



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

MESTRADO ACADÊMICO

**DINÂMICA DO ESTADO DE PORTADOR DE *Neisseria meningitidis*: ESTUDO
LONGITUDINAL COM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS DE 18 A 24 ANOS DE
IDADE, SALVADOR, BRASIL**

LARA EVELLYN DO NASCIMENTO MACEDO

Salvador – Bahia

2022

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**DINÂMICA DO ESTADO DE PORTADOR DE *Neisseria meningitidis*: ESTUDO
LONGITUDINAL COM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS DE 18 A 24 ANOS DE
IDADE, SALVADOR, BRASIL**

LARA EVELLYN DO NASCIMENTO MACEDO

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

Orientadora: Profa. Dra. Leila Carvalho Campos

Salvador – Bahia

2022

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

M141d Macedo, Lara Evellyn do Nascimento

Dinâmica do estado de portador de *neisseria meningitidis*: estudo longitudinal com estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade, Salvador, Brasil / Lara Evellyn do Nascimento Macedo. _ Salvador, 2022.

113 f.; il.; 30 cm

Orientador: Profa. Dra. Leila Carvalho Campos

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Neisseria meningitidis. 2. Portador. 3. Colonização. 4. Epidemiologia. I. Título.

CDU 616.832.9-002

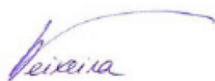
“DINÂMICA DO ESTADO DE PORTADOR DE *Neisseria meningitidis*: ESTUDO LONGITUDINAL COM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS DE 18 A 24 ANOS DE IDADE, SALVADOR, BRASIL”.

LARA EVELLYN DO NASCIMENTO MACEDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 25 de maio de 2022.

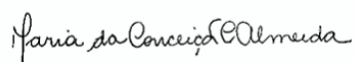
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Lucia Martins Teixeira
Professora Titular
UFRJ



Dra. Paula Carvalho Lage von Buettner Ristow
Professora Associada
UFBA



Dra. Maria da Conceição Chagas de
Almeida Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB.
À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pela oportunidade de aprendizado e crescimento através da realização desse trabalho.

À minha mãe, Edna, por todo o apoio, carinho, incentivo e confiança depositados em mim. Ao meu pai, Wilson, desencarnado durante a pandemia da COVID-19, por toda a inspiração e dedicação em vida.

Aos meus irmãos, Nara e Wilson Júnior, por todo o amor e companheirismo durante a minha trajetória acadêmica.

À minha querida orientadora Dra. Leila Campos, pela paciência, dedicação e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento tanto profissional quanto pessoal.

Aos meus colegas, Juliana Santos, Lucas Oliveira, Édipo Ferreira, Ítalo Ferreira e Amélia Nunes pela colaboração e esforço empregados para que esse trabalho alcançasse os objetivos propostos.

À minha querida amiga Viviane Ferreira, pelo desejo incessante de colaboração e trabalho, pela amizade verdadeira e pelos momentos memoráveis que compartilhamos.

À Dra. Xin Wang e a toda sua equipe do Laboratório de Meningite do CDC, por todo o auxílio inestimável prestado para o desenvolvimento desse projeto.

Aos coordenadores e aos alunos monitores do centro universitário escolhido que foram fundamentais para a realização do nosso estudo.

Aos estudantes, por terem participado voluntariamente, doando o seu tempo e se empenhando para comparecer a todas as coletas.

À querida amiga Caroline Feitosa, que apesar de todas as dificuldades impostas pela pandemia da COVID-19, me auxiliou de forma brilhante com a análise estatística e epidemiológica dos dados, sendo essencial para o desenvolvimento da minha dissertação.

À toda equipe do Núcleo de Pesquisa e Inovação (NUPI) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, especialmente a Amâncio Souza, Jéssica Gomes e Jacqueline Silva, que disponibilizaram o laboratório, equipamentos e os insumos necessários para o desenvolvimento da minha pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), que possibilitou a realização desse trabalho.

À FIOCRUZ, e especialmente, ao Instituto Gonçalo Moniz (IGM), pela oportunidade de compor, como aluna de mestrado, o curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

MACEDO, Lara Evellyn do Nascimento. **Dinâmica do estado de portador de *Neisseria meningitidis***: estudo longitudinal com estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade, Salvador, Brasil. 2022. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Neisseria meningitidis* (Nm) é uma bactéria que comumente coloniza a orofaringe de humanos, de forma assintomática, embora possa tornar-se patogênica, causando principalmente meningite. Os adolescentes e adultos jovens são os principais transmissores da bactéria e são, portanto, considerados alvos importantes de programas de vacinação. Estudos longitudinais com portadores assintomáticos podem fornecer informações fundamentais sobre a epidemiologia e estrutura da população das cepas circulantes de *N. meningitidis*. Entretanto, poucos estudos são realizados para estimar a duração do estado de portador assintomático do meningococo, através do acompanhamento de indivíduos ao longo do tempo. **OBJETIVO:** Estudar a dinâmica do estado de portador de Nm em uma população de estudantes de 18 a 24 anos de idade de uma universidade na cidade de Salvador, Bahia. **MATERIAL E MÉTODOS:** Entre os meses de fevereiro e novembro de 2019 nós conduzimos um estudo longitudinal para a coleta de cinco *swabs* de orofaringe de cada estudante. O isolamento e identificação das cepas de Nm foram realizados por métodos clássicos. O sequenciamento do genoma total (WGS) foi empregado para a caracterização molecular dos isolados. Foi aplicado um questionário para a obtenção das informações sociodemográficas dos estudantes. Além disso, foi calculada a taxa de aquisição de Nm bem como o tempo de colonização pela bactéria. **RESULTADOS:** Cada aluno realizou, em média, três coletas, sendo que 11,2% ($n=47/418$) deles apresentaram-se como portadores de Nm pelo menos uma vez durante o estudo. Sete estudantes foram portadores em cinco coletas. A taxa de aquisição do meningococo foi de 3,2% ($n=12$) e estava associada à frequência a festas pelo menos uma vez durante o estudo (OR: 4,37 95% IC 1,15 - 16,67; $p=0,031$). A maioria dos isolados ($n=102/115$; 88,7%) foi caracterizada como não-grupável, sendo que 72,2% ($n=83/115$) apresentaram deleção do gene da cápsula. O genogrupo B correspondeu a 8,7% ($n=10/115$) das cepas. Um total de 19 STs foram identificadas e distribuídas em oito complexos clonais. Quatro STs eram novos. O complexo clonal mais frequente foi o cc198, presente em 20% ($n=23/115$) dos isolados. As variantes de PorA e FetA mais prevalentes foram P1.18,25-37 ($n=11$; 9,6%) e F5-5 ($n=65$; 56,5%), respectivamente. Todos isolados apresentaram a PorB de classe 3. A subfamília A/v2-3 da FHbp correspondeu a 67,8% ($n=78$) dos isolados, enquanto a subvariante 912 da NHBA foi predominante entre as amostras analisadas ($n=30$; 26,1%). A maioria das cepas sequenciadas ($n=74$; 64,3%) não apresentou o gene *nadA*. Entretanto, a variante NadA-1.1 correspondeu a 4,3% ($n=5$) dos isolados e estava associada ao complexo clonal hiperinvasivo cc32. A média de tempo de colonização foi de 22,5 semanas, sendo que sete indivíduos permaneceram colonizados durante 38,8 semanas. A maioria ($n=23/29$; 79,3%) dos participantes albergou a mesma cepa ou cepas idênticas de Nm durante o estudo. **CONCLUSÕES:** Os resultados do nosso trabalho demonstram uma baixa taxa de aquisição de Nm entre os universitários; o estado de portador se mostrou duradouro, sendo mantido pela mesma cepa na maioria dos casos. Também foi identificada uma alta diversidade genética entre as cepas analisadas, com a predominância de isolados não-grupáveis.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*. Portador. Colonização. Epidemiologia.

MACEDO, Lara Evellyn do Nascimento. **Dynamics of carriage of neisseria meningitidis**: a longitudinal study with university students aged 18 to 24 years, Salvador, Brazil. 2022. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Neisseria meningitidis* (Nm) is a common asymptomatic oropharyngeal colonizer in humans, which in rare cases can invade the bloodstream causing invasive disease such as meningitis. Adolescents and young adults play a pivotal role in transmission, and they are the main targets of vaccination programs. Longitudinal studies with asymptomatic carriers can provide important information on the epidemiology and structure of the circulating meningococcal strains. However, few studies were carried out to estimate the duration of carriage of Nm, following up individuals over time. **AIM:** To study the dynamics of meningococcal carriage among 18 to 24 years old students at a university in the city of Salvador, Bahia. **MATERIALS AND METHODS:** Between February and November 2019 we conducted a longitudinal study to collect five oropharyngeal swabs from each student. The isolation and identification of Nm strains were performed using classical methods. Whole genome sequencing (WGS) was performed for the molecular characterization of the isolates. A questionnaire was applied to obtain sociodemographic information of the students. In addition, the Nm acquisition rate and the duration of meningococcal colonization were calculated. **RESULTS:** On average, each student attended three visits and 11.2% ($n=47/418$) of them were positive for meningococcal carriage in at least one visit. Seven students were carriers in five visits. The meningococcal acquisition rate was 3.2% ($n=12$) and was associated with party attendance at least once during the study (OR: 4.37 95% CI 1.15 - 16.67; $p=0.031$). Most of the isolates ($n=102/115$; 88.7%) were non-groupable and 72.2% ($n=83/115$) of them showed a deletion of the capsule gene. Genogroup B corresponded only to 8.7% ($n=10/115$) of the strains. The isolates were assigned to 19 STs and eight clonal complexes. Four new STs were identified. The most frequent clonal complex was cc198, which was present in 20% ($n=23/115$) of the isolates. The most prevalent PorA and FetA variants were P1.18,25-37 ($n=11$; 9.6%) and F5-5 ($n=65$; 56.5%), respectively. All isolates showed class 3 PorB. The FHbp A/v2-3 subfamily corresponded to 67.8% ($n=78$) of the isolates, whereas the subvariant 912 of NHBA was predominant among the analyzed samples ($n=30$; 26.1%). The majority of the strains ($n=74$; 64.3%) lacked *nadA* gene. However, the NadA-1.1 variant was found in 4.3% ($n=5$) of the isolates and was associated with the cc32 hyperinvasive clonal complex. The average duration of carriage was 22.5 weeks and seven individuals remained carriers for 38.8 weeks. The majority ($n=23/29$; 79.3%) of the participants harbored the same or identical strains of Nm during the study. **CONCLUSIONS:** Our data demonstrate a low acquisition rate of Nm among university students; carriage proved to be long-lasting and it was maintained by the same strain in most cases. A high genetic diversity was also identified among the analyzed strains, with a predominance of non-groupable isolates.

Keywords: *Neisseria meningitides*. Carrier. Colonization. Epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização genética do <i>locus cps</i> de <i>Neisseria meningitidis</i> . Adaptado de HARRISON et al. 2013	21
Figura 2	Fluxograma das etapas de coleta do estudo	50
Figura 3	Proporção de indivíduos que tiveram resultado positivo para <i>Neisseria meningitidis</i> através do sequenciamento do genoma total (WGS) em cada coleta, considerando apenas os estudantes com amostra sequenciada (A) e incluindo os indivíduos cujas amostras não foram submetidas ao WGS (B)	55
Figura 4	Identificação dos genogrupos das cepas de <i>N. meningitidis</i> através do sequenciamento do genoma total (WGS)	60
Figura 5	Distribuição das sequências tipo (ST) de acordo com os complexos clonais identificados	63
Figura 6	Distribuição das variantes da proteína PorA de acordo com os complexos clonais identificados	64
Figura 7	Distribuição das variantes da proteína PorB de acordo com os complexos clonais identificados	65
Figura 8	Distribuição das variantes da proteína FetA de acordo com os complexos clonais identificados	66
Figura 9	Distribuição das variantes da proteína NHBA de acordo com os complexos clonais identificados	67
Figura 10	Distribuição das variantes da proteína FHbp de acordo com os complexos clonais identificados	68
Figura 11	Filogenia dos isolados de <i>Neisseria meningitidis</i>	69
Figura 12	Tempo de colonização (em semanas) por <i>Neisseria meningitidis</i> de acordo com o número de resultados positivos entre os indivíduos que tinham pelo menos duas coletas realizadas (N=35)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características sociodemográficas dos participantes do estudo na linha de base (N=418)	51
Tabela 2	Características (medidas repetidas) sociais e comportamentais dos participantes ao longo do estudo	53
Tabela 3	Fatores de risco para a aquisição do estado de portador de <i>Neisseria meningitidis</i> ao longo do estudo em modelo bruto e multivariado	58
Tabela 4	Tempo de colonização assintomática (em semanas) por <i>Neisseria meningitidis</i> , de acordo com o número de resultados positivos entre os indivíduos que tinham pelo menos duas coletas realizadas (N=35)	71
Tabela 5	Identificação do genogrupo e do tipo da PorA dos isolados de <i>Neisseria meningitidis</i> que expressaram algum tipo de modificação durante o estudo	72
Tabela 6	Similaridade entre cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> provenientes de participantes que pertenciam à mesma turma ou a turmas diferentes	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Períodos de realização das coletas do estudo	45
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4CMenB	Bexsero®
BHI	Caldo infusão cérebro-coração
BIGSdb	Banco de dados de sequências do genoma de isolados bacterianos
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CC	Complexo clonal
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
<i>cnl</i>	Do inglês, <i>capsule null locus</i>
<i>cps</i>	Do inglês, <i>capsule polysaccharide synthesis</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CTA	Cisteína Tríplice Ágar
DM	Doença meningocócica
DNA	Do inglês, <i>desoxiribonucleic acid</i>
FetA	Proteína reguladora de ferro
FHbp	Proteína de ligação ao fator H
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IC	Intervalo de Confiança
IS	Do inglês, <i>insertion sequence</i>
LOS	Lipooligossacarídeo
MCC	Vacina meningocócica C conjugada
MLST	Do inglês, <i>multilocus sequence type</i>
NadA	Neisseria Adesina A
NG	Não-grupável
NHBA	Antígeno de ligação à heparina
Nm	<i>Neisseria meningitidis</i>
NmB	Meningococo sorogrupo B
NmC	Meningococo sorogrupo C
OMV	Vesícula de membrana externa
PorA	Porina A
PorB	Porina B
REDCap	Do inglês, <i>Research electronic data capture</i>
ST	Sequência Tipo

STGG	<i>Skim milk</i> , triptona, glicose e glicerina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VCNT	Vancomicina, colistina, nistatina e trimetropim
VR	Do inglês, <i>variable region</i>
WGS	Do inglês, <i>whole genome sequence</i>
WHO	Do inglês, <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 NEISSERIA MENINGITIDIS.....	18
2.1.1 Principais fatores de virulência de <i>N. meningitidis</i>	19
2.1.1.1. Cápsula polissacarídica	19
2.1.1.2. Lipooligossacarídeo.....	21
2.1.1.3. Proteínas da membrana externa.....	21
2.2. DOENÇA MENINGOCÓCICA.....	24
2.3. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA.....	25
2.3.1. Epidemiologia da doença meningocócica no mundo	25
2.3.2. Epidemiologia da doença meningocócica no Brasil	27
2.4 O ESTADO DE PORTADOR DE <i>N. meningitidis</i>	29
2.5 VACINAS MENINGOCÓCICAS.....	35
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	42
4.2 COLETA DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E DAS AMOSTRAS.....	42
4.2.1 Coleta dos dados epidemiológicos	43
4.2.2 Coleta das amostras de orofaringe	43
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>N. meningitidis</i> ATRAVÉS DE TESTES FENOTÍPICOS.....	44
4.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>N. meningitidis</i> ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL (WGS).....	44
4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	46
4.6. ANÁLISE DOS DADOS.....	47
4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	48
5 RESULTADOS	49
5.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO NA LINHA DE BASE.....	49

5.2 CARACTERÍSTICAS SOCIAIS E COMPORTAMENTAIS DOS PARTICIPANTES AO LONGO DO ESTUDO.....	51
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PORTADORES DE <i>N. meningitidis</i> NA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	54
5.4 FATORES ASSOCIADOS À AQUISIÇÃO DO ESTADO DE PORTADOR DE <i>N. meningitidis</i>	56
5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE <i>N. meningitidis</i> ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL (WGS).....	59
5.5.1 Determinação dos genogrupos	59
5.5.2 Análise da sequência genética da região capsular	60
5.5.3 Determinação das sequências tipo e dos complexos clonais	60
5.5.4 Caracterização das proteínas de membrana externa	61
5.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>Neisseria meningitidis</i>	69
5.7 DURAÇÃO DO ESTADO DE PORTADOR DE <i>N. meningitidis</i> E SIMILARIDADE DAS CEPAS ADQUIRIDAS.....	70
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis (Nm) ou meningococo continua a ser uma das principais causas de doença bacteriana invasiva, afetando 1,2 milhão de pessoas e causando 135.000 mortes por ano em todo o mundo (BORROW et al., 2017). O ser humano é o único hospedeiro do meningococo, que coloniza a nasofaringe e orofaringe aderindo à superfície da mucosa, onde pode persistir assintomaticamente de dias a meses (GIANCHECCHI et al., 2017). Em condições raras, mas potencialmente fatais, Nm pode invadir a corrente sanguínea, disseminar-se para vários órgãos, podendo causar, principalmente, meningite além de outras doenças meningocócicas (DM) (ROSENSTEIN et al., 2001; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). Quase todas as cepas causadoras de doenças são encapsuladas, associadas a seis principais sorogrupos: A, B, C, Y, W e X (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012; HARRISON et al., 2013).

A transmissão do meningococo ocorre de pessoa a pessoa por meio de secreções respiratórias, mais frequentemente de portadores assintomáticos e de pessoas infectadas (ROSENSTEIN et al., 2001). A idade é um dos fatores mais importantes associados ao estado de portador. Na Europa e América do Norte, a prevalência de portadores é baixa nos primeiros anos de vida (menos que 3%), aumentando na adolescência e atingindo o pico no início da vida adulta, entre 20 e 24 anos de idade (CARTWRIGHT et al., 1987; CAUGANT et al., 1988; BLACKWELL et al., 1990; CAUGANT et al., 1994; CHRISTENSEN et al., 2010). Por outro lado, esse padrão não é observado na África, e as crianças em idade escolar de 9-14 anos de idade são o principal reservatório do meningococo (COOPER et al., 2019a). Em Salvador, a prevalência de portadores assintomáticos de *N. meningitidis* varia de 4,9% entre estudantes de 11 a 19 anos (NUNES et al., 2016) a 12,3% entre universitários de 18 a 24 anos de idade (FERREIRA et al., 2020).

Além da idade, outros fatores de risco incluem sexo masculino (CAUGANT et al., 1994), presença de infecções do trato respiratório (viral ou bacteriana) (MUELLER et al., 2008; COOPER et al., 2019b), tabagismo ativo e passivo (STUART et al., 1989; BLACKWELL et al., 1990; BLACKWELL et al., 1992; KREMASTINOOU et al., 1994) e baixo nível socioeconômico (DAVIES et al., 1996). Da mesma forma, o número e a proximidade das interações sociais também aumentam o risco de ser portador (MACLENNAN et al., 2006).

No Brasil, *N. meningitidis* do sorogrupo C (NmC) substituiu o sorogrupo B (NmB) como a principal causa de DM no início dos anos 2000. NmC do complexo clonal ST-103 tem sido responsável pela maioria dos casos diagnosticados e é associado a surtos em todo o país, com incidência de 0,17 caso por 100.000 habitantes em 2017 (DE LEMOS et al., 2007; SÁFADI et al., 2013; PRESA et al., 2019; NUNES et al., 2021).

Em novembro de 2010, o Programa Nacional de Imunização (PNI) introduziu a vacina meningocócica C conjugada (MCC) para crianças menores de dois anos de idade (duas doses aos três e aos cinco meses de idade seguidas por um reforço aos 12-15 meses) (CARDOSO et al., 2012). Em fevereiro de 2010, antes da introdução nacional da vacina MCC, a cidade de Salvador iniciou seu programa de vacinação em resposta a um aumento na incidência de DM do sorogrupo C (CARDOSO et al., 2012). No entanto, o cronograma de vacinação na cidade diferiu daquele iniciado alguns meses depois no país; compreendia duas doses aos 2 e aos 4 meses de idade, seguido por um reforço aos 12-15 meses de idade; dose única para crianças de 1 a 5 anos; e uma campanha de *catch-up* incluindo adolescentes e adultos jovens de 10 a 24 anos (CARDOSO et al., 2012). Em novembro de 2010, Salvador adotou o calendário nacional de vacinação da MCC. Após a implementação desses programas, uma redução significativa na incidência da DM causada por NmC foi observada em Salvador e no resto do país (CARDOSO et al., 2012; ANDRADE et al., 2017; MACEDO et al., 2018; NUNES et al., 2021).

Atualmente duas doses da vacina MCC estão sendo disponibilizadas para as crianças no PNI aos três e aos cinco meses de idade, com um reforço aos 12 meses (BRASIL, 2021), e uma dose da vacina quadrivalente ACWY está sendo oferecida aos adolescentes de 11 e 12 anos de idade desde 2020 (BRASIL, 2022).

Embora a DM seja considerada um evento raro, o estado de portador é relativamente comum, especialmente entre adolescentes e adultos jovens (prevalência de 8-20%), que são considerados os portadores primários e principais transmissores do microrganismo (CHRISTENSEN et al., 2010; VETTER et al., 2016; ACEVEDO et al., 2019). Portanto, a vacinação de pessoas nesses grupos etários pode ajudar a reduzir a colonização e, conseqüentemente, a transmissão do meningococo, resultando em uma proteção indireta das pessoas não vacinadas (VETTER et al., 2016).

O estado de portador assintomático é crucial não apenas para a dinâmica de transmissão como também para o início da doença invasiva. Entretanto, a relação entre o estado de portador e o desenvolvimento da doença invasiva não é completamente conhecida,

nem o prazo necessário para a transição de um estado para outro (CAUGANT; MAIDEN, 2009).

Estudos sobre portadores assintomáticos de Nm podem fornecer informações fundamentais sobre a epidemiologia, patogenicidade da DM, sobre a estrutura da população das cepas circulantes do meningococo, além de serem essenciais antes e após períodos de intervenções vacinais. Esses estudos fornecem, desta forma, subsídios fundamentais para embasar medidas de saúde pública, principalmente no que tange à intervenção de surtos e políticas vacinais (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016; GIANCHECCHI et al., 2017; BALMER et al., 2018). Entretanto, as investigações sobre portadores são normalmente de corte transversal, observando a colonização pelo meningococo em uma dada população em um único período de tempo (CAUGANT; MAIDEN, 2009). Apesar de serem importantes, os estudos de corte transversal não permitem informar quando o indivíduo adquiriu o microrganismo e uma amostra negativa não descarta a possibilidade de baixa sensibilidade do teste adotado para identificação bacteriana bem como da ocorrência de falha na coleta da amostra (CARTWRIGHT, 2001). Por outro lado, existe uma escassez de estudos longitudinais em portadores na literatura e, até o momento, nenhum estudo deste tipo foi realizado no Brasil.

As investigações longitudinais são importantes para a caracterização da duração do estado de portador e a data de aquisição na população. De modo geral, os estudos longitudinais existentes têm mostrado que a associação de uma determinada cepa com o hospedeiro é de certa forma durável, com 85% dos portadores albergando a mesma cepa por um período médio de 5 a 6 meses (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; GLITZA et al., 2008). Períodos maiores de acompanhamento são necessários para se estabelecer a duração do estado de portador como um todo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Neisseria meningitidis (Nm) ou meningococo é uma β -Proteobactéria integrante da família Neisseriaceae. É uma bactéria Gram-negativa, fastidiosa, aeróbia, cocóide (0,6 – 1,0 μm de diâmetro) que comumente ocorre em par, formando diplococos. Possui os lados adjacentes achatados, fornecendo-lhe um aspecto de “grão de café”. Esse microrganismo é imóvel, não forma esporos e cresce de forma ótima a uma temperatura de 35-37°C com 5% de dióxido de carbono (CO_2) (WINN et al., 2008). No meio ágar sangue, as colônias de Nm possuem coloração acinzentada, são brilhantes, redondas, não hemolíticas, convexas, lisas e úmidas, apresentando bordas bem definidas (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Essa bactéria produz ácido a partir da utilização dos carboidratos glicose e maltose através da via oxidativa, o que permite identificá-la fenotipicamente e diferenciá-la de outras espécies de *Neisseria*, sendo caracterizada desta forma como oxidase-positiva (WINN et al., 2008).

O meningococo tem baixa sobrevivência no meio ambiente e pode colonizar as vias respiratórias superiores humanas, como nasofaringe e orofaringe, sem causar doença (portador assintomático) embora possa tornar-se patogênico em caso de supressão do sistema imune e presença de doença subjacente (ROSENSTEIN et al., 2001; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A virulência de Nm está associada a diversos fatores tais como: a presença de cápsula polissacarídica, proteínas da membrana externa (OMP) e endotoxinas como o lipooligossacarídeo (LOS). Outros mecanismos relacionados à virulência dessa bactéria incluem transferências horizontais de material genético, variação de fase e antigênica e mimetismo molecular (TZENG; STEPHENS, 2000; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). Todos esses fatores conferem ao meningococo uma maior capacidade de adaptação e invasão do hospedeiro (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

2.1.1 Principais fatores de virulência de *N. meningitidis*

2.1.1.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do meningococo e pode estar presente ou não (CLAUS et al., 2002). Todavia, a maior parte dos isolados de Nm associados a doença invasiva é encapsulada (ROSENSTEIN et al., 2001; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). A cápsula desempenha um papel fundamental na sobrevivência do microrganismo, protegendo a bactéria contra dessecação, fagocitose, opsonização e a ativação do sistema complemento (STEPHENS, 2007). Ao mesmo tempo, a capacidade de adesão do microrganismo à mucosa do hospedeiro é reduzida na presença da cápsula polissacarídica, em razão do encobrimento das proteínas adesinas presentes nas fímbrias (*pili*), aumentando desta forma a capacidade de transmissão do meningococo (STEPHENS, 2009).

As diferenças estruturais encontradas na cápsula polissacarídica permitem a classificação do meningococo em 12 sorogrupos: A, B, C, E, H, I, K, L, Y, W, X e Z, sendo seis deles (A, B, C, W, Y e X) responsáveis por mais de 90% dos casos de doença invasiva (STEPHENS, 2009; VIRJI, 2009; HARRISON et al., 2013). Esses sorogrupos são caracterizados pela presença de derivados do ácido siálico na sua cápsula polissacarídica, com exceção do sorogrupo A, que consiste em uma repetição de unidades de N-acetilmanosamina-1-fosfato (STEPHENS, 2009).

Os genes responsáveis pela síntese e transporte da cápsula estão agrupados em um único *locus* cromossomal denominado *capsule polysaccharide synthesis (cps)* que possui seis regiões: A, B, C, D, D' e E (FROSCHE; WEISGERBER; MEYER, 1989). Os genes localizados na região A codificam enzimas que participam da biossíntese dos polissacarídeos capsulares; os genes presentes nas regiões B e C são responsáveis pela translocação desses polissacarídeos do ambiente citoplasmático para a superfície celular bacteriana (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Os genes localizados na região D parecem estar envolvidos na síntese de lipooligossacarídeos (LOS); os genes da região E não estão envolvidos nem na síntese e nem no transporte de polissacarídeos, mas parecem participar da regulação desses processos, enquanto a região D' não possui função definida (HARRISON et al., 2013; GANESH et al., 2017).

O meningococo possui uma alta plasticidade genômica com elevada taxa de transformação e subsequente recombinação que podem ocorrer, principalmente, na região A,

cujos genes determinam o sorogrupo da bactéria. Esse fenômeno é denominado troca capsular (*capsular switching*) e consiste em um mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro, aumentando a sua virulência; esse fenômeno já foi identificado em outros microrganismos encapsulados, a exemplo do *Streptococcus pneumoniae* (SWARTLEY et al., 1997; HARRISON et al., 2010).

A expressão da cápsula polissacarídica de Nm é regulada através de três mecanismos: pela variação de fase “on-off / off-on” de genes responsáveis pela biossíntese da cápsula, por alterações estruturais nos polissacarídeos capsulares e pela modificação da quantidade de polissacarídeos capsulares expressos na superfície bacteriana (TZENG; THOMAS; STEPHENS, 2016). Considerando a importância da presença ou ausência da cápsula na interação patógeno-hospedeiro, fica evidente a necessidade de a bactéria desenvolver estratégias diversas para a regulação capsular (TZENG; THOMAS; STEPHENS, 2016). De fato, enquanto os meningococos encapsulados são comumente associados a doença invasiva, os isolados de Nm provenientes de portadores assintomáticos não expressam ou expressam de forma reduzida os polissacarídeos capsulares, sendo caracterizados como não encapsulados ou não grupáveis (NG) (HAMMERSCHMIDT et al., 1996; TZENG; THOMAS; STEPHENS, 2016). A ausência de expressão da cápsula aumenta a capacidade do meningococo de aderir à mucosa da nasofaringe e orofaringe (HAMMERSCHMIDT et al., 1994).

A ausência da cápsula polissacarídica também pode ser atribuída à deleção do gene no *locus cps* que codifica a sua síntese e transporte. Nesse caso, o gene é substituído por uma região não codificante denominada *capsule null locus (cnl)* (Figura 1) (GANESH et al., 2017). Os isolados *cnl* quase sempre são não-patogênicos, conquanto já tenham sido reportados casos de DM atribuídos a essas cepas (VOGEL et al., 2004; HOANG et al., 2005; FINDLOW et al., 2007) que, em sua maioria, pertence aos complexos clonais 192, 198 e 845 (GANESH et al., 2017).

A identificação do sorogrupo da cápsula pode ser feita por soroaglutinação/aglutinação em látex, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, PCR em tempo real e pelo sequenciamento do genoma completo (do inglês, *whole genome sequencing*, WGS) (WHO, 2011).

predominante da membrana externa. Além disso, algumas dessas OMP são utilizadas para a caracterização das cepas de Nm (WINN et al., 2008).

A proteína porina A (PorA) é resultado da expressão do gene *porA* e pertence à classe 1 (cátion-seletiva). Possui duas regiões variáveis (VR1 e VR2) que determinam o subtipo da bactéria, e é especialmente importante porque induz a produção de anticorpos bactericidas em humanos (RUSSELL et al., 2004). Essa proteína é expressa pela maioria dos meningococos. Vale ressaltar que a alta variabilidade dos epítomos expressos nas duas VRs de PorA dificultam o seu uso no desenvolvimento de vacinas (MAIDEN et al., 1991; FEATHERS et al., 1996), embora essa proteína já tenha feito parte da composição das primeiras vacinas monovalentes utilizadas contra o meningococo do sorogrupo B (NmB) que eram baseadas nas vesículas da membrana externa (OMV), e que tiveram êxito no combate às epidemias na Noruega, em Cuba e na Nova Zelândia, onde predominava um único clone bacteriano. Entretanto, esse tipo de vacina se mostrou incapaz de fornecer uma ampla proteção contra o NmB devido à alta diversidade das cepas (FINDLOW et al., 2020).

A porina B (PorB) é uma proteína de classe 2 ou 3 (ânion-seletiva) que determina o sorotipo de Nm. Essa proteína resulta da expressão do gene *porB* e possui quatro regiões de grande variabilidade: alças I, V, VI e VII; ela possui um papel relevante na infecção e invasão do hospedeiro ao penetrar nas membranas das células-alvo e dos fagolisossomos, induzindo apoptose (FEATHERS et al., 1992; WINN et al., 2008).

As proteínas de opacidade Opa e Opc pertencem à classe 5 e possuem papel fundamental na patogênese da doença meningocócica (DM), facilitando a aderência bacteriana às células da mucosa. Além disso, a Opa é capaz de modular a imunidade celular do hospedeiro através da sua interação com as células T e os neutrófilos, enquanto a Opc atua na invasão das células endoteliais (SADARANGANI et al., 2016).

A proteína de ligação ao fator H (FHbp) ou LP2086 é uma lipoproteína presente na membrana externa de 99% dos isolados de Nm e que se liga ao fator H do sistema complemento de humanos e outros primatas (MURPHY et al., 2009; FINDLOW et al., 2020). A FHbp é responsável pelo recrutamento do fator H para a superfície bacteriana, atuando como um regulador negativo do sistema complemento e inibindo a sua ativação, o que consiste em um importante mecanismo de sobrevivência da bactéria no soro humano (LUCIDARME et al., 2011). A FHbp pode ser classificada em duas subfamílias (A e B) ou em três grupos de variantes (V1, V2 e V3), com a subfamília A correspondendo às variantes V2 e V3 e a subfamília B à variante V1 (LUCIDARME et al., 2011). Uma terceira

classificação inclui o identificador numérico Oxford, subfamília Pfizer (A e B) e variante Novartis (RODRIGUES et al., 2018).

O antígeno de ligação à heparina (NHBA) ou GNA2132 é uma lipoproteína que é encontrada apenas em espécies de *Neisseria*. Essa proteína é capaz de se ligar à heparina por meio de uma região rica em arginina, inibindo o sistema complemento bem como promovendo a adesão e evasão de cepas não encapsuladas de Nm (SERRUTO et al., 2010).

A *Neisseria Adesina A* (NadA) desempenha um papel crucial na fixação de Nm às células epiteliais via β 1-integrinas e em sua subsequente invasão durante o processo de infecção. Essa adesina é altamente imunogênica, sendo capaz de induzir a produção de anticorpos bactericidas em humanos (COMANDUCCI et al., 2002). As variantes de NadA podem ser divididas em dois grupos geneticamente distintos: no grupo I encontram-se as variantes NadA-1, NadA-2 e NadA-3, enquanto o grupo II é formado pelas variantes NadA-4, NadA-5 e NadA-6 (THIBAU et al., 2020). O gene *nadA* está presente em aproximadamente 30% das cepas isoladas de Nm e em 75% das linhagens hipervirulentas do NmB (THIBAU et al., 2020).

A proteína reguladora de ferro (FetA) ou FrbB é uma proteína da membrana externa do meningococo que é composta por 13 alças expostas, sendo a alça VII altamente variável. Os peptídeos presentes nas regiões variáveis de FetA permitem a sua classificação em nove famílias designadas F1 a F9 (BENNETT et al., 2009). Embora tenha a capacidade de induzir a produção de anticorpos bactericidas, o uso da FetA como um potencial candidato vacinal é limitado devido à sua alta variabilidade antigênica, bem como a sua deleção em isolados invasivos de Nm, conforme foi reportado em alguns estudos (DWIVEDI et al., 2014).

Com a descoberta das OMPs como possíveis candidatos vacinais, a Sociedade Europeia de Doença Meningocócica (EMGM) estabeleceu mudanças na nomenclatura dos genótipos de Nm. O nome da cepa deve incluir o sorogrupo, seguido das duas variantes de PorA e da variante de FetA, além do ST e do complexo clonal como no exemplo a seguir: B: P1.19,15: F5-1: ST-33 (cc32) (JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007).

As cepas de Nm também podem ser caracterizadas molecularmente através da técnica de Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos *loci* (*Multilocus Sequence Typing*, MLST), onde é realizado o sequenciamento do DNA de sete genes constitutivos do meningococo: *abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*. A combinação dos alelos de cada um dos sete *loci* determina a sequência tipo (ST) que é identificada por um número que corresponde a um tipo eletroforético (MAIDEN et al., 1998). O compartilhamento de até quatro alelos de um grupo de STs com um ST central determina um complexo clonal. Esse complexo clonal será

nomeado a partir do ST central, que é considerado o genótipo ancestral (URWIN; MAIDEN, 2003). Com a aplicação da técnica de MLST a nível global é possível conhecer a estrutura populacional do meningococo, sua diversidade e evolução ao longo do tempo (JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007).

2.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA

N. meningitidis é o agente etiológico da doença meningocócica (DM), uma infecção aguda e severa, embora rara. Os primeiros casos dessa doença foram reportados no século XVI (ROSENSTEIN et al., 2001). Entretanto, somente no ano de 1805, em Genebra na Suíça, essa doença foi identificada e bem descrita pelo médico Gaspard Vieusseux. O isolamento do meningococo ocorreu anos depois, em 1887, pelo patologista austríaco Anton Weichselbaum ao analisar uma amostra de líquido cefalorraquidiano de um paciente com meningite (ROSENSTEIN et al., 2001; PACE; POLLARD, 2012).

A transmissão do meningococo ocorre de pessoa a pessoa através de gotículas respiratórias ou pelo contato com secreções de portadores saudáveis ou doentes (ROSENSTEIN et al., 2001). A aquisição dessa bactéria pode ser transitória, resultando em doença invasiva que pode se manifestar em até 14 dias após a aquisição ou levando à colonização (estado de portador assintomático). Estima-se que a taxa de portador é de 8 a 20% na população geral, mas essa prevalência varia amplamente (STEPHENS, 2007).

Na presença de determinados fatores como a ausência de anticorpos protetores bactericidas e deficiência do sistema complemento, há um risco aumentado do desenvolvimento da DM (ROSENSTEIN et al., 2001; CAUGANT; MAIDEN, 2009). A partir da invasão da corrente sanguínea, a bactéria dissemina-se para vários órgãos, podendo causar, principalmente, meningite e/ou meningococemia, conquanto se observem casos raros de pneumonia, sinusite, otite média, conjuntivite, artrite, uretrite e pericardite associados à infecção meningocócica (ROSENSTEIN et al., 2001; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007; CAUGANT; MAIDEN, 2009).

A população pediátrica abaixo dos cinco anos de idade é a mais acometida pela doença, especialmente os lactentes menores de um ano. Isso ocorre em razão da perda de anticorpos protetores maternos que são adquiridos durante a gestação (ROSENSTEIN et al., 2001; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

A DM é uma patologia grave e potencialmente fatal cuja letalidade varia de 4 a 20%, ainda que na presença de tratamento adequado com antibioticoterapia. Na ausência de

tratamento, 80% dos casos podem evoluir para óbito (WANG et al., 2019). Entre os indivíduos acometidos, cerca de 11 a 19% permanecem com sequelas a longo prazo que incluem amputações, perda de audição e deficiências neurológicas (ROSENSTEIN et al., 2001; PACE; POLLARD, 2012).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA

2.3.1 Epidemiologia da doença meningocócica no mundo

A DM continua a ser um problema de saúde pública em todo o mundo, afetando 1,2 milhão de pessoas e causando 135.000 mortes por ano (BORROW et al., 2017). A incidência de DM e a distribuição dos sorogrupos prevalentes variam tanto geograficamente quanto temporalmente. Entretanto, os sorogrupos A, B, C, W, X e Y são responsáveis pela maioria dos casos de DM, que podem ocorrer de forma endêmica e epidêmica (PARIKH et al., 2020).

O sorogrupo A do complexo clonal ST-5 tem sido responsável pela ocorrência de diversas epidemias no continente africano desde o início do século XX até recentemente, sobretudo na região que se estende do Senegal à Etiópia denominada “cinturão da meningite” (HOLLINGSHEAD; TANG, 2019; WHO, 2020). A maior epidemia registrada foi em 1996, com uma estimativa de 250.000 casos e 25.000 mortes (HOLLINGSHEAD; TANG, 2019; WHO, 2020). A partir de 2010, com a imunização da população com a vacina conjugada contra este sorogrupo, os casos de DM reduziram drasticamente (WHO, 2020). Entre 2016 e 2017, esse sorogrupo praticamente desapareceu do continente africano, sendo responsável por apenas 0,8% dos casos de DM nas regiões onde a vacina foi administrada (HOLLINGSHEAD; TANG, 2019). O sorogrupo A também tem sido reportado como o principal causador de DM na Ásia (BORROW et al., 2016).

Diferentemente do sorogrupo A, o meningococo do sorogrupo B (NmB) está mais associado a surtos e endemias e vários países já experimentaram períodos endêmicos de DM causados por esse sorogrupo, incluindo Noruega (BJUNE et al., 1991), Cuba (SIERRA et al., 1991) e Nova Zelândia (HALPERIN et al., 2012). Os complexos clonais hiperinvasivos cc32, cc41/44 e cc269 estão envolvidos na ocorrência da maioria dos casos de DM causados por NmB reportados no mundo (VILLENA et al., 2018). Nos Estados Unidos, onde historicamente a incidência da DM é baixa, vários surtos de NmB ocorreram em universidades nos últimos anos (WHO, 2020). Na Europa e, especialmente no Reino Unido, este sorogrupo ainda é considerado um problema de saúde pública, especialmente entre as

crianças, não obstante se observe uma redução da incidência da DM após a introdução da vacinação de rotina do público infantil (PARIKH et al., 2020). Na América do Sul e na Austrália, as endemias de NmB também são grande fonte de preocupação para as autoridades sanitárias (HALPERIN et al., 2012). De fato, a incidência desse sorogrupo tende a flutuar naturalmente ao longo do tempo e a razão dessa flutuação permanece desconhecida, embora seja levantada a hipótese de que determinadas medidas adotadas por alguns países, como a proibição de fumar em locais públicos, tenham influência sobre essa flutuação (ACEVEDO et al., 2019).

Historicamente, o meningococo do sorogrupo C (NmC) sempre esteve envolvido na ocorrência de surtos e epidemias ao redor do mundo, atingindo indivíduos de todas as faixas etárias, notadamente os adolescentes e adultos jovens (CAUGANT, 2008). Na América Latina os casos de DM são esporádicos e o NmC é o segundo sorogrupo mais prevalente na região, sendo frequentemente associado aos complexos clonais cc103 e cc11 (PARIKH et al., 2020). De forma geral, os países que implementaram programas de vacinação contra o NmC registraram uma redução significativa da incidência da DM, a exemplo do Reino Unido (FINDLOW et al., 2019), Estados Unidos (COHN; MACNEIL, 2015) e Austrália (LAWRENCE et al., 2016). Todavia, esse sorogrupo continua causando surtos em regiões onde não houve vacinação da população. Desde 2013 alguns países africanos, sobretudo aqueles que se situam no “cinturão da meningite”, têm experimentado um aumento dos surtos de DM do NmC em razão da circulação de um novo clone (ST-10217) (BRYNILDSDRUD et al., 2018). Esse clone também foi identificado em 2017 na Libéria e foi apontado como a principal causa da ocorrência de surtos naquela região (PATEL et al., 2017).

O sorogrupo W foi identificado pela primeira vez no final dos anos 1960 entre militares nos Estados Unidos (EVANS; ARTENSTEIN; HUNTER, 1968) e era uma causa relativamente incomum de DM em todo o mundo até o final do século XX. Porém, no ano 2000, esse sorogrupo foi responsável por uma epidemia global que se iniciou com um surto entre os peregrinos do Hajj, em Meca na Arábia Saudita, que resultou em mais de 400 casos de DM e 52 mortes (TAHA et al., 2000). A cepa do Hajj pertencia ao complexo clonal hipervirulento ST-11. Houve uma grande disseminação desse clone à medida que os peregrinos tinham contato com seus familiares ao retornarem ao seu país de origem (WILDER-SMITH et al., 2003). Desde então, diversas epidemias do sorogrupo W têm ocorrido, sobretudo no “cinturão da meningite” no continente africano, enquanto surtos foram relatados na África do Sul, Europa, Estados Unidos, China e América do Sul, especialmente no Sul do Brasil e na região denominada Cone Sul (Argentina, Chile, Paraguai e Uruguai)

(ABAD et al., 2014; WHO, 2020). Através da análise do WGS, demonstrou-se que a cepa W:2a:P1.5,2 do complexo clonal ST-11 que se disseminou na América do Sul é distinta da cepa do Hajj (LUCIDARME et al., 2015). Alguns estudos demonstram que o sorogrupo W está associado a uma alta letalidade, afetando principalmente indivíduos mais jovens, que podem apresentar um quadro clínico atípico que inclui: artrite, pericardite e sintomas gastrointestinais (CAMPBELL et al., 2016; MUSTAPHA; MARSH; HARRISON, 2016).

O sorogrupo Y tem sido associado a surtos em diversas regiões, sobretudo Estados Unidos e Escandinávia, embora os casos de DM desse sorogrupo permaneçam relativamente raros (WHO, 2020). Nos Estados Unidos, o sorogrupo Y foi associado a vários surtos entre militares na década de 1970 (SMILACK, 1974), e a sua incidência aumentou progressivamente de modo que um terço dos casos no país correspondiam a esse sorogrupo na década de 1990 (ROSENSTEIN et al., 1999). Um aumento da incidência do sorogrupo Y também foi observado na Europa, em particular nos países escandinavos, onde cerca de 50% dos indivíduos acometidos tinham entre 45 e 88 anos de idade (BRÖKER et al., 2015).

Os casos de DM do sorogrupo X são raros, conquanto surtos em determinadas regiões da África sejam reportados desde a década de 1990 (CAMPAGNE et al., 1999; GAGNEUX et al., 2002; DJIBO et al., 2003). Por exemplo, em Níger, o sorogrupo X correspondia a 51% dos casos de DM registrados entre janeiro e junho de 2006, sendo que no sudoeste do país essa proporção era ainda maior, atingindo 90% dos casos (BOISIER et al., 2007). Recentemente, casos de DM do sorogrupo X foram identificados entre refugiados na Itália (STEFANELLI et al., 2017).

2.3.2 Epidemiologia da doença meningocócica no Brasil

A DM é endêmica no Brasil com ocorrência periódica de surtos e a sua epidemiologia mudou ao longo do tempo no país. Casos esporádicos da doença foram registrados no início do século XX entre imigrantes europeus e na década de 1920 ocorreu a primeira epidemia de DM na cidade de São Paulo que durou seis anos. O sorogrupo A foi responsável pela metade dos casos registrados e o NmC por um quarto deles (DE MORAES; BARATA, 2005). A partir de 1945, impulsionada pelas epidemias que ocorriam na Europa após o fim da Segunda Guerra Mundial, a incidência da DM aumentou significativamente em São Paulo, atingindo o seu pico em 1947. Desta vez o sorogrupo A correspondia a 90% dos casos diagnosticados (DE MORAIS et al., 1974). Na década de 1970, a cidade de São Paulo experimentou duas ondas epidêmicas de DM que se sobrepuseram. A primeira iniciou-se em 1971, resultando em

uma elevada incidência com mais de 100 casos por 100 mil habitantes e a predominância do NmC do complexo clonal ST-11 (SACCHI et al., 1992; DE MORAES; BARATA, 2005). A segunda onda epidêmica teve predominância do sorogrupo A associada ao complexo clonal ST-5 e foi registrada em 1974, enquanto ainda se observava uma alta incidência de DM do NmC (DE MORAES et al., 1974; SACCHI et al., 1992; DE MORAES; BARATA, 2005).

No final da década de 1970, a incidência de DM havia retornado ao nível endêmico (1,0-2,5 casos por 100 mil habitantes) e permaneceu desta forma até meados da década de 1980, quando houve um aumento do número de casos, atingindo o pico no final da década e caracterizando o advento de uma nova epidemia (DE MORAES; BARATA, 2005). Os sorogrupos A e C, até então dominantes, foram substituídos pelo NmB associado aos complexos clonais ST-5 e ST-32 (DE MORAES et al., 1992; SACCHI et al., 1992; DE LEMOS et al., 2007; SÁFADI et al., 2015). Até o final da década de 1990, o NmB era dominante, causando a maioria dos surtos e epidemias registrados no país (DE FILIPPIS; VICENTE, 2005).

Desde o início dos anos 2000, o NmC do complexo clonal ST-103 tem sido responsável pela maioria dos casos diagnosticados e é associado a surtos em todo o país, com incidência de 0,17 caso por 100.000 habitantes em 2017 (LEMOS et al., 2007; SÁFADI et al., 2013; PRESA et al., 2019; NUNES et al., 2021). De 2007 a 2009, a incidência de DM do NmC aumentou substancialmente em diferentes regiões do país, particularmente no estado da Bahia e em sua capital Salvador, que experimentou um aumento de 400% no número de casos nesse período em razão da circulação da cepa C:23:P1.14-6: ST-3779 e ST-3780 do complexo clonal cc103 (CARDOSO et al., 2012; CORDEIRO et al., 2018). O NmB permanece presente em todas as regiões do Brasil, correspondendo a 19,9% dos casos de DM registrados no país entre 2005 e 2018 (NUNES et al., 2021).

Desde 2003, a região Sul do Brasil tem registrado casos de DM do sorogrupo W associado ao complexo clonal hipervirulento cc11 (WEIDLICH et al., 2008; GORLA et al., 2019; PRESA et al., 2019), resultando em um aumento significativo da prevalência desse sorogrupo na região (3,2% em 1995-2002 *versus* 17,8% em 2003-2005) (WEIDLICH et al., 2008). No estado de Santa Catarina, por exemplo, o sorogrupo W foi o mais prevalente em 2018 (FEIJO; CUNHA, 2020). O aumento da prevalência do sorogrupo W nessa proporção não é observado em outras regiões do Brasil; esse sorogrupo continua sendo o terceiro mais frequente, correspondendo a 6,8% dos casos de DM registrados no país no período de 2005 a 2018, com maior incidência em crianças menores de um ano de idade (NUNES et al., 2021). Mais recentemente, foi identificada, principalmente na região Sul do Brasil, uma nova

variante da sublinhagem da cepa da América do Sul pertencente ao sorogrupo W ST-11/cc11, nomeada “cepa 2016”, expressando um novo peptídeo (1241) de FHbp. Entretanto, essa nova variante parece ter um baixo potencial de disseminação (DE LEMOS et al., 2022).

2.4 O ESTADO DE PORTADOR DE *N. meningitidis*

O único nicho ecológico de Nm é a mucosa da nasofaringe e orofaringe do ser humano. Ao colonizar de forma assintomática o trato respiratório superior, fenômeno comumente referido como estado de portador, o meningococo estabelece uma relação bem-sucedida com o hospedeiro, que não apresenta nenhuma patologia (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004). Além disso, o estado de portador induz uma resposta imune específica à cepa colonizadora, que pode prevenir a aquisição posterior dessa mesma cepa e proteger contra a DM (GOLDSCHNEIDER; GOTSCHLICH; ARTENSTEIN, 1969; JORDENS et al., 2004). Todavia, o desequilíbrio dessa relação, seja por falhas na resposta imune do hospedeiro ou por fatores de virulência da bactéria, pode resultar no desenvolvimento da DM (CAUGANT; MAIDEN, 2009).

O estado de portador assintomático de Nm foi descrito pela primeira vez na Europa por Kiefer em 1896 e, desde então, diversos estudos sobre o tema têm sido realizados no mundo (KIEFER, 1896 *apud* DE SOUZA; SEGURO, 2008). Em 1906, Kutscher mostrou que os portadores assintomáticos de Nm podem ser encontrados na população geral e não apenas entre contactantes de casos de DM (KUTSCHER, 1906 *apud* RAKE, 1934). Durante a primeira Guerra Mundial (1914-1918), os estudos epidemiológicos conduzidos por Glover (1918) demonstraram que a proximidade das camas em quartéis do Exército Britânico localizados na região de Caterham, no sul de Londres, estava relacionada ao aumento do número de portadores de Nm e, eventualmente, a uma maior ocorrência de surtos de DM entre os recrutas. Esses estudos foram realizados antes do advento dos antibióticos e a quimioprofilaxia dos contactantes de casos de DM consistia na inalação de sulfato de zinco (CARTWRIGHT, 2005).

Estudos posteriores questionaram os resultados encontrados por Glover (1918), sugerindo que a relação entre portador assintomático e a ocorrência de DM não estava bem estabelecida (LAYBOURN, 1931; DUDLEY; BRENNAN, 1934). Entretanto, na década de 1930, Rake (1934) estabeleceu um marco na elucidação da dinâmica do estado de portador ao conduzir um estudo longitudinal com trabalhadores jovens e saudáveis de um escritório na cidade de Nova Iorque, demonstrando que a duração do estado de portador varia entre os

indivíduos, podendo ser intermitente bem como persistir durante meses. Outra descoberta relevante ocorreu, em 1965, com a identificação da bactéria comensal *Neisseria lactamica* na nasofaringe de indivíduos e que é intimamente relacionada a Nm (MITCHELL; RHODEN; KING, 1965; HOLLIS; WIGGINS; WEAVER, 1969). Posteriormente demonstrou-se que a *N. lactamica* é capaz de induzir, especialmente em crianças, uma resposta imune contra o meningococo (GOLD et al., 1978) em razão da presença de estruturas homólogas em ambas as espécies bacterianas (TRONCOSO et al., 2000).

A partir da década de 1970, as investigações sobre os fatores de risco associados ao estado de portador ganharam maior notoriedade. Diversos estudos demonstraram que o estado de portador é idade-dependente. Greenfield, Sheehe e Feldman (1971), ao conduzirem um estudo longitudinal com famílias em Nova Iorque, encontraram uma prevalência maior de portadores entre indivíduos do sexo masculino e maiores de 20 anos de idade, enquanto as crianças pareciam ser menos propensas a albergar o meningococo de forma assintomática.

Na Europa e América do Norte, a prevalência de portadores é baixa nos primeiros anos de vida (menos que 3%), aumentando na adolescência e atingindo o pico no início da vida adulta, entre 20 e 24 anos de idade (CARTWRIGHT et al., 1987; CAUGANT et al., 1988; BLACKWELL et al., 1990; CAUGANT et al., 1994; CHRISTENSEN et al., 2010). Por outro lado, na África, esse padrão não é observado e as crianças são o principal reservatório do meningococo. Dois estudos sobre portadores conduzidos no Mali (BURIAN; FOFANA; SOW, 1974) e no norte da Nigéria (BLAKEBROUGH et al., 1982) relataram, respectivamente, uma prevalência de 11,6% e 14% entre crianças de um a quatro anos de idade. Mais recentemente, foi reportada uma maior prevalência entre crianças em idade escolar (9-14 anos), com pico aos 10 anos de idade nos países do “cinturão da meningite” (COOPER et al., 2019a).

Na América Latina e na Ásia, os dados publicados sobre portadores são limitados. Em Cuba a prevalência entre crianças de 5-12 anos de idade é de 6,9% (MARTÍNEZ et al., 2003) e de 31,9% entre indivíduos de 17-22 anos (GUTIERREZ et al., 2006). Na América do Sul, a taxa de portador é de 6,9% (15-21 anos) na Colômbia (MORENO et al., 2015), 6,5% (10-19 anos) (DÍAZ et al., 2016), 4% (18-24 anos) no Chile (RODRÍGUEZ et al., 2014) e 2,1% (3-21 anos) no Paraguai (CHAMORRO et al., 2019). Um estudo realizado recentemente na Argentina reportou que 9,4% dos indivíduos de 10-17 anos de idade albergavam o meningococo de forma assintomática (GENTILE et al., 2021). Na Ásia, uma baixa prevalência de portadores tem sido relatada em países como o Japão (0,8%) entre indivíduos de 18-23 anos de idade (TAKAHASHI et al., 2016), o Nepal (1,4%) entre crianças de 5-14

anos (THAPA et al., 2017) e a Coréia do Sul (3,4%) entre estudantes do ensino médio (KIM et al., 2017), enquanto na Turquia essa taxa pode atingir 7,5% entre pessoas de 0-18 anos, com um pico aos 13 anos de idade (12,5%) (KIZIL et al., 2021).

Outros fatores de risco associados ao estado de portador são: sexo masculino (CAUGANT et al., 1994; BREAKWELL et al., 2018), presença de infecções do trato respiratório (viral ou bacteriana) (MUELLER et al., 2008; BREAKWELL et al., 2018; COOPER et al., 2019b), tabagismo ativo e passivo (STUART et al., 1989; BLACKWELL et al., 1990; BLACKWELL et al., 1992; KREMASTINOY et al., 1994) e baixo nível socioeconômico (DAVIES et al., 1996). Além disso, o número e a proximidade das interações sociais também aumentam o risco de ser portador (MACLENNAN et al., 2006).

A prevalência de portadores de Nm é geralmente maior entre os contatos domiciliares de pacientes com a DM quando comparada à população geral (OLCÉN et al., 1981; COOKE et al., 1989; CARDEÑOSA et al., 2001). Um estudo realizado na Nova Zelândia demonstrou que a taxa de portador entre os familiares que tiveram contato com um caso de DM foi de 20,5%, e que 50% desses indivíduos albergavam a mesma cepa do paciente com a DM (SIMMONS et al., 2001). Mais recentemente, a prática de sexo oral também foi apontada como um fator de risco para a aquisição do meningococo, considerando que casos de infecção do trato urogenital causados por Nm têm sido reportados nos últimos anos (URRA et al., 2005; MORENO et al., 2015; MIGLIETTA et al., 2018; LADHANI et al., 2020; TINGGAARD et al., 2021).

A prevalência de portadores de Nm varia amplamente nas populações. Na Europa e nos Estados Unidos, a taxa de portador varia de 10 a 35% entre adultos jovens (CAUGANT; MAIDEN, 2009) e na África essa prevalência pode atingir 30% (TROTTER; GREENWOOD, 2007). De fato, estima-se que na população geral, aproximadamente, 10% dos indivíduos serão portadores em algum momento da vida (CARTWRIGHT et al., 1987). Entretanto, essa prevalência pode ser muito maior (70-100%) em comunidades fechadas ou semifechadas, como quartéis militares (CAUGANT et al., 1992; TYSKI et al., 2001) e dormitórios universitários (NEAL et al., 2000; ALA'ALDEEN et al., 2011), onde o potencial de transmissão de pessoa a pessoa é alto (SORIANO-GABARRÓ et al., 2011). Um estudo realizado na Universidade de Nottingham, no Reino Unido, mostrou que a taxa de portador aumentou substancialmente na primeira semana de aula, de 6,9% no dia 1 para 23,1% no dia 4 (NEAL et al., 2000). Os autores atribuíram esse aumento às aglomerações e ao grande número de interações sociais.

A caracterização molecular das cepas de Nm isoladas da nasofaringe e orofaringe de portadores é essencial para a compreensão da dinâmica de transmissão desse microrganismo na população humana bem como da epidemiologia da DM (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007). O ambiente do trato respiratório superior humano alberga diversas bactérias além do meningococo. Esse ambiente pode favorecer trocas horizontais de material genético entre os microrganismos, podendo resultar em uma grande diversidade genética das cepas de meningococo (LIPSITCH; O'HAGAN, 2007). De fato, as cepas isoladas de portadores são mais diversas que aquelas isoladas de indivíduos doentes (TROTTER; MAIDEN, 2009).

Enquanto 90% dos isolados de doença invasiva são encapsulados, cerca de 50% dos isolados provenientes de portadores assintomáticos não expressam ou expressam de forma reduzida os polissacarídeos capsulares, sendo caracterizados como NG (CLAUS et al., 2002). Modificações do sorotipo e do subtipo do meningococo bem como do nível de expressão das proteínas PorA e PorB durante o período de colonização assintomática também já foram reportadas por alguns estudos (CAUGANT, 1998; ALA'ALDEEN et al., 2000). Além disso, a estrutura do LOS das cepas isoladas de portadores parece diferir daquelas associadas à DM, observando-se uma predominância dos imunotipos L1 e L8 (estrutura mais curta) em portadores, enquanto os imunotipos com cadeias longas são mais comumente encontrados em isolados invasivos (POOLMAN; VAN DER LEY; TOMMASSEN, 1995 *apud* YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004). Do mesmo modo, já se demonstrou que a proteína NadA está ausente na maioria dos isolados de portadores, em contraste com o que se observa em isolados de doença invasiva, onde essa proteína pode estar presente em 50% das cepas (COMMANDUCCI et al., 2004). Em relação aos STs e complexos clonais, as linhagens hipervirulentas, como o cc11, raramente são encontradas em cepas de portadores (CAUGANT et al., 1988; CLAUS et al., 2005). Em contraste, outros complexos clonais, como o cc1136 e cc198, são comumente associados ao estado de portador e parecem estar bem adaptados ao ambiente do trato respiratório superior humano, estabelecendo uma relação bem-sucedida com o hospedeiro (YAZDANKHAH et al., 2004; CLAUS et al., 2005; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007).

Alguns estudos sobre portadores de Nm foram realizados no Brasil (MUNFORD et al., 1974; SÁFADI et al., 2014; GIOIA et al., 2015; MORAES et al., 2015; NUNES, et al., 2016; RIZEK et al., 2016; MOURA et al., 2017; WECKX et al., 2017; FERREIRA et al., 2020; LIMA et al., 2020; DE LEMOS et al., 2022). Um estudo realizado em 2012 na cidade de Campinas, em São Paulo, com 1208 estudantes de 11 a 19 anos de idade encontrou uma prevalência de portadores de 9,9% (DE MORAES et al., 2015); NmC (1,32%) e NmB

(0,99%) foram os sorogrupos predominantes, seguidos pelos sorogrupos E (0,74%), Y (0,49%) e W (0,25%). As cepas NG corresponderam a 60,8% das amostras positivas. Utilizando a técnica de MLST, foram identificados 36 STs diferentes distribuídos em 14 complexos clonais, sendo que o ST-103 foi o mais prevalente (DE MORAES et al., 2015). Além disso, um menor nível de escolaridade dos pais dos estudantes foi associado a um maior risco de ser portador (DE MORAES et al., 2015).

Outro estudo conduzido com 968 participantes no município de Embu das Artes, em São Paulo, mostrou uma prevalência semelhante de 9% entre indivíduos de 1 a 24 anos de idade; 60,9% das amostras positivas para Nm eram NG (WECKX et al., 2017). O NmC foi o sorogrupo predominante (18,4%), seguido pelo NmB (12,6%). Também se demonstrou que o risco de ser portador aumenta de acordo com o número de moradores no domicílio na faixa etária de 15 a 19 anos (WECKX et al., 2017).

Em 2014, o nosso grupo de pesquisa realizou um estudo com alunos da rede pública estadual e municipal de educação de Salvador, Bahia. Entre os 1.200 participantes de 11 a 19 anos de idade, 59 obtiveram resultado positivo para colonização por Nm, com prevalência total de portadores de 4,9% (NUNES, et al., 2016). Entre as 59 amostras positivas, foram identificados os sorogrupos B (11,8%), Y (8,5%), E (6,7%), Z (5,1%), C (3,4%) e W (3,4%). As cepas NG corresponderam a 61% das amostras positivas (NUNES, et al., 2016). Realizando a caracterização genética das cepas através do MLST e do WGS, observou-se uma grande diversidade de genótipos, incluindo 34 STs diferentes distribuídos em 14 complexos clonais, sendo que o cc1136 e o cc198 associados às cepas NG foram os mais prevalentes (MOURA et al., 2017). O risco de ser portador foi maior entre os indivíduos que possuíam apenas um quarto compartilhado no domicílio, cuja mãe era tabagista e que frequentavam festas/bares mais de cinco vezes por mês (NUNES, et al., 2016). Outro estudo do nosso grupo conduzido em 2016 em Salvador com 407 participantes mostrou que 12,3% dos universitários de 18 a 24 anos albergavam a bactéria de forma assintomática; 92% das amostras positivas eram NG (FERREIRA et al., 2020). Um total de 25 STs foram identificados e estavam distribuídos em 11 complexos clonais. Os complexos clonais cc198 e cc1136 associados às cepas *cnI* foram os mais frequentes (FERREIRA et al., 2020). Além disso, se demonstrou que o risco de ser portador estava associado ao sexo masculino bem como frequentar festas/bares pelo menos uma vez por mês (FERREIRA et al., 2020).

A maioria dos estudos sobre portadores de Nm encontrados na literatura são de corte transversal, provavelmente devido às dificuldades inerentes à condução de um estudo longitudinal, como o seu alto custo e a possibilidade de perda de seguimento. Embora sejam

importantes, os estudos de corte transversal consistem na observação da colonização pelo meningococo em uma dada população em um único período de tempo e, portanto, não permitem informar quando o indivíduo adquiriu a bactéria e por quanto tempo ele permaneceu colonizado (CARTWRIGHT, 2001). Vale ressaltar também que uma amostra negativa não descarta a possibilidade de baixa sensibilidade do teste adotado para a identificação bacteriana bem como a ocorrência de falha na coleta da amostra (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; CAUGANT; MAIDEN, 2009). Por outro lado, existe uma escassez de estudos longitudinais em portadores de Nm na literatura e, até o momento, nenhum estudo deste tipo foi realizado no Brasil.

As investigações longitudinais são importantes para a caracterização da duração do estado de portador de Nm e da data de aquisição na população. Estudos longitudinais sobre portadores de Nm em quartéis militares são comuns na literatura (ARTENSTEIN et al., 1967; PETHER et al., 1988; ANDERSEN et al., 1998; JONES et al., 1998; RIORDAN et al., 1998; JOUNIO et al., 2012). Um estudo realizado com militares na Dinamarca mostrou que 20% dos recrutas adquiriram o meningococo durante o primeiro mês de serviço militar (ANDERSEN et al., 1998). Outro estudo conduzido na Finlândia em um quartel militar evidenciou, por exemplo, que a taxa de portador era significativamente maior no final do que no início do serviço militar (18% *versus* 2,2%) (JOUNIO et al., 2012). Além dos quartéis militares, os dormitórios universitários são considerados locais de alto risco para a aquisição do meningococo (PETERSON et al., 2018). Desta forma, alguns estudos sobre portadores de Nm com estudantes universitários são encontrados na literatura (ALA'ALDEEN et al., 2000; JORDENS et al., 2004; BIDMOS et al., 2011; DUREY et al., 2012; JEPPESEN et al., 2015; VAN RAVENHORST et al., 2017; GILCA et al., 2018; MCMILLAN et al., 2019; CHOI et al., 2021; KANAYAMA et al., 2021). Jordens e colaboradores (2004), ao conduzirem um estudo longitudinal em uma universidade do Reino Unido com estudantes do primeiro ano da graduação, demonstraram que 25% dos alunos adquiriram o meningococo ao longo do estudo. Outro trabalho, também realizado no Reino Unido, investigou a taxa de portador entre os estudantes da Universidade de Nottingham que viviam em dormitórios entre 2008 e 2009. Na primeira coleta, que foi realizada cinco semanas após o início das aulas, 47% dos indivíduos eram portadores e, ao final do estudo (seis meses depois), essa taxa aumentou para 62% (BIDMOS et al., 2011). Um estudo mais recente com universitários na Coreia do Sul demonstrou que a taxa de portador de Nm entre os novos alunos que viviam em dormitórios aumentou significativamente de 2,7% no primeiro mês para 11,8% três meses após o início das aulas (CHOI et al., 2021).

As investigações longitudinais apontam que o estado de portador de Nm pode ser transitório (durando poucos dias), intermitente ou crônico (persistindo por vários meses) (ANDERSEN et al., 1998; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007). O tempo de colonização assintomática pelo meningococo reportado na literatura varia de 30 dias a nove meses (BLAKEBROUGH et al., 1982; DE WALS et al., 1983; MUELLER et al., 2007; BIDMOS et al., 2011; BASTA et al., 2018; SHARMA et al., 2021). A duração do estado de portador parece estar associada às características da cepa colonizadora, e nem todas as cepas de meningococo têm a capacidade de estabelecer uma relação de longo prazo com o hospedeiro (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007). De modo geral, os estudos longitudinais existentes têm mostrado que a associação de uma determinada cepa com o hospedeiro é de certa forma durável, e que 85% dos portadores permanecem colonizados pela mesma cepa durante o período de acompanhamento (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; GLITZA et al., 2008).

2.5 VACINAS MENINGOCÓCICAS

A vacinação consiste em uma importante ferramenta de prevenção da DM por se tratar de uma patologia grave, com alta letalidade, de rápida evolução e potencial epidêmico (SÁFADI; BEREZIN; OZELKA, 2012). As vacinas contra a DM estão disponíveis há mais de 50 anos e, ao longo do tempo, com o desenvolvimento de novas tecnologias, tornaram-se mais acessíveis e mais competentes, principalmente no que tange uma maior cobertura das cepas de Nm circulantes. Entretanto, não existe, até o momento, uma vacina universal contra o meningococo (PARIKH et al., 2020). As vacinas meningocócicas podem oferecer tanto uma proteção direta contra a doença, ao estimular a produção de anticorpos bactericidas em indivíduos vacinados, quanto prevenir o estado de portador, ao induzir uma resposta imune na mucosa do trato respiratório superior, reduzindo, desta forma, a circulação e transmissão do meningococo (ZHANG; FINN, 2004; TROTTER; MAIDEN, 2009). As vacinas meningocócicas disponíveis atualmente podem ser enquadradas em três grupos: polissacarídicas, polissacarídicas conjugadas e recombinantes. Uma vez que as vacinas polissacarídicas (simples e conjugada) são sorogrupo-específicas, elas não são capazes de fornecer proteção cruzada contra outros sorogrupos do meningococo (PARIKH et al., 2020).

A primeira vacina baseada nos antígenos da cápsula de Nm foi desenvolvida na década 1960, e a vacina polissacarídica contra o NmC foi a primeira a ser licenciada nos Estados Unidos em 1974 (TROTTER; MAIDEN, 2009). As vacinas polissacarídicas podem

ser monovalentes (A ou C), bivalentes (A e C) ou quadrivalentes (A, C, W e Y) (WHO, 2020). A resposta imunológica às vacinas polissacarídicas é do tipo células T independente e, por essa razão, é pouco imunogênica, confere uma proteção de curta duração por não induzir memória imunológica, além de possuir baixa responsividade com doses de reforço quando aplicadas em crianças menores de dois anos de idade, não obstante se observe uma maior eficácia dessas vacinas em crianças mais velhas e adultos (MASLANKA et al., 1998; HARRIS et al., 2003). Essa resposta imunológica idade-dependente às vacinas polissacarídicas já foi demonstrada em diversos estudos que utilizaram vacina monovalente (LEPOW et al., 1977; KAYHTY et al., 1980), bivalente (JOKHDAR et al., 2004) e quadrivalente (AL-MAZROU et al., 2005). Outra limitação das vacinas polissacarídicas consiste na sua incapacidade de prevenir o estado de portador bem como reduzir a colonização, tendo efeito apenas transitório e pouco impacto na circulação e transmissão do meningococo (DELLICOUR; GREENWOOD, 2007). Essas vacinas têm sido utilizadas principalmente na contenção de surtos e epidemias e em países de renda baixa e renda média devido ao seu baixo custo. Em países de renda mais alta, as vacinas polissacarídicas foram substituídas pelas vacinas conjugadas (PARIKH et al., 2020).

As limitações desse tipo de vacina foram superadas com o desenvolvimento das vacinas polissacarídicas conjugadas que utilizam um carreador proteico (a proteína de *Corynebacterium diphtheriae* CRM₁₉₇ ou o toxóide tetânico) para apresentar o polissacarídeo capsular ao sistema imunológico, de forma a induzir uma resposta do tipo células T dependente, além de co-estimular os linfócitos B, melhorando a sua imunogenicidade, fenômeno que é observado inclusive em crianças menores de dois anos de idade (RICHMOND et al., 2001). As vacinas conjugadas também induzem memória imunológica por meio da produção de linfócitos B de memória de longa duração (KELLY; POLLARD; MOXON, 2005). Além disso, as vacinas conjugadas são capazes de prevenir o estado de portador bem como reduzir a colonização e a transmissão, resultando em proteção indireta ou “imunidade de rebanho”; a hiporresponsividade em doses subsequentes, observada com as vacinas polissacarídicas, também não ocorre com o uso das vacinas conjugadas (SÁFADI; BEREZIN; OZELKA, 2012).

Em 1999, o Reino Unido tornou-se o primeiro país a introduzir a vacina meningocócica conjugada contra o sorogrupo C (MCC) no calendário nacional de vacinação infantil cujo esquema consistia em três doses para lactentes aos dois, três e quatro meses de idade; em paralelo a isso foi feita uma campanha de *catch-up* com uma dose da vacina para imunizar indivíduos com até 18 anos de idade (MILLER; SALISBURY; RAMSAY, 2001).

Essa estratégia resultou em uma redução expressiva tanto da incidência da DM, inclusive em grupos não vacinados, o que evidencia a capacidade da vacina de induzir a “imunidade de rebanho”, quanto da prevalência de portadores (BALMER; BORROW; MILLER, 2002; MAIDEN et al., 2008).

O Brasil foi o primeiro país da América Latina a introduzir a vacina MCC no programa nacional de imunização em 2010, após a incidência da DM no país atingir 7,0 casos por 100.000 habitantes entre crianças menores de dois anos de idade nesse ano. O esquema consistia em duas doses da vacina aos três e cinco meses de idade com um reforço aos 12-15 meses (SÁFADI; BEREZIN; OZELKA, 2012; ANDRADE et al., 2017). O estado da Bahia foi o primeiro a adotar a imunização de rotina de crianças menores de dois anos de idade, ainda em fevereiro de 2010, após experimentar um surto em 2009, registrando 194 casos de DM (1,5 casos por 100.000 habitantes) e 50 óbitos (39% de letalidade). Além disso, as crianças menores de cinco anos também eram elegíveis a receber pelos menos uma dose da vacina MCC (CARDOSO et al., 2012). Na capital Salvador, além das crianças, os indivíduos de 10 a 24 anos de idade receberam uma dose da vacina, em razão do aumento do número de casos de DM nessa faixa etária (CARDOSO et al., 2012).

As campanhas revelaram-se altamente eficazes no controle do surto e na redução da incidência da doença entre crianças menores de dois anos em todo o país (ANDRADE et al., 2017). Na Bahia, comparando o período pós-vacinal (2011 a 2015) ao período pré-vacinal (2007 a 2009), houve uma redução de 33% da incidência de DM do NmC, com a faixa etária de 0-4 anos (público-alvo da vacinação) registrando a redução mais expressiva (70%) (MACEDO et al., 2018). Em Salvador, onde houve a vacinação de adolescentes e adultos jovens, essa redução foi ainda maior na população geral (69%), sendo significativa em todas as faixas etárias, incluindo indivíduos com idade superior a 40 anos, que não eram elegíveis para receber a vacina durante as campanhas (MACEDO et al., 2018). Esses resultados destacam a importância das campanhas de *catch-up*, incluindo adolescentes e adultos jovens (grupos mais susceptíveis à aquisição do estado de portador) na vacinação, para reduzir a colonização e, conseqüentemente, a transmissão de Nm, resultando na proteção indireta dos indivíduos não vacinados (VETTER et al., 2016; MACEDO et al., 2018).

Atualmente duas doses da vacina MCC estão sendo disponibilizadas para as crianças no PNI aos três e aos cinco meses de idade, com um reforço aos 12 meses (BRASIL, 2021). A partir de 2017, a imunização de adolescentes com uma dose da vacina foi incluída no calendário nacional, com as seguintes coortes sendo contempladas: 12 a 13 anos (2017), 11 e 12 anos (2018), 10 e 11 anos (2019) e 9 e 10 anos de idade (2020) (ANDRADE et al., 2017).

Estão disponíveis atualmente quatro tipos de vacinas conjugadas quadrivalentes (A, C, W e Y) licenciadas em vários países (WHO, 2020). Todas essas vacinas se mostraram, até o momento, seguras, eficazes, altamente imunogênicas contra os quatro sorogrupos de Nm e capazes de induzir memória imunológica. Além disso, as vacinas conjugadas quadrivalentes, do mesmo modo que as monovalentes, parecem prevenir o estado de portador e reduzir a colonização, contribuindo para a “imunidade de rebanho” (READ et al., 2014; KORZENIEWSKI et al., 2015). No Brasil, uma dose da vacina quadrivalente ACWY está sendo disponibilizada no PNI para os adolescentes de 11 e 12 anos de idade desde 2020 (BRASIL, 2022). Todavia, apenas os países de renda mais alta conseguem ter acesso a essas vacinas em razão do seu alto custo (GARCIA et al., 2021).

Vale ressaltar que o alto custo das vacinas meningocócicas sempre constituiu um empecilho para a implementação da vacinação de rotina nos países de renda baixa, especialmente nos países africanos do “cinturão da meningite”. A MenAfriVac® é uma vacina meningocócica conjugada contra o sorogrupo A de baixo custo, que foi desenvolvida em 2001 pelo Projeto Vacina contra Meningite para o uso nessa região da África, após as epidemias que ocorreram em 1996 e 1997 (DRETHER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). Esse projeto foi uma colaboração entre a Organização Mundial da Saúde e parceiros, cujo objetivo era vacinar indivíduos de 1 a 29 anos de idade. A vacina foi altamente eficaz e resultou em uma diminuição de 57% da incidência de DM (TROTTER et al., 2017) bem como em uma redução da prevalência de portadores (DAUGLA et al., 2014).

Em razão da ocorrência de diversos surtos de DM do sorogrupo X nos países do “cinturão da meningite” no continente africano (CAMPAGNE et al., 1999; GAGNEUX et al., 2002; DJIBO et al., 2003; BOISIER et al., 2007), uma vacina conjugada pentavalente de baixo custo contra os sorogrupos A, C, W, Y e X foi desenvolvida e já se encontra na fase três de ensaios clínicos na África e na Índia (BOLGIANO et al., 2021). Na sua formulação, os polissacarídeos dos sorogrupos A e X são conjugados, individualmente, com o toxóide tetânico, e os polissacarídeos C, W e Y com a proteína CRM₁₉₇ (PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020; BOLGIANO et al., 2021). O estudo de fase um em adultos de 18 a 45 anos de idade nos Estados Unidos demonstrou que essa vacina é segura, bem tolerada e altamente imunogênica contra os cinco sorogrupos (CHEN et al., 2018). Este foi o primeiro ensaio clínico de uma vacina contendo o polissacarídeo do sorogrupo X (CHILUKURI et al., 2014). O estudo de fase dois em crianças de 12 a 16 meses em Mali também demonstrou a sua segurança e imunogenicidade nessa faixa etária (TAPIA et al., 2021).

Outra vacina pentavalente conjugada contra os sorogrupos A, B, C, W e Y (quadrivalente ACWY-CRM associada a 4CMenB) foi desenvolvida e demonstrou ser segura, imunogênica e bem tolerada em adolescentes e adultos (SÁEZ-LLORENS et al., 2015; SÁEZ-LLORENS et al., 2018; SZENBORN et al., 2018; WELSCH et al., 2018). O uso dessa vacina pode ter um impacto expressivo na incidência de DM dos cinco principais sorogrupos de Nm, além de simplificar o esquema de imunização, aumentando a sua adesão e, conseqüentemente, a cobertura vacinal (HUANG et al., 2021; VESIKARI et al., 2021).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o NmB tem sido um desafio, a despeito dos avanços da tecnologia na produção de vacinas. O polissacarídeo desse sorogrupo é pouco imunogênico, além de ser expresso em vários tecidos humanos, o que poderia desencadear reações autoimunes (FINNE et al., 1987). Nesse contexto, os antígenos subcapsulares de Nm se apresentam como uma alternativa para a produção das vacinas recombinantes contra o NmB (WHO, 2020). Na década de 1980, as vacinas baseadas nas vesículas da membrana externa (OMV) foram utilizadas para proteger contra cepas específicas que causavam doença hiperendêmica em Cuba, Noruega e Nova Zelândia (HOLST et al., 2013). Apesar de ser relativamente eficaz, esse tipo de vacina não fornece proteção cruzada devido à sua composição, que inclui variantes específicas de PorA e, portanto, induz a produção de anticorpos bactericidas específicos (WHO, 2020).

O advento das ciências genômica e proteômica forneceu abordagens adicionais para a identificação de novos antígenos de Nm candidatos a vacina, por meio de um processo denominado vacinologia reversa (MASIGNANI; PIZZA; MOXON, 2019). Utilizando essa tecnologia, três antígenos da membrana externa do NmB foram apontados como candidatos vacinais: o NHBA, FHbp e NadA, em razão da sua ampla distribuição na população de meningococos e a sua capacidade de induzir reação cruzada contra cepas geneticamente diversas. Esses antígenos serviram de base para a produção das vacinas 4CMenB (Bexsero®) e a rLP2086 bivalente (Trumenba®) (MASIGNANI; PIZZA; MOXON, 2019; PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020).

A vacina 4CMenB é composta pelos três antígenos da membrana externa de Nm, NHBA, FHbp e NadA, associados a OMV de uma cepa epidêmica da Nova Zelândia. Desta forma foi possível aumentar a produção de anticorpos bactericidas induzida por essa vacina (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). A vacina rLP2086 bivalente é composta por duas variantes de FHbp, que podem ser categorizadas imunologicamente em duas subfamílias (A e B). Essa proteína tem demonstrado ser capaz de induzir, de forma robusta, a produção de anticorpos bactericidas contra diversas cepas do NmB (FLETCHER et al., 2004). Ambas as

vacinas já foram licenciadas em 12 países, incluindo Reino Unido e Estados Unidos (WHO, 2020). No Brasil, a vacina 4CMenB foi licenciada em 2015 e foi disponibilizada apenas na rede particular, sendo indicada a partir dos dois meses de idade até 50 anos (SÁFADI et al., 2017).

Os estudos sobre portadores assintomáticos de Nm podem fornecer informações fundamentais sobre a epidemiologia, patogenicidade da DM e sobre a estrutura populacional das cepas circulantes de meningococo ao longo do tempo, particularmente antes e após períodos de intervenções vacinais (CARTWRIGHT, 2001; YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; CAUGANT; MAIDEN, 2009). Portanto, para que programas eficazes de vacinação sejam projetados, faz-se necessária a compreensão da dinâmica do estado de portador assintomático de Nm, através da identificação da taxa de portador na população, dos fatores de risco e do tempo de colonização pela bactéria bem como da caracterização das cepas circulantes de meningococo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a dinâmica do estado de portador assintomático de *Neisseria meningitidis* em uma população de estudantes de 18 a 24 anos de idade de um centro universitário na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os fatores associados à aquisição do estado de portador de *N. meningitidis*;
- Identificar e caracterizar as cepas de *N. meningitidis* em genogrupáveis e não-genogrupáveis;
- Determinar a sequência tipo e o complexo clonal das cepas de *N. meningitidis*;
- Caracterizar as proteínas de membrana externa (PorA, PorB e FetA) e os antígenos vacinais (FHbp, NadA e NHBA) contra o sorogrupo B de *N. meningitidis*;
- Estimar o tempo de colonização assintomática por *N. meningitidis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Um estudo com uma coorte dinâmica foi conduzido em uma universidade particular de Salvador, Bahia, de 12 de fevereiro a 28 de novembro de 2019, com a participação de estudantes de 18 a 24 anos de idade.

Critérios de inclusão:

- estar matriculado na universidade;
- pertencer à faixa etária de 18 a 24 anos de idade.

Critérios de exclusão:

- não pertencer à faixa etária de 18 a 24 anos de idade.

Critérios de não inclusão:

- presença de sintomas de qualquer doença infecciosa no momento da coleta;
- uso de antibiótico até 15 dias antes da coleta;
- estar cursando o último semestre da graduação.

Os alunos foram recrutados durante o período da matrícula, ou entre a primeira e segunda semana de aula, quando o grupo responsável fez uma explanação sobre a importância da participação no projeto e obteve o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) devidamente assinado. Os estudantes que desistiram de participar do estudo foram substituídos por novos voluntários, selecionados aleatoriamente, de forma a obter um número similar de participantes em cada coleta.

4.2 COLETA DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E DAS AMOSTRAS

As coletas ocorreram nos meses de fevereiro, março, maio, agosto e novembro de 2019, com o objetivo de coletar cinco *swabs* de cada aluno. A primeira e a segunda coletas foram realizadas antes e após o carnaval, respectivamente, como mostra o quadro abaixo.

Quadro 1 - Períodos de realização das coletas do estudo.

Coleta (dia)	Período	Mês
1ª coleta (Zero)	1º dia/semana de aula	fevereiro
2ª coleta (30)	1 mês após a 1ª coleta	março
3ª coleta (90)	3 meses após a 1ª coleta	maio
4ª coleta (180)	6 meses após a 1ª coleta	agosto
5ª coleta (270)	9 meses após a 1ª coleta	novembro

Fonte: Elaborado pela autora

4.2.1 Coleta dos dados epidemiológicos

Após o universitário concordar com a pesquisa e assinar o TCLE (Apêndice A), foi aplicado um questionário na primeira coleta para a obtenção dos dados demográficos (sexo, idade, cor da pele e escolaridade da mãe), sociais (número de pessoas que residem na casa e quantidade de cômodos utilizados para dormir por residência) e comportamentais (frequência a festas/bares, exposição à fumaça de cigarro, etc) (Apêndice B). Nas coletas subsequentes, aplicou-se outro questionário cujas respostas às variáveis (densidade domiciliar, contato com alguém com meningite, frequência a festas/bares, etc) poderiam sofrer modificações ao longo do estudo e que compõem os dados longitudinais do trabalho (medidas repetidas) (Apêndice C).

4.2.2 Coleta das amostras de orofaringe

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de um abaixador de língua para que o *swab* de Rayon fosse pressionado e rolado sobre a mucosa da parte posterior da orofaringe dos participantes (CARTWRIGHT, 2001). O material coletado foi semeado imediatamente em meio ágar chocolate PolyVitex VCAT3 (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France), meio descrito por Thayer e Martin modificado com VCNT (vancomicina, colistina, nistatina e trimetoprim) (THAYER; MARTIN, 1966) e transportado até o laboratório em uma jarra com vela, em temperatura ambiente, no período máximo de 4 horas. Cada amostra foi devidamente etiquetada de acordo com o código de identificação do participante.

Após a semeadura em meio de cultura, o *swab* foi introduzido em um tubo plástico (capacidade de 4 mL), com tampa de rosca, contendo 2 mL do meio de transporte STGG (Skim Milk, triptona, glicose, glicerina). Sua haste foi cortada com uma tesoura de forma que a ponta contendo a parte do algodão ficasse totalmente submersa no meio de transporte.

O tubo contendo o STGG identificado com o código do participante foi acondicionado adequadamente em caixa térmica (4-8°C) com gelo, segundo as normas de biossegurança, para garantir a viabilidade das amostras até o encaminhamento ao Núcleo de Pesquisa e Inovação (NUPI) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. No laboratório, as placas semeadas foram incubadas a 37±2°C com 5% de CO₂ e os tubos de STGG foram acondicionados a -80° C para futura análise.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *N. meningitidis* ATRAVÉS DE TESTES FENOTÍPICOS

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

As colônias isoladas foram avaliadas microscopicamente quanto à sua característica morfotintorial através da coloração de Gram, e apenas os isolados que se apresentaram como diplococos Gram negativos foram submetidos ao teste da oxidase. Em seguida, as cepas foram submetidas à prova de oxidação dos açúcares (glicose, maltose, sacarose e lactose) através do meio CTA (Cysteine Triplice Agar) (Becton Dickinson and Company, BD, EUA) (WHO, 2011). Após essa triagem, as cepas identificadas como Nm foram conservadas e congeladas a -80°C em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) (Becton Dickinson and Company, BD, EUA) acrescido de 20% de glicerol.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *N. meningitidis* ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL (WGS)

Os 176 isolados identificados durante o estudo como diplococos Gram-negativos e oxidase positiva foram enviados ao Laboratório de Meningite do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), em Atlanta, nos Estados Unidos, para a identificação e caracterização molecular de *N. meningitidis* por meio do sequenciamento do genoma total (WGS), sob a coordenação da Dr^a. Xin Wang. Apenas 136 isolados mostraram-se viáveis para a realização do WGS no CDC.

As cepas de *N. meningitidis* armazenadas em BHI foram reativadas, plaqueando-se 10 µL da suspensão bacteriana em ágar triptonsoja enriquecido com 5% de sangue carneiro

(Becton Dickinson and Company, BD, EUA) e mantida a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, em estufa de CO_2 a 5%, por 18-24 horas. Em seguida, com o auxílio de *swabs* estéreis, o crescimento bacteriano foi removido da placa e resuspenso em tubos de 1,5mL contendo 1mL de Tris-HCl (10mM; pH=7,5). Essas suspensões foram então centrifugadas por 5 minutos a 13.000 -16.000 x g para a formação de pellets. O sobrenadante foi descartado de modo que todo o resíduo do tampão Tris-HCl fosse removido.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Os alelos do MLST foram identificados com base em uma pesquisa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), em comparação com as listas de alelos do PubMLST. Para isto foi utilizado o banco de dados de sequências do genoma de isolados bacterianos (BIGSdb) ([http://pubmlst.org/software/database/bigsgdb/.](http://pubmlst.org/software/database/bigsgdb/)).

As sequências das proteínas da membrana externa foram igualmente tipificadas comparando-as com as sequências encontradas no PubMLST. As proteínas FetA, PorA e PorB foram caracterizadas de acordo com suas respectivas regiões variáveis. A proteína NadA foi categorizada pela convenção de variante e identificador de peptídeos da Novartis, e a NHBA foi denominada através do identificador de peptídeo PubMLST. A proteína FHbp foi categorizada pelo identificador de peptídeo PubMLST, de acordo com o identificador do peptídeo Pfizer/variante Novartis (A/v2-3 e B/v1) e o identificador numérico Oxford (KRETZ et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018).

Todas as análises do sequenciamento, incluindo a determinação dos STs, complexos clonais bem como a caracterização das proteínas da membrana externa foram realizadas pela equipe do Laboratório de Meningite do CDC.

4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As árvores filogenéticas foram construídas a partir dos isolados de Nm através da identificação de polimorfismos de nucleotídeo Único (SNPs) empregando-se o *software* kSNP (versão 3) (GARDNER; SLEZAK; HALL, 2015). O alinhamento dos SNPs centrais foi usado como entrada para inferir a filogenia de máxima verossimilhança (ML). Para isto, foi utilizada a ferramenta RAxML (versão 8.2.12) (STAMATAKIS, 2014), com modelo geral de

substituição reversível no tempo e algoritmo de parada de *bootstrap* do tipo “autoMRE”. A árvore filogenética foi anotada utilizando a ferramenta Interactive Tree of Life (LETUNIC; BORK, 2016).

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos através dos questionários foram digitados, validados e armazenados em um banco de dados eletrônico através do sistema REDCap (*Research Electronic Data Capture*). Posteriormente, as análises estatísticas foram realizadas no sistema STATA versão 16 (College Station, Texas). Os dados da linha de base e longitudinais foram descritos através de frequências (absolutas e relativas).

A aquisição do meningococo foi avaliada ao longo do período do estudo utilizando os resultados laboratoriais obtidos através do WGS e seguindo o método sugerido por Cooper e colaboradores (2019b). A aquisição de Nm foi definida como a obtenção de um resultado negativo na linha de base e um resultado positivo em qualquer uma das coletas subsequentes (Apêndice D).

A não aquisição foi definida como a obtenção de um resultado negativo para Nm tanto na linha de base quanto nas coletas posteriores (Apêndice D). Os indivíduos que não compareceram a três coletas ou mais foram excluídos devido à possibilidade de aquisição da bactéria durante o período em que não houve acompanhamento (Apêndice D). Os indivíduos positivos na linha de base também foram excluídos (Apêndice D).

Dado o tamanho amostral e a baixa frequência de aquisição ($n=12/418$; 3,2%), não foi possível realizar análises para efeito dose-resposta de variáveis como densidade domiciliar, frequência a festas e nível de escolaridade da mãe, sendo essas variáveis categorizadas de forma dicotômica (expostos/não expostos).

Para estimar a associação entre as variáveis de exposição e o desfecho (aquisição) e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, foram implementadas uma série de regressões logísticas de efeitos fixos (*fixed-effects logistic regressions*), para levar em consideração a estrutura dos dados em medidas repetidas. O modelo bruto avaliou de forma independente a associação de cada uma das variáveis com o desfecho, sendo o modelo final composto por sexo, idade e as variáveis cujo valor de p para as associações brutas foi inferior a 0,20.

De acordo com o método sugerido por Jeppesen e colaboradores (2015) e Van Ravenhorst e colaboradores (2017), o tempo de colonização foi definido como o tempo (em semanas) em que o indivíduo permaneceu positivo para Nm, assumindo-se que a aquisição da

bactéria ocorreu no período entre as coletas. Para essa sub-análise só foram avaliados os indivíduos com pelo menos duas coletas realizadas e em que pelo menos uma delas o resultado do WGS tenha sido positivo para Nm ($n=35$).

4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia (CAEE No. 02429318.7.0000.0040) e foi conduzido de acordo com as Normas e Resoluções que norteiam a pesquisa envolvendo seres humanos, em especial a resolução CNS 466/2012. As informações obtidas durante as entrevistas com os universitários são confidenciais. Os questionários aplicados foram arquivados sob sigilo profissional e serão mantidos durante cinco anos em gaveta fechada com chave onde apenas os investigadores do grupo de pesquisa têm acesso. O estudante voluntário não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO NA LINHA DE BASE

Um total de 422 estudantes foram recrutados durante o período do estudo, sendo que quatro indivíduos foram excluídos posteriormente por não pertencerem à faixa etária de 18 a 24 anos. Desta forma, 418 alunos foram incluídos e tiveram amostras de orofaringe coletadas (Figura 2). A média de tempo na coorte foi de 24,3 semanas (mínimo = 0; máximo = 41,3 semanas) e a mediana foi de 35,3 semanas. Cada aluno realizou, em média, três coletas. Um total de 198 (47,4%; $n=198/418$) estudantes participaram de todas as coletas. Para 45 (10,8%; $n=45/418$), 31 (7,4%; $n=31/418$) e 47 (11,2%; $n=47/418$) indivíduos foram realizadas duas, três e quatro coletas, respectivamente, enquanto 97 (23,2%; $n=97/418$) estudantes participaram de apenas uma coleta.

Os alunos que desistiram ou que por algum outro motivo não retornaram para a realização das coletas corresponderam a 30,6% ($n=128/418$) dos indivíduos; na 2ª coleta a perda de seguimento foi de 16,5% ($n=51/310$), 9,2% ($n=27/295$), 10,1% ($n=29/286$) e 7,5% ($n=21/279$), na 3ª, 4ª e 5ª coletas, respectivamente (Figura 2). Na primeira etapa do estudo foram recrutados 310 estudantes (Figura 2). Para compensar as perdas, novos participantes foram recrutados nas 2ª ($n=47$), 3ª ($n=7$), 4ª ($n=22$) e 5ª ($n=36$) coletas, para a obtenção de um número homogêneo de amostras de orofaringe em todas as etapas de obtenção do material clínico (Figura 2).

Ao analisar as características sociodemográficas dos participantes na linha de base, observou-se que 62,4% ($n=261$) eram do sexo feminino; 30,1% ($n=126$) pertenciam à faixa etária de 18-19 anos; 41,2% ($n=172$) à faixa etária de 20-21 anos e 28,7% ($n=120$) à faixa etária de 22-24 anos (Tabela 1). Em relação à raça/cor da pele autorreferida, 45% dos indivíduos se declararam pardos, 30,6% pretos, 18,4% brancos e 3,6% amarelos ou indígenas (Tabela 1). Dez indivíduos (2,4%) não souberam informar a sua raça/cor. Um total de 202 (48,3%) participantes responderam que a mãe tinha nível superior completo; 33,8% ($n=141$) tinha o ensino médio completo; 14,6% ($n=61$) apresentavam menos do que o ensino médio e 3,3% ($n=14$) dos participantes não souberam informar o nível educacional da mãe (Tabela 1).

Quanto à imunização com a vacina meningocócica C conjugada (MCC), 28,9% ($n=121$) dos participantes afirmaram terem sido imunizados, dos quais 68,6% ($n=83$) e 31,4% ($n=38$) forneceram essa informação através da carteira de vacinação e de forma oral,

respectivamente (Tabela 1). Um total de 101 estudantes (24,2%) não foram vacinados e 46,9% ($n=196$) não souberam informar se haviam tomado a vacina (Tabela 1). Foi possível observar que 339 participantes (81,1%) não eram expostos à fumaça de cigarro, enquanto 5,7% ($n=24$) relataram serem fumantes ativos; 11% ($n=46$) passivos e 1,2% tinham ambas as exposições (Tabela 1).

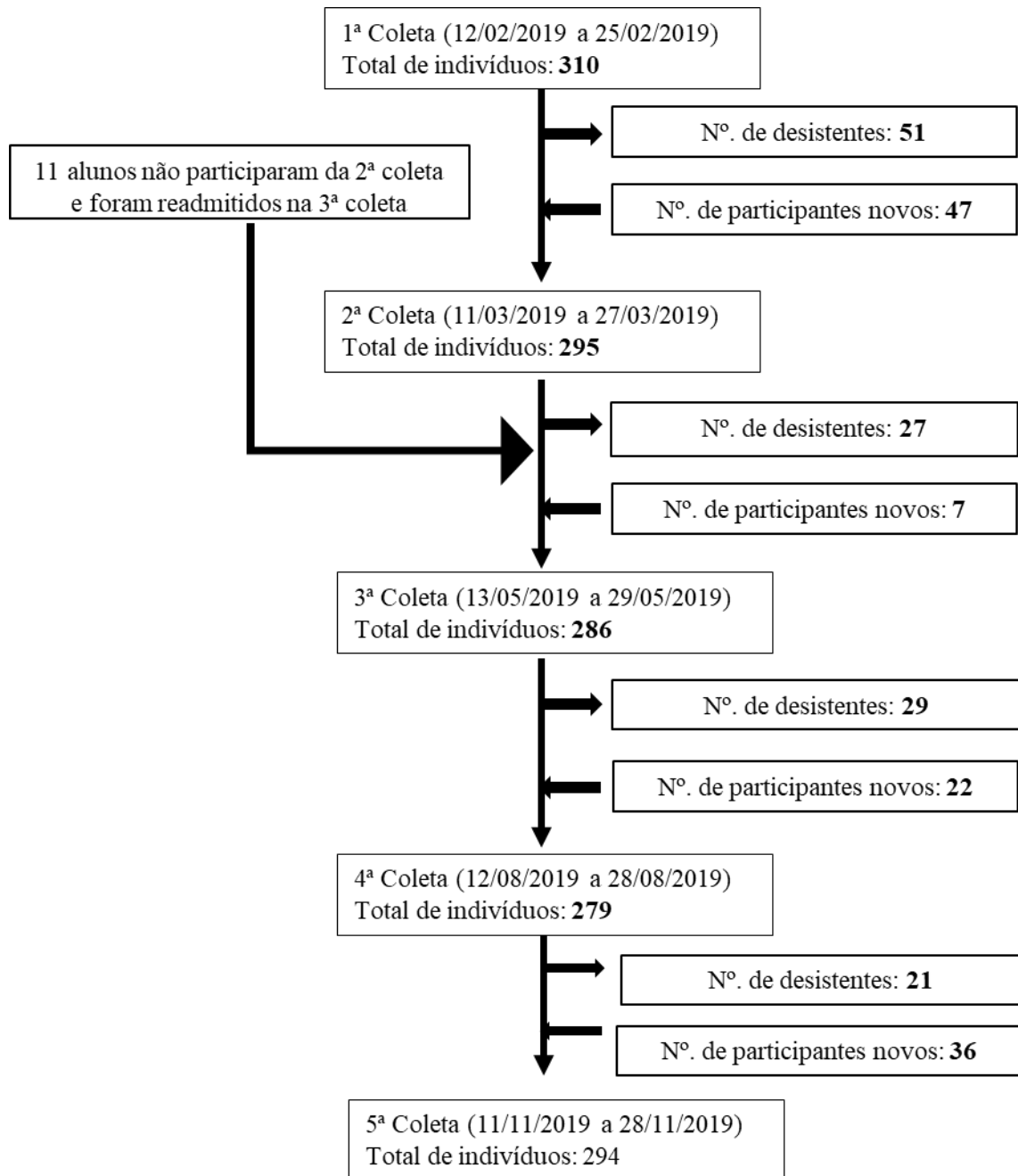


Figura 2 - Fluxograma das etapas de coleta do estudo.

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 1 - Características sociodemográficas dos participantes do estudo na linha de base (N=418).

Características	n (%)
Sexo feminino	261 (62,4)
Faixa etária	
18-19	126 (30,1)
20-21	172 (41,2)
22-24	120 (28,7)
Raça/cor da pele autorreferida	
Branco	77 (18,4)
Preto	128 (30,6)
Pardo	188 (45,0)
Outros	15 (3,6)
Não soube informar	10 (2,4)
Nível educacional da mãe	
Até o nível fundamental	61 (14,6)
Ensino médio completo	141 (33,8)
Ensino superior completo	202 (48,3)
Não soube informar	14 (3,3)
Imunização com a vacina MCC	
Sim	121 (28,9)
Não	101 (24,2)
Não soube informar	196 (46,9)
Como forneceu a informação sobre vacina	
Oral	38 (31,4)
Carteira de vacinação	83 (68,6)
Exposição à fumaça de cigarro	
Não	339 (81,1)
Fumante ativo	24 (5,7)
Fumante passivo	46 (11,0)
Ambas as exposições	5 (1,2)
Não informou	4 (1,0)

Legenda: MCC = vacina meningocócica C conjugada

Fonte: Elaborado pela autora

5.2 CARACTERÍSTICAS SOCIAIS E COMPORTAMENTAIS DOS PARTICIPANTES AO LONGO DO ESTUDO

Com relação aos dados longitudinais dos participantes, foi observada uma variação nas respostas à frequência a festas/bares e presença de sintomas de gripe até 15 dias antes da coleta (Tabela 2). A maioria dos indivíduos respondeu que não frequentava festas/bares tanto no início (40,7%) quanto ao final do estudo (57,6%) (Tabela 2). Entre aqueles que afirmaram que frequentavam esse tipo de evento, 34,9% ($n=146$) e 27,8% ($n=55$) responderam que o faziam até duas vezes por mês na primeira e na última coletas, respectivamente (Tabela 2). Os

indivíduos que compareciam a festas/bares três ou mais vezes por mês correspondiam a 21,8% ($n=91$) dos alunos no início e 14,6% ($n=29$) ao final do estudo (Tabela 2). Em relação à presença de sintomas de gripe nos últimos 15 dias, ocorreu um aumento na proporção de estudantes que relataram esses sintomas entre a primeira (23,7%) e a quarta coletas (42,9%), enquanto houve uma redução dessa medida (27,3%) na última coleta (Tabela 2).

Pouca ou nenhuma variação foi observada ao longo do estudo nas respostas às variáveis densidade domiciliar (número de pessoas por cômodo da residência), contato com alguém com meningite bem como a prática de sexo oral nos últimos 15 dias (Tabela 2). A maioria dos estudantes relatou ter até um morador por cômodo da sua residência tanto no início (53,1%) quanto ao final do estudo (51,0%) (Tabela 2). Um total de 184 (44,0%) alunos tinham dois moradores por cômodo da casa na primeira coleta e 92 (46,5%) na quinta coleta (Tabela 2). Uma maior densidade domiciliar (três ou mais pessoas por cômodo) foi pouco frequente, tendo sido reportada por 2,6% ($n=11$) e 2,5% ($n=5$) dos estudantes na primeira e última coletas, respectivamente (Tabela 2). Apenas quatro indivíduos informaram ao longo do estudo que tiveram contato prévio com alguém diagnosticado com meningite bacteriana (Tabela 2). A prática de sexo oral foi relatada por 146 (34,9%) alunos na primeira coleta e por 66 (33,3%) na quinta coleta (Tabela 2).

Tabela 2 - Características (medidas repetidas) sociais e comportamentais dos participantes ao longo do estudo.

Características	Coletas				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
	N=418 n (%)	N=321 n (%)	N=276 n (%)	N=245 n (%)	N=198 n (%)
Densidade domiciliar					
≤ 1 morador por cômodo	222 (53,1)	167 (52,0)	143 (51,8)	125 (51,0)	101 (51,0)
2 moradores por cômodo	184 (44,0)	142 (44,2)	124 (44,9)	112 (45,7)	92 (46,5)
≥ 3 moradores por cômodo	11 (2,6)	10 (3,1)	9 (3,3)	8 (3,3)	5 (2,5)
Não informou	1 (0,3)	2 (0,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Contato com alguém com meningite					
Sim	4 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Não	329 (78,7)	254 (79,1)	210 (76,1)	188 (76,7)	143 (72,2)
Não soube informar	85 (20,3)	67 (20,9)	66 (23,9)	57 (23,3)	55 (27,8)
Frequenta festas/bares?					
Não	170 (40,7)	156 (48,6)	165 (59,8)	140 (57,1)	114 (57,6)
1 a 2 vezes por mês	146 (34,9)	80 (24,9)	64 (23,2)	68 (27,8)	55 (27,8)
≥ 3 vezes por mês	91 (21,8)	83 (25,9)	47 (17,0)	35 (14,3)	29 (14,6)
Não informou	11 (2,6)	2 (0,6)	0 (0,0)	2 (0,8)	0 (0,0)
Sintomas de gripe nos últimos 15 dias?					
Sim	99 (23,7)	124 (38,6)	111 (40,2)	105 (42,9)	54 (27,3)
Não	308 (73,7)	196 (61,1)	165 (59,8)	136 (55,1)	144 (72,7)
Não informou	11 (2,6)	1 (0,3)	0 (0,0)	4 (2,0)	0 (0,0)
Fez sexo oral nos últimos 15 dias?					
Sim	146 (34,9)	101 (31,5)	83 (30,1)	79 (32,2)	66 (33,3)
Não	272 (65,1)	220 (68,5)	193 (69,9)	166 (67,8)	132 (66,7)

Fonte: Elaborado pela autora

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PORTADORES DE *N. meningitidis* NA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Durante o período do estudo foram coletados 1.458 *swabs* de orofaringe. Um total de 176 isolados foram caracterizados como diplococos Gram-negativos e oxidase positiva e apenas 136 foram submetidos ao WGS. Desse total, 115 isolados foram caracterizados como *N. meningitidis*, seguido de *N. lactamica* ($n=15$), *Enhydrobacter aerosaccus* ($n=5$) e *Neisseria* sp. ($n=1$).

Entre os 418 participantes, 47 (11,2%) tiveram, pelo menos, um resultado positivo para Nm durante o estudo (Apêndice E). Um total de 18 (4,3%; $n=18/418$) indivíduos foram positivos em uma coleta, 12 (2,9%; $n=12/418$) em duas coletas, 7 (1,7%; $n=7/418$) em três coletas, 3 (0,7%; $n=3/418$) em quatro coletas e 7 (1,7%; $n=7/418$) em cinco coletas. A porcentagem de portadores em cada coleta é mostrada na Figura 3. Esta porcentagem teve pouca variação ao longo do estudo, sendo que na terceira e na quinta coletas foram identificadas uma menor e uma maior proporção de portadores, respectivamente (Figura 3A). O mesmo padrão é observado quando consideramos os participantes ($n=38$) cujas amostras não foram submetidas ao WGS (Figura 3B). Dos 34 indivíduos que tiveram resultado positivo para Nm na linha de base, 8 (23,5%; $n=8/34$) deixaram de ser portadores em algum momento do estudo e entre os 381 estudantes que não eram portadores na linha de base, 280 (73,5%; $n=280/381$) permaneceram com resultado negativo para Nm nas coletas subsequentes. Dois alunos foram portadores na primeira, segunda, quarta e quinta coletas e tiveram resultado negativo para Nm na terceira coleta.

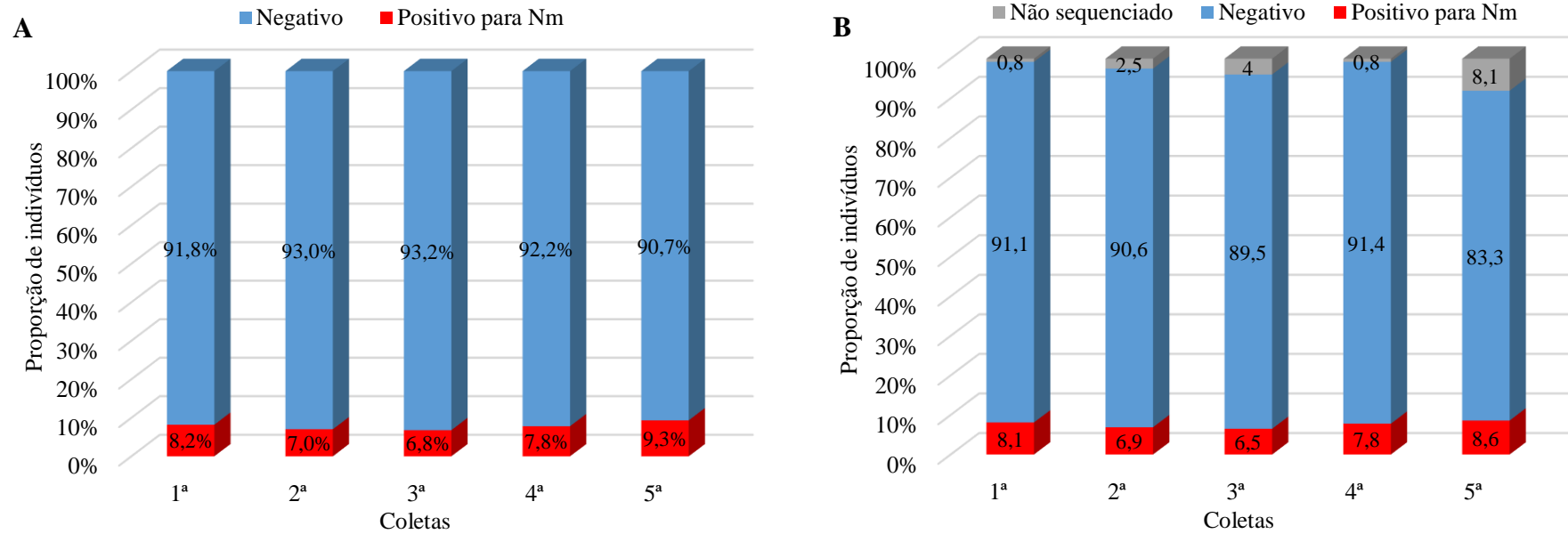


Figura 3 - Proporção de indivíduos que tiveram resultado positivo para *Neisseria meningitidis* através do sequenciamento do genoma total (WGS) em cada coleta, considerando apenas os estudantes com amostra sequenciada (A) e incluindo os indivíduos cujas amostras não foram submetidas ao WGS (B). Legenda: Nm = *Neisseria meningitidis*.

Fonte: Elaborado pela autora

5.4 FATORES ASSOCIADOS À AQUISIÇÃO DO ESTADO DE PORTADOR DE *N. meningitidis*

Um total de 12 ($n=12/381$; 3,2%) participantes que não eram portadores na linha de base adquiriram o meningococo ao longo do estudo. Ao analisar os fatores de risco associados à aquisição de Nm, o modelo multivariado mostrou que a frequência a festas/bares pelo menos uma vez durante o período do estudo aumentou em 4,37 vezes a chance de ser portador (OR: 4,37 95% IC 1,15 - 16,67; $p=0,031$) (Tabela 3). Além disso, a taxa de aquisição entre esses participantes foi de 7,3% ($n=9$) contra 1,7% ($n=3$) entre os alunos que não compareciam a esse tipo de evento (Tabela 3).

Embora sem significância estatística, uma maior densidade domiciliar (duas pessoas ou mais por cômodo da casa) aumentou em 2,49 vezes a chance de ser portador (OR: 2,49 95% IC 0,72 - 8,63; $p=0,150$). Da mesma forma, uma maior taxa de aquisição (5,9%) foi encontrada entre esses estudantes (Tabela 3). Os indivíduos do sexo masculino tiveram uma chance 1,72 vezes maior de se tornarem portadores (OR: 1,72 95% IC 0,53 - 5,60; $p=0,365$), e uma taxa de aquisição de 5,4% ($n=6$) contra 3,2% ($n=6$) entre os participantes do sexo feminino, embora essas associações não sejam estatisticamente significantes (Tabela 3).

Não houve diferença estatística entre os grupos etários, conquanto se observe uma maior taxa de aquisição (4,7%) na faixa etária de 18 a 19 anos (Tabela 3). Em relação à imunização com a vacina MCC, foi identificado um fator de proteção entre os participantes que foram vacinados (OR: 0,88 95% IC 0,26 - 2,99; $p=0,836$) bem como uma menor taxa de aquisição (3,7%), embora sem significância estatística (Tabela 3).

Entre os participantes que eram fumantes ativos, embora sem significância estatística, foi observada uma maior taxa de aquisição do meningococo (5,6%) (OR: 1,38 95% IC 0,17 - 11,44; $p=0,764$), bem como entre aqueles cuja mãe tinha o ensino superior completo (5,0%) (OR: 1,90 95% IC 0,53 - 6,5; $p=0,327$) e que se autodeclararam indígenas ou amarelos (9,1%) (OR: 1,13 95% IC 0,11 - 11,18; $p=0,920$) (Tabela 3). Do mesmo modo, os alunos que relataram a presença de sintomas de gripe pelo menos três vezes durante o período do estudo e aqueles que praticaram sexo oral duas ou mais vezes tiveram uma chance 2,05 e 1,38 vezes maior de se tornarem portadores, respectivamente (Tabela 3). Todavia, vale ressaltar que essas associações não foram estatisticamente significantes (OR: 2,05 95% IC 0,47 - 8,89; $p=0,338$; OR: 1,38 95% IC 0,39 - 4,91; $p=0,615$, respectivamente).

Não foi possível estabelecer uma associação entre a variável contato com alguém com meningite e aquisição de Nm em razão da ausência de portadores entre aqueles que relataram essa exposição ($n=4$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Fatores de risco para a aquisição do estado de portador de *Neisseria meningitidis* ao longo do estudo em modelo bruto e multivariado.

Fatores	n/N (%)	Modelo 1 ¹		Modelo 2 ²	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%
Idade					
18 a 19 anos	4/85 (4,7)	1			
20 a 21 anos	5/123 (4,1)	0,86	0,22-3,29	0,90	0,23-3,58
22 a 24 anos	3/88 (3,4)	0,71	0,15-3,29	0,71	0,15-3,39
Sexo					
Feminino	6/185 (3,2)	1			
Masculino	6/111 (5,4)	1,70	0,54-5,42	1,72	0,53-5,60
Raça/cor					
Branco	4/49 (8,2)	1			
Negros (pretos e pardos)	7/232 (3,0)	0,35	0,10-1,25		
Indígena/amarelo	1/11 (9,1)	1,13	0,11-11,18		
Escolaridade da mãe					
Até 2º grau completo	4/146 (2,7)	1			
3º grau completo	7/140 (5,0)	1,90	0,53-6,5		
Vacina MCC					
Não	8/189 (4,2)	1			
Sim	4/107 (3,7)	0,88	0,26-2,99		
Exposição ao cigarro					
Não exposto	10/245 (4,1)	1			
Fumante ativo	1/18 (5,6)	1,38	0,17-11,44		
Fumante passivo	1/31 (3,2)	0,78	0,10-6,34		
Densidade domiciliar					
≤ 1 pessoa/cômodo	4/161 (2,5)	1			
≥ 2 pessoas/cômodo	8/135 (5,9)	2,47	0,73-8,40	2,49	0,72-8,63
Frequenta festas					
Não	3/172 (1,7)	1			
≥ 1 vez	9/124 (7,3)	4,41	1,17-16,64	4,37	1,15-16,67
Contato com alguém com meningite					
Não	12/292 (4,1)	1			
Sim	0/4 (0,0)	-*	-		

Legenda: ¹ = Modelo bruto; ² = Modelo multivariado ajustado por sexo, idade e variáveis com $p < 0,20$ no modelo bruto; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; * = Modelo não convergiu devido à ausência de aquisição entre os expostos.

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 3 - (continuação). Fatores de risco para a aquisição do estado de portador de *Neisseria meningitidis* ao longo do estudo em modelo bruto e multivariado.

Fatores	n/N (%)	Modelo 1 ¹		Modelo 2 ²	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%
Sintomas de gripe					
Não	5/169 (3,0)	1			
1 a 2 vezes	4/76 (5,3)	1,82	0,48-6,98		
≥ 3 vezes	3/51 (5,9)	2,05	0,47-8,89		
Sexo oral					
Não	5/142 (3,5)	1			
1 vez	2/50 (4,0)	1,14	0,21-6,08		
≥ 2 vezes	5/104 (4,8)	1,38	0,39-4,91		

Legenda: ¹ = Modelo bruto; ² = Modelo multivariado ajustado por sexo, idade e variáveis com $p < 0,20$ no modelo bruto. OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança.

Fonte: Elaborado pela autora

5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *N. meningitidis* ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL (WGS)

5.5.1 Determinação dos genogrupos

Das 115 cepas que foram identificadas como Nm através do WGS, 88,7% ($n=102/115$) apresentaram-se como não-grupáveis e 72,2% ($n=83/115$) foram caracterizadas como *cnI* (Figura 4). A caracterização do genogrupo só foi identificada em 8,7% ($n=10/115$) das cepas, correspondendo ao genogrupo B (Figura 4). Para três amostras (2,6%; $n=3/115$) não foi possível determinar o genogrupo (Figura 4).

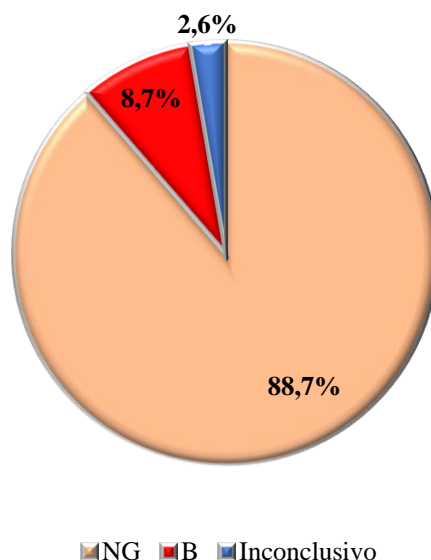


Figura 4 - Identificação dos genogrupos das cepas de *N. meningitidis* através do sequenciamento do genoma total (WGS). Legenda: NG = não-grupável; B = genogrupo B.
Fonte: Elaborado pela autora

5.5.2 Análise da sequência genética da região capsular

Através do WGS, 23 cepas apresentaram a estrutura gênica do genogrupo B e apenas 10 tinham todos os genes da cápsula (*cps*) intactos. As outras 13 cepas possuíam algum tipo de interrupção, como uma parada interna (“*stop-codon*”), uma variação de fase “off” ou a presença de um elemento de inserção (IS1301). Um total de seis cepas caracterizadas como NG tinham a estrutura gênica do genogrupo Z, embora todas tivessem algum tipo de interrupção na sua sequência interna. Para três cepas que eram NG e *cnl* negativas, não foi possível determinar a sua estrutura gênica devido aos genes da cápsula que eram compatíveis com vários genogrupos.

5.5.3 Determinação das sequências tipo e dos complexos clonais

Um total de 19 sequências tipo (ST) foram identificadas através do WGS, sendo que quatro STs foram considerados como novos. Esses STs estavam distribuídos em oito complexos clonais (Figura 5). O complexo clonal mais frequente foi o cc198 presente em 20% ($n=23/115$) dos isolados, seguido pelo cc4821 (6,1%; $n=7/115$) (Figura 5). Todos os isolados pertencentes ao complexo clonal cc198 eram *cnl*, enquanto aqueles associados ao

cc4821 corresponderam ao genogrupo B. Outros complexos clonais foram identificados, como cc53 ($n=5$), cc162 ($n=4$), cc1136 ($n=3$) e o cc1572 ($n=1$), além daqueles considerados hiperinvasivos como o cc32 ($n=6/115$; 5,2%) (Figura 5) associado às cepas NG e o cc41/44 ($n=5/115$; 4,3%) associado ao genogrupo B ($n=3$) e às cepas NG ($n=2$). Um total de 43,5% ($n=50/115$) das cepas não tiveram o complexo clonal definido, sendo que a maioria ($n=39/115$; 33,9%) correspondia ao ST-7129.

5.5.4 Caracterização das proteínas de membrana externa

Na caracterização das proteínas da membrana externa através do WGS foram identificadas 29 variantes de PorA (P1.VR1, VR2) (Figura 6). Particularmente em relação à VR1, 16 variantes foram encontradas, sendo que 8,7% ($n=10/115$) dos isolados apresentaram uma nova variante da VR1 e em 2,6% ($n=3/115$) das amostras o peptídeo VR1 estava ausente. Um total de 23 variantes de VR2 foram observadas, sendo que 13,0% ($n=15/115$) dos isolados possuíam uma nova variante da VR2 e em 3,5% ($n=4/115$) das cepas o peptídeo VR2 estava ausente. O subtipo P1.18,25-37 ($n=11/115$; 9,6%) foi o mais prevalente e estava associado ao cc198 (Figura 6).

Quanto às variantes de PorB, todos os isolados apresentaram proteína de classe 3, sendo os sorotipos mais frequentes PorB 3-671 ($n=32/115$; 27,8%) associado às cepas sem complexo clonal definido e PorB 3-84 ($n=16/115$; 13,9%) associado ao cc198 (Figura 7). Também foram identificadas sete novas variantes de PorB (Figura 7).

Entre as 12 variantes de FetA encontradas, F5-5 ($n=65/115$; 56,5%) e F3-36 ($n=7/115$; 6,1%) foram as mais prevalentes. O cc198 foi o complexo clonal mais associado à variante F5-5 (Figura 8). Uma nova variante de FetA estava presente em 1,7% ($n=2/115$) dos isolados (Figura 8).

A maioria das cepas sequenciadas ($n=74/115$; 64,3%) não apresentou o gene *nadA*. A variante NadA-1.1 estava presente em 4,3% ($n=5/115$) das amostras, associada ao complexo clonal hiperinvasivo cc32. Um total de 11 isolados (9,6%; $n=11/115$) albergavam a variante NadA-6 (complexo clonal não definido) cujo gene expressava uma variação de fase “off”. Uma nova variante de NadA foi identificada em 21,7% ($n=25/115$) das cepas.

Em relação à proteína NHBA, 12 subvariantes foram identificadas, sendo a NHBA-912 a mais frequente ($n=30/115$; 26,1%). Todas as cepas que possuíam essa subvariante não tiveram o complexo clonal definido (Figura 9). Em seguida, foi observada a NHBA-10

($n=25/115$; 21,7%), associada ao complexo clonal cc198 (Figura 9). O peptídeo NHBA estava ausente em dois isolados.

Um total de 67,8% ($n=78/115$) dos isolados pertenciam à subfamília A/v2-3 e 28,7% ($n=33/115$) à subfamília B/v1 da FHbp, segundo a nomenclatura da subfamília Pfizer e variante Novartis, respectivamente. A maioria das cepas que pertencia à subfamília A/v2-3 não possuía o complexo clonal definido ($n=48/78$; 61,5%), sendo o cc4821 o mais prevalente ($n=7/78$; 9,0%) (Figura 10). Por outro lado, o complexo clonal cc198 foi predominante entre os isolados pertencentes à subfamília B/v1 ($n=23/33$; 69,7%) (Figura 10). Utilizando a nomenclatura Oxford, um total de 11 identificadores numéricos foram encontrados, com maior frequência para o 627 ($n=40/115$; 34,8%), 4 ($n=25/115$; 21,7%) e 16 ($n=13/115$; 11,3%). Um total de quatro isolados não possuía a variante FHbp.

Nenhuma das variantes antigênicas que compõem as vacinas 4CMenB (Bexsero®) (FHbp1.1; NadA-3; NHBA-2 e PorA P1.4) e rLP2086 bivalente (Trumenba®) (FHbp45 e FHbp55) contra o NmB foram encontradas entre as 115 cepas de Nm analisadas através do WGS. Utilizando a nomenclatura recomendada pela EMGM, o padrão genotípico mais comum foi o NG:P1.18,25-37:F5-5:ST823 (cc198), presente em 9,6% dos isolados ($n=11/115$).

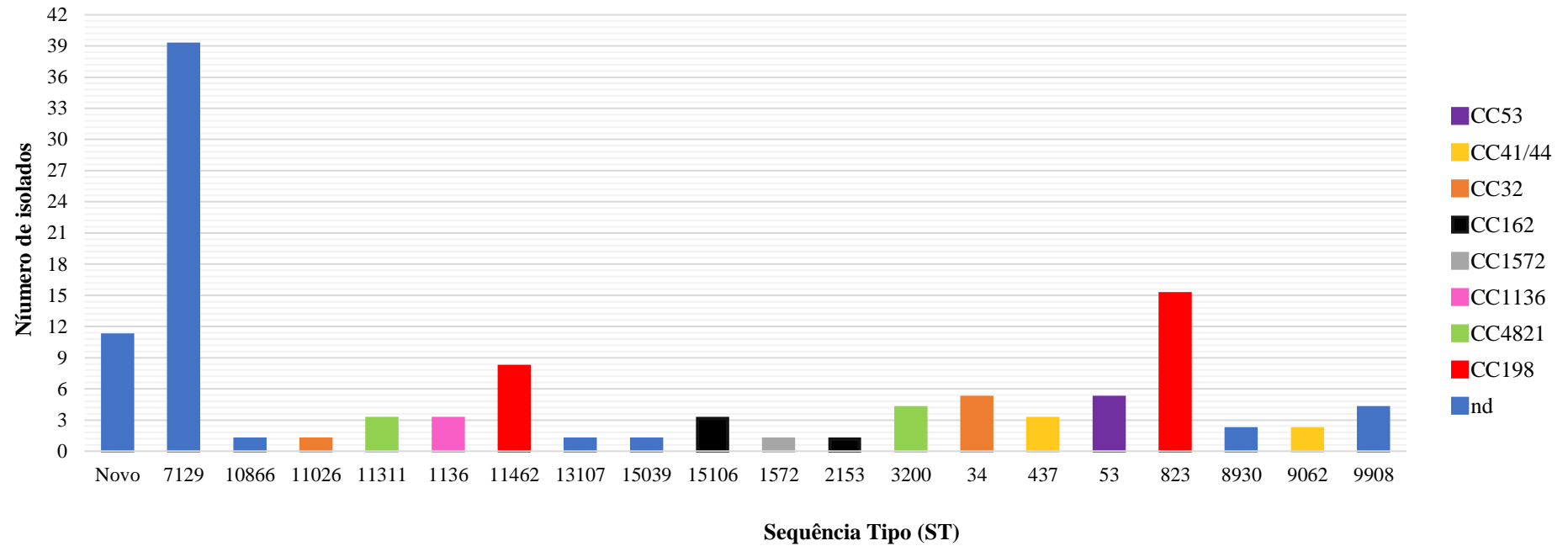


Figura 5 - Distribuição das sequências tipo (ST) de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido.
Fonte: Elaborado pela autora

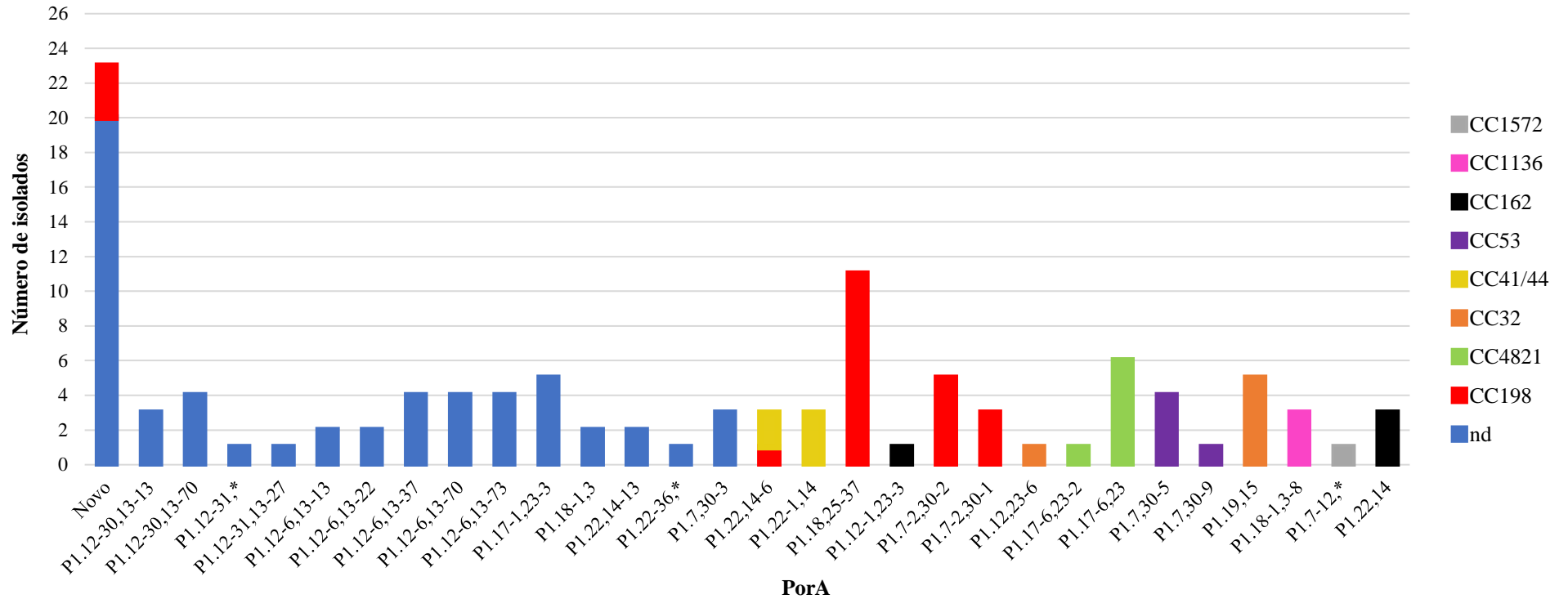


Figura 6 - Distribuição das variantes da proteína PorA de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido; variante VR2 não encontrada.

Fonte: Elaborado pela autora

* =

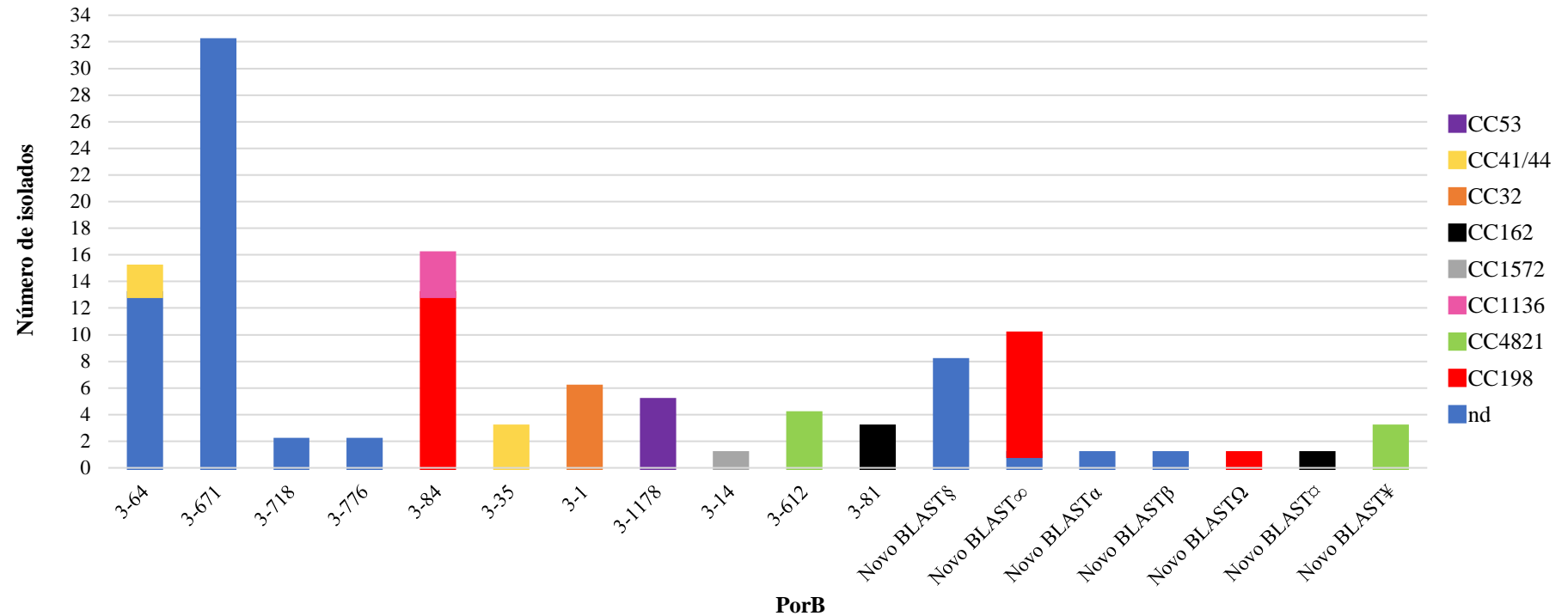


Figura 7 - Distribuição das variantes da proteína PorB de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido; [§]Novo BLAST do alelo 3-671; [∞]Novo BLAST do alelo 3-64; ^αNovo BLAST do alelo 3-654; ^βNovo BLAST do alelo 3-653; ^ΩNovo BLAST do alelo 3-84; [¶]Novo BLAST do alelo 3-81; [¶]Novo BLAST do alelo 3-68.

Fonte: Elaborado pela autora

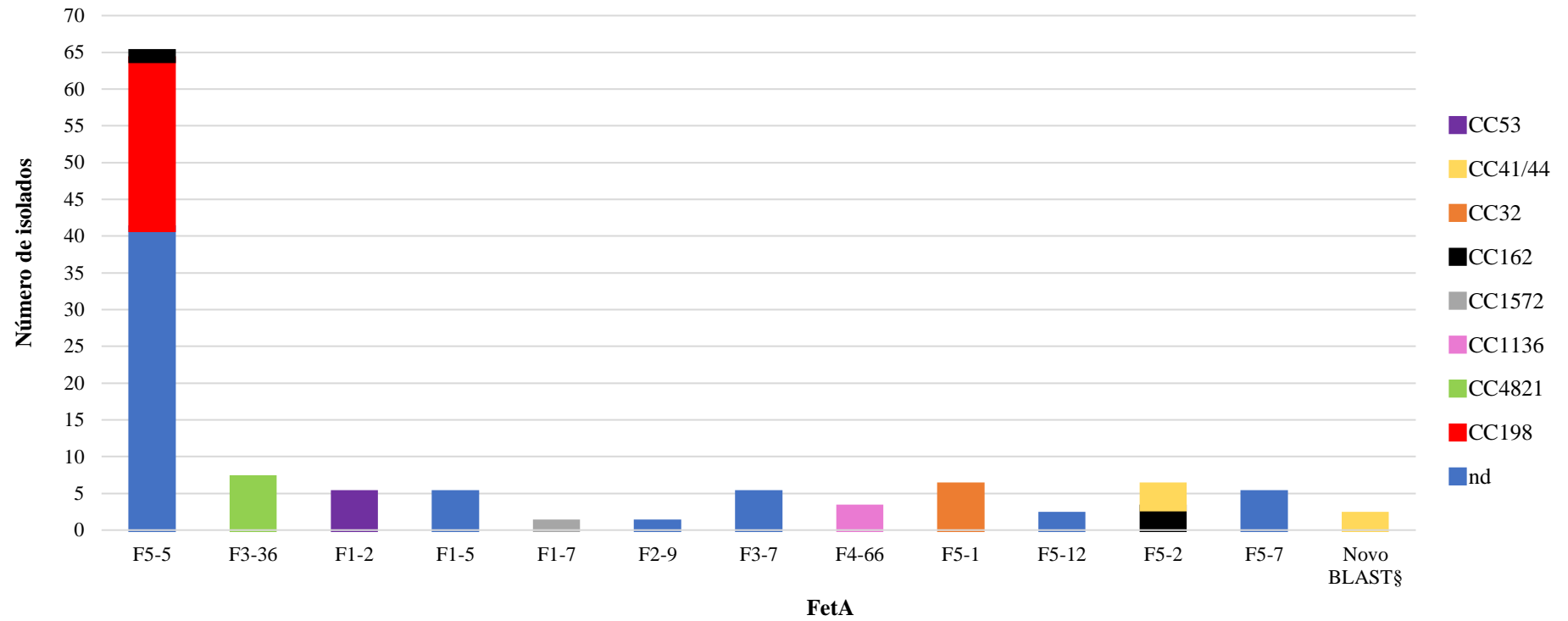


Figura 8 - Distribuição das variantes da proteína FetA de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido; §Novo BLAST do alelo F1-55.

Fonte: Elaborado pela autora

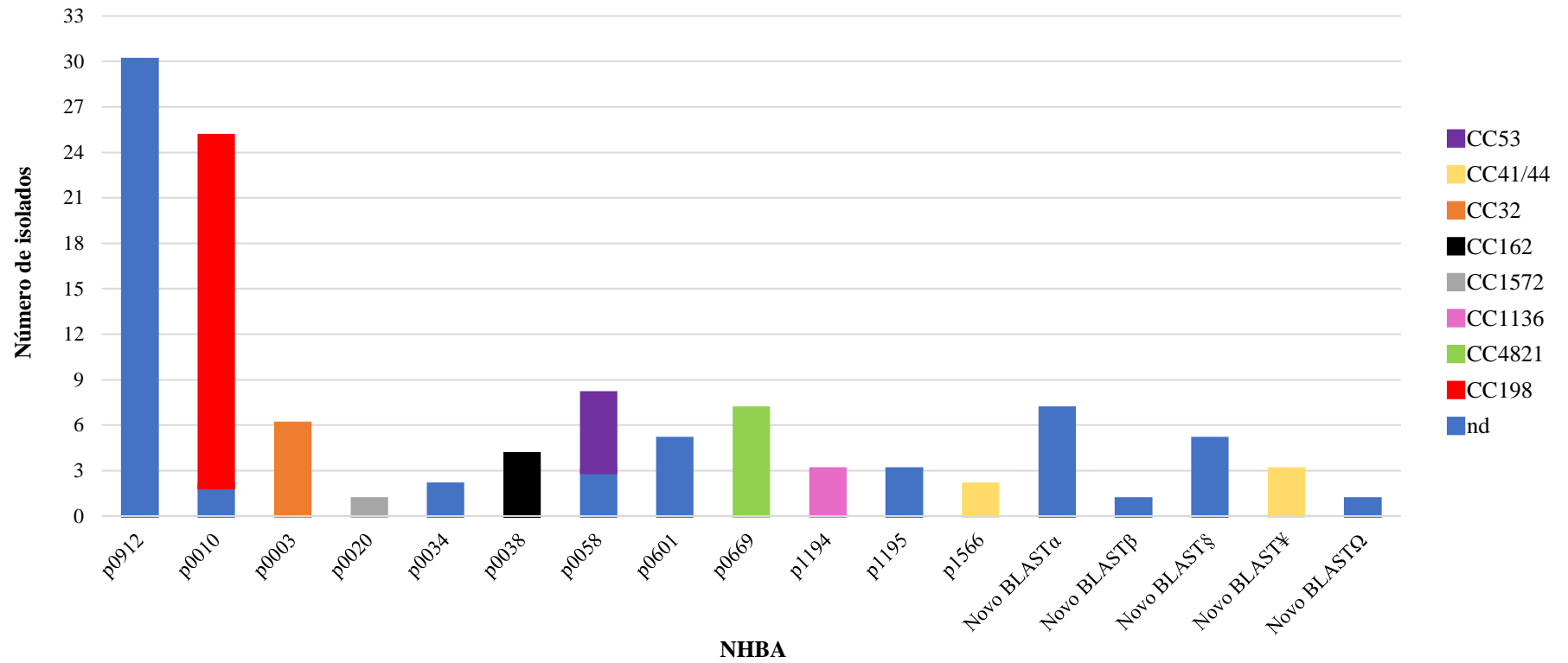


Figura 9 - Distribuição das variantes da proteína NHBA de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido; ^aNovo BLAST do alelo 912; ^bNovo BLAST do alelo 1289; [§]Novo BLAST do alelo 239; [¶]Novo BLAST do alelo 1; ^ΩNovo BLAST do alelo 601.

Fonte: Elaborado pela autora

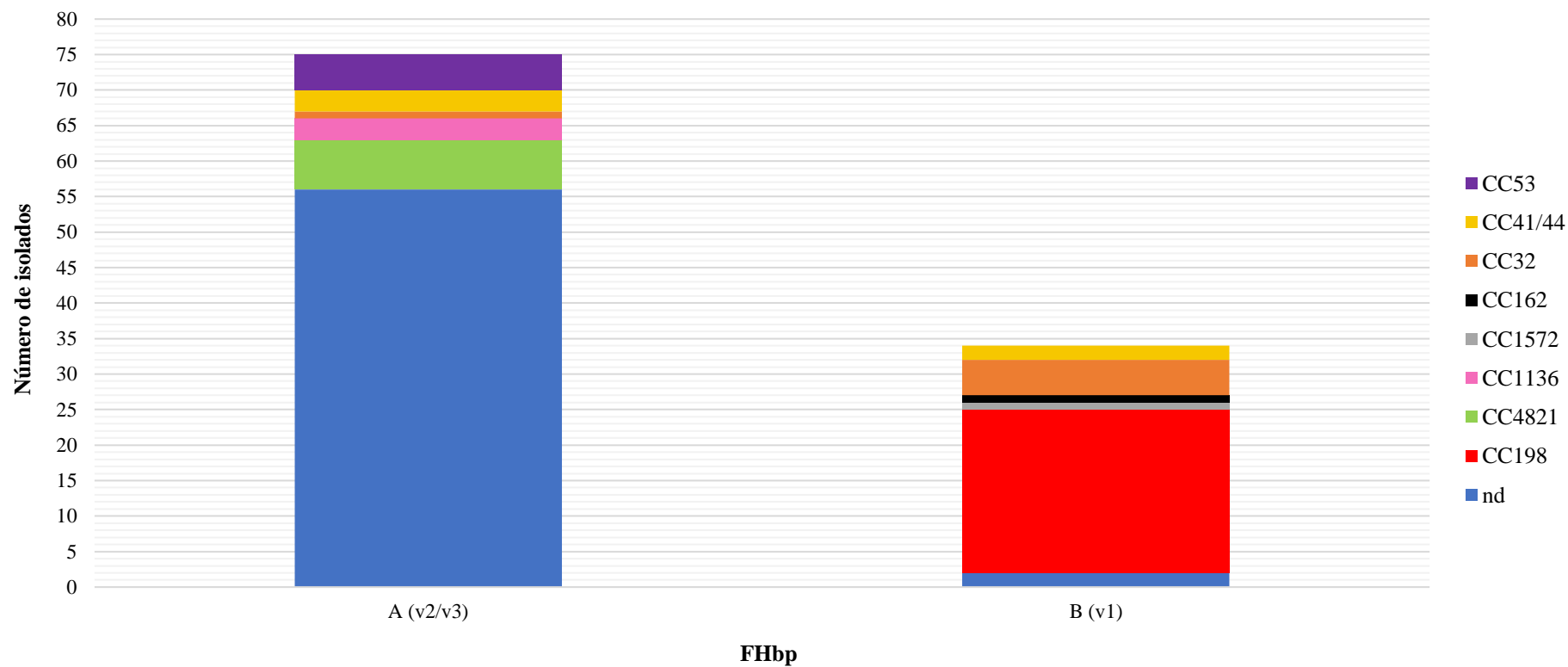


Figura 10 - Distribuição das variantes da proteína FHbp de acordo com os complexos clonais identificados. Legenda: nd = não definido.

Fonte: Elaborado pela autora

5.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE *Neisseria meningitidis*

A análise filogenética dos 112 isolados de Nm mostrou uma alta diversidade, ocorrendo um agrupamento das cepas com complexos clonais semelhantes. Dois cladogramas principais foram detectados (Figura 11). O primeiro clado contém os isolados do cc1136 e do cc198; dentro deste clado, alguns isolados não tiveram complexo clonal definido, sendo que duas cepas possuíam um novo ST e, portanto, nenhum complexo clonal foi determinado para elas (Figura 11). O segundo clado contém os isolados do cc1572, cc53, cc41/44, cc162, cc4821 e cc32; da mesma forma, dentro deste clado, alguns isolados não possuíam complexo clonal definido, sendo que o ST não pôde ser determinado para algumas cepas (Figura 11). Para três isolados não foi possível montar a sequência genômica.

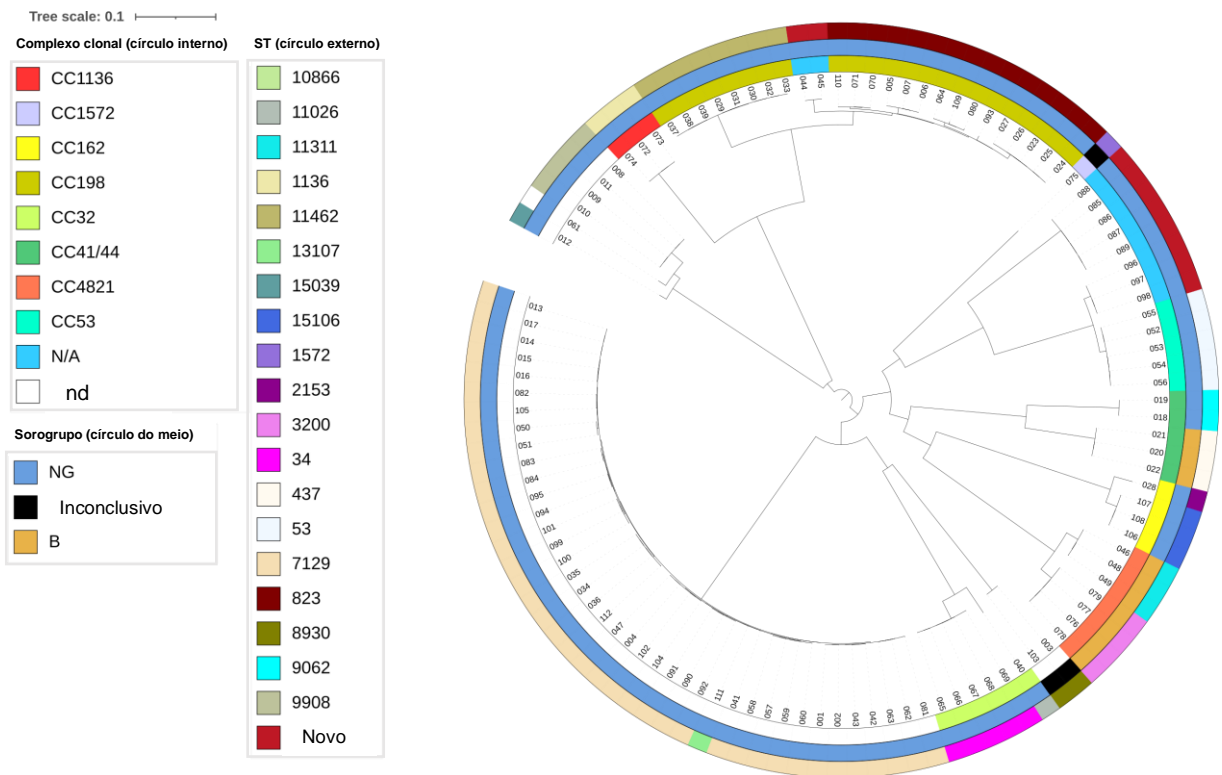


Figura 11 - Filogenia dos isolados de *Neisseria meningitidis*. Legenda: cc = complexo clonal; ST = sequência tipo; N/A = não determinado; nd = não definido; NG = não grupável; B = genogrupo B.
Fonte: Elaborado pela autora

5.7 DURAÇÃO DO ESTADO DE PORTADOR DE *N. meningitidis* E SIMILARIDADE DAS CEPAS ADQUIRIDAS

Considerando apenas os participantes que tinham pelo menos um resultado positivo para Nm e o mínimo de duas coletas realizadas (N=35), foi possível observar que, em média, cada indivíduo permaneceu colonizado durante 22,5 semanas (Tabela 4). A menor média de tempo de colonização (11,7 semanas) correspondia aos estudantes que foram positivos em apenas uma coleta ($n=6/35$; 17,1%), enquanto a maior (38,8 semanas) foi identificada entre os alunos que foram portadores durante todo o período do estudo ($n=7/35$; 20,0%) (Tabela 4). O tempo mínimo de duração do estado de portador foi de 5,6 semanas, enquanto o máximo foi de 39,7 semanas (Figura 12).

Ao analisar o tempo de colonização de acordo com o genogrupo de Nm observou-se que a média de duração do estado de portador foi menor (21,9 semanas) entre os estudantes que estavam colonizados por cepas NG ($n=32/35$; 91,4%) do que entre aqueles que albergavam a Nm do genogrupo B (28,5 semanas) ($n=3/35$; 8,6%). Chama-nos a atenção o fato de que entre os 18 participantes com apenas 1 coleta positiva para Nm, 15 (83,3%; $n=15/18$) albergavam cepas *cnl*.

Para os indivíduos que foram portadores em pelo menos duas coletas (N=29), foi possível analisar a similaridade das cepas. A maioria ($n=23/29$; 79,3%) dos participantes permaneceu colonizada pela mesma cepa de Nm ou por cepas idênticas que expressaram uma pequena modificação em um epítipo da VR2 da PorA ao longo do período de acompanhamento (Tabela 5; participantes nº 28, 178, 184 e 303). Os isolados provenientes do participante nº 148 tiveram modificações tanto do tipo capsular quanto do tipo da PorA ao longo do estudo (Tabela 5). Um total de cinco indivíduos foram excluídos dessa análise em razão da ausência de informação sobre o genogrupo ou o tipo da PorA da cepa.

É interessante notar que alguns alunos que pertenciam à mesma turma estavam colonizados por cepas idênticas de Nm (Tabela 6). Esse dado também foi observado entre participantes que pertenciam a turmas diferentes (Tabela 6).

Tabela 4 - Tempo de colonização assintomática (em semanas) por *Neisseria meningitidis*, de acordo com o número de resultados positivos entre os indivíduos que tinham pelo menos duas coletas realizadas (N=35).

Número de resultados positivos para Nm	Número de indivíduos	%	Média de tempo de colonização (semanas)	Min-máx (semanas)	Desvio padrão
1	6	17,1	11,7	8,9-14,3	1,96
2	12	34,3	17,9	5,6-26,1	8,79
3	7	20,0	18,0	12,1-26,0	5,35
4	3	8,6	34,2	30,1-37,7	3,82
5	7	20,0	38,8	38,0-39,7	0,55
Total	35	100	22,5	5,6-39,7	11,42

Legenda: Nm = *Neisseria meningitidis*

Fonte: Elaborado pela autora

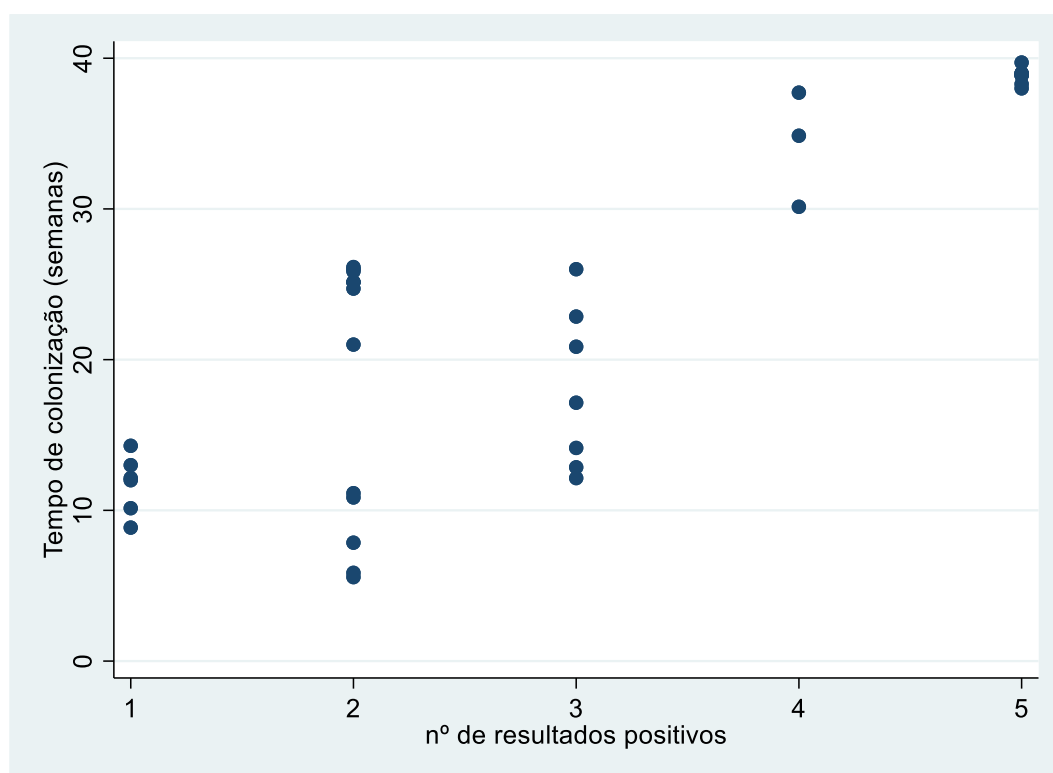


Figura 12 - Tempo de colonização (em semanas) por *Neisseria meningitidis* de acordo com o número de resultados positivos entre os indivíduos que tinham pelo menos duas coletas realizadas (N=35).

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5 - Identificação do genogrupo e do tipo da PorA dos isolados de *Neisseria meningitidis* que expressaram algum tipo de modificação durante o estudo.

Nº do participante	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4		Coleta 5	
	GG	PorA	GG	PorA	GG	PorA	GG	PorA	GG	PorA
28	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-73	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-73	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-73	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-73	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-37
148	-	-	B	17-6,23-2	NG (<i>cnl</i>)	12-30,13-70	B	17-6,23	B	17-6,23
178	NG (<i>cnl</i>)	7,30-5	NG (<i>cnl</i>)	7,30-5	NG (<i>cnl</i>)	7,30-5	NG (<i>cnl</i>)	7,30-5	NG (<i>cnl</i>)	7,30-9
184	SNR	-	-	-	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-39	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-37	-	-
303	-	-	-	-	-	-	NG (<i>cnl</i>)	12-6,13-27	NG (<i>cnl</i>)	12-6, 13-73

Legenda: GG = genogrupo; porA = porina A; NG = não-grupável; *cnl* = *capsule null locus*; - = resultado negativo para *Neisseria meningitidis*; B = genogrupo B; SNR = sequenciamento não realizado. Os dados em negrito indicam os isolados que expressaram algum tipo de modificação ao longo do estudo.

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 6 - Similaridade entre cepas de *Neisseria meningitidis* provenientes de participantes que pertenciam à mesma turma ou a turmas diferentes.

Tipo de Contato	Nº do participante	Tipo capsular	ST	CC	PorA VR1	PorA VR2	FetA	FHbp	NHBA	Gene <i>nadA</i> presente
Mesma turma	114	<i>cnl</i>	7129	nd	12-6	13-70	F5-5	3	p0912	Sim
	252	<i>cnl</i>	7129	nd	Novo*	13-70	F5-5	3	Novo[‡]	Sim
	274	<i>cnl</i>	7129	nd	12-6	13-37	F5-5	3	p0912	Sim
Mesma turma	342	<i>cnl</i>	7129	nd	12-31	Novo[§]	F5-5	3	p1195	Sim
	347	<i>cnl</i>	7129	nd	12-31	13-27	F5-5	3	p1195	Sim
Mesma turma	190	<i>cnl</i>	823	198	18	25-37	F5-5	1	p0010	Não
	386	<i>cnl</i>	823	198	18	25-37	F5-5	1	p0010	Não
Turmas diferentes	2	<i>cnl</i>	7129	nd	12-30	13-70	F5-5	3	p0912	Sim
	353	<i>cnl</i>	7129	nd	12-30	13-70	F5-5	3	p0912	Sim
Turmas diferentes	28	<i>cnl</i>	7129	nd	12-6	13-37	F5-5	3	p0912	Sim
	370	<i>cnl</i>	7129	nd	12-6	13-37	F5-5	3	p0912	Sim

Legenda: ST = Sequência Tipo; CC = complexo clonal; VR = região variável; *cnl* = *capsule null locus*; nd = não definido; *Novo BLAST do alelo 12-6; [‡]Novo BLAST do alelo 912; [§]Novo BLAST do alelo 13-27. Os dados em negrito indicam as diferenças identificadas através do sequenciamento do genoma total (WGS).

Fonte: Elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

Durante nove meses, nós conduzimos um estudo longitudinal para avaliar a dinâmica do estado de portador assintomático de Nm em uma população de estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade em Salvador, Bahia e do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo desse tipo realizado no Brasil. Embora o objetivo principal do estudo não tenha sido avaliar a prevalência de portadores de Nm, não podemos deixar de mencionar que foi encontrado 11,2% de portadores. Este percentual foi praticamente semelhante àquele observado (12,3%) por Ferreira e colaboradores (2020) em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa em Salvador, em 2016, com estudantes da mesma faixa etária, mostrando que a circulação de cepas de Nm entre adultos jovens continua relativamente a mesma, nesses três anos de intervalo entre os dois estudos.

Taxas de colonização por Nm inferiores a observada neste estudo foram encontradas em São Paulo por Weckx e colaboradores (2017), entre indivíduos de 20-24 anos de idade (9%), como também em outros países da América do Sul, como Paraguai (2,3%; 18-21 anos) (CHAMORRO et al., 2019), Colômbia (2,5-7%; 18 e 21 anos, respectivamente) (MORENO et al., 2015), Chile (4%; 18-24 anos) (RODRÍGUEZ et al., 2014) e Argentina (9,4%; 10-17 anos) (GENTILE et al., 2021). Entretanto, nesses estudos da América do Sul, não houve o plaqueamento imediato do *swab* de orofaringe no meio de cultura após a coleta, como é recomendado pela literatura (CARTWRIGHT, 2001; CUNNINGHAM et al., 2001; CAUGANT; MAIDEN, 2009), o que pode ter subestimado a prevalência de portadores encontrada nesses países.

Outro ponto importante a ser destacado é que um total de 40 isolados caracterizados como diplococos Gram-negativos e oxidase positiva, provenientes de 38 participantes, não foram submetidos ao WGS e, portanto, não foi determinada a espécie bacteriana. Desta forma, o percentual de portadores encontrado no nosso trabalho pode ter sido subestimado. Por outro lado, foi observado que o número total de portadores de Nm teve pouca variação ao longo do estudo, sendo que na 3ª e na 5ª coletas foram identificadas uma menor e uma maior proporção de indivíduos colonizados, respectivamente. Do mesmo modo, para a nossa surpresa, não houve um aumento dessa proporção na segunda etapa de coleta, que ocorreu logo após o carnaval, quando era esperada uma maior exposição dos estudantes às aglomerações, e possivelmente, um aumento do risco de aquisição do meningococo. Um total de 73,5% dos estudantes permaneceu com resultado negativo para Nm durante todo o período de

acompanhamento. Considerando que o estado de portador assintomático pode ser transitório, durando poucos dias (ANDERSEN et al., 1998; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007), não podemos ignorar a hipótese de que uma parte desses indivíduos possa ter adquirido o meningococo no intervalo entre as coletas, quando não houve acompanhamento da equipe de pesquisa. É interessante notar que dois alunos que foram portadores na 1^a, 2^a, 4^a e 5^a coletas, tiveram resultado negativo para Nm na 3^a coleta, provavelmente devido a uma falha na coleta do *swab* de orofaringe, dificultando a detecção da bactéria em laboratório.

A identificação dos portadores de Nm na população está diretamente relacionada à qualidade da coleta da amostra de orofaringe e o seu manuseio. Seguindo o protocolo preconizado pela literatura (CARTWRIGHT, 2001; CUNNINGHAM et al., 2001; CAUGANT; MAIDEN, 2009), os *swabs* de orofaringe foram coletados no nosso estudo por uma equipe treinada e as amostras foram semeadas imediatamente em meio ágar chocolate PolyVitex VCAT3 (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France), meio descrito por Thayer e Martin modificado com VCNT (vancomicina, colistina, nistatina e trimetoprim) (THAYER; MARTIN, 1966), sendo transportado até o laboratório em uma jarra com vela, em temperatura ambiente, no período máximo de 4 horas.

É importante salientar que a perda de seguimento, um fator comumente associado aos estudos longitudinais, também pode influenciar no número de portadores identificados em cada coleta. Apesar dos nossos esforços, essa perda correspondeu a 30,6% ($n=128/418$) dos participantes do nosso estudo e, desse total, 16 (12,5%; $n=16/128$), tinham pelo menos um resultado positivo para Nm, o que seria importante para o acompanhamento do estado de portador que havíamos proposto. Entre os 128 alunos que desistiram de participar do estudo, 71,9% ($n=92/128$) justificaram o desejo de não dar continuidade às coletas em função do incômodo decorrente da coleta do *swab* de orofaringe. Para 23,4% ($n=30/128$) dos estudantes não foi possível o contato por telefone e 4,7% ($n=6/128$) não retornaram por outros motivos, como a transferência para outra faculdade. Da mesma forma, outros estudos longitudinais com portadores de Nm verificaram perdas de 18,2 a 66,8% dos participantes (GLITZA et al., 2008; BIDMOS et al., 2011; MCMILLAN et al., 2019; CHOI et al., 2021).

Seguindo o método proposto por Cooper e colaboradores (2019b), a aquisição de Nm foi definida como a obtenção de um resultado negativo na linha de base e um resultado positivo em qualquer uma das coletas subsequentes. Deste modo, a taxa de aquisição do meningococo relatada em nosso estudo (3,2%) foi inferior àquela reportada por outras investigações longitudinais: 13,9% na Alemanha (GLITZA et al., 2008), 25% (JORDENS et al., 2004) e 35,8% no Reino Unido (ALA'ALDEEN et al., 2000). Vale ressaltar que em

diversos países da Europa e nos Estados Unidos é comum os indivíduos saírem da casa dos pais e residirem em dormitórios para frequentar a universidade. Entretanto, de forma geral, isso não ocorre no Brasil, onde os estudantes normalmente permanecem com a família durante o período da graduação. Desta forma, esses indivíduos são menos expostos a ambientes aglomerados, que consistem em um importante fator de risco para a aquisição do estado de portador de Nm.

A frequência a festas/bares também é um fator de risco para a aquisição do meningococo descrito na literatura (MACLENNAN et al., 2006; BREAKWELL et al., 2018). Apesar do tamanho limitado da nossa população de estudo, o nosso trabalho demonstrou que a frequência a esses eventos pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento aumentou em 4,37 vezes a chance de colonização, provavelmente em razão da aglomeração de indivíduos nesses locais, que pode potencializar a transmissão da bactéria. Outros estudos também já reportaram essa associação com o estado de portador (DE MORAES et al., 2015; GIOIA et al., 2015; MORENO et al., 2015; NUNES et al., 2016; BREAKWELL et al., 2018; FERREIRA et al., 2020; GENTILE et al., 2021; DE LEMOS., 2022). Todavia, é importante ressaltar que o pequeno número de indivíduos que adquiriram o meningococo ($n=12$) ao longo do estudo pode ter influenciado no poder estatístico das nossas análises. Alcançar a significância estatística é muitas vezes difícil nas investigações com portadores, uma vez que o número de participantes colonizados pode ser baixo e a quantidade de indivíduos amostrados nesses estudos é frequentemente limitada por razões logísticas.

De acordo com a literatura, o estado de portador de Nm é um fenômeno que depende da idade, sendo que a prevalência é baixa nos primeiros anos de vida (menos que 3%), aumentando na adolescência e atingindo o pico no início da vida adulta, entre 20 e 24 anos de idade (CARTWRIGHT et al., 1987; CAUGANT et al., 1988; BLACKWELL et al., 1990; CAUGANT et al., 1994; CHRISTENSEN et al., 2010). A associação entre a aquisição do meningococo e a idade dos participantes não foi encontrada no nosso estudo, assim como em outras investigações no Brasil e na América Latina (DE MORAES et al., 2015; NUNES et al., 2016; CHAMORRO et al., 2019; FERREIRA et al., 2020; DE LEMOS et al., 2022).

Da mesma forma, o sexo masculino tem sido associado positivamente com o estado de portador de Nm (CAUGANT et al., 1994; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; GIOIA et al., 2015; BREAKWELL et al., 2018; FERREIRA et al., 2020). Apesar da taxa de aquisição ter sido maior entre os homens (5,4%) do que entre as mulheres (3,2%), essa associação não foi estatisticamente significativa no nosso trabalho bem como em outras investigações realizadas no Brasil (DE MORAES et al., 2015; NUNES et al., 2016; WECKX

et al., 2017; DE LEMOS et al., 2022) e na América do Sul (RODRÍGUEZ et al., 2014; MORENO et al., 2015; GENTILE et al., 2021). É importante ressaltar, entretanto, que a maioria dos indivíduos que participaram do nosso estudo era formada por estudantes do sexo feminino (62,4%).

Assim como relatado por Nunes e colaboradores (2016) e Weckx e colaboradores (2017), o nosso estudo demonstrou, embora sem significância estatística, que uma maior densidade domiciliar aumentou em 2,49 vezes a chance de ser portador de Nm. Este fato está relacionado à proximidade entre os indivíduos que compartilham o cômodo da residência, aumentando a transmissão do meningococo.

A associação entre um baixo nível de escolaridade da mãe e um maior risco de adquirir o meningococo é evidenciada em alguns estudos, refletindo as condições socioeconômicas dos indivíduos (DAVIES et al., 1996; YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004; DE MORAES et al., 2015; NUNES et al., 2016; FERREIRA et al., 2020). Ao contrário do que se observa na literatura, o nosso trabalho encontrou uma maior chance de ser portador entre os participantes cujas mães tinham o ensino superior completo, embora sem significância estatística. É importante lembrar que 82,1% ($n=343/418$) dos alunos afirmaram que a genitora possuía pelo menos o ensino médio completo. Este dado reflete as condições socioeconômicas dos participantes, considerando que o nosso estudo utilizou uma amostra de conveniência e que foi conduzido em uma universidade particular de Salvador, onde, de forma geral, os alunos têm um nível socioeconômico mais alto, e conseqüentemente, os pais teriam, provavelmente, um nível de escolaridade maior.

Apesar de alguns estudos encontrarem associação entre a colonização por Nm e ser fumante ativo (STUART et al., 1989; BLACKWELL et al., 1990; BLACKWELL et al., 1992; KREMASTINOY et al., 1994; BREAKWELL et al., 2018), esse resultado não foi evidenciado no nosso trabalho, embora a chance de se tornar portador tenha sido maior entre os alunos que tinham esse tipo de exposição (sem significância estatística). Entretanto, vale ressaltar que o pequeno número de fumantes ativos reportados nesse estudo pode ter influenciado no poder de detecção dessa associação.

Do mesmo modo, diversas investigações apontam a presença de infecções respiratórias como um fator de risco para a aquisição do estado de portador de Nm (MUELLER et al., 2008; BREAKWELL et al., 2018; COOPER et al., 2019b). O nosso trabalho evidenciou que os participantes que relataram sintomas de gripe pelo menos três vezes durante o período de acompanhamento tiveram uma chance duas vezes maior de se tornarem portadores, embora esse resultado não seja estatisticamente significativo. Alguns

autores propõem que a infecção respiratória (viral ou bacteriana) pode reduzir a imunidade da mucosa, aumentando assim o risco tanto de colonização assintomática pela Nm quanto o desenvolvimento de doença invasiva (MUELLER et al., 2008; COOPER et al., 2019b). Além disso, nós encontramos uma associação positiva, embora sem significância estatística, entre a prática de sexo oral e uma maior chance de colonização pelo meningococo. Esse resultado também foi reportado por Moreno e colaboradores (2015). Considerando que casos de infecção do trato urogenital causados por Nm têm sido reportados nos últimos anos (URRA et al., 2005; MIGLIETTA et al., 2018; LADHANI et al., 2020; TINGGAARD et al., 2021), a prática de sexo oral poderia aumentar tanto a transmissibilidade do meningococo quanto a chance da Nm e da *Neisseria gonorrhoeae* de compartilharem o mesmo ambiente, possibilitando a troca de material genético entre as duas espécies bacterianas.

Não foi possível estabelecer uma associação entre a variável contato com alguém diagnosticado com meningite e aquisição de Nm em razão da ausência de portadores entre aqueles que relataram essa exposição. Contudo, diversos estudos demonstram que o contato com indivíduos diagnosticados com DM aumenta a chance de aquisição da bactéria e, portanto, é indicada a quimioprofilaxia para os contactantes. (OLCÉN et al., 1981; COOKE et al., 1989; CARDEÑOSA et al., 2001).

Em relação à imunização contra o NmC, foi identificado um fator de proteção entre os participantes que foram vacinados bem como uma menor taxa de aquisição do meningococo. Entretanto, esses resultados não foram estatisticamente significantes. Da mesma forma, Ferreira e colaboradores (2020) encontraram uma prevalência de portadores 40% menor entre os participantes que haviam tomado a vacina MCC. Esses achados estão de acordo com a literatura, que afirma que as vacinas conjugadas são capazes de prevenir o estado de portador de Nm, bem como reduzir a colonização e a transmissão, podendo resultar em proteção indireta dos indivíduos não vacinados (TROTTER; MAIDEN, 2009; SÁFADI; BEREZIN; OZELKA, 2012). Todavia, é importante lembrar que apenas 28,9% ($n=121/418$) dos participantes do nosso estudo informaram terem sido imunizados com a vacina MCC.

Nos estudos anteriores realizados com portadores pelo nosso grupo em Salvador (NUNES et al., 2016; MOURA et al., 2017; FERREIRA et al., 2020), nós sugerimos que a baixa prevalência de cepas do genogrupo C poderia estar relacionada à campanha de imunização com a vacina MCC realizada em 2010, que abrangeu tanto crianças menores de cinco anos de idade quanto adolescentes e adultos jovens de 10 a 24 anos em Salvador (CARDOSO et al., 2012). A duração da imunidade conferida pela vacina MCC ainda é desconhecida, mas parece estar associada principalmente à idade do indivíduo no momento da

vacinação (DE WALS, 2006; DE WALS et al., 2011). A queda de anticorpos protetores um ano ou mais após a vacinação é observada em todas as faixas etárias, embora essa queda seja mais expressiva entre os indivíduos mais jovens, que foram vacinados antes dos dois anos de idade (DE WALS et al., 2011; BORROW et al., 2013; FINDLOW et al., 2019). Por outro lado, a imunização de pessoas de uma faixa etária mais alta com a vacina MCC, parece conferir uma proteção mais duradoura, podendo atingir mais de 90% de eficácia até oito anos após a vacinação (DE WALS et al., 2011; BORROW et al., 2013; FINDLOW et al., 2019).

Outro ponto importante a ser destacado é que um número expressivo de estudantes ($n=196/418$; 46,9%) não soube informar o seu *status* vacinal. Esse fato pode ter prejudicado a análise dos dados, considerando que parte desses alunos pode ter sido imunizada e desconhecem essa informação. Além disto, é importante enfatizar que as taxas de cobertura vacinal para Nm, como para outras doenças imunopreveníveis, estão caindo vertiginosamente no país, agravadas pela pandemia de COVID-19 e impulsionadas pelos movimentos antivacina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES, 2021; ALDERSON et al., 2022).

A obtenção da carteira de vacinação dos estudantes foi uma das maiores dificuldades enfrentadas pela equipe de pesquisa. Isso reflete a necessidade de um sistema informatizado amplo para o registro de imunização com dados nominais no Brasil. Com a informatização desses dados, uma melhor acurácia das informações de vacinação pode ser obtida, a exemplo da cobertura vacinal, o que poderia impactar na tomada de decisão dos gestores de saúde. Entretanto, desafios que abrangem o processo de implantação, manutenção, treinamento dos profissionais de saúde bem como a confidencialidade dos dados inseridos no sistema parecem retardar essa necessidade.

Quanto ao sequenciamento do genoma total das cepas de Nm identificadas neste estudo, a maioria dos isolados (88,7%; $n=102/115$) foi caracterizada como não-grupável e, desse total, 81,4% ($n=83/102$) das cepas eram *cnl* positivas, sendo esse resultado semelhante àquele observado em outro estudo realizado em Salvador pelo nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2020). Uma predominância de cepas NG é comumente reportada em estudos com portadores assintomáticos de Nm (RODRÍGUEZ et al., 2014; DE MORAES et al., 2015; MORENO et al., 2015; MOURA et al., 2017; WECKX et al., 2017; GENTILE et al., 2021; DE LEMOS et al., 2022). De fato, a ausência de expressão da cápsula polissacarídica, seja pela deleção do gene responsável pela sua síntese ou pela sua supressão (regulação negativa), aumenta a capacidade do meningococo de aderir à mucosa da

nasofaringe e orofaringe (HAMMERSCHMIDT et al., 1994; TZENG; THOMAS; STEPHENS, 2016).

A identificação de cepas do genogrupo B entre a população estudada está de acordo com a literatura, reforçando a presença desse genogrupo em amostras de portadores (GASPARINI et al., 2014; DE MORAES et al., 2015; DÍAZ et al., 2016; MOURA et al., 2017; BREAKWELL et al., 2018; FERREIRA et al., 2020; DE LEMOS et al., 2022). Do mesmo modo, o NmB é o segundo sorogrupo mais prevalente no Brasil, correspondendo a 19,9% dos casos de DM registrados entre 2005 e 2018 e está presente em todas as regiões do país (NUNES et al., 2021).

É interessante notar que nenhum isolado do genogrupo C foi identificado nesse estudo. Outras investigações também demonstraram uma baixa prevalência desse genogrupo entre cepas de Nm provenientes de portadores saudáveis (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; DÍAZ et al., 2016; MOURA et al., 2017; BREAKWELL et al., 2018; FERREIRA et al., 2020). De acordo com Caugant, Tzanakaki e Kriz (2007), o genogrupo C está mais associado a doença invasiva quando comparado ao genogrupo B, e por isso, é menos propenso à colonização assintomática, sendo, portanto, menos frequente entre os isolados de portadores.

Foi observada uma alta diversidade genética entre os isolados de Nm reportados nesse estudo, com 19 STs identificados e distribuídos em oito complexos clonais, o que está em concordância com outros trabalhos (CAUGANT et al., 1988; ALA'ALDEEN et al., 2000; BIDMOS et al., 2011; MOURA et al., 2017; FERREIRA et al., 2020). Entre os complexos clonais identificados, o cc198 foi o mais prevalente e estava associado às cepas *cnl*, sendo que esse resultado era esperado, considerando que o cc198 é comumente encontrado entre isolados de portadores assintomáticos (CLAUS et al., 2005; MOURA et al., 2017; FERREIRA et al., 2020; DE LEMOS et al., 2022).

Do mesmo modo, outros complexos clonais associados a amostras de portadores, como cc53, cc162, cc1136 e o cc1572 (CAUGANT; MAIDEN, 2009; GASPARINI et al., 2014; BREAKWELL et al., 2018) foram identificados em menor proporção no nosso estudo. O nosso trabalho também encontrou complexos clonais associados a cepas invasivas como o cc4821, cc32 e o cc41/44, a maioria correspondendo ao genogrupo B (JOUNIO et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2014; DE MORAES et al., 2015; BREAKWELL et al., 2018). Apesar de recentemente ter sido apontada a crescente circulação dos complexos clonais cc213, cc35 e cc461 entre os isolados de DM associados ao genogrupo B no Brasil (DE LEMOS et al., 2020), nós não identificamos esses complexos clonais no nosso estudo com portadores. Além disto, apenas 8,7% ($n=10$) das cepas de Nm corresponderam ao genogrupo B.

Foi observada uma alta variabilidade das proteínas da membrana externa em relação aos complexos clonais identificados, o que corrobora os achados de outros estudos (GASPARINI et al., 2014; MOURA et al., 2017; BREAKWELL et al., 2018; FERREIRA et al., 2020). Entretanto, vale ressaltar que os estudos que realizam a caracterização das proteínas da membrana externa em isolados de portadores são escassos na literatura.

As três variantes de FHbp estavam presentes entre os isolados analisados, sendo que as variantes 2 e 3 (subfamília A) foram as mais prevalentes, enquanto a variante 1 (subfamília B) foi encontrada em menor proporção, o que está em concordância com outros trabalhos sobre portadores (MARSH et al., 2011; GASPARINI et al., 2014; MOURA et al., 2017; FERREIRA et al., 2020). De fato, a variante 1 do FHbp tem sido descrita como predominante em cepas de Nm causadoras de doença invasiva (BAMBINI et al., 2009; DE LEMOS et al., 2020). Além disso, o nosso estudo demonstrou uma prevalência da variante F5-5 de FetA, da subvariante 912 da NHBA e da PorB de classe 3 semelhante àquela encontrada nos estudos conduzidos no mesmo município por Moura e colaboradores (2017) e Ferreira e colaboradores (2020). Em relação à proteína NadA, a maioria dos isolados não possuía o gene codificante dessa proteína, o que reforça os achados da literatura que apontam uma menor prevalência de NadA entre cepas de portadores assintomáticos de Nm (COMANDUCCI et al., 2004). Por outro lado, entre as variantes encontradas, nós identificamos a NadA-1.1 associada ao complexo clonal hipervirulento cc32, estando de acordo com os resultados reportados por outros trabalhos (COMANDUCCI et al., 2004; MOURA et al., 2017; BREAKWELL et al., 2018).

Nenhuma das variantes antigênicas presentes nas vacinas 4CMenB (Bexsero®) e rLP2086 bivalente (Trumenba®) foram encontradas no nosso estudo. No Brasil, ambas as vacinas já foram licenciadas e estão disponíveis apenas na rede particular, sendo a 4CMenB indicada a partir dos dois meses de idade até 50 anos (SÁFADI et al., 2017), enquanto a rLP2086 bivalente é recomendada apenas para indivíduos entre 10 e 25 anos de idade (BRASIL, 2019). Desta forma, faz-se necessária uma vigilância contínua para avaliar o impacto que medidas como a vacinação podem ter sobre a população de meningococos. Entretanto, já foi demonstrado que a vacina 4CMenB tem pouco ou nenhum efeito na redução da colonização por Nm (READ et al., 2014; BREAKWELL et al., 2018).

A média de tempo de colonização pela Nm foi estimada em 22,5 semanas no nosso trabalho, o que está em concordância com outros estudos (ALA'ALDEEN et al., 2000; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; GLITZA et al., 2008; BIDMOS et al., 2011; JEPPESEN et al., 2015). Nós identificamos sete indivíduos que permaneceram colonizados

durante todo o período de acompanhamento (38,8 semanas). A colonização por Nm de longa duração também foi reportada por De Wals e colaboradores (9,4 meses) (1983) e Van Ravenhorst e colaboradores (8 meses) (2017).

Além dos fatores inerentes ao hospedeiro, a duração do estado de portador parece estar associada às características da cepa colonizadora, sendo que nem todas as cepas de meningococo têm a capacidade de estabelecer uma relação de longo prazo com o hospedeiro (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; SHARMA et al., 2021). Vale ressaltar que a duração do estado de portador relatada pelas investigações longitudinais varia consideravelmente. Esse fato tem relação direta com o tempo de acompanhamento dos indivíduos em cada estudo e o intervalo entre as coletas. Poucos estudos tiveram um período de acompanhamento superior a seis meses (DE WALS et al., 1983; JOUNIO et al., 2012; VAN RAVENHORST et al., 2017; BASTA et al., 2018).

No presente trabalho, foi observado que a duração do estado de portador foi semelhante entre os participantes que tinham dois (17,9 semanas) e três (18 semanas) resultados positivos para Nm. É importante lembrar que, por uma questão de logística, o intervalo entre as coletas não foi uniforme no nosso estudo, variando de um a três meses. Além disso, a coorte era dinâmica, com a entrada dos participantes em momentos diferentes do trabalho. Esses fatores podem ter superestimado a duração do estado de portador encontrada no nosso estudo. Por outro lado, a perda de seguimento pode ter prejudicado o cálculo do tempo de colonização assintomática.

A duração do estado de portador foi maior (28,5 semanas) entre os participantes que estavam colonizados por cepas de Nm do genogrupo B do que entre aqueles cujas cepas eram NG (21,9 semanas). Todavia, apenas três participantes albergaram o meningococo do genogrupo B durante o trabalho. Outros estudos também sugerem que a colonização pelo genogrupo B pode persistir durante meses (DE WALS et al., 1983; ALA'ALDEEN et al., 2000; JORDENS et al., 2004; VAN RAVENHORST et al., 2017). Do mesmo modo, entre os 18 participantes com apenas 1 coleta positiva para Nm, 15 (83,3%; $n=15/18$) albergavam cepas *cnl*. Isso poderia sugerir uma associação entre cepas *cnl* e uma menor duração do estado de portador de Nm. Entretanto, desse total, 12 alunos não participaram de todas as coletas. Portanto, mais estudos são necessários para determinar uma associação entre o tempo de colonização assintomática e o tipo capsular de Nm.

Nós observamos que a maioria (79,3%) dos alunos permaneceu colonizada pela mesma cepa de Nm ou por cepas idênticas, que expressaram uma pequena modificação em um epítipo da VR2 da PorA ao longo do período de acompanhamento. Essas pequenas

modificações parecem ser importantes para a adaptação da bactéria ao organismo do hospedeiro, principalmente entre os indivíduos com colonização persistente (ANDERSEN et al., 1998; ALA'ALDEEN et al., 2000; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; GLITZA et al., 2008; BIDMOS et al., 2011; JOUNIO et al., 2012; GASPARINI et al., 2014; JEPPESEN et al., 2015). Todavia, o acúmulo dessas modificações no genoma dos isolados de portadores de Nm pode resultar, potencialmente, em um aumento da virulência da bactéria (VAN RAVENHORST et al., 2017). Por outro lado, um estudante (nº 148) albergou cepas distintas durante o estudo. Enquanto o isolado da segunda coleta (B:P1.17-6,23-2:F3-36:ST11311 (cc4821) era semelhante àqueles da quarta e da quinta coletas (B:P1.17-6,23:F3-36:ST11311 (cc4821), a cepa identificada na terceira coleta mostrou-se distinta das demais (NG:P1.12-30,13-70:F5-5:ST7129 (cc não definido). Embora seja considerado um fenômeno raro, a colonização simultânea por mais de uma cepa de Nm já foi demonstrada por Andersen e colaboradores (1998) e Caugant, Tzanakaki e Kriz (2007) e está associada à colonização persistente, indicando que a recombinação entre essas cepas pode gerar novos genótipos que podem ser selecionados dentro do hospedeiro. Desta forma, a detecção de cepas distintas de Nm provenientes de uma mesma amostra está diretamente relacionada ao número de colônias bacterianas escolhidas para o repique em laboratório, sendo que a probabilidade de detecção desse fenômeno aumenta para 80% quando são escolhidas 15 colônias bacterianas (CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007). No nosso estudo, por razões logísticas e limitação de recursos, apenas uma colônia bacteriana foi escolhida de cada placa, assim como foi realizado em outras investigações (ANDERSEN et al., 1998; CARTWRIGHT, 2001; GASPARINI et al., 2014). Esta é uma limitação que pode ter dificultado a identificação de colonização simultânea por cepas distintas de Nm.

Outra hipótese que podemos sugerir é de que houve uma substituição de cepa ao longo do estudo, ou seja, a cepa da segunda coleta foi substituída na coleta seguinte, sendo que o participante nº 148 pode ter sido colonizado novamente na quarta coleta por uma cepa semelhante àquela identificada na segunda etapa. Assumindo que essa hipótese é verdadeira, isso reforçaria os achados reportados por alguns estudos que mostram que a colonização por uma cepa de Nm não protege contra a aquisição de cepas homólogas ou heterólogas (ALA'ALDEEN et al., 2000; CAUGANT; TZANAKAKI; KRIZ, 2007; BIDMOS et al., 2011; GASPARINI et al., 2014; VAN RAVENHORST et al., 2017).

7 CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos para este trabalho, podemos tirar as seguintes conclusões:

1 – Foi identificada uma baixa taxa de aquisição (3,2%) de Nm entre estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade, estando associada a uma maior frequência a festas/bares;

2 – A maioria das cepas (88,7%) de Nm identificadas mostrou-se não-grupável;

3 – Foi encontrada uma alta diversidade genética entre as cepas analisadas, bem como a circulação de complexos clonais associados a doença invasiva;

4 - O estado de portador se mostrou duradouro, com média de 22,5 semanas, sendo a colonização mantida, em geral, pela mesma cepa ou por cepas idênticas de Nm;

5 - Reforçamos a necessidade de contínua vigilância das cepas de meningococo circulantes na população de portadores, com o intuito de compreender melhor a epidemiologia da DM, além de embasar medidas de saúde pública e avaliar o impacto de programas de vacinação.

REFERÊNCIAS

- ABAD, R. et al. Serogroup W meningococcal disease: global spread and current affect on the Southern Cone in Latin America. **Epidemiol Infect.** Vol. 142, p. 2461-2470, 2014.
- ACEVEDO, R. et al The Global Meningococcal Initiative meeting on prevention of meningococcal disease worldwide: Epidemiology, surveillance, hypervirulent strains, antibiotic resistance and high-risk populations. **Expert Rev Vaccines.** vol. 18, p. 15-30, 2019.
- ALA'ALDEEN, D. A. et al. Carriage of meningococci by university students, United Kingdom. **Emerg Infect Dis.** vol. 17, p. 1762-1763, 2011.
- ALA'ALDEEN, D. A. et al. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. **J Clin Microbiol.** vol. 38, p. 2311-2316, 2000.
- ALDERSON, M. R. et al. Surveillance and control of meningococcal disease in the COVID-19 era: A Global Meningococcal Initiative review. **J Infect.** vol. 84, p. 289-296, 2022.
- AL-MAZROU, Y. et al. Serologic responses to ACYW135 polysaccharide meningococcal vaccine in Saudi children under 5 years of age. **Infect Immun.** vol. 73, p. 2932-2939, 2005.
- 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. **Epid. & Infect.**, vol. 121, n. 1, p. 85-94, 1998.
- ANDRADE, A. L. et al. Impact of meningococcal C conjugate vaccination four years after introduction of routine childhood immunization in Brazil. **Vaccine**, v. 35, p. 2025–2033, 2017.
- ARTENSTEIN, M. S. et al. Acute respiratory disease and meningococcal infection in army recruits. **JAMA.** vol. 201, p. 1004-1007, 1967.
- BALMER, P.; BORROW, R.; MILLER, E. Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. **J Med Microbiol.** vol. 51, p. 717-722, 2002.
- BALMER, P. et al. Impact of meningococcal vaccination on carriage and disease transmission: a review of the literature. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1118-1130, 2018.
- BAMBINI, S. et al. Distribution and genetic variability of three vaccine components in a panel of strains representative of the diversity of serogroup B meningococcus. **Vaccine**, v. 27, n. 21, p. 2794-2803, 2009.
- BASTA, NE. et al. Meningococcal carriage within households in the African meningitis belt: A longitudinal pilot study. **J Infect.** vol. 76, p. 140-148, 2018.

BENNETT, J.S. et al. A common gene pool for the *Neisseria* FetA antigen. **Int J Med Microbiol.** vol. 299, p. 133-139, 2009.

BIDMOS, F. A. et al. Persistence, replacement, and rapid clonal expansion of meningococcal carriage isolates in a 2008 university student cohort. **J Clin Microbiol.** vol. 49, n. 2, p. 506-512, 2011.

BJUNE, G. et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. **Lancet.** vol. 338, p. 1093-1096, 1991.

BLACKWELL, C. C. et al. Factors affecting carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek military recruits. **Epidemiol Infect.** vol. 108, p. 441-448, 1992.

BLACKWELL, C. C. et al. Secretor status, smoking and carriage of *Neisseria meningitidis*. **Epidemiol Infect.** vol. 104, n. 2, p. 203-209, 1990.

BLAKEBROUGH, I. S. et al. The epidemiology of infections due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in a northern Nigerian community. **J Infect Dis.** vol. 146, p. 626-637, 1982.

BOISIER, P. et al. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. **Clin Infect Dis.** vol. 44, p. 657-663, 2007.

BOLGIANO, B. et al. Evaluation of Critical Quality Attributes of a Pentavalent (A, C, Y, W, X) Meningococcal Conjugate Vaccine for Global Use. **Pathogens.** Vol. 10, p. 1-17, 2021.

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

BORROW, R. et al. Global Meningococcal Initiative. Meningococcal disease in the Asia-Pacific region: Findings and recommendations from the Global Meningococcal Initiative. **Vaccine.** vol. 34, p. 5855-5862, 2016.

BORROW, R. et al. Global Meningococcal Initiative. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. **Expert Rev Vaccines.** vol. 16, n. 4, p. 313-328, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Aprovado registro de nova vacina contra meningite B.** Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/aprovado-registro-de-nova-vacina-contrameningite-b>. 2019. Acesso em: 16 de março de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Calendário de vacinação da criança.** Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2020/calendario-de-vacinacao-2020_crianca-1.pdf/view. Acesso em 22 de dezembro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Calendário de vacinação de adolescente.** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de->

vacinacao/calendario-vacinal-2020/calendario-de-vacinacao-2020_adolescente.pdf/view.
Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

BREAKWELL, L. et al. Meningococcal carriage among a university student population - United States, 2015. **Vaccine**. vol. 36, p. 29-35, 2018.

BRÖKER, M. et al. Meningococcal serogroup Y disease in Europe: Continuation of high importance in some European regions in 2013. **Hum Vaccin Immunother**. vol. 11, p. 2281-2286, 2015.

BRYNILDSRUD, O. B. et al. Acquisition of virulence genes by a carrier strain gave rise to the ongoing epidemics of meningococcal disease in West Africa. **Proc Natl Acad Sci**. vol. 115, p. 5510-5515, 2018.

BURIAN, V.; FOFANA, Y.; SOW, O. A study of *Neisseria meningitidis* isolated in the Republic of Mali in 1970. **Bull World Health Organ**. vol. 51, n. 5, p. 495-500, 1974.

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

CAMPBELL, H. et al. Presentation with gastrointestinal symptoms and high case fatality associated with group W meningococcal disease (MenW) in teenagers, England. **Euro Surveill**, v. 21, 2016.

CARDEÑOSA, N. et al. Carriers of *Neisseria meningitidis* in household contacts of meningococcal disease cases in Catalonia (Spain). **Eur J Epidemiol**. vol. 17, p. 877-884, 2001.

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

CARTWRIGHT, K. A. Epidemiology, surveillance, and population biology: carriage studies. **Methods Mol Med**. vol. 67, p. 293-311, 2001.

CARTWRIGHT, K. A. et al. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. **Epidemiol Infect**. vol. 99, p. 591-601, 1987.

CARTWRIGHT, K. A. The Stonehouse survey. **Epidemiol Infect**. vol. 133, Supl. 1, p. S37-S39, 2005.

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

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

CAUGANT, D. A. et al. Transmission of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis. **Epidemiol Infect**. vol. 109, p. 241-253, 1992.

- CAUGANT, D. A.; MAIDEN, M. C. Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution. **Vaccine**. vol. 27, p. b64-b70, 2009.
- CAUGANT, D. A.; TZANAKAKI, G.; KRIZ, P. Lessons from meningococcal carriage studies. **FEMS Microbiol Rev**. vol. 31, p. 52-63, 2007.
- CHAMORRO, G. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and other *Neisseria* species among children and young adults in Paraguay. **J Med Microbiol**. vol. 68, p. 1793-1801, 2019.
- CHEN, W. H. et al. Safety and immunogenicity of a pentavalent meningococcal conjugate vaccine containing serogroups A, C, Y, W, and X in healthy adults: a phase 1, single-centre, double-blind, randomised, controlled study. **Lancet Infect Dis**. vol. 18, p. 1088-1096, 2018.
- CHILUKURI, S. R. et al. Process development and immunogenicity studies on a serogroup 'X' Meningococcal polysaccharide conjugate vaccine. **Biologicals**. vol. 42, p. 160-168, 2014.
- CHOI, H. et al. Longitudinal study of meningococcal carriage rates in university entrants living in a dormitory in South Korea. **PloS one**, v. 16, n. 1, p. e0244716, 2021.
- CHRISTENSEN, H. et al. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect. Dis.**, v.10, p.853-61, 2010.
- CLAUS, H. et al. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. **J Infect Dis**. vol. 191, p. 1263-1271, 2005.
- CLAUS, H. et al. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. **Microbiology**. Vol. 148, p. 1813-1819, 2002.
- COHN, A.; MACNEIL, J. The Changing Epidemiology of Meningococcal Disease. **Infect Dis Clin North Am**. vol. 29, p. 667-677, 2015.
- COMANDUCCI, M. et al. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. **J Exp Med**. vol. 195, n. 11, p. 1445-1454, 2002.
- COMANDUCCI, M. et al. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun**. vol. 72, p. 4217-4223, 2004.
- COOKE, R. P. et al. Secondary cases of meningococcal infection among close family and household contacts in England and Wales, 1984-7. **BMJ**. vol. 298, p. 555-558, 1989.
- COOPER, L. V. et al. Meningococcal carriage by age in the African meningitis belt: a systematic review and meta-analysis. **Epidemiol Infect**. vol. 147, p. 1-9, 2019a.
- COOPER, L. V. et al. Risk factors for acquisition of meningococcal carriage in the African meningitis belt. **Trop Med Int Health**. vol. 24, p. 392-400, 2019b.
- CORDEIRO, S. M. et al. Dissemination of the ST-103 clonal complex serogroup C meningococci in Salvador, Brazil. **Microb. Infect.**, v.20, p.19-24, 2018.

- CRUM-CIANFLONE, N.; SULLIVAN, E. Meningococcal Vaccinations. **Infect. Dis. Ther.** v.5, p. 89-112, 2016.
- CUNNINGHAM, R. et al. Improved rate of isolation of *Neisseria meningitidis* by direct plating of pharyngeal swabs. **J Clin Microbiol.** vol. 39, p. 4575-4576, 2001.
- DAUGLA, D. M. et al. Effect of a serogroup A meningococcal conjugate vaccine (PsA-TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in Chad: a community study. **Lancet.** vol. 383, p. 40-47, 2014.
- DAVIES, A. L. et al. Risk factors for *Neisseria meningitidis* carriage in a school during a community outbreak of meningococcal infection. **Epidemiol Infect.** vol. 117, p. 259-266, 1996.
- DE FILIPPIS, I.; VICENTE, A. C. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. **Diagn Microbiol Infect Dis.** vol. 53, p. 161-167, 2005.
- DE LEMOS, A. P. et al. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. **J Clin Microbiol.** vol. 45, p. 1266-1273, 2007.
- DE LEMOS, A. P. et al. Emergence of *Neisseria meningitidis* W South American sublineage strain variant in Brazil: disease and carriage. **J Med Microbiol.** vol. 71, p., 2022.
- DE LEMOS, A. P. et al. Genomic surveillance of *Neisseria meningitidis* serogroup B invasive strains: Diversity of vaccine antigen types, Brazil, 2016-2018. **PLoS One.** vol. 15, p. 1-17, 2020.
- DELLICOUR, S.; GREENWOOD, B. Systematic review: Impact of meningococcal vaccination on pharyngeal carriage of meningococci. **Trop Med Int Health.** vol. 12, p. 1409-1421, 2007.
- DE MORAES, J. C.; BARATA, R.B. A doença meningocócica em São Paulo, Brasil, no século XX: características epidemiológicas. **Cad. Saúde Públ.**, v.21, p.1458-1471, 2005.
- DE MORAES, J. C. et al. Prevalence of meningococcal carriage among adolescents in Campinas, Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.34, p.1197-202, 2015.
- DE MORAES, J. C. et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. **Lancet.** vol. 340, p. 1074-1078, 1992.
- DE MORAIS, J. S. et al. Epidemic Disease due to Serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo, Brazil, **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 129, p. 568–571, 1974.
- DE SOUZA, A. L.; SEGURO, A. C. Two centuries of meningococcal infection: from Vieusseux to the cellular and molecular basis of disease. **J Med Microbiol.** vol. 57, p. 1313-1321, 2008.

- DE WALSH, P. et al. Effectiveness of serogroup C meningococcal conjugate vaccine: a 7-year follow-up in Quebec, Canada. **Pediatr Infect Dis J.** vol. 30, p. 566-569, 2011.
- DE WALSH, P. et al. Longitudinal study of asymptomatic meningococcal carriage in two Belgian populations of schoolchildren. **J Infect.** vol. 6, p. 147-156, 1983.
- DE WALSH, P. Immunization strategies for the control of serogroup C meningococcal disease in developed countries. **Expert Rev Vaccines.** vol. 5, p. 269-275, 2006.
- DÍAZ, J. et al. Prevalence of meningococcal carriage in children and adolescents aged 10-19 years in Chile in 2013. **J Infect Public Health.** vol. 9, p. 506-515, 2016.
- DJIBO, S. et al. Outbreaks of serogroup X meningococcal meningitis in Niger 1995-2000. **Trop Med Int Health.** vol. 8, p. 1118-1123, 2003.
- DRETLER, A. W.; ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for future vaccine development. **Hum Vaccin Immunother.** vol. 14, p. 1146-1160, 2018.
- DUDLEY, S. F.; BRENNAN, J. R. High and Persistent Carrier Rates of *Neisseria meningitidis*, unaccompanied by Cases of Meningitis. **J Hyg (Lond).** vol. 34, p. 525-541, 1934.
- DUREY, A. et al. Carriage rates and serogroups of *Neisseria meningitidis* among freshmen in a University dormitory in Korea. **Yonsei Med J.** vol. 53, p. 742-747, 2012.
- DWIVEDI, S. et al. Antigen sequence typing of outer membrane protein (fetA) gene of *Neisseria meningitidis* serogroup A from Delhi & adjoining areas. **Indian J Med Res.** vol. 140, p. 766-769, 2014.
- EVANS, J. R.; ARTENSTEIN, M. S.; HUNTER, D. H. Prevalence of meningococcal serogroups and description of three new groups. **Am J Epidemiol.** vol. 87, p. 643-646, 1968.
- FEAVERS, I. M. et al. Antigenic diversity of meningococcal outer membrane protein PorA has implications for epidemiological analysis and vaccine design. **Clin Diagn Lab Immunol.** vol. 3, n. 4, p. 444-450, 1996.
- FEAVERS, I. M. et al. Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun.** vol. 60, n. 9, p. 3620-3629, 1992.
- FEIJO, R. B.; CUNHA, J. Trajectory of serogroups causing Invasive Meningococcal Disease in Santa Catarina state, Brazil (2007-2019). **Braz J Infect Dis.** vol. 24, p. 349-351, 2020.
- FERREIRA, V. M. et al. Meningococcal carriage in young adults six years after meningococcal C conjugate (MCC) vaccine catch-up campaign in Salvador, Brazil. **Vaccine.** vol. 38, p. 2995-3002, 2020.
- FINDLOW, J. et al. Broad vaccine protection against *Neisseria meningitidis* using factor H binding protein. **Vaccine.** vol. 38, p. 7716-7727, 2020.

FINDLOW, H. et al. Serogroup C *Neisseria meningitidis* disease epidemiology, seroprevalence, vaccine effectiveness and waning immunity, England, 1998/99 to 2015/16. **Euro Surveill.** Vol. 24, p. 1-26, 2019.

FINDLOW, H. et al. Three cases of invasive meningococcal disease caused by a *capsule null locus* strain circulating among healthy carriers in Burkina Faso. **J Infect Dis.** vol. 195, p. 1071-1077, 2007.

FINNE, J. et al. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. **J Immunol.** vol. 138, p. 4402-4407, 1987.

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

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

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

GANESH, K. et al. Molecular characterization of invasive *capsule null Neisseria meningitidis* in South Africa. **BMC Microbiol.** vol. 17, p. 1-10, 2017.

GARCIA, Y. R. et al. A Decade of Fighting Invasive Meningococcal Disease: A Narrative Review of Clinical and Real-World Experience with the MenACWY-CRM Conjugate Vaccine. **Infect Dis Ther.** Vol. , p. 1-17, 2021.

GARDNER, S. N.; SLEZAK, T.; HALL, B. G. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome. **Bioinformatics.** vol. 31, n. 17, p. 2877-2878, 2015.

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

GENTILE, A. et al. Oropharyngeal meningococcal carriage in children and adolescents, a single center study in Buenos Aires, Argentina. **PLoS One.** vol. 16, p. 1-12, 2021.

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

GILCA, R. et al. A Longitudinal Epidemiology Study of Meningococcal Carriage in Students 13 to 25 Years Old in Quebec. **mSphere.** vol. 3, p. 1-13, 2018.

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

GLITZA, I. C. et al. Longitudinal study of meningococcal carrier rates in teenagers. **Int J Hyg Environ Health**, vol. 211, n. 3-4, p. 263-272, 2008.

GLOVER, J. A. Observations on the Meningococcus Carrier-Rate in Relation to Density of Population in Sleeping Quarters. **The Journal of Hygiene**, vol. 17, n. 4, p. 367-379, 1918.

GOLD, R. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. **J Infect Dis.** vol. 137, p. 112-121, 1978.

GOLDSCHNEIDER, I; GOTSCHLICH, E. C.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. **J Exp Med.** vol. 129, p. 1327-1348, 1969.

GORLA, M. C. et al. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive meningococcal disease in Brazil from 2002 to 2017. **Access Microbiol.** vol. 2, p. 34-43, 2019.

GREENFIELD, S; SHEEHE, P. R; FELDMAN, H. A. Meningococcal carriage in a population of "normal" families. **J Infect Dis.**, vol. 123, p. 67-73, 1971.

GUTIERREZ, N. N. et al. Prevalence and dynamics of asymptomatic carriers of *Neisseria meningitidis* in university students at a military school in the City of Havana. **Rev. Panam. Infectol.** vol. 8, p. 9-17, 2006.

HALPERIN, A. S. et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine.** vol. 30, Supl. 2, p. b26-b36, 2012.

HAMMERSCHMIDT, S. et al. Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. **Mol Microbiol.** vol. 11, p. 885-896, 1994.

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

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

HARRISON, O. B. et al. Description and Nomenclature of *Neisseria meningitidis* Capsule Locus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, p. 566-573, 2013.

HARRIS, S. L. et al. Age-related disparity in functional activities of human group C serum anticapsular antibodies elicited by meningococcal polysaccharide vaccine. **Infect Immun.** vol. 71, p. 275-286, 2003.

HOANG, L. M. et al. Rapid and fatal meningococcal disease due to a strain of *Neisseria meningitidis* containing the *capsule null locus*. **Clin Infect Dis.** vol. 40, p. 38-42, 2005.

HOLLINGSHEAD, S.; TANG, C. M. An Overview of *Neisseria meningitidis*. **Methods Mol Biol.** vol. 1969, p. 1-16, 2019.

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

HOLST, J. et al. Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future. **Hum Vaccin Immunother.** vol. 9, p. 1241-1253, 2013.

HUANG, L. et al. Potential public health impact of a *Neisseria meningitidis* A, B, C, W, and Y pentavalent vaccine in the United States. **Postgrad Med.** vol., p. 1-8, 2021.

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

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

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

JONES, G. R. et al. Dynamics of carriage of *Neisseria meningitidis* in a group of military recruits: subtype stability and specificity of the immune response following colonization. **J Infect Dis.** vol. 178, p. 451-459, 1998.

JORDENS, J. Z. et al. Development of immunity to serogroup B meningococci during carriage of *Neisseria meningitidis* in a cohort of university students. **Infect Immun.** vol. 72, p. 6503-6510, 2004.

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

KANAYAMA, A. et al. Carriage Rate and Characteristics of *Neisseria meningitidis* among Dormitory Students. **Jpn J Infect Dis.** vol. 74, p. 487-490, 2021.

KÄYHTY, H. et al. Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A *Neisseria meningitidis* followed for three years in infants and children. **J Infect Dis.** vol. 142, p. 861-868, 1980.

KELLY, D. F; POLLARD, A. J.; MOXON, E. R. Immunological memory: the role of B cells in long-term protection against invasive bacterial pathogens. **JAMA.** vol. 294, p. 3019-3023, 2005.

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

KIZIL, M. C. et al. Nasopharyngeal Meningococcal Carriage among Children and Adolescents in Turkey in 2018: An Unexpected High Serogroup X Carriage. **Children (Basel).** vol. 8, p. 1-10, 2021.

KORZENIEWSKI, K. et al. Effectiveness of immunoprophylaxis in suppressing carriage of *Neisseria meningitidis* in the military environment. **Adv Exp Med Biol.** vol. 836, p. 19-28, 2015.

KREMASTINO, J. et al. Parental smoking and carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek schoolchildren. **Scand J Infect Dis.** vol. 26, p. 719-723, 1994.

KRETZ, C. et al. Whole genome characterization of the emerging epidemic meningococcal serogroup C and resurgence and serogroup W in Niger, 2015. **Emerg. Infect. Dis.**, v.22, p.1762-1768, 2016.

LADHANI, S. N. et al. Meningococcal disease and sexual transmission: urogenital and anorectal infections and invasive disease due to *Neisseria meningitidis*. **Lancet.** vol. 395, p. 1865-1877, 2020.

LAWRENCE, G. L. et al. Meningococcal disease epidemiology in Australia 10 years after implementation of a national conjugate meningococcal C immunization programme. **Epidemiol Infect.** vol. 144, p. 2382-2391, 2016.

LAYBOURN, R. L. A study of epidemic meningitis in Missouri: epidemiological and administrative considerations. **South. Med. J.** vol. 24, p. 678-685, 1931.

LEPOW, M. L. et al. Persistence of antibody following immunization of children with groups A and C meningococcal polysaccharide vaccines. **Pediatrics.** vol. 60, p. 673-680, 1977.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Res.** vol. 44, n. 1, p. W242-245, 2016.

LIMA, K. M. S. et al. *Neisseria meningitidis* carriage in indigenous peoples of Amazonas State, Brazil. **J Infect.** vol. 80, p. 671-693, 2020.

LIPSITCH, M.; O'HAGAN, J. J. Patterns of antigenic diversity and the mechanisms that maintain them. **J R Soc Interface.** vol. 4, p. 787-802, 2007.

LUCIDARME, J. et al. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates that do not express the virulence factor and vaccine antigen factor H binding protein. **Clin Vaccine Immunol.** vol. 18, p. 1002-1014, 2011.

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

- MACEDO, L. E. N. et al. Impact of meningococcal C conjugate vaccination programs with and without catch-up campaigns in adolescents: Lessons learned from Bahia, Brazil. **Human vaccines & Immunotherap.**, vol. 14, p. 1131-1137, 2018.
- MACLENNAN, J. et al. Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. **Emerg Infect Dis.** vol. 12, p. 950-957, 2006.
- MAIDEN, M. C. et al. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. **Mol Microbiol.** vol. 5, p. 727-736, 1991.
- MAIDEN, M. C. et al. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. **J Infect Dis.** vol. 197, p. 737-743, 2008.
- MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci.** vol. 95, p. 3140-3145, 1998.
- MANDRELL, R. E.; GRIFFISS, J. M.; MACHER, B. A. Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. **J. Exp. Med.** v. 168, p. 107-126, 1988.
- MARSH, J. W. et al. Diversity of factor H-binding protein in *Neisseria meningitidis* carriage isolates. **Vaccine.** vol. 29, p. 6049-6058, 2011.
- MARTÍNEZ, I. et al. Carriers of *Neisseria meningitidis* among children from a primary school. **Rev Cubana Med Trop.** vol. 55, p. 162-168, 2003.
- MASIGNANI, V.; PIZZA, M.; MOXON, E. R. The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. **Front Immunol.** vol. 10, p. 1-14, 2019.
- MASLANKA, S. E. et al. Age-dependent *Neisseria meningitidis* serogroup C class-specific antibody concentrations and bactericidal titers in sera from young children from Montana immunized with a licensed polysaccharide vaccine. **Infect Immun.** vol. 66, p. 2453-2459, 1998.
- MCMILLAN, M. et al. B Part of It study: a longitudinal study to assess carriage of *Neisseria meningitidis* in first year university students in South Australia. **Hum Vaccin Immunother.** vol. 15, p. 987-994, 2019.
- 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 Surveill.** vol. 23, p. 1-28, 2018.
- MILLER, E.; SALISBURY, D.; RAMSAY, M. Planning, registration, and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. **Vaccine.** vol. 20, Supl. 1, p. S58-S67, 2001.

MITCHELL, M. S.; RHODEN, D. L.; KING, E. O. Lactose-fermenting organisms resembling *Neisseria meningitidis*. **J Bacteriol.** vol. 90, n. 2, p.560, 1965.

MORENO, J. et al. Characterization of Carriage Isolates of *Neisseria meningitidis* in the Adolescents and Young Adults Population of Bogota (Colombia). **PLoS One.** vol. 10, p. 1-11, 2015.

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

MUELLER, J. E. et al. Association of respiratory tract infection symptoms and air humidity with meningococcal carriage in Burkina Faso. **Trop Med Int Health.** vol. 13, p. 1543-1552, 2008.

MUELLER, J. E. et al. Molecular characteristics and epidemiology of meningococcal carriage, Burkina Faso, 2003. **Emerg Infect Dis.** vol. 13, p. 847-854, 2007.

MUNFORD, R. S. et al. Eradication of carriage of *Neisseria meningitidis* in families: a study in Brazil. **J Infect Dis.** vol. 129, p. 644-649, 1974.

MURPHY, E. et al. Sequence diversity of the factor H binding protein vaccine candidate in epidemiologically relevant strains of serogroup B *Neisseria meningitidis*. **J Infect Dis.** vol. 200, p. 379-389, 2009.

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

NEAL, K. R. et al. Changing carriage rate of *Neisseria meningitidis* among university students during the first week of term: cross sectional study. **BMJ.** vol. 320, p. 846-849, 2000.

NUNES, A. A. et al. Meningococcal disease epidemiology in Brazil (2005-2018) and impact of MenC vaccination. **Vaccine.** vol. 39, p. 605-616, 2021.

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

OLCÉN, P. et al. Epidemiology of *Neisseria meningitidis*; prevalence and symptoms from the upper respiratory tract in family members to patients with meningococcal disease. **Scand J Infect Dis.** vol. 13, p. 105-109, 1981.

PACE, D.; POLLARD, A. J. Meningococcal disease: clinical presentation and sequelae. **Vaccine.** vol. 30, p. b3-b9, 2012.

PARIKH, S. R. et al. The everchanging epidemiology of meningococcal disease worldwide and the potential for prevention through vaccination. **J Infect.** vol. 81, p. 483-498, 2020.

PATEL, J. C. et al. Rapid Laboratory Identification of *Neisseria meningitidis* Serogroup C as the Cause of an Outbreak - Liberia, 2017. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** vol. 66, p. 1144-1147, 2017.

- PETERSON, M. E. et al. Meningococcal carriage in high-risk settings: A systematic review. **Int J Infect Dis.** vol. 73, p. 109-117, 2018.
- PETHER, J. V. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis*: investigations in a military establishment. **Epidemiol Infect.** vol. 101, p. 21-42, 1988.
- PIZZA, M.; BEKKAT-BERKANI, R.; RAPPUOLI, R. Vaccines against Meningococcal Diseases. **Microorganisms.** vol. 8, p. 1-21, 2020.
- PRESA, J. V. et al. Epidemiological burden of meningococcal disease in Brazil: A systematic literature review and database analysis. **Int J Infect Dis.** vol. 80, p. 137-146 2019.
- RAKE, G. Studies on meningococcus infection: VI. The carrier problem. **J Exp Med.** vol. 59, p. 553-576, 1934.
- READ, R. C. et al. Effect of a quadrivalent meningococcal ACWY glycoconjugate or a serogroup B meningococcal vaccine on meningococcal carriage: an observer-blind, phase 3 randomised clinical trial. **Lancet.** vol. 384, p. 2123-2131, 2014.
- RICHMOND, P. et al. Evaluation of De-O-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: reactogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against O-acetylated and De-O-acetylated serogroup C strains. **Infect Immun.** vol. 69, p. 2378-82, 2001.
- RIORDAN, T. et al. Acquisition and carriage of meningococci in marine commando recruits. **Epidemiol Infect.** vol. 121, p. 495-505, 1998.
- RIZEK, C. F. et al. Comparison of methods to identify *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** vol. 58, p. 1-5, 2016.
- RODRIGUES, C.M.C. et al. Genomic Surveillance of 4CMenB Vaccine Antigenic Variants among Disease-Causing *Neisseria meningitidis* Isolates, United Kingdom, 2010–2016. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 24, p. 673-682, 2018.
- RODRÍGUEZ, P. et al. Meningococcal carriage prevalence in university students, 18-24 years of age in Santiago, Chile. **Vaccine.** vol. 32, p. 5677-80, 2014.
- ROSENSTEIN, N. E. et al. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.** v. 344, p. 1378-1388, 2001.
- ROSENSTEIN, N. E. et al. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. **J Infect Dis.** vol. 180, p. 1894-1901, 1999.
- ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. *Neisseria meningitidis*: Biology, microbiology, and epidemiology. **Methods Mol, Biol**, v. 799, p. 1-20, 2012.
- RUSSELL, J. E. et al. PorA variable regions of *Neisseria meningitidis*. **Emerg Infect Dis.** v.10, n. 4, p. 674-678, 2004.
- SACCHI, C. T. et al. Emergence of a new clone of serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo. **Brazil. J Clin Microbiol.** vol. 30, p. 1282-1286, 1992.

SADARANGANI, M. et al. Phase variation of Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and the effects of bacterial transformation. **J Biosci.** vol. 41, p. 13-19, 2016.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Immunogenicity and safety of investigational vaccine formulations against meningococcal serogroups A, B, C, W, and Y in healthy adolescents. **Hum Vaccin Immunother.** vol. 11, p. 1507-1517, 2015.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Four-year antibody persistence and response to a booster dose of a pentavalent MenABCWY vaccine administered to healthy adolescents and young adults. **Hum Vaccin Immunother.** vol. 14, p. 1161-1174, 2018.

SÁFADI, M. A.; BEREZIN, E. N.; OSELKA, G. W. A critical appraisal of the recommendations for the use of meningococcal conjugate vaccines. **J Pediatr.** vol. 88, n. 3, p. 195-202, 2012.

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

SÁFADI, M. A. et al. Global Meningococcal Initiative. The current situation of meningococcal disease in Latin America and updated Global Meningococcal Initiative (GMI) recommendations. **Vaccine.** vol. 33, p. 6529-6536, 2015.

SÁFADI, M. A. et al. Immunogenicity and safety of concomitant administration of meningococcal serogroup B (4CMenB) and serogroup C (MenC-CRM) vaccines in infants: A phase 3b, randomized controlled trial. **Vaccine,** v.35, p. 2052-2059, 2017.

SÁFADI, M. A. et al. The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945-2010: an unpredictable and changing landscape. **Epidemiol Infect.** vol. 141, p. 447-458, 2013.

SERRUTO, D. et al. *Neisseria meningitidis* GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans. **Proc Natl Acad Sci.** vol. 107, n. 8, p. 3770-3775, 2010.

SHARMA, S. et al. Meningococcal Carriage among Household Contacts of Patients with Invasive Meningococcal Disease in Kathmandu, Nepal: A Longitudinal Study. **Pathogens.** vol. 10, p. 1-8, 2021.

SIERRA, G. V. et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. **NIPH Ann.** vol. 14, p. 195-207, 1991.

SIMMONS, G. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* among household contacts of patients with meningococcal disease in New Zealand. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** vol. 20, p. 237-242, 2001.

SMILACK, J. D. Group-y meningococcal disease. Twelve cases at an army training center. **Ann Intern Med.** vol. 81, p. 740-745, 1974.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES. **Desde 2015 em queda no Brasil, coberturas vacinais voltam aos patamares da década de 1980.** 2021. Disponível em: <https://sbim.org.br/noticias/1572-desde-2015-em-queda-no-brasil-coberturas-vaciniais-voltam-aos-patamares-da-decada-de-1980>. Acesso em 21 de março de 2022.

SORIANO-GABARRÓ, M. et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* in Europe: a review of

- studies undertaken in the region. **Expert Rev Anti Infect Ther.** vol. 9, p. 761-774, 2011.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics.** vol. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.
- STEFANELLI, P. et al. Meningococci of Serogroup X Clonal Complex 181 in Refugee Camps, Italy. **Emerg Infect Dis.** vol. 23, p. 870-872, 2017.
- STEPHENS, D. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v.27, p. B71-77, 2009.
- STEPHENS, D. S. Conquering the Meningococcus. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31, p. 3-14, 2007.
- STEPHENS, D. S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. **Lancet**, v.369, p. 2196–210, 2007.
- STUART, J. M. et al. Effect of smoking on meningococcal carriage. **Lancet.** vol. 2, p. 723-725, 1989.
- SWARTLEY, J. S. et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, n. 1, p. 271-276, 1997.
- SZENBORN, L. et al. Immune Responses to Booster Vaccination With Meningococcal ABCWY Vaccine After Primary Vaccination With Either Investigational or Licensed Vaccines: A Phase 2 Randomized Study. **Pediatr Infect Dis J.** vol. 37, p. 475-482, 2018.
- TAHA, M. K. et al. Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. **Lancet.** vol. 356, p. 2159, 2000.
- TAKAHASHI, H. et al. Meningococcal carriage rates in healthy individuals in Japan determined using Loop-Mediated Isothermal Amplification and oral throat wash specimens. **J Infect Chemother.** vol. 22, p. 501-504, 2016.
- TAPIA, M. D. et al Meningococcal Serogroup ACWYX Conjugate Vaccine in Malian Toddlers. **N Engl J Med.** vol. 384, p. 2115-2123, 2021.
- THAPA, S. et al. Burden of bacterial upper respiratory tract pathogens in school children of Nepal. **BMJ Open Respir Res.** vol. 4, p. 1-9, 2017.
- THAYER J. D.; MARTIN J. E. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. **Publ. Health. Rep.** v. 81, p. 559-562, 1966.
- THIBAU, A. et al. Immunogenicity of trimeric autotransporter adhesins and their potential as vaccine targets. **Med Microbiol Immunol.** vol. 209, p. 243-263, 2020.
- TINGGAARD, M. et al. Oral and anal carriage of *Neisseria meningitidis* among sexually active HIV-infected men who have sex with men in Denmark 2014-15. **Int J Infect Dis.** vol. 105, p. 337-344, 2021.
- TRONCOSO, G. et al. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. **FEMS Immunol Med Microbiol**,

vol. 27, n. 2, p.103-109, 2000.

TROTTER, C. L. et al. Impact of MenAfriVac in nine countries of the African meningitis belt, 2010-15: an analysis of surveillance data. **Lancet Infect Dis**. vol. 17, 867-872, 2017.

TROTTER, C. L.; GREENWOOD, B. M. Meningococcal carriage in the African meningitis belt. **Lancet Infect Dis**. vol. 7, p. 797-803, 2007.

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

TYSKI, S. et al. Phenotypical and genotypical characterization of *Neisseria meningitidis* carrier strains isolated from Polish recruits in 1998. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. vol. 20, p. 350-353, 2001.

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

TZENG, Y. L.; THOMAS, J.; STEPHENS, D. S. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. **Crit Rev Microbiol**. vol. 42, p. 759-772, 2016.

URRA, E. et al. Oro-genital transmission of *Neisseria meningitidis* serogroup C confirmed by genotyping techniques. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. vol. 24, p. 51-53, 2005.

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

VAN RAVENHORST, M. B. et al. Meningococcal carriage in Dutch adolescents and young adults; a cross-sectional and longitudinal cohort study. **Clin Microbiol Infect**. vol. 23, p. 573.e1-573.e7, 2017.

VESIKARI, T. et al. Immunogenicity and safety of different schedules of the meningococcal ABCWY vaccine, with assessment of long-term antibody persistence and booster responses - results from two phase 2b randomized trials in adolescents. **Hum Vaccin Immunother**. vol. 17, p. 4689-4700, 2021.

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

VILLENA, R. et al. Global epidemiology of serogroup B meningococcal disease and opportunities for prevention with novel recombinant protein vaccines. **Hum Vaccin Immunother**. vol. 14, p. 1042-1057, 2018.

VIRJI, M. Pathogenic *neisseriae*: surface modulation, pathogenesis and infection control. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 274-286, 2009.

VOGEL, U. et al. Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the *capsule null locus (cnl)*. **J Clin Microbiol**. vol. 42, n. 7, 2004.

WANG, B. et al. Case fatality rates of invasive meningococcal disease by serogroup and age: A systematic review and meta-analysis. **Vaccine**. vol. 37, p. 2768-2782, 2019.

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

WEIDLICH, L. et al. High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. **J Infect**. vol. 57, p. 324-331, 2008.

WELSCH, J. A. et al. Breadth of coverage against a panel of 110 invasive disease isolates, immunogenicity and safety for 2 and 3 doses of an investigational MenABCWY vaccine in US adolescents - Results from a randomized, controlled, observer-blind phase II study. **Vaccine**. vol. 36, p. 5309-5317, 2018.

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

WHO. **The immunological basis for immunization series. Module 15: meningococcal disease**. Update 2020, Geneva, Suíça, 2020.

WILDER-SMITH, A. et al. Hajj-associated outbreak strain of *Neisseria meningitidis* serogroup W135: estimates of the attack rate in a defined population and the risk of invasive disease developing in carriers. **Clin Infect Dis**. vol. 36, p. 679-683, 2003.

WINN, W. C. et al. Espécies de *Neisseria* e *Moraxella catarrhalis*. In: **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. cap. 11, p. 563-570.

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

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

ZHANG, Q.; FINN, A. Mucosal immunology of vaccines against pathogenic nasopharyngeal bacteria. **J Clin Pathol**. vol. 57, p. 1015-1021, 2004.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dinâmica do estado de portador de *Neisseria meningitidis*: estudo longitudinal com estudantes universitários de 18 a 24 anos, Salvador, Brasil.

Pesquisa de *Neisseria meningitidis*

Prezado (a) jovem _____

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

A meningite causada pelo meningococo é uma doença grave, que se transmite de pessoa a pessoa, por meio de contato direto com portadores (saudáveis ou doentes). O portador saudável é uma pessoa colonizada (infectada) pela bactéria e que não apresenta nenhum sintoma e na maioria das vezes nunca apresentará, mas pode transmiti-la na comunidade.

Estudos longitudinais são importantes para a caracterização da duração do estado portador assim como a identificação e caracterização de cepas circulantes e possíveis permutas gênicas entre micro-organismos. Nenhum estudo deste tipo foi realizado no Brasil. Por esse motivo, o Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ BAHIA, juntamente com essa universidade está propondo esta investigação e para isto contamos com sua ajuda e colaboração. Essas informações serão úteis para melhor compreendermos a dinâmica do estado de portador e da transmissão da bactéria.

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

Coleta (dia)	Período
1ª coleta (Zero)	1º dia/semana de aula
2ª coleta (30)	1 mês após a 1ª coleta
3ª coleta (90)	3 meses após a 1ª coleta
4ª coleta (180)	6 meses após a 1ª coleta
5ª coleta (270)	9 meses após a 1ª coleta

Se você concordar em participar deste estudo, você deverá ler e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido e responder a um questionário simples sobre o histórico vacinal, antecedente recente de doenças respiratórias, uso de antibióticos, hábitos que podem contribuir para aumentar a taxa de portadores e número de pessoas que habitam a mesma casa e dormem no mesmo quarto.

O objetivo desta pesquisa é de interesse para a saúde coletiva e não implica em mudança de conduta individual, não havendo indicação de se vacinar ou revacinar uma pessoa saudável previamente vacinada e nem mesmo administrar antibiótico mesmo que ela seja portadora da bactéria.

Riscos: Suas respostas durante a entrevista são confidenciais. Apenas você e os investigadores do grupo de pesquisa terão acesso a estas informações. Para prevenir, minimizar e sanar os danos e riscos de confidencialidade será utilizado um código para a sua identificação como participante do estudo, garantindo desta forma o seu anonimato conforme regulamentação das Resoluções 466/2012. Você não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa.

Caso ocorra algum dano ou complicações referentes à participação do estudante no estudo, o pesquisador responsável pela execução do projeto assume toda a responsabilidade de dar assistência integral ao indivíduo, bem como ressarcimento de custos e indenização.

Benefícios: Não existe nenhum custo para participar deste estudo e você não terá nenhum tipo de benefício imediato, mas ao participar deste estudo estará ajudando a melhorar os nossos conhecimentos sobre a epidemiologia da doença meningocócica, o que possibilita o reconhecimento de potenciais surtos e auxilia na implementação de medidas de vigilância e controle da doença.

Participação Voluntária: A participação nesta pesquisa é voluntária. **Você pode recusar a participar ou interromper a participação em qualquer momento.** Mas se você aceitar participar, pedimos por favor para que você não desista. A importância deste projeto está na possibilidade de acompanhamento do processo durante um período de nove meses. Também, a equipe de estudo pode optar por encerrar a participação do estudante durante ou no fim da pesquisa. Neste caso, você será avisado. Durante a entrevista, se houver alguma pergunta que você ache que não é própria e não queira responder, você tem o direito de não respondê-la. A recusa em participar de todo ou de parte desta pesquisa não afetará o rendimento e/ou as atividades do estudante na faculdade. Este termo de consentimento será emitido em duas vias e todas as páginas deverão ser rubricadas pelo participante. Você receberá uma das vias e a outra ficará em poder da equipe de pesquisa.

Grupo de Contato: Se no futuro você tiver qualquer questão sobre a sua participação ou sobre os seus direitos na pesquisa, por favor, entre em contato com a Dra. Leila Campos, Pesquisadora do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ_BAHIA, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2350; (71) 99977-1196 e e-mail para contato: leila.campos@fiocruz.br. Ou com o Comitê de Ética em Pesquisas que é responsável pela análise ética de projetos de pesquisa que necessitem da utilização de seres humanos e está localizado no Instituto Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Autorização para Banco de Amostras Biológicas: Caso você autorize, o material da orofaringe que sobrar deste estudo após a realização dos exames, será armazenado em um banco de amostras biológicas na Fiocruz até a finalização do projeto, quando serão descartadas através de autoclavagem. Este material guardado na Fiocruz poderá ser também

utilizado, no futuro, em outros projetos de pesquisa que ajudarão a compreender melhor a meningite bacteriana ou no desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas. Nenhum material será utilizado sem a autorização prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz e a sua identidade será mantida em sigilo.

Sobre a autorização para banco de amostras biológicas:

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

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

Consentimento:

Pelo presente Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo, pois fui informado (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, desconfortos e benefícios todos acima descritos.

Assinatura do estudante

Telefone _____ e data ____/____/____

Assinatura do Investigador

Data

Hora

APÊNDICE B

Dinâmica do estado de portador de *Neisseria meningitidis*: estudo longitudinal em estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade, Salvador, Brasil.

Coleta nº __1__

PLNM _____

Data da entrevista _____

Iniciais do entrevistador () Lara () Amélia () Viviane () Juliana () Lucas

Nome do participante _____

Data de nascimento _____

Idade do participante _____

Idade calculada _____

Curso do participante _____

Qual o semestre do participante? () 1º semestre
() 2º semestre
() 3º semestre
() 4º semestre
() 5º semestre
() 6º semestre
() 7º semestre
() 8º semestre
() 9º semestre
() 10º semestre

Você tem alguma atividade extracurricular (estágio, trabalho...)? () Sim () Não

Qual? _____

Sexo () Masculino () Feminino

O senhor(a) se considera de que cor/raça? () Branco () Preto () Pardo (mulato, mestiço, moreno...) () Indígena () Amarela () Não sabe

Endereço _____

Complemento _____

Telefone residencial _____

Telefone celular _____

Escolaridade da mãe ou responsável pelo estudante: () Analfabeto

- 1º grau incompleto
- 1º grau completo
- 2º grau incompleto
- 2º grau completo
- 3º grau incompleto
- 3º grau completo
- Não sabe

Quantas pessoas vivem em sua casa? _____

Quantos cômodos são usados para dormir? _____(Valores 88 significa não informado)

Teve algum contato recente com um caso de Meningite? Sim Não Não sabe

Foi vacinado contra meningite? Sim Não Não sabe

Ano em que foi vacinado _____

- Qual o tipo de vacina? Hib (DTP + HIB)
- Pneumocócica deca-valente (PCV10)
 - Pneumocócica 13-valente (PCV13)
 - Pneumocócica 23-valente (PCV23)
 - Meningocócica conjugada C (MenC)
 - Meningocócica conjugada (MenACWY)
 - Meningocócica polissacarídica (MenAC)
 - Não sabe

Como foi obtida a informação? Oral Documento

Carteira de Vacinação _____

Alguém fuma em sua casa? Sim Não Não informou

- Quem fuma? Você
- Pai
 - Mãe
 - Irmão
 - Outro morador da casa Quem? _____

Você costuma frequentar festas ou baladas? Sim Não Não informou

Quantas vezes por mês? _____

Teve sintomas de gripe nos últimos 15 dias? Sim Não Não informou

Fez sexo oral nos últimos 15 dias? Sim Não

APÊNDICE C

Dinâmica do estado de portador de *Neisseria meningitidis*: estudo longitudinal em estudantes universitários de 18 a 24 anos de idade, Salvador, Brasil.

Coleta nº _____

PLNM _____

Data da entrevista _____

Nome do participante _____

Curso do participante _____

Qual o semestre do participante? () 1º semestre
() 2º semestre
() 3º semestre
() 4º semestre
() 5º semestre
() 6º semestre
() 7º semestre
() 8º semestre
() 9º semestre
() 10º semestre

Você tem alguma atividade extracurricular (estágio, trabalho...)? () Sim () Não

Qual? _____

Telefone celular _____

Quantas pessoas vivem em sua casa? _____

Quantos cômodos são usados para dormir? _____

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

Você costuma frequentar festas ou baladas? () Sim () Não () Não informou

Quantas vezes por mês? _____

Teve sintomas de gripe nos últimos 15 dias? () Sim () Não () Não informou

Fez sexo oral nos últimos 15 dias? () Sim () Não

APÊNDICE D

Definição de aquisição do estado de portador de *Neisseria meningitidis* ao longo do estudo.

Classificação	Portador de Nm na linha de base	Portador de Nm nas coletas 2-5	≥ 3 coletas realizadas	Nº de indivíduos
Aquisição	Não	Sim	Sim	12
Não aquisição	Não	Não	Sim	217
Excluídos	Sim	Não	Sim	7
Excluídos	Sim	Sim	Sim	8
Excluídos	SNR	SNR	Sim	1
Excluídos	SNR	Sim	Sim	1
Excluídos	SNR	Não	Sim	1
Excluídos	Sim	SNR	Sim	3
Excluídos	Não	SNR	Sim	27
Excluídos	Não	SNR	Não	4
Excluídos	NA	NA	Não	137
Total				418

Legenda: Nm = *Neisseria meningitidis*; SNR = Sequenciamento não realizado; NA = Não se aplica.

APÊNDICE E

Tipo capsular dos isolados de *Neisseria meningitidis* provenientes dos 47 portadores identificados durante o estudo.

Nº do participante	Coletas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
1	-	-	-	NG (cnl)	NG (cnl)
2	-	-	-	I (B)	NG (cnl)
10	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	*	*
19	NG (Z)	NG (Z)	NG (Z)	NG (Z)	NG (Z)
28	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)
43	NG (B)	NG (B)	-	-	-
58	B	B	B	-	-
59	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)
66	-	-	-	-	NG (cnl)
82	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)
84	NG (cnl)	NG (cnl)	-	NG (cnl)	SNR
93	NG (cnl)	SNR	NG (cnl)	NG (cnl)	*
104	-	-	NG (I)	-	-
114	-	-	NG (cnl)	-	-

Legenda: - = resultado negativo para *Neisseria meningitidis*; NG = não grupável; cnl = capsule null locus; I = Inconclusivo; B = genogrupo B; * = coleta não realizada; Z = genogrupo Z; SNR = sequenciamento não realizado. A estrutura gênica da cepa se encontra entre parênteses.

Tipo capsular dos isolados de *Neisseria meningitidis* provenientes dos 47 portadores identificados durante o estudo (continuação).

Nº do participante	Coletas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
139	-	-	-	NG (cml)	NG (cml)
144	NG (cml)	NG (cml)	SNR	*	*
148	-	B	NG (cml)	B	B
149	-	-	SNR	NG (cml)	NG (cml)
178	NG (cml)	NG (cml)	NG (cml)	NG (cml)	NG (cml)
181	NG (cml)	NG (cml)	-	NG (cml)	NG (cml)
183	-	-	-	-	NG (Z)
184	SNR	-	NG (cml)	NG (cml)	-
190	NG (cml)	*	*	*	*
210	NG (B)	NG (B)	NG (B)	NG (B)	NG (B)
213	NG (cml)	*	*	*	*
228	-	-	-	NG (cml)	NG (cml)
243	I (B)	*	*	*	*
244	B	B	B	B	SNR

Legenda: - = resultado negativo para *Neisseria meningitidis*; NG = não grupável; cml = *capsule null locus*; I = Inconclusivo; B = genogrupo B; * = coleta não realizada; Z = genogrupo Z; SNR = sequenciamento não realizado. A estrutura gênica da cepa se encontra entre parênteses.

Tipo capsular dos isolados de *Neisseria meningitidis* provenientes dos 47 portadores identificados durante o estudo (continuação).

Nº do participante	Coletas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
248	NG (cnl)	*	*	*	*
252	NG (cnl)	*	*	*	*
271	NG (cnl)	*	*	*	*
274	NG (cnl)	*	*	*	*
277	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)
293	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	-	*
299	NG (cnl)	-	*	*	*
303	-	-	-	NG (cnl)	NG (cnl)
317	NG (cnl)	NG (cnl)	NG (cnl)	-	*
328	NG (I)	NG (cnl)	-	*	*
342	NG (cnl)	*	*	*	*
347	NG (cnl)	*	*	*	*
353	NG (cnl)	I (B)	NG (cnl)	-	*
370	NG (cnl)	*	*	*	*

Legenda: - = resultado negativo para *Neisseria meningitidis*; NG = não grupável; cnl = capsule null locus; I = Inconclusivo; B = genogrupo B; * = coleta não realizada; Z = genogrupo Z; SNR = sequenciamento não realizado. A estrutura gênica da cepa se encontra entre parênteses.

Tipo capsular dos isolados de *Neisseria meningitidis* provenientes dos 47 portadores identificados durante o estudo (continuação).

Nº do participante	Coletas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
373	NG (B)	NG (B)	*	*	*
381	NG (<i>cnl</i>)	NG (I)	*	*	*
386	-	NG (<i>cnl</i>)	*	*	*
400	NG (<i>cnl</i>)	*	*	*	*
402	NG (<i>cnl</i>)	*	*	*	*

Legenda: - = resultado negativo para *Neisseria meningitidis*; NG = não grupável; *cnl* = *capsule null locus*; I = Inconclusivo; B = genogrupo B; * = coleta não realizada; Z = genogrupo Z; SNR = sequenciamento não realizado. A estrutura gênica da cepa se encontra entre parênteses.