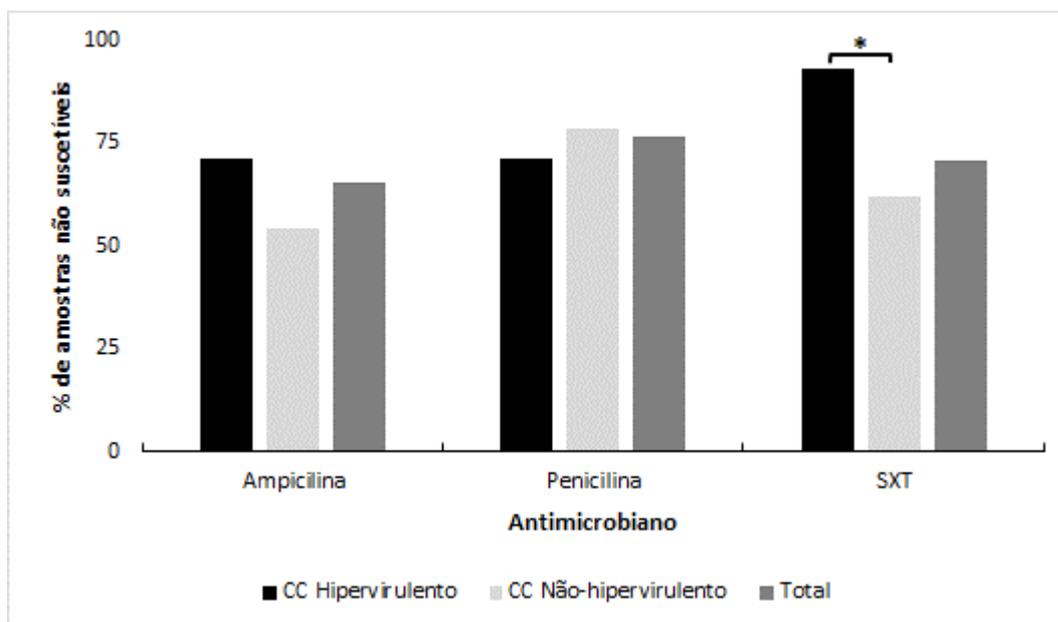
Fonte: Aautora, 2020.

Figura 5 - Distribuição dos complexos clonais de 51 amostras de *Neisseria meningitidis* de acordo com o genogrupo



cnl, do inglês “capsule null locus”; NA, não atribuído; ND, não determinado; NG, não genogrupoável
 Fonte: A autora, 2020.

Figura 6 - Frequência de amostras de *Neisseria meningitidis* não suscetíveis a ampicilina, penicilina e trimetoprim-sulfametoxazol por complexos clonais hipervirulentos e não hipervirulentos



CC, complexo clonal; CC hipervirulentos: CC11, CC32, CC41/44, CC103, CC213, CC269, CC4821; CC não-hipervirulento: CC35, CC53, CC178, CC198, CC865, CC1117, CC1136; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; * $p < 0,05$.
 Fonte: A autora, 2020.

5.5.2 “Whole genome sequencing” (WGS)

Quatro amostras de *N. meningitidis*, dos genogrupos B ou C, foram caracterizadas por WGS. Após a montagem, as sequências foram submetidas ao “Genbank” para anotação segundo o protocolo PGAP. O tamanho dos genomas foi de aproximadamente 2,2 Mpb e o índice GC foi de cerca de 51%. O número de alelos identificados pelo PubMLST foi maior no genoma montado sem prévia anotação pelo protocolo PGAP. As informações obtidas do genoma são resumidas na Tabela 18. As variantes das proteínas vacinais *fHbp*, *nhba* e *nada*, e os determinantes de resistência identificados no genoma estão descritos na Tabela 19. O alelo do gene *penA* foi determinado para todas as quatro amostras estudadas, tendo sido observadas as mutações A510V, F504L, H541N, I515V e I566V em todas as amostras. O alelo do gene *folP* foi determinado apenas na amostra MCRJ 108, na qual detectou-se as mutações R228S e F31L.

Tabela 18 - Características da montagem e anotação do genoma de quatro amostras de *N. meningitidis* submetidas ao WGS

| Amostra | Perfil genotípico | Genoma | | | | |
|----------|--|--------------|---------------|------------------|-----------------|------------------|
| | | Montagem | | | Anotação – PGAP | |
| | | Tamanho (pb) | Índice GC (%) | PubMLST (alelos) | Sequências | PubMLST (alelos) |
| MCRJ 001 | B:P1.5-1,2,36-2:F5-6:ST-13212(CC41/44) | 2.221.828 | 51,3 | 1959 | 381 | 480 |
| MCRJ 074 | C:P1.5-1,10-6,36-2:F3-6:ST-11(CC11) | 2.109.904 | 51,7 | 2128 | 336 | 1247 |
| MCRJ 107 | B:P1.7-2,1,35-1:F5-148:ST-4221 | 2.215.303 | 51,4 | 2029 | 406 | 461 |
| MCRJ 108 | C:P1.22,14-61,36-2:F3-9:ST-8730 | 2.173.901 | 51,4 | 2032 | 410 | 490 |

Perfil genotípico, Genogrupo: PorA (P1). VR1,VR2,VR3: FetA (F)VR: ST (CC); pb, pares de base

Número de submissão no “Genbank”: SUB5664905 (MCRJ 001), SUB5664975 (MCRJ 074), SUB5664982 (MCRJ 107), SUB5664993 (MCRJ 108).

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 19 - Variantes dos genes *fHbp*, *nhba* e *nadA*, e determinantes de resistência extraídos do WGS de quatro amostras de *N. meningitidis*

| Amostra | NHBA (peptídeo) | FHBP | | | NadA | Suscetibilidade | Determinantes de resistência |
|----------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------|------|---------------------------|-----------------------------------|
| | | Segmentos | Variantes | Alelo (Peptídeo) | | | |
| MCRJ 001 | 187 (545) | A1.29, B1.1, C1.31, D1.2, E1.3 | ND | ND | ND | AMP (I), PEN (I), SXT (R) | <i>penA</i> 874* |
| MCRJ 074 | 3 (20) | A1.3, B1.1, D1.2, E1.1 | Novartis 1, Pfizer B139_001 | 669 (ND) | 308 | AMP (I), PEN (I) | <i>penA</i> 7* |
| MCRJ 107 | 824 (819) | A1.1, B1.1, C1.23, D1.12 | Novartis 1, Pfizer B | 1588 (1230) | ND | AMP (I), PEN (I) | <i>penA</i> 203* |
| MCRJ 108 | ND (24) | A1.4, B1.3, C2.3, D2.1, E2.1 | Novartis 2.25, Pfizer A15_001 | 25 (25) | ND | AMP (I), PEN (I), SXT (R) | <i>penA</i> 14*; <i>folP</i> 45** |

AMP, ampicilina; I, resistência intermediária; ND, não determinado; PEN, penicilina; R, resistente; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

*Mutações: A510V, F504L, H541N, I515V e I566V; **Mutações: R228S e F31L.

Fonte: A autora, 2020.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, realizou-se uma análise de corte transversal incluindo 373 adultos jovens de quatro instituições de ensino das cidades do Rio de Janeiro e de Niterói para investigar a prevalência de portadores de *N. meningitidis*. A prevalência geral de portadores foi de 13,6%, sendo similar à frequência observada (12,3%) em um estudo realizado com estudantes de uma faculdade privada de Salvador (FERREIRA *et al.*, 2020) e inferior ao reportado (15,4%) entre alunos de medicina de uma universidade da cidade de São Paulo (LUIZ, 2018). Entretanto, a prevalência observada em nosso estudo foi superior àquelas reportadas em Campinas (9,9%) (DE MORAES *et al.*, 2015), Salvador (4,9%) (NUNES *et al.*, 2016), Rio Grande (9,0%) (COCH GIOIA *et al.*, 2015) e Embu das Artes (9,0%) (WECKX *et al.*, 2017).

A diferença entre a prevalência de portadores observada no presente estudo e em outras cidades do país pode ser explicada pela faixa etária dos indivíduos incluídos na amostragem. Enquanto no presente estudo foram admitidos voluntários de 18 a 35 anos de idade, os demais estudos incluíram indivíduos de 11 a 19 anos (DE MORAES *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2016), 18 a 63 anos (COCH GIOIA *et al.*, 2015) e 01 a 24 anos (WECKX *et al.*, 2017). Entretanto, nos estudos onde a prevalência de portadores foi similar ou superior ao observado em nosso estudo, os grupos etários incluídos foram de 18 a 39 anos (LUIZ, 2018) e de 18 a 24 anos (FERREIRA *et al.*, 2020). Segundo Caugant e colaboradores (1994), o pico da frequência de portadores ocorre na idade de 15 a 24 anos, e está associado com a maior atividade social praticada por esses grupos. Em uma revisão sistemática da literatura e metanálise sobre portadores de *N. meningitidis* e a idade, Christensen e colaboradores (2010) relataram que a prevalência da colonização aumenta com a idade, atinge o pico aos 19 anos de idade e declina ao longo da idade adulta. Em um estudo longitudinal com alunos ingleses de 10 a 25 anos de idade relatou-se que a prevalência de portadores de *N. meningitidis* aumentou ao longo da adolescência, sendo a maior prevalência observada no grupo etário de 19 a 25 anos (JEPPESEN *et al.*, 2015).

6.1 Fatores associados à colonização

A relação entre fatores demográficos, socioeconômicos e de saúde dos voluntários do estudo e a colonização por *N. meningitidis* foi investigada empregando-se análise multivariada. Observou-se uma associação independente entre a colonização por *N. meningitidis* e HSH, frequência a bares/boates/escolas de samba pelo menos uma vez ao mês e sexo masculino, bem

como risco reduzido para colonização por *N. meningitidis* em indivíduos de cor parda/preta/negra.

No presente estudo homens apresentaram 3,5 mais chances de carream *N. meningitidis*. O maior risco de indivíduos do sexo masculino serem colonizados por *N. meningitidis* é amplamente descrito na literatura, entretanto não são apontadas as possíveis causas para este risco. Em um estudo conduzido por Caugant e colaboradores (1994) na Noruega, constatou-se que o risco de ser portador de *N. meningitidis* é duas vezes maior em indivíduos do sexo masculino. Basta e colaboradores (2018) realizaram um estudo longitudinal piloto em Mali e observaram que homens tem 2,21 mais chances de ser colonizado por *N. meningitidis*. O sexo masculino também foi associado ao estado de portador de *N. meningitidis* em um estudo realizado com estudantes universitários de Rhode Island, Estados Unidos (BREAKWELL *et al.*, 2018). Nos estudos realizados em Rio Grande (COCH GIOIA *et al.*, 2015) e em Salvador (FERREIRA *et al.*, 2020) a colonização por *N. meningitidis* e o sexo masculino também foram relacionados.

Exposição a aglomerações como serviço militar, peregrinações religiosas e ingresso no ensino superior, tem sido relacionada à colonização por *N. meningitidis* (PETERSON *et al.*, 2018). O número de residentes por domicílio e/ou dormitório também já foi descrito como fator de risco para o estado de portador de *N. meningitidis* (COCH GIOIA *et al.*, 2015; WECKX *et al.*, 2017). Em nosso estudo não foi observada correlação entre o estado de portador e número de residentes por domicílio/dormitório. Também não foi observada relação entre frequência a instituições religiosas e a colonização por *N. meningitidis*.

Quase 95% dos voluntários incluídos no presente estudo declararam o ensino superior (completo ou incompleto) como grau de escolaridade, entretanto não houve correlação entre o nível de escolaridade e colonização por *N. meningitidis*. A ausência de correlação pode ser explicada pelo pequeno grupo de indivíduos pertencente a outros níveis de escolaridade. Em um estudo longitudinal realizado com estudantes de 13 a 25 anos em Quebec, Canadá, os autores relataram um maior percentual de portadores de *N. meningitidis* entre estudantes universitários residentes em dormitórios estudantis em comparação com estudantes do ensino médio. Os autores também observaram que a taxa de aquisição do sorogrupo B foi de 3,3/1000 pessoa-mês para estudantes universitários e <2,0/1000 pessoa-mês para alunos do ensino médio (GILCA *et al.*, 2018).

Em uma revisão sistemática da literatura incluindo 22 estudos sobre portadores assintomáticos de *N. meningitidis* em grupos de alto risco (estudantes universitários, militares e peregrinos do Hajj), a frequência a festas foi relacionada ao aumento do risco de

desenvolvimento do estado de portador em estudantes universitários (PETERSON *et al.*, 2018). No presente estudo, a frequência a clubes/bailes/festas/baladas/escolas de samba ao menos uma vez por mês foi associada à colonização por *N. meningitidis* (OR 3,52), como já descrito anteriormente no Brasil (COCH GIOIA *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2020; NUNES *et al.*, 2016) e no exterior (BREAKWELL *et al.*, 2018; MCMILLAN *et al.*, 2019; WATLE *et al.*, 2020). Watle e colaboradores (2020) observaram um risco quase três vezes maior de colonização por *N. meningitidis* entre estudantes noruegueses que participaram de uma tradicional festa de final de semestre no ensino médio (“russ celebration”), e sugeriram a ocorrência de uma alta transmissão bacteriana devido à aglomeração, compartilhamento de garrafas, beijo na boca e consumo excessivo de bebidas alcoólicas.

No presente estudo, o risco de colonização por *N. meningitidis* foi cinco vezes maior em HSH quando comparado aos voluntários que declararam outras orientações sexuais. Embora ainda não tenha sido descrita nos estudos sobre portadores de *N. meningitidis* realizados no país, a colonização por *N. meningitidis* já foi relacionada a homens homossexuais em estudos prévios. Em 1979, pacientes de duas clínicas de Nova Iorque, Estados Unidos, foram avaliados para diagnóstico do quadro de gonorreia anogenital e a colonização da faringe por *N. meningitidis*. O percentual de portadores de *N. meningitidis* observado em pacientes da clínica especializada no atendimento de homens homossexuais foi maior do que o detectado na clínica de atendimento do público geral (WILLIAM, SCHAPIRO, FELMAN, 1980). Em uma clínica de monitoramento de infecções sexualmente transmissíveis (IST) em Chicago, onde homens homossexuais eram avaliados mesmo na ausência de sintomas de IST, 42,5% de 815 pacientes testados eram portadores de *N. meningitidis* na orofaringe (JANDA *et al.*, 1980). Em estudo realizado no Canadá, realizado com homens homossexuais admitidos em uma clínica de doenças venéreas e em um programa de monitoramento, 35,6% estavam colonizados por *N. meningitidis* na orofaringe (SALIT, FRASCH, 1982). Em 2019, 2285 indivíduos entre 11 e 45 anos de idade foram avaliados quanto à presença de *N. meningitidis* na orofaringe após um surto de DM causada pelo sorogrupo C ST-11 (CC11) na Toscana. Um dos fatores de risco associados à colonização por *N. meningitidis* na população estudada foi a prática de relações sexuais com pessoas do mesmo sexo (MIGLIETTA *et al.*, 2019).

Em uma pesquisa realizada com pacientes de um hospital de Londres, observou-se uma maior prevalência de colonização por *N. meningitidis* em homens homossexuais, e o histórico de contato oro-anal foi associado com duas vezes mais chances de colonização entre homens homossexuais (RUSSELL *et al.*, 1995). Carlin e colaboradores (1997) investigaram a ocorrência de colonização por *N. meningitidis* em HSH portadores do vírus da imunodeficiência

humana (HIV) e observaram uma correlação entre homens homossexuais praticantes de sexo oral em comparação com os homens homossexuais não praticantes. Em 2012, Moreno e colaboradores (2015) conduziram uma pesquisa com estudantes de 15 a 21 anos da cidade de Bogotá, Colômbia, e relataram a associação entre colonização da orofaringe por *N. meningitidis* e a prática de sexo oral. Segundo Janda e colaboradores (1980), a prática de sexo oral entre homens homossexuais pode ocasionar lesões na orofaringe favorecendo a colonização por *N. meningitidis*. Os autores sugerem ainda que a suscetibilidade da mucosa orofaríngea de HSH à colonização por *N. meningitidis* pode estar relacionada à infecção assintomática por outros agentes de IST tais como *Chlamydia trachomatis*.

A correlação inversa entre colonização por *N. meningitidis* e a autodeclaração de cor parda/preta/negra (OR 0,37) foi observada na população amostrada em nosso estudo. Após pesquisa na literatura, encontramos apenas uma publicação que relata a cor parda/preta/negra como fator de proteção para colonização por *N. meningitidis*. Um total de 2000 pacientes atendidos em clínica de doenças venéreas do estado norte-americano de Kentucky e avaliados quanto à colonização da faringe por *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*. Observou-se uma maior prevalência de colonização por *N. meningitidis* em homens (15,3%) e mulheres brancos (12,4%) em comparação com homens (2,4%) e mulheres negros (2,5%). Os autores sugeriram que a diferença racial na frequência de colonização por *N. meningitidis* possa estar relacionada a fatores genéticos determinantes de receptores presentes na mucosa faríngea (NOBLE, COOPER, MILLER, 1979).

6.2 Caracterização das amostras bacterianas

Um total de 61 amostras foi classificado no gênero *Neisseria* por MALDI-TOF, sendo 51 identificadas como *N. meningitidis*. Desse total, apenas 4 (6,5%) amostras apresentaram baixo “score” de identificação (inferior a 2,000). A técnica de MALDI-TOF se mostrou rápida e satisfatória para a identificação presuntiva de *N. meningitidis*, já que das 51 amostras classificadas definitivamente como *N. meningitidis*, apenas uma (1,9%) não foi identificada corretamente por MALDI-TOF. Esses resultados estão de acordo com Morel e colaboradores (2018), que observaram um baixo percentual de erro na identificação de *N. meningitidis* pela técnica de MALDI-TOF.

Com exceção de duas amostras, identificadas inicialmente como *N. meningitidis* e *N. flavescens/N. subflava*, a classificação em espécies pelo sequenciamento do gene *rplF* e do MALDI-TOF foram concordantes. Não foi possível determinar o alelo do gene *rplF* em duas

amostras (MCRJ 125 e MCRJ 171), e a identificação dessas amostras como *N. meningitidis* foi concluída com base na genogrupagem (MCRJ 125) e na tipificação por MLST (MCRJ 171). Diallo e colaboradores (2016) utilizaram o sequenciamento parcial do gene *rplF* na caracterização de uma coleção de mais de 4000 amostras de *Neisseria* spp. obtidas da orofaringe de indivíduos de seis países do cinturão da meningite. Khoder e colaboradores (2019) propuseram a associação da técnica de MALDI-TOF e do sequenciamento parcial do gene *rplF* para o diagnóstico confiável após um estudo para caracterização de espécies não gonocócicas de *Neisseria* isoladas de sêmen humano no Líbano.

6.2.1 Genogrupos

No presente estudo foram detectados os genogrupos B, C, E, Z e Y, embora mais de metade das amostras tenham sido classificadas como *cnl* ou não foram genogrupáveis. Ao contrário do relatado em outros estudos brasileiros, os genogrupos W (DE MORAES *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2016) e X (WECKX *et al.*, 2017) não foram detectados. O genogrupo B foi o mais frequentemente isolado entre as amostras grupáveis, como observado em Salvador (NUNES *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2020) e Rio Grande (COCH GIOIA *et al.*, 2015). Entretanto, a frequência de colonização pelo genogrupo B no nosso estudo foi 3,48%, consideravelmente maior que o relatado em outras cidades do país. Os percentuais observados anteriormente variaram entre 0,58% (NUNES *et al.*, 2016) e 1,5% (COCH GIOIA *et al.*, 2015).

A frequência de colonização pelo genogrupo C em nosso estudo foi inferior (1,07%) ao observado em Embu das Artes (1,65%) (WECKX *et al.*, 2017) e em Campinas (1,32%) (DE MORAES *et al.*, 2015), mas superior ao relatado em Salvador (0,17%; 0,25%) (NUNES *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2020). Esse resultado por ser justificado pela administração rotineira da vacina meningocócica conjugada contra o sorogrupo C no país a partir de 2010. Os estudos realizados em Embu das Artes (WECKX *et al.*, 2017) e em Campinas (DE MORAES *et al.*, 2015) foram realizados até 2012, pouco tempo após a introdução da vacina meningocócica conjugada contra o sorogrupo C no PNI/MS. Contudo, os estudos realizados em Salvador foram conduzidos em 2014 (NUNES *et al.*, 2016) e 2016 (FERREIRA *et al.*, 2020), onde campanhas de vacinação meningocócica conjugada contra o sorogrupo C em crianças menores de cinco anos e jovens de 10 a 24 anos de idade foram realizadas em 2010 após surtos de DM causados pelo sorogrupo C entre 2007 e 2009.

A prevalência de portadores do genogrupo Y no presente estudo foi inferior a 0,5% como observado em Campinas (DE MORAES *et al.*, 2015), Embu das Artes (WECKX *et al.*,

2017) e em Salvador (NUNES *et al.*, 2016). A frequência de colonização pelo genogrupo Z foi de aproximadamente 0,5% em nosso estudo, mas duas vezes menor em Salvador (NUNES *et al.*, 2016) e mais de seis vezes menor em Campinas (DE MORAES *et al.*, 2015). A prevalência de portadores do genogrupo E observada na presente investigação foi de 0,8%. Embora tenha sido inferior a 1,0% em relatos anteriores, a frequência do genogrupo entre portadores variou de 0,10% (WECKX *et al.*, 2017) a 0,74% (DE MORAES *et al.*, 2015).

Mais da metade das amostras do presente estudo não foram grupáveis, e a frequência de colonização por esse grupo foi de 7,5%. O “cluster” gênico *cps* das amostras não grupáveis não foi caracterizado nos estudos sobre portadores de *N. meningitidis* conduzidos no Brasil. Moura e colaboradores (2017) e Ferreira *et al.* (2020) distinguiram amostras *cnl* das demais amostras não grupáveis, mas não determinaram o alelo *cnl*. Mais de 80% (23/28) das amostras não grupáveis do nosso estudo foram caracterizadas como *cnl*, e apenas uma não teve a variante *cnl* definida. Embora amostras não encapsuladas não sejam associadas ao desenvolvimento de doença invasiva, casos de DM em indivíduos imunocomprometidos (VOGEL *et al.*, 2004) e imunocompetentes (FINDLOW *et al.*, 2007; HOANG *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2015) causados por variantes *cnl* foram descritos na literatura, bem como o potencial virulento dessas cepas (JOHSWICH *et al.*, 2012).

As variantes observadas entre as amostras de nosso estudo foram *cnl-2*, *cnl-3* e *cnl-12*, e estavam associados aos clados B, C e A, respectivamente, observados na análise filogenética do concatenado das sequências do MLST. A variante *cnl-2* foi relatada em casos de DM na Alemanha (VOGEL *et al.*, 2004), China (XU *et al.*, 2015) e África do Sul (GANESH *et al.*, 2017), além de um caso fatal descrito no Canadá (HOANG *et al.*, 2005). Casos de DM causados pelas variantes *cnl-3* e *cnl-12* já foram descritos em Burkina Faso (FINDLOW *et al.*, 2007) e na África do Sul (GANESH *et al.*, 2017), respectivamente.

6.2.2 Perfil genotípico

O perfil genético das amostras foi definido com base nos resultados da genogrupagem, variante de três VR da PorA, variante da FetA, ST e CC. Não foi possível determinar a VR1, VR2 e VR3 das amostras MCRJ 301, MCRJ 318 e MCRJ 267, respectivamente. Moura e colaboradores (2017) e Ferreira *et al.* (2020) descreveram a amostras de portadores isoladas em Salvador nas quais não foi possível determinar a VR2. O gene *fetA* não foi amplificado em duas amostras (MCRJ 196 e MCRJ 341) que foram classificadas como “*fetA* null” (*fnl*, ausência do gene *fetA*). A ausência do gene *fetA* já foi relatada em amostras de portadores de

N. meningitidis (DIALLO *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2017). A identificação do ST não foi concluída para 17 amostras, devido à indefinição de um (n=13) ou dois (n=4) alelos. O alelo do gene *adk* não foi definido em 10 amostras de diferentes genogrupos. De Moraes e colaboradores (2015) relataram a dificuldade de definir o alelo do gene *adk* de uma amostra do genogrupo Z isolada na cidade de Campinas. Moura e colaboradores (2017) realizaram o sequenciamento do genoma de 45 amostras de portadores que não foram satisfatoriamente caracterizadas por MLST.

Seis CC foram detectados em mais de uma amostra do presente estudo, sendo os CC53 e CC198 predominantes entre as amostras *cnl*. O CC198 foi associado ao clado B (*cnl-2*, *rplF* alelo 1 e F5-5), sendo o perfil *cnl-2*:P1.18,25-44,38-1:F5-5:ST-823 (CC198) detectado em duas amostras. Embora já tenha sido relacionado a casos de DM no Canadá (HOANG *et al.*, 2005) e na China (XU *et al.*, 2015), o CC198 tem sido isolado principalmente de portadores. Em um estudo comparativo do genoma dos CC53 e CC198, o maior potencial invasivo do CC198 foi associado à presença de genes de adesinas (SCHORK *et al.*, 2012). No Brasil, o CC já foi relatado colonizando indivíduos de Campinas (DE MORAES *et al.*, 2015) e Salvador (FERREIRA *et al.*, 2020; MOURA *et al.*, 2017). Assim como observado em nosso estudo, o CC198 foi um dos mais frequente entre as amostras de portadores em Salvador, juntamente com o CC1136 (FERREIRA *et al.*, 2020; MOURA *et al.*, 2017). No estudo realizado por De Moraes e colaboradores (2015) o CC1136 também esteve entre os CC mais frequentes. Entretanto, o CC1136 só foi identificado em uma amostra isolada entre os voluntários de nosso estudo.

As amostras do CC53 foram incluídas no clado A (*cnl-12*, CC53, *rplF* alelo 4). Apesar de um caso de doença invasiva causada por *N. meningitidis* *cnl-12* ST-53 (CC53) já ter sido descrito na literatura (GANESH *et al.*, 2017), o CC53 figura entre os CC mais comumente isolados de portadores assintomáticos. No estudo conduzido em Campinas o CC53 foi o mais frequente (DE MORAES *et al.*, 2015), também tendo sido detectado em Salvador (FERREIRA *et al.*, 2020; MOURA *et al.*, 2017), ainda que em menor proporção. O clado C foi majoritariamente formado por amostras *cnl-3*:P1.12-6,13-70,35-1:F5-5:ST-7129 (CC indeterminado), e incluiu uma amostra do ST-15578 - descrito pela primeira vez em nosso estudo - e VR2 13-27. O ST-7129 já foi detectado entre portadores de *N. meningitidis* em outras cidades brasileiras, embora a variante *cnl* não tenha sido determinada (DE MORAES *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2020; MOURA *et al.*, 2017).

Complexos clonais hipervirulentos, comumente associados ao desenvolvimento de DM (READ, 2014), foram identificados em 27,5% das amostras caracterizadas em nosso estudo,

frequência ligeiramente superior àquela observada (23,8%) por Moura e colaboradores (2017). Os complexos clonais mais frequentes foram CC213, CC41/44, CC11 e CC4821. Uma amostra de cada um dos CC32 e CC269 também foi detectada. Em concordância com relatos da literatura, entre as amostras do genogrupo B figuraram os CC213 (clado D), CC4821, CC41/44, CC269 e o CC11. Entretanto, uma amostra do CC41/44 não foi genogrupável e a amostra do CC32 foi classificada como *cnl*. O CC41/44 também foi identificado entre portadores de *N. meningitidis* em outros locais do país (DE MORAES *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2020; MOURA *et al.*, 2017).

Amostras do genogrupo C foram agrupadas no CC11, CC865 e CC103. O CC11 foi prevalente no país na década de 1970 (DE LEMOS *et al.*, 2007), e recentemente tem sido frequentemente associado a casos de DM no exterior (AMBROSIO *et al.*, 2019; KRIZOVA, HONSKUS, 2019; KRONE *et al.*, 2019; MIGLIETTA *et al.*, 2018; RUBILAR *et al.*, 2018; STEFANELLI *et al.*, 2019). Além do sorogrupo C, o CC11 tem sido identificado entre amostras dos sorogrupos W e B, sendo o sorogrupo W CC11 relatado principalmente na América do Sul (LUCIDARME *et al.*, 2015; RUBILAR *et al.*, 2018). Na Toscana “clusters” de DM causados pelo sorogrupo C ST-11 (CC11) envolveram indivíduos bissexuais e HSH, e foram relacionados à transmissão em discotecas e festas “gay” (MIGLIETTA *et al.*, 2018). Casos de uretrite causados por *N. meningitidis* CC11, principalmente entre homens heterossexuais, têm sido descritos na literatura (BAZAN *et al.*, 2017; TZENG *et al.*, 2017). Segundo Tzeng e colaboradores (2017), a linhagem de *N. meningitidis* CC11 isolada de uretrite, denominada como “US Nm urethritis clade” (US_NmUC), se adaptou ao trato urogenital por meio da perda da cápsula e aquisição de um cassete gênico de *N. gonorrhoeae* que propicia o crescimento em anaerobiose. Ao contrário do relatado em Campinas (DE MORAES *et al.*, 2015) e em Salvador (MOURA *et al.*, 2017), não identificamos a presença do sorogrupo W CC11 entre os voluntários do nosso estudo. Entretanto, detectamos uma amostra do CC11 pertencente ao genogrupo B. Stefanelli e colaboradores (2019) relataram um surto de DM causado por uma cepa do sorogrupo B CC11 na Sardenha. Linhagens de *N. meningitidis* do sorogrupo B CC11 são provavelmente derivadas do sorogrupo C CC11 mediante o fenômeno de “capsule switching” (LUCIDARME *et al.*, 2017; STEFANELLI *et al.*, 2019) e parecem não ser alvo das vacinas contra o sorogrupo B disponíveis no mercado (LUCIDARME *et al.*, 2017).

Desde o fim da década de 1990 o CC103 tem sido relatado como a linhagem do sorogrupo C predominante no Brasil (CORDEIRO *et al.*, 2018; DE LEMOS *et al.*, 2007; SÁFADI *et al.*, 2014). Assim como no presente estudo, amostras do sorogrupo C CC103 foram identificadas entre portadores assintomáticos de *N. meningitidis* das cidades de Campinas (DE

MORAES *et al.*, 2015) e Salvador (MOURA *et al.*, 2017). Marin e colaboradores (2017) caracterizaram o genoma de diversas amostras do CC103 e observaram a presença de um repertório gênico acessório possivelmente responsável pela virulência e persistência desse clone.

6.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos

Entre as amostras investigadas neste estudo, observou-se a presença de resistência intermediária à rifampicina (3,9%), resistência (68,6%) ou resistência intermediária (1,9%) ao trimetoprim-sulfametoxazol, resistência intermediária (65,2%) à ampicilina e resistência (7,8%) ou resistência intermediária (68,6%) à penicilina. As amostras foram majoritariamente suscetíveis à rifampicina, antimicrobiano de escolha no país para a quimioprofilaxia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Mais de 70% das amostras caracterizadas no presente estudo não apresentaram suscetibilidade ao trimetoprim-sulfametoxazol. O teste de suscetibilidade para o trimetoprim-sulfametoxazol é recomendado pelo CLSI com o objetivo de detectar resistência a sulfonamidas, classe de drogas que pode ser usada na profilaxia de contatos (CLSI, 2020). A não suscetibilidade ao trimetoprim-sulfametoxazol foi mais frequente entre as amostras de CC hipervirulentos ($p=0,032$).

Ao contrário do relatado tanto em amostras de portadores (COCH GIOIA *et al.*, 2015) quanto em amostras clínicas (GORLA *et al.*, 2011; IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012), mais da metade das amostras do nosso estudo não foi suscetível aos antimicrobianos ampicilina e penicilina. Coch Gioia *et al.* (2015) observaram resistência intermediária à ampicilina e penicilina em 27,2% e 22,2% das amostras isoladas em portadores de um hospital universitário do Rio Grande do Sul, respectivamente. Em um estudo da suscetibilidade aos antimicrobianos de 1096 amostras de pacientes brasileiros com DM isoladas entre 2006 e 2008, a frequência de amostras não suscetíveis à ampicilina, à penicilina e à rifampicina foi de 12,9%, 13% e 0,7%, respectivamente (GORLA *et al.*, 2011). Entre as amostras brasileiras isoladas entre 2006 e 2010 e caracterizadas pelo SIREVA II o percentual de resistência intermediária à penicilina foi de 14,45%, enquanto apenas 0,4% das amostras não foi suscetível à rifampicina (IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012).

Nas quatro amostras que apresentaram resistência intermediária à ampicilina e penicilina e foram submetidas ao sequenciamento total do genoma observou-se a presença das mutações A510V, F504L, H541N, I515V e I566V no gene *penA*. O fenótipo de suscetibilidade reduzida à penicilina tem sido amplamente associado com a presença de cinco substituições de

aminoácidos (A510V, F504L, H541N, I515V e I566V) na PBP2 codificada pelo gene *penA* (HARCOURT *et al.*, 2015; TAHA *et al.*, 2007; VACCA *et al.*, 2018), inclusive entre amostras clínicas isoladas no Brasil (FONSECA *et al.*, 2017). Ambrosio *et al.* (2019) encontraram as mutações A510V, F504L, H541N, I515V e I566V em mais de 80% das amostras isoladas de portadores de *N. meningitidis* da Toscana durante um surto de DM causada pelo sorogrupo C CC11.

6.4 Limitações do estudo

A amostragem de conveniência foi um dos fatores limitantes do nosso estudo, e pode ter influenciado tanto as frequências, grupos e fatores de risco observados. Considerando o tipo de amostragem empregada, nossos resultados podem não ser extrapolados para a população de 18 a 35 anos das cidades incluídas na pesquisa. Adicionalmente, os resultados podem ter sido impactados por procedimentos técnicos como coleta e semeadura do swab de orofaringe.

Apesar do estudo ter sido realizado após a introdução da vacina meningocócica conjugada contra o sorogrupo C no calendário vacinal do PNI/MS, acreditamos que a maior parte da população amostrada não foi vacinada. Apenas 13,6% dos voluntários declararam ter sido previamente vacinados com vacina meningocócica. O presente estudo pode ser futuramente utilizado como “baseline” para monitoramento da frequência dos sorogrupos circulantes entre os portadores e avaliação do impacto da vacinação com as vacinas (meningocócica conjugada contra o sorogrupo C e meningocócica conjugada ACWY) distribuídas pelo Ministério da Saúde.

A elevada prevalência do genogrupo B e de amostras *cnI* apontam para a necessidade de administração de vacinas com alvos não capsulares. Duas vacinas proteicas, desenvolvidas contra o sorogrupo B, já foram licenciadas pela Anvisa e são disponibilizadas em clínicas particulares de vacinação. Entretanto, se faz necessária a caracterização das proteínas vacinais presentes nas cepas circulantes entre os portadores para avaliação da eficácia dessas vacinas em nossa população.

7 CONCLUSÕES

A prevalência de portadores assintomáticos de *N. meningitidis* entre adultos jovens de instituições de ensino da região metropolitana do Rio de Janeiro foi de 13,6%.

As amostras foram classificadas em espécie por MALDI-TOF e sequenciamento parcial do gene *rplF*. Foram detectados os genogrupos B, C, E, Z e Y, sendo o genogrupo B o mais prevalente. As variantes da PorA mais frequentes foram VR1 22, VR2 13-70, VR2 23 e VR3 35-1, e cinco variantes novas foram detectadas (VR1 12-33, VR1 12-34, VR2 14-60, VR2 14-61 e VR2 16-166). Foram observados 20 tipos de FetA, sendo a variante F5-5 a mais frequente.

Mais da metade das amostras não apresentou sensibilidade a penicilina, ampicilina e ao trimetoprim-sulfametoxazol. A resistência intermediária à rifampicina foi detectada em 3,9% das amostras. A resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol foi significativamente maior entre amostras de CC hipervirulentos.

Mais de 80% das amostras não genotipáveis foram identificadas como *cnl* e classificadas nas variantes *cnl-2*, *cnl-3* e *cnl-12*.

Foram identificados seis CC predominantes, sendo dois deles (CC198 e CC53) associados a amostras *cnl*. Sete CC hipervirulentos (CC11, CC32, CC41/44, CC103, CC213, CC269 e CC4821) foram detectados. Cinco ST foram descritos pela primeira vez no presente estudo.

Observou-se uma associação independente entre a colonização por *N. meningitidis* e HSH, frequência a bares/boates/escolas de samba pelo menos uma vez ao mês e sexo masculino, bem como uma correlação inversa entre colonização por *N. meningitidis* e a cor parda/preta/negra.

A presença de um elevado percentual (80%) de amostras do genogrupo B ou não capsuladas circulantes entre portadores assintomáticos de instituições de ensino da região metropolitana do Rio de Janeiro, assim como a detecção de CC hipervirulentos, indica a importância da vigilância epidemiológica de portadores para avaliação da eficácia da vacinação no controle da disseminação de linhagens hipervirulentas de *N. meningitidis*. A identificação das variantes de proteínas vacinais entre as amostras de colonização se faz necessária para nortear futuras alterações no programa de vacinação contra esse agente.

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, n.7, p. 373-380, 2013.
- ALA'ALDEEN, D.A. *et al.* Human antibody responses to the meningococcal factor H binding protein (LP2086) during invasive disease, colonization and carriage. **Vaccine**, v. 28, n. 48, p. 7667-7675, 2010.
- ALA'ALDEEN, D.A. *et al.* Carriage of meningococci by university students, United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1762-1763, 2011.
- ALI, A. *et al.* Global practices of meningococcal vaccine use and impact on invasive disease. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 1, p. 11-20, 2014.
- AMBROSIO, L. *et al.* Genomic analysis of *Neisseria meningitidis* carriage isolates during an outbreak of serogroup C clonal complex 11, Tuscany, Italy. **PLoS ONE**, 14, n. 5, p. e0217500, 2019.
- ANDERSEN, J. *et al.* Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. **Epidemiology and Infection**, v. 121, n. 1, p. 85-94, 1998.
- ANDREWS, S. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acessado em: 13 nov. 2017.
- ANTIGNAC, A. *et al.* Polymorphism of *Neisseria meningitidis penA* gene associated with reduced susceptibility to penicillin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 285-296, 2001.
- ARREAZA, L.; DE LA FUENTE, L.; VÁZQUEZ, J.A. Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p.1705-1707, 2000.
- AZEVEDO, L.C.; TOSCANO, C.M.; BIERRENBACH, A.L. Bacterial meningitis in Brazil: baseline epidemiologic assessment of the decade prior to the introduction of pneumococcal and meningococcal vaccines. **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.
- BARNETT, E.D.; WALKER, P.F. Role of Immigrants and Migrants in Emerging Infectious Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 92, p. 1447-1458, 2008.
- BARROSO, D.E. *et al.* Doença meningocócica: epidemiologia e controle dos casos secundários. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 1, p. 89-97, 1998.
- BARROSO, D.E. *et al.* Microbiological epidemiological history of meningococcal disease in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 242-251, 2010.

- BASTA, N.E. *et al.* Methods for identifying *Neisseria meningitidis* carriers: a multi-center study in the African meningitis belt. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.
- BASTA, N.E. *et al.* Meningococcal carriage within households in the African meningitis belt: A longitudinal pilot study. **Journal of Infection**, v. 76, p. 140-148, 2018.
- BATISTA, R.S. *et al.* Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1019-1029, 2017.
- BAZAN, J. A. *et al.* Large Cluster of *Neisseria meningitidis* Urethritis in Columbus, Ohio, 2015. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 1, p. 92-99, 2017.
- BENNETT, J. S. *et al.* Independent evolution of the core and accessory gene sets in the genus *Neisseria*: insights gained from the genome of *Neisseria lactamica* isolate 020-06. **BMC Genomics**, v. 11, n. 652, 2010.
- BENNETT, J. S. *et al.* Identifying *Neisseria* Species by Use of the 50S Ribosomal Protein L6 (*rplF*) Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1375-1381, 2014.
- BERTRAND, S. *et al.* Evolutionary changes in antimicrobial resistance of invasive *Neisseria meningitidis* isolates in Belgium from 2000 to 2010: increasing prevalence of penicillin nonsusceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2268-2272, 2012.
- BIDMOS, F.A. *et al.* Persistence, replacement, and rapid clonal expansion of meningococcal carriage isolates in a 2008 university student cohort. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 506-512, 2011.
- BLACK, S.B.; PLOTKIN, S.A. Meningococcal disease from the public health policy perspective. **Vaccine**, v. 30, supl. 2, B37-39, 2012.
- BLACKWELL, C.C. *et al.* Factors affecting carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek military recruits. **Epidemiology and Infection**, v. 108, n. 3, p. 441-448, 1992.
- BORROW, R. Advances with vaccination against *Neisseria meningitidis*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 12, p. 1478-1491, 2012.
- BRASIL. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**; Seção 1:23.
- BROOKS, A. *et al.* Detection of the United States *Neisseria meningitidis* urethritis clade in the United Kingdom, August and December 2019 – emergence of multiple antibiotic resistance calls for vigilance. **Euro Surveillance**, v. 25, n. 15: pii=2000375, 2020.
- CARTER, P.E. *et al.* Molecular Characterization of Rifampin-Resistant *Neisseria meningitidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1256-1261, 1994.

- CARTWRIGHT, K.A. *et al.* The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. **Epidemiology and Infection**, v. 99, n. 3, p. 591-601, 1987.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Evaluation of quinolone resistance—determining region mutations and efflux pump expression in *Neisseria meningitidis* resistant to fluoroquinolones. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, p. 263-266, 2012.
- CAUGANT, D.A. *et al.* Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 323-330, 1994.
- CAUGANT, D.A.; TZANAKAKI, G.; KRIZ, P. Lessons from meningococcal carriage studies. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 52-63, 2007.
- CAUGANT, D.A.; MAIDEN, M.C. Meningococcal carriage and disease—population biology and evolution. **Vaccine**, v. 27, suppl. 2, B64-70, 2009.
- CHEN, M. *et al.* Shifts in the antibiotic susceptibility, serogroups, and clonal complexes of *Neisseria meningitidis* in Shanghai, China: a time trend analysis of the pre-quinolone and quinolone eras. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 6, 2015.
- CHRISTENSEN, H. *et al.* Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 853-861, 2010.
- CLAUS, H. *et al.* Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. **Microbiology**, v. 148, n. 6, p. 1813-1819, 2002.
- CLEARY, P.R. *et al.* Variations in *Neisseria meningitidis* carriage by socioeconomic status: a cross-sectional study. **Journal of Public Health**, v. 38, n. 1, p. 61-70, 2016.
- CLEMENCE, M.E.A.; MAIDEN, M.C.J.; HARRISON, O. B. Characterization of capsule genes in non-pathogenic *Neisseria* species. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 9: e000208, 2018.
- CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard**. 11. ed. M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2020.
- COCH GIOIA, C.A. *et al.* Detection of *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers in a university hospital from Brazil. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 47, n. 4, p. 322-327, 2015.
- COIL, D.; JOSPIN, G.; DARLING, A.E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 4, p. 587-589, 2015.
- CUNNINGHAM, S.A.; MAINELLA, J.M.; PATEL, R. Misidentification of *Neisseria polysaccharea* as *Neisseria meningitidis* with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2270-2271, 2014.

- DARLING, A.C.E. *et al.* Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394-1403, 2004.
- DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M.; SOE, M.M. **OpenEpi**: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão www.OpenEpi.com, atualizado em 04 de maio de 2015, acessado em 25 de agosto de 2015.
- DE FILIPPIS, I. *et al.* Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid by one-step polymerase chain reaction of the *nspA* gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 2, p. 85-90, 2005.
- DE LEMOS, A.P.S. *et al.* Clonal Distribution of Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup C Strains Circulating from 1976 to 2005 in Greater São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1266-1273, 2007.
- DE MORAES, J.C. *et al.* Prevalence, risk factors and molecular characteristics of meningococcal carriage among Brazilian adolescents. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 11, p. 1197-1202, 2015.
- DIALLO, K. *et al.* Pharyngeal carriage of *Neisseria* species in the African meningitis belt. **Journal of Infection**, n. 72, p. 667-677, 2016.
- DIALLO, K. *et al.* Development of a PCR algorithm to detect and characterize *Neisseria meningitidis* carriage isolates in the African meningitis belt. **PLoS ONE**, v. 13, n.12, e0206453, 2018.
- DIENE, S.M. *et al.* Comparative genomics of *Neisseria meningitidis* strains: new targets for molecular diagnostics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 568.e1-568.e7, 2016.
- DOLAN THOMAS, J. *et al.* *sodC*-Based Real-Time PCR for Detection of *Neisseria meningitidis*. **Plos One**, v. 6, n. 5, e19361, 2011.
- ELIAS, J.; FROSCHE, M.; VOGEL, U. *Neisseria*. In: JORGENSEN, J.H. *et al.* (Org.). **Manual of Clinical Microbiology**. 11 ed. Washington: ASM Press, p. 635-651, 2015.
- ESPOSITO *et al.* Oropharyngeal and nasal *Staphylococcus aureus* carriage by healthy children. **BMC Infectious Diseases**, v. 14:723, 2014.
- FDA. Establishing a List of qualifying pathogens under the Food and Drug Administration safety and innovation act. **Federal Register**, v. 79, n. 108, p. 32464-32481, 2014.
- FEVEARES, I.M.; PIZZA, M. Meningococcal protein antigens and vaccines. **Vaccine**, v. 27, Supl. 2, p. B42-50, 2009.
- FEIL, E.J. *et al.* The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 1496-1502, 1999.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

- FIEBELKORN, K.R. *et al.* Mutations in *folP* associated with elevated sulfonamide MICs for *Neisseria meningitidis* clinical isolates from five continents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 536-540, 2005.
- FINDLOW, H. *et al.* Three cases of invasive meningococcal disease caused by a capsule null locus strain circulating among healthy carriers in Burkina Faso. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 7, p. 1071-1077, 2007.
- FOLARANMI, T. *et al.* Use of serogroup b meningococcal vaccines in persons aged ≥ 10 years at increased risk for serogroup B meningococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 64, n. 22, p. 608-612, 2015.
- FONSECA, E. L. *et al.* The invasive MenC cc103 lineage with penicillin reduced susceptibility persisting in Brazil. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, p. 287-290, 2017.
- FROSCH, M. *et al.* Conserved Outer Membrane Protein of *Neisseria meningitidis* Involved in Capsule Expression. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 3, p. 798-803, 1992.
- GALIMAND, M. *et al.* High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 868-874, 1998.
- GAMMELGAARD, L.K. *et al.* Meningococcal Disease and Future Drug Targets. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 10, n. 1, p. 140-145, 2011.
- GASPARINI, R. *et al.* Molecular and serological diversity of *Neisseria meningitidis* carrier strains isolated from Italian students aged 14 to 22 years. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1901-1910, 2014.
- GE, M. *et al.* Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 5, p. 662-668 2017.
- GIANCACCCHI, E. *et al.* *Neisseria meningitidis* infection: who, when and where? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 10, p. 1249-1263, 2015.
- GILCA, R. *et al.* A Longitudinal Epidemiology Study of Meningococcal Carriage in Students 13 to 25 Years Old in Quebec. **mSphere**, v. 3, n. 6, e00427-18, 2018.
- GORLA, M.C.O. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated from meningitis cases in Brazil from 2006 to 2008. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 2, p. 85-89, 2011.
- HAFT, D.H. *et al.* RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. **Nucleic Acids Research**, v. 46 (D1), D851-D860, 2018.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARCOURT, B. H. *et al.* Population-Based Surveillance of *Neisseria meningitidis* Antimicrobial Resistance in the United States. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, ofv117, 2015.

HARRISON, L.H. Vaccines for prevention of group B meningococcal disease: Not your father's vaccines. **Vaccine**, v. 33, Suppl 4, p. D32-8, 2015.

HARRISON, L.H. *et al.* The Global Meningococcal Initiative: Recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. **Vaccine**, n. 29, p. 3363-3371, 2011.

HILL, D.J. *et al.* Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. **Clinical Science**, v. 118, n. 9, p. 547-564, 2010.

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

HONG, E.; BAKHALEK, Y.; TAHA, M.K. Identification of *Neisseria meningitidis* by MALDI-TOF MS may not be reliable. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 6, p. 717-722, 2019.

HOU, T. *et al.* Cross Reactivity of *Neisseria meningitidis* crgA Diagnostic PCR Primers with Nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Clinical Laboratory**, v. 60, n. 9, p. 1425-1429, 2014.

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

IBGE. **Rio de Janeiro> Rio de Janeiro> infográficos: evolução populacional e pirâmide etária.** Disponível em:

https://censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/frm_piramide.php?codigo=330455.

Acessado em: agosto de 2015.

JACOBSSON, S. *et al.* Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. **Vaccine**, n. 24, n. 12, p. 2161-2168, 2006.

JEPPESEN, C. A. *et al.* Meningococcal carriage in adolescents in the United Kingdom to inform timing of an adolescent vaccination strategy. **Journal of Infection**, v. 71, p. 43-52, 2015.

JOHSWICH, K.O. *et al.* Invasive Potential of Nonencapsulated Disease Isolates of *Neisseria meningitidis*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 7, p. 2346-2353, 2012.

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

JOLLEY, K.A.; BRAY, J.E.; MAIDEN, M.C. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Research**, 3:124, 2018.

JORGENSEN, J.H. *et al.* Susceptibility of *Neisseria meningitidis* to 16 Antimicrobial Agents and Characterization of Resistance Mechanisms Affecting Some Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3162-3171, 2005.

KHODER, M. *et al.* Evaluation of different testing tools for the identification of nongonococcal *Neisseria* spp. isolated from Lebanese male semen: a strong and significant association with infertility. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 1012-1020, 2019.

KNAPP, J.S. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, n. 4, p. 415-431, 1988.

KRIZOVA, P.; HONSKUS, M. Genomic surveillance of invasive meningococcal disease in the Czech Republic, 2015-2017. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219477, 2019.

KRONE, M. *et al.* Increase of invasive meningococcal serogroup W disease in Europe, 2013 to 2017. **Euro Surveillance**, v. 24, n. 14;pii=1800245, 2019.

KULAH, C. *et al.* Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway 2009. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 30, 2009.

KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LECA, M. *et al.* Meningococcal vaccines: Current state and future outlook. **Pathologie-biologie**, v. 63, n. 3, p. 144-151, 2015.

LEIMKUGEL, J. *et al.* Global review of meningococcal disease. A shifting etiology. **Journal of Bacteriology Research**, v. 1, n.1, p. 06-18, 2009.

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

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

LUCIDARME, J. *et al.* Frequent capsule switching in 'ultra-virulent' meningococci - Are we ready for a serogroup B ST-11 complex outbreak? **Journal of Infection**, v. 75, p. 95-103, 2017.

LUIZ, A. M. **Prevalência do estado de portador sadio de *Neisseria meningitidis* entre estudantes de medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.** 2018. 86f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

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

MAIDEN, M.C.J. *et al.* Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MAIDEN, M.C.J. The impact of protein-conjugate polysaccharide vaccines: an endgame for meningitis? **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 368, n. 1623, 2013.

MASIGNANI, V. *et al.* Vaccination against *Neisseria meningitidis* Using Three Variants of the Lipoprotein GNA1870. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 6, p. 789-799, 2003.

MARIN, M.A. *et al.* The invasive *Neisseria meningitidis* MenC CC103 from Brazil is characterized by an accessory gene repertoire. **Scientific Reports**, v. 7, p.1617, 2017.

MCMILLAN, M. *et al.* Meningococcal carriage in Norwegian teenagers: strain characterisation and assessment of risk factors. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 15, n. 4, p. 987-994, 2019.

MEMISH, Z.A. Meningococcal Disease and Travel. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 84-90, 2002.

MIGLIETTA, A. *et al.* Interconnected clusters of invasive meningococcal disease due to *Neisseria meningitidis* serogroup C ST-11 (cc11), involving bisexuals and men who have sex with men, with discos and gay-venues hotspots of transmission, Tuscany, Italy, 2015 to 2016. **Euro Surveillance**, v. 23, n.34:pii=1700636, 2018.

MIGLIETTA, A. *et al.* Carriage rates and risk factors during an outbreak of invasive meningococcal disease due to *Neisseria meningitidis* serogroup C ST-11 (cc11) in Tuscany, Italy: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 29, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 7 ed. Brasília, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota informativa nº 135-SEI/2017-CGPNI/DEVIT/SVS/MS**: Informa as mudanças no Calendário Nacional de Vacinação para o ano de 2018. Coordenação-geral do Programa Nacional de Imunizações. Brasília, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3 ed. Brasília: MS, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Técnico**: orientações técnico-operacionais para a Vacinação dos Adolescentes com a Vacina Meningocócica ACWY (conjugada). Brasília: MS, 2020a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Técnico**: introdução da Vacina Meningocócica ACWY (conjugada) para os pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) em uso de Eculizumabe. Brasília: MS, 2020b.

MOIR, J.W. Meningitis in adolescents: the role of comensal microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 181-182, 2015.

MOREL, F. *et al.* Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the Identification of *Neisseria*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, p. 2273-2277, 2018.

MORENO, J. *et al.* Characterization of Carriage Isolates of *Neisseria meningitidis* in the Adolescents and Young Adults Population of Bogota (Colombia). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135497, 2015.

MOUNCHETROU NJOYA, I. *et al.* A cluster of meningococcal disease caused by rifampicin-resistant C meningococci in France, April 2012. **Euro Surveillance**, v. 17, n. 34, 2012.

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, n. 9, 2017.

NOBLE, R.C.; COOPER, R. M.; MILLER, B.R. Pharyngeal colonisation by *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* in black and white patients attending a venereal disease clinic. **British Journal of Venereal Diseases**, v. 55, p. 14-19, 1979.

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

O'BRIEN, K.L. *et al.* Evaluation of a Medium (STGG) for Transport and Optimal Recovery of *Streptococcus pneumoniae* from Nasopharyngeal Secretions Collected during Field Studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1021-1024, 2001.

OPPENHEIM, B.A. Antibiotic Resistance in *Neisseria meningitidis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, suppl. 1, p. S98-S101, 1997.

PACE, D.; POLLARD, A.J. Meningococcal disease: Clinical presentation and sequelae. **Vaccine**, v. 30, sup. 2, B3-B9, 2012.

PANTANO, E. *et al.* NHBA is processed by kallikrein from human saliva. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 2019.

PETERING, H. *et al.* Genes Associated with the Meningococcal Capsule Complex Are Also Found in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 11, p. 3342-3345, 1996.

PETERSON, M.E. *et al.* Meningococcal carriage in high-risk settings: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 73, p. 109–117, 2018.

RACLOZ, V.N.; LUIZ, S.J. The elusive meningococcal meningitis serogroup: a systematic review of serogroup B epidemiology. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 175, 2010.

READ, R.C. *Neisseria meningitidis*: clones, carriage, and disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 391-395, 2014.

RILEY, G.; SHIRLEY, B.; CHANDRASEKAR, K. Penicillin Resistance in *Neisseria meningitidis*. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 14, p. 997, 1991.

RIO DE JANEIRO. Secretaria Municipal de Saúde. **Número de casos confirmados de meningite meningocócica por ano, área programática, regiões administrativas e bairros, Município do Rio de Janeiro – 2000 a 2015**. Rio de Janeiro: Secretaria Municipal de Saúde, [S.d.]. Disponível em: www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/4524932/4138135/Meningocasos.pdf. Acesso em: 08 ago. 2015.

RIORDAN, T. *et al.* Acquisition and carriage of meningococci in marine commando recruits. **Epidemiology and Infection**, v. 121, n. 3, p. 495-505, 1998.

ROHANI, M.Y. *et al.* Serogroups and antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolated from army recruits in a training camp. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 29, n. 2, p. 91-94, 2007.

ROSSOTTI, R. *et al.* Risk factors for community-acquired bacterial meningitis: men who have sex with men (MSM) as a population at risk for meningococcal. **Infectious Diseases**, v. 51, n. 9, p. 714-717, 2019.

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

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

RUBILAR, P. S. *et al.* Increase of *Neisseria meningitidis* W:cc11 invasive disease in Chile has no correlation with carriage in adolescents. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193572, 2018.

RUSSELL, J.M. *et al.* Pharyngeal flora in a sexually active population. **International Journal of STD and AIDS**, v. 6, p. 211-215, 1995.

RUSSELL, J.E. *et al.* PorA Variable Regions of *Neisseria meningitidis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 674-678, 2004.

SÁFADI, M.A. *et al.* The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945–2010: an unpredictable and changing landscape. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 3, p. 447-458, 2013.

SÁFADI, M.A. *et al.* Carriage rate and effects of vaccination after outbreaks of serogroup c meningococcal disease, Brazil, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 806-811, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALIT, I. E.; FRASCH, C. E. Seroepidemiologic aspects of *Neisseria meningitidis* in homosexual men. **Canadian Medical Association Journal**, v. 126, n. 1, p. 38-41, 1982.

SBIm. **Informe técnico**: vacina meningocócica b. Disponível em: www.sbim.org.br/notas-e-informes-tecnicos/informe-tecnico-vacina-meningococica-b/. Acessado em agosto de 2015.

SBP. **Calendário Vacinal 2015. Recomendação da Sociedade Brasileira de Pediatria**. Rio de Janeiro: SBP, 2015. Disponível em: www.sbp.com.br/src/uploads/2015/02/calendario-vacinal2015-2.pdf. Acessado em: 08 ago. 2015.

SCHOEN, C. *et al.* Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence Evolution in *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 9, p. 3473-3478, 2008.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. **Informe epidemiológico – Doença Meningocócica – Rio de Janeiro 2010-2018**. Rio de Janeiro: Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=XZXusLVpCS8%3D#:~:text=De%20todos%20os%20.195%20casos,de%20meningite%20meningoc%C3%B3cica%20com%20meningococcemia>. Acesso em: 08 ago. 2020.

SPRATT, B.G. *et al.* Recruitment of a penicillin-binding protein gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 22, p. 8988-8992, 1989.

STEFANELLI, P. *et al.* Imported and Indigenous cases of Invasive Meningococcal Disease W:P1.5,2:F1-1:ST-11 in migrants' reception centers. Italy, June-November 2014. **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 897, p. 81-83, 2015.

STEFANELLI, P. *et al.* Meningococci of Serogroup X Clonal Complex 181 in Refugee Camps, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 870-872, 2017.

STEFANELLI, P. *et al.* An outbreak of severe invasive meningococcal disease due to a capsular switched *Neisseria meningitidis* hypervirulent strain B:cc11. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, p. 111.e1 - 111.e4, 2019.

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

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

SUK, J.E. *et al.* The interconnected and cross-border nature of risks posed by infectious diseases. **Global Health Action**, v. 7: 25287, 2014.

SULLIVAN, K.M.; DEAN, A.; SOE, M.M. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. **Public Health Reports**, v. 124, n. 3, p. 471-474, 2009.

- TAFURI, S. *et al.* Prevalence of Carriers of *Neisseria meningitidis* Among Migrants: Is Migration Changing the Pattern of Circulating Meningococci? **Journal of Travel Medicine**, v. 19, n. 5, p. 311-313, 2012.
- TAHA, M. Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 855-857, 2000.
- TAHA, M. *et al.* Target Gene Sequencing to Characterize the Penicillin G Susceptibility of *Neisseria meningitidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2784-2792, 2007.
- TAHA, M. *et al.* Travel-related *Neisseria meningitidis* Serogroup W135 Infection, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 1030-1032, 2013.
- TATUSOVA, T. *et al.* NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 14, p. 6614-24, 2016.
- THOMPSON, E.A.; FEAVERS, I.M.; MAIDEN, M.C. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. **Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 1849-1858, 2003.
- TOMMASSEN, J.; ARENAS, J. Biological Functions of the Secretome of *Neisseria meningitidis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 256, 2017.
- TZANAKAKI, G. *et al.* Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 31-36, 2003.
- TZENG, Y. *et al.* Emergence of a new *Neisseria meningitidis* clonal complex 11 lineage 11.2 clade as an effective urogenital pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 16, p. 4237-4242, 2017.
- UNALAN-ALTINTOP, T.; KARAGOZ, A.; HAZIROLAN, G. A diagnostic challenge in clinical laboratory: Misidentification of *Neisseria subflava* as *Neisseria meningitidis* by MALDI-TOF MS. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 2020.
- URWIN, R. Nucleotide sequencing of antigen genes of *Neisseria meningitidis*. In: POLLARD, A. P.; MAIDEN, M. C. J.; TOTOWA, N.J. **Meningococcal Disease: methods and protocols**. [S.l.]: Humana Press, 2001. p. 157–172.
- VACCA, I. *et al.* Neisserial Heparin Binding Antigen (NHBA) Contributes to the Adhesion of *Neisseria meningitidis* to Human Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 2016.
- VACCA, P. *et al.* *Neisseria meningitidis* Antimicrobial Resistance in Italy, 2006 to 2016. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, e00207-18, 2018.
- VAN DE BEEK, D. *et al.* Community-acquired bacterial meningitis. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 3, n. 2:16074, 2016.

- VAN DER LEY, P. *et al.* Topology of Outer Membrane Porins in Pathogenic *Neisseria* spp. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 2963-2971, 1991.
- VAZQUEZ, J.A. The resistance of *Neisseria meningitidis* to the antimicrobial agents: an issue still in evolution. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 39-45, 2001.
- VOGEL, U. *et al.* Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cni). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2898-2901, 2004.
- WATLE, S. V. *et al.* Meningococcal carriage in Norwegian teenagers: strain characterisation and assessment of risk factors. **Epidemiology and Infection**, v. 148, e80, 2020.
- WATKINS, E.R.; MAIDEN, M.C.J. Persistence of Hyperinvasive Meningococcal Strain Types during Global Spread as Recorded in the PubMLST Database. **PLoS One**, v.7, n. 9, 2012.
- WILLIAM, D. C.; SCHAPIRO, C. M.; FELMAN, Y. M. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and anogenital gonorrhea: evidence for their relationship. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 7, n. 4, p. 175-177, 1980.
- WINN, W. C. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Brasil, 2008.
- WU, H.M. *et al.* Emergence of ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis* in North America. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 9, p. 886-892, 2009.
- XU, Z. *et al.* First case of *Neisseria meningitidis* capsule null locus infection in China. **Infectious Diseases**, v. 47, n. 8, p. 591-592, 2015.
- YARO, S. *et al.* *Neisseria meningitidis* serogroup X outbreak in Burkina Faso, 2009-2010. **Open Journal of Internal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 41-49, 2012.
- YAZDANKHAH, S.P.; CAUGANT, D.A. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 821-832, 2004.
- YOGEV, R.; TAN, T. Meningococcal disease: The advances and challenges of meningococcal disease prevention. **Human Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 828-837, 2011.
- ZHU, H. *et al.* Development of a Multiplex PCR Assay for Detection and Genogrouping of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 46-51, 2012.
- ZIMBRO, M. J. *et al.* (ed.). **Difco & BBL Manual**: manual of microbiological culture media. 2. ed. Sparks: Becton, Dickinson and Company, 2009, p. 242-246.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Neisseria meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos da cidade do Rio de Janeiro

1. Número de identificação no estudo

2. Data: ____/____/____

3. Entrevistador: _____

4. Digitador: _____

4a. Data da digitação: ____/____/____

5. Local do estudo: _____

COLE A ETIQUETA AQUI

6. Data de nascimento: ____/____/____ ou Idade: _____

7. Sexo: (A) Feminino
 (B) Masculino

8. CEP/local de residência: _____

9. Qual a sua raça ou cor?

- (A) Branca
- (B) Amarela
- (C) Indígena
- (D) Preta ou negra
- (E) Parda
- (F) Outra: _____
- (G) Não sabe
- (H) Nega-se a responder

10. Estado civil:

- (A) Casado
- (B) Separado/Divorciado
- (C) Viúvo
- (D) Solteiro
- (E) Não sabe
- (F) Nega-se a responder

11. Você trabalha?

- (A) Não
- (B) Sim Profissão/atividade: _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

12. Qual é o seu nível de escolaridade?

- (A) Fundamental incompleto
- (B) Médio ou técnico incompleto
- (C) Superior incompleto
- (D) Fundamental completo
- (E) Médio ou técnico completo
- (F) Superior completo
- (G) Não sabe
- (H) Nega-se a responder

13. Qual é o nível de escolaridade dos seus pais?

| | Mãe | Pai |
|-----------------------------|------------|------------|
| Nenhum (analfabeto) | (A) | (A) |
| Fundamental incompleto | (B) | (B) |
| Médio ou técnico incompleto | (C) | (C) |
| Superior incompleto | (D) | (D) |
| Fundamental completo | (E) | (E) |
| Médio ou técnico completo | (F) | (F) |
| Superior completo | (G) | (G) |
| Não sabe | (H) | (H) |
| Nega-se a responder | (I) | (I) |

14. Quantas pessoas vivem em sua residência, incluindo você? _____**15. Quantos cômodos são utilizados para dormir?** _____**16. Você fuma?**

- (A) Não
- (B) Sim **Quantos maços por dia?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

17. Com que idade você começou a fumar? _____**18. Você mora ou convive com fumantes?**

- (A) Não
- (B) Sim **Quem são?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

19. Você toma bebidas alcoólicas de forma habitual?

- (A) Não
- (B) Sim **Com que frequência semanal?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

20. Com que idade você começou a beber? _____

21. Nos últimos 30 dias você usou drogas (maconha, crack, cocaína, ecstasy, LSD, heroína)?

- (A) Não
- (B) Sim **Qual?** _____ **Com que frequência semanal?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

22. Você costuma frequentar clubes/bailes/festas/baladas/escolas de samba?

- (A) Não
- (B) Sim **Com que frequência mensal?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

23. Você costuma frequentar bailes funk?

- (A) Não
- (B) Sim **Com que frequência mensal?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

24. Qual a sua orientação sexual?

- (A) Heterossexual
- (B) Homossexual
- (C) Bissexual
- (D) Não sabe
- (E) Nega-se a responder

25. Você teve contato com algum caso de Doença Meningocócica nos últimos 3 meses?

- (A) Não
- (B) Sim
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

26. Você foi vacinado com vacina meningocócica?

- (A) Não
- (B) Sim **Qual?** _____ **Quando?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

27. Você usou algum antibiótico nos últimos 30 dias?

- (A) Não
- (B) Sim **Qual?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

28. Você fez uso de algum outro medicamento nos últimos 30 dias?

- (A) Não
- (B) Sim **Qual?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

29. Você teve alguma infecção respiratória nos últimos 30 dias?

- (A) Não
- (B) Sim **Qual?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

30. Você teve diarreia nos últimos 30 dias?

- (A) Não
- (B) Sim **Durante quantos dias?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

31. Você viajou para o exterior recentemente?

- (A) Não
- (B) Sim **Para onde?** _____ **Quando?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

32. Quantas vezes por dia você escova os dentes?

- (A) Nenhuma
- (B) 1 vez por dia
- (C) 2 vezes por dia
- (D) 3 vezes por dia
- (E) 4 ou mais vezes por dia
- (F) Não sabe
- (G) Nega-se a responder

33. Você usa enxaguante bucal?

- (A) Não
- (B) Sim **Com que frequência semanal?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

34. Você tem alguma doença crônica?

- (A) Não
- (B) Sim **Qual?** _____
- (C) Não sabe
- (D) Nega-se a responder

35. Você costuma frequentar igrejas/centros/sinagogas/outras instituições religiosas?

- (A) Sim; 1 ou mais vezes por semana
- (B) Sim; menos de 1 vez por semana, mas algumas vezes por mês
- (C) Raramente
- (D) Não
- (E) Não sabe
- (F) Nega-se a responder

36. Somando a sua renda com a renda das pessoas que moram com você, quanto é, aproximadamente, a renda familiar mensal?

- (A) Nenhuma renda

- (B) Até 1 salário mínimo (até R\$ 880,00)
- (C) De 1 a 3 salários mínimos (de R\$ 880,01 até R\$ 2.640,00)
- (D) De 3 a 6 salários mínimos (de R\$ 2.640,01 até R\$ 5.280,00)
- (E) De 6 a 9 salários mínimos (de R\$ 5.280,01 até R\$ 7.920,00)
- (F) De 9 a 12 salários mínimos (de R\$ 7.920,01 até R\$ 10.560,00)
- (G) Mais de 12 salários mínimos (mais de R\$ 10.560,01)
- (H) Não sabe
- (I) Nega-se a responder

APÊNDICE B - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *Neisseria meningitidis* ISOLADAS DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Esta pesquisa tem como objetivo verificar a presença do meningococo na orofaringe (garganta). Serão dimensionados fatores associados à colonização pela bactéria *Neisseria meningitidis*. O estudo será realizado através da análise do material da orofaringe. A amostra será colhida com um *swab* estéril (uma haste flexível com ponta de algodão) fornecido sem custo. Para a coleta, a parte do *swab* com algodão será introduzida na região da sua orofaringe, realizando um movimento giratório em torno do próprio eixo do *swab*. Nessa ocasião será aplicado um questionário para coleta de informações referentes ao participante. Todo material, incluindo o Questionário, será processado de forma anônima, identificado por um código, assegurando total privacidade ao participante da pesquisa. O resultado da cultura e as informações obtidas nas fichas de atendimento serão de competência exclusiva dos pesquisadores envolvidos no projeto e dos profissionais que atuam no processamento das amostras. O procedimento em alguns casos pode causar mínimo desconforto durante a coleta, mas não acarreta risco de lesão física para o participante. Não haverá nenhum tipo de remuneração para participação do estudo. Ao final da obtenção dos resultados iniciais, com identificação da bactéria em estudo e ao menos seu sorogrupo, retornaremos à sua Escola para dar uma aula onde os resultados serão expostos de forma compilada, sem exposição de nenhum identificador individual. A exposição será precedida de uma explicação sobre a Doença Meningocócica, seus principais fatores de risco e medidas preventivas. Após uma exposição de forma didática e com linguagem simples, será reservado tempo para perguntas e discussão dos resultados.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável pelo estudo: **Dr. Ivano de Filippis**, que poderá ser encontrado no **Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/Fiocruz - Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Rio de Janeiro / Tel.: (21) 3865-5236**. Para esclarecimento de questões éticas entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz – Avenida Brasil, 4036 – Manguinhos, Rio de Janeiro – Expansão, 7º andar, sala 705 / Tel.: (21) 3882-9011 – e-mail:

cepfiocruz@ioc.fiocruz.br ou com o CEP da EPSJV/Fiocruz – Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos – EPSJV, sala 316 / Tel.: (21) 3865-9710 – e-mail: cep@epsjv.fiocruz.br. Você tem liberdade de recusar participar do projeto de pesquisa, ou de retirar o consentimento, a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de frequentar a Instituição. As bactérias obtidas para esse estudo serão armazenadas na Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS)/Fiocruz. As bactérias poderão ser utilizadas, no futuro, em outros projetos de pesquisa que ajudarão a compreender melhor a Doença meningocócica. Para isso, será requerida uma nova autorização do CEP e a sua identidade será mantida em sigilo. Os *swabs* serão descartados após o uso.

Eu discuti com o **Dr. Ivano de Filippis ou com os membros de sua equipe** sobre a minha decisão de participar no estudo. Ficaram claros para mim: quais são os propósitos do estudo; os procedimentos a serem realizados; que a coleta do material, embora possa causar ligeiro desconforto, é isenta de riscos; e as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de frequentar esta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma via de igual teor desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o Pesquisador Responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o Pesquisador Responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Data: ____/____/____

Nome do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data: ____/____/____

**APÊNDICE C - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DOS 373
PARTICIPANTES DO ESTUDO.**

| Variável | Número (%) |
|-----------------------------|-------------------|
| Idade | |
| 18-20 anos | 114 (30,56) |
| 21-23 anos | 140 (37,53) |
| 24-26 anos | 69 (18,49) |
| 27-29 anos | 32 (8,57) |
| 30-32 anos | 11 (2,94) |
| 33-35 anos | 7 (1,87) |
| Sexo feminino | 248 (66,48) |
| Cidade de residência | |
| Rio de Janeiro | 249 (66,76) |
| AP 3.1 | 65 (17,42) |
| AP 2.1 | 41 (10,99) |
| AP 2.2 | 28 (7,50) |
| AP 5.2 | 27 (7,23) |
| AP 4.0 | 25 (6,70) |
| AP 3.2 | 23 (6,16) |
| AP 3.3 | 17 (4,55) |
| AP 5.1 | 11 (2,94) |
| AP 1.0 | 8 (2,14) |
| AP 5.3 | 3 (0,80) |
| Niterói | 44 (11,79) |
| Desconhecida | 19 (5,09) |
| Duque de Caxias | 16 (4,28) |
| São João de Meriti | 9 (2,41) |
| São Gonçalo | 8 (2,14) |
| Nova Iguaçu | 6 (1,60) |
| Nilópolis | 5 (1,34) |
| Maricá | 4 (1,07) |
| Belford Roxo | 2 (0,53) |
| Mesquita | 2 (0,53) |
| Petrópolis | 2 (0,53) |
| São Paulo | 2 (0,53) |
| Japeri | 1 (0,26) |

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Magé | 1 (0,26) |
| Mendes | 1 (0,26) |
| Nova Friburgo | 1 (0,26) |
| Paraíba do Sul | 1 (0,26) |
| Raça | |
| Branca | 217 (58,17) |
| Parda | 103 (27,61) |
| Preta ou negra | 40 (10,72) |
| Amarela | 4 (1,07) |
| Não sabe | 4 (1,07) |
| Indígena | 3 (0,80) |
| Negou-se a responder | 2 (0,53) |
| Estado civil | |
| Solteiro | 343 (91,95) |
| Casado | 25 (6,70) |
| Separado/Divorciado | 5 (1,34) |
| Trabalha | 100 (26,80) |
| Escolaridade | |
| Superior incompleto | 277 (74,26) |
| Superior completo | 74 (19,83) |
| Médio ou técnico incompleto | 8 (2,14) |
| Médio ou técnico completo | 6 (1,60) |
| Fundamental incompleto | 3 (0,80) |
| Não informou | 3 (0,80) |
| Fundamental completo | 2 (0,53) |
| Escolaridade materna | |
| Superior completo | 191 (51,20) |
| Médio ou técnico completo | 95 (25,46) |
| Médio ou técnico incompleto | 31 (8,31) |
| Superior incompleto | 21 (5,63) |
| Fundamental incompleto | 19 (5,09) |
| Fundamental completo | 6 (1,60) |
| Não sabe | 4 (1,07) |
| Analfabeto | 3 (0,80) |
| Não informou | 3 (0,80) |
| Escolaridade paterna | |
| Superior completo | 187 (50,13) |

| | |
|--|--------------|
| Médio ou técnico completo | 81 (21,71) |
| Fundamental incompleto | 29 (7,77) |
| Superior incompleto | 24 (6,43) |
| Médio ou técnico incompleto | 22 (5,89) |
| Fundamental completo | 13 (3,48) |
| Não sabe | 10 (2,68) |
| Não informou | 6 (1,60) |
| Analfabeto | 1 (0,26) |
| Pessoas na residência | |
| Quatro | 128 (34,31) |
| Três | 101 (27,07) |
| Duas | 58 (15,54) |
| Cinco | 36 (9,65) |
| Uma | 18 (4,82) |
| Seis | 17 (4,55) |
| Sete | 4 (1,07) |
| Oito | 4 (1,07) |
| Não informou | 4 (1,07) |
| Mais de oito | 3 (0,80) |
| Cômodos usados para dormir | |
| Dois | 156 (41,82) |
| Três | 129 (34,58) |
| Um | 40 (10,72) |
| Quatro | 34 (9,11) |
| Cinco | 7 (1,87) |
| Não informou | 4 (1,07) |
| Mais de cinco | 3 (0,80) |
| Fumante | |
| Idade que começou a fumar* | 18 (4,82) |
| Fumante passivo | |
| | 91 (24,39) |
| Ingestão de bebida alcóolica | |
| 1 – 2 vezes por semana | 161 (43,16) |
| < 1 vez por semana | 122 (32,71) |
| Não informou | 24 (6,43) |
| 3 – 4 vezes por semana | 9 (2,41) |
| Idade que começou a beber* | 8 (2,14) |
| | 17 (15 – 18) |
| Uso de drogas nos últimos 30 dias | |
| | 42 (11,26) |

| | |
|--|-------------|
| Maconha | 29 (7,77) |
| Ecstasy e maconha | 5 (1,34) |
| Ecstasy, LSD e maconha | 2 (0,53) |
| LSD e maconha | 2 (0,53) |
| Cocaína e ecstasy | 1 (0,26) |
| Ecstasy | 1 (0,26) |
| Ecstasy e LSD | 1 (0,26) |
| Haxixe | 1 (0,26) |
| Frequência semanal de uso de drogas | |
| < 1 vez | 15 (4,02) |
| 1 – 2 vezes | 10 (2,68) |
| Não informou | 9 (2,41) |
| ≥ 3 vezes | 8 (2,14) |
| Frequenta bares/boates/escolas de samba | 192 (51,47) |
| 1 – 2 vezes por mês | 119 (31,90) |
| 3 – 4 vezes por mês | 39 (10,45) |
| Não informou | 16 (4,28) |
| ≥ 5 vezes por mês | 10 (2,68) |
| < 1 vez por mês | 8 (2,14) |
| Frequenta bailes funk | 17 (4,55) |
| 1 vez por mês | 7 (1,87) |
| Não informou | 5 (1,34) |
| 2 vezes por mês | 4 (1,07) |
| 4 vezes por mês | 1 (0,26) |
| Orientação sexual | |
| Heterossexual | 296 (79,35) |
| Bissexual | 37 (9,91) |
| Homossexual | 29 (7,77) |
| Não sabe | 6 (1,60) |
| Não informou | 3 (0,80) |
| Negou-se a responder | 2 (0,53) |
| Contato com DM nos últimos 3 meses | 3 (0,80) |
| Imunizado com vacina meningocócica | 51 (13,67) |
| Não informou | 29 (7,77) |
| Meningocócica conjugada C | 12 (3,21) |
| Meningocócica C | 4 (1,07) |
| Não sabe | 4 (1,07) |

| | |
|---|-------------|
| Meningocócica conjugada ACWY | 1 (0,26) |
| Meningocócica B | 1 (0,26) |
| Uso de antibiótico nos últimos 30 dias | 46 (12,33) |
| Amoxicilina com clavulanato | 9 (2,41) |
| Não informou | 9 (2,41) |
| Amoxicilina | 5 (1,34) |
| Azitromicina | 4 (1,07) |
| Levofloxacino | 3 (0,80) |
| Benzilpenicilina benzatina | 2 (0,53) |
| Não sabe | 2 (0,53) |
| Tetraciclina | 2 (0,53) |
| Outros** | 10 (2,68) |
| Uso de outros medicamentos nos últimos 30 dias | 248 (66,48) |
| Infecção respiratória nos últimos 30 dias | 64 (17,15) |
| Diarreia nos últimos 30 dias | 80 (21,44) |
| Duração em dias* | 2 (2 – 3) |
| Viagem para o exterior no último ano | 53 (14,20) |
| Europa | 25 (6,70) |
| América do Norte | 14 (3,75) |
| América do Sul | 9 (2,41) |
| África | 3 (0,80) |
| Ásia | 2 (0,53) |
| África e Europa | 1 (0,26) |
| América do Sul e Oceania | 1 (0,26) |
| Tempo entre viagem e coleta | |
| 1 – 2 meses | 20 (5,36) |
| 3 – 4 meses | 18 (4,82) |
| > 6 meses | 9 (2,41) |
| 5 – 6 meses | 6 (1,60) |
| Frequência de escovação dos dentes | |
| 3 vezes por dia | 219 (58,71) |
| 2 vezes por dia | 101 (27,07) |
| 4 ou mais vezes por dia | 43 (11,52) |
| 1 vez por dia | 5 (1,34) |
| Não informou | 4 (1,07) |
| Não sabe | 1 (0,26) |
| Uso de enxaguante bucal | 130 (34,85) |

| | |
|---|-------------|
| 5 – 7 vezes por semana | 53 (14,20) |
| 3 – 4 vezes por semana | 28 (7,50) |
| Não informou | 26 (6,97) |
| 1 – 2 vezes por semana | 21 (5,63) |
| > 7 vezes por semana | 2 (0,53) |
| Doença crônica | 90 (24,12) |
| Frequenta igrejas/outras instituições religiosas | 218 (58,44) |
| ≥ 1 vez por semana | 100 (26,80) |
| Raramente | 76 (20,37) |
| < 1 vez por semana, mas algumas vezes por mês | 42 (11,26) |
| Renda familiar mensal*** | |
| 3 – 6 salários mínimos (R\$ 2.640,01 - R\$ 5.280,00) | 73 (22,39) |
| > 12 salários mínimos (> R\$ 10.560,01) | 72 (22,08) |
| 1 – 3 salários mínimos (R\$ 880,01 - R\$ 2.640,00) | 53 (16,25) |
| 6 – 9 salários mínimos (R\$ 5.280,01 - R\$ 7.920,00) | 39 (11,96) |
| Não sabe | 37 (11,34) |
| 9 – 12 salários mínimos (R\$ 7.920,01 - R\$ 10.560,00) | 27 (8,28) |
| < 1 salário mínimo (≤ R\$ 880,00) | 14 (4,29) |
| Negou-se a responder | 7 (2,14) |
| Nenhuma renda | 2 (0,61) |
| Não informou | 2 (0,61) |

AP: área programática; DM: Doença Meningocócica; LSD: dietilamida do ácido lisérgico (do alemão “Lysergsäurediethylamid”)

AP 1.0: Benfica, Centro, Cidade Nova, Estácio, Rio Comprido e São Cristóvão; AP 2.1: Botafogo, Catete, Copacabana, Cosme Velho, Flamengo, Humaitá, Ipanema, Jardim Botânico, Lagoa, Laranjeiras, Leblon, Leme e Urca; AP 2.2: Alto da Boa Vista, Andaraí, Grajaú, Maracanã, Praça da Bandeira, Tijuca e Vila Isabel; AP 3.1: Bonsucesso, Braz de Pina, Cidade Universitária (Ilha do Fundão), Ilha do Governador, Jardim América, Mangueiras, Maré, Olaria, Penha, Penha Circular, Ramos e Vigário Geral; AP 3.2: Abolição, Água Santa, Cachambi, Engenho da Rainha, Engenho de Dentro, Engenho Novo, Lins de Vasconcelos, Méier, Pilares, Rocha e Todos os Santos; AP 3.3: Campinho, Colégio, Madureira, Parque Anchieta, Pavuna, Quintino Bocaiúva, Vicente de Carvalho, Vila da Penha e Vista Alegre; AP 4.0: Barra da Tijuca, Jacarepaguá, Recreio dos Bandeirantes e Vila Valqueire; AP 5.1: Bangu e Realengo; AP 5.2: Barra de Guaratiba, Campo Grande, Cosmos, Guaratiba, Inhaóiba e Santíssimo; AP 5.3: Santa Cruz

* Mediana (intervalo interquartil)

** Outros: amoxicilina e ciprofloxacino; antifúngico; azitromicina, metronidazol e ciprofloxacino; sulfametoxazol com trimetoprima; cefalexina; amoxicilina com clavulanato, sulfametoxazol com trimetoprima e oxacilina; metronidazol; fosfomicina trometamol; norfloxacino; tinidazol

*** 326 voluntários foram questionados