



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Neisseria meningitidis DE CASOS DE MENINGITE NO HOSPITAL
COUTO MAIA, EM SALVADOR - BA.**

SORAIA MACHADO CORDEIRO

**Salvador - Bahia - Brasil
2002**

575.21(813.8)



001783

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

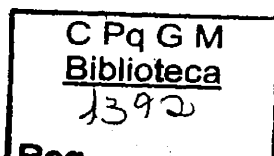
**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de
Neisseria meningitidis de casos de meningite no
Hospital Couto Maia, em Salvador-BA**

Soraia Machado Cordeiro

Orientador: Mitermayer Galvão dos Reis

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Patologia
Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil
2002



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ Salvador - Bahia.

Cordeiro, Soraia Machado
C794c Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Neisseria meningitidis* de casos de meningite do Hospital Couto Maia, em Salvador-Bahia / Soraia Machado Cordeiro. _ Salvador: Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2002.

108 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)-
Universidade Federal da Bahia, 2002.

1. Meningite Meningocócica. 2. Fenótipos. 3. Genótipos. 4. Biologia Molecular. 5. Bahia. Título.

CDU 616.981.23:575.21'22 (813.4)

L12DB1

616.981.23:575.21(813.4)
C794c


HF1342

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Neisseria meningitidis* DE
CASOS DE MENINGITE NO HOSPITAL COUTO MAIA, SALVADOR-BA

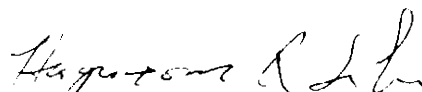
SORAIA MACHADO CORDEIRO

FOLHA DE APROVAÇÃO

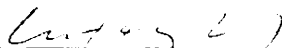
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Edson Duarte Moreira
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Hagamenon R. da Silva
Professor Adjunto
FAMED / UFBA



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Professor Titular
CPqGM / FIOCRUZ

"Se vi mais longe foi por ter-me colocado em ombros de gigantes"

Isaac Newton

A Deus, pelo dom da vida.

A meus pais, Moisés e Ana, pelo amor e pela dedicação de uma vida de esforços na minha criação e educação.

A meus irmãos, Simone e Mario, pelo companheirismo.

A meu marido Luciano, pelo incentivo nos momentos difíceis.

A meu filhinho Lucas, pela sua existência.

AGRADECIMENTOS

- "A Deus por me colocar sempre como um servo de seus desejos."
- Aos orientadores Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e Albert Ko pela oportunidade de trabalhar em pesquisa e constante orientação.
- Um agradecimento especial às professoras Dra. Hygia Maria Nunes Guerreiro e Dra Tânia Fraga Barros, responsáveis pelo meu ingresso na pesquisa. Muito obrigada pelo reconhecimento e amizade.
- À professora e amiga Joice Neves Reis que sempre esteve ao meu lado, principalmente, nos momentos mais difíceis.
- À grande amiga Patrícia Guimarães de Oliveira, pelo companheirismo durante a vida acadêmica.
- Aos Drs. Manoel Barral Neto e Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, coordenadores do Mestrado e Doutorado em Patologia FIOCRUZ-UFBA, pela presteza e competência com que têm conduzido este curso.
- Aos demais professores, colegas do Mestrado que ingressaram comigo e, especialmente, à secretária do curso, Sra. Rosália Oliveira, pela dedicação e competência com que vem exercendo suas atividades.
- Aos pesquisadores do Lab. de Pat. e Biol. Molecular, Dra. Marilda Gonçalves, Theomira e Eliana Reis, pelo apoio profissional, consultoria e amizade.
- Aos estudantes de iniciação científica Tatiana Lôbo e Cásio Tâmara, pela participação ativa e entusiasmo demonstrado, lado a lado, na execução do levantamento de dados epidemiológicos.
- Aos demais colegas e amigos do Lab. de Patologia e Biol. Molecular/CPqGM, que vivenciaram e compartilharam os momentos difíceis e vitoriosos.
- À Sra. Ana Maria Fiscina, Bibliotecária e a meu tio por escolha, Agnelo Cerqueira Costa, pela normalização desse trabalho e revisão das referências bibliográficas.
- Ao corpo clínico do HCM e às bioquímicas Kátia Salgado e Neide Oliveira Silva, pelos isolamentos e fornecimentos das amostras bacterianas.
- Ao Dr. Warren Jonhson Jr., Chefe da Divisão Internacional de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de Cornell, New York; e Dr. Lee Riley Prof. da Escola de Saúde Pública da Califórnia, Berkeley, pela disponibilidade de recursos que contribuíram para a realização desse trabalho.
- Ao Dr. Carmo Melles e Ana Paula Lemos, Instituto Adolfo Lutz/SP, pela disponibilidade dos resultados de sorotipagem e fornecimento de amostras de *N. meningitidis*.
- Aos participantes do estudo, pelo consentimento e aceitação desta pesquisa.
- A todos aqueles que, embora não citados nominalmente, também contribuíram, de alguma forma, para o nosso êxito.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	VII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 NEISSERIA MENINGITIDIS.....	1
1.2 PATOGENICIDADE.....	3
1.3 FENOTIPAGEM.....	5
1.4 CLASSIFICAÇÃO PELO MLEE (MULTILOCUS ENZYME ELECTROPHORESIS).....	10
1.5 EPIDEMIOLOGIA.....	11
1.6 VACINAS CONTRA A DOENÇA MENINGOCÓCICA.....	21
1.7 GENOTIPAGEM E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	26
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 GERAL.....	32
3.2 ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO.....	33
4.2 PERÍODO DO ESTUDO.....	33
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	33
4.4 ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS.....	33
4.5 ESTOCAGEM BACTERIANA.....	34
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROGRUPOS.....	34
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS E SOROSUBTIPOS.....	35
4.8 GENOTIPAGEM POR REP-PCR.....	35
4.8.1 Primer.....	35
4.8.2 Cepas.....	36
4.8.3 Extração de DNA.....	37
4.8.4 NgREP-PCR.....	38
4.8.5 Eletroforese.....	38
4.8.6 Padronização da NgREP-PCR.....	39
4.8.7 Análise dos produtos amplificados e determinação dos padrões genéticos.....	41
4.9 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	42
4.10 ASPECTOS ÉTICOS.....	43
4.11 ANÁLISES DE DADOS.....	43
5 RESULTADOS	44
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DE MENINGITE MENINGOCÓCICA.....	44
5.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS ISOLADOS DE N. MENINGITIDIS.....	46
5.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	49
5.3.1 Avaliação do método.....	49
5.4 VALIDAÇÃO DA NgREP-PCR PARA USO EM VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.....	52
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9 LISTA DE ANEXO	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Typing Culture Collection</i>
BHI	<i>broth heart infusion</i>
CO ₂	dióxido de carbono
cols.	colaboradores
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeos
ET	tipo eletroforético
HCl	ácido clorídrico
HCM	Hospital Couto Maia
KCl	cloreto de potássio
m(Abs)	anticorpos monoclonais
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MLEE	<i>multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
NT	não sorotipável
nt	não sorosubtipável
ORFs	fase aberta de leitura
pb	pares de base
PCR	reação da polimerase em cadeia
PFGE	<i>pulse field gel electrophoresis</i>
PorA	porina A
PorB	porina B
REP- PCR	reação da polimerase em cadeia de regiões repetitivas

RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
Taq DNA	DNA polimerase do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
tRNA	ácido ribonucléico transportador
TSA	- triptic soy agar
UPGMA	<i>unweighted pair group method arithmetic averages</i>
UV	ultravioleta
VR1	região variável 1
VR2	região variável 2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	<i>Neisseria meningitidis</i> (seta) no líquido cérebro espinhal (coloração de Gram, 1000X). Os organismos são visíveis como diplococcos Gram-negativos intracelulares (Roseinstein, 2001).	01
Figura 2.	Visão de corte transversal da membrana celular do meningococo (Roseinstein, 2001).	02
Figura 3.	Colonização da <i>N. meningitidis</i> na mucosa nasofaríngea (Virji, 1998).	04
Quadro 1.	Composição química da cápsula polissacarídica dos principais sorogrupos de <i>Neisseria meningitidis</i> (Volk e cols.,1996).	07
Figura 4.	Topologia da proteína de Classe 1 do sorotipo P1.5a,10d baseado no modelo de van der Ley e cols., 1991 (Jelfs e cols., 2000).	09
Quadro 2.	Características sorológicas e fontes geográficas dos complexos clonais (ETs) pelo MLEE, responsáveis por epidemias de doenças meningocócicas (Adaptado Caugant, 1998).	14
Figura 5.	Distribuição geográfica de surtos causados por clones do complexo ET-5. As datas indicadas referem-se ao período da primeira identificação em cada região (Caugant, 1998).	15
Quadro 3.	Lista dos anticorpos monoclonais utilizados na determinação dos sorotipos e sorosubtipos (Sacchi, e cois., 1998; Sacchi e cols., 1998).....	35
Quadro 4.	Relação das amostras utilizadas na validação da NgREP-PCR.	37
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amostras controle em duplicata e em diferentes diluições.	40

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de isolados de <i>N.meningitidis</i> para demonstrar reprodutibilidade do método.	41
Gráfico 1. Distribuição de casos de meningite meningocócica no período de Fev/96 a Jan/99 (N=272), identificados no Hospital Couto Maia-Salvador/BA.	44
Gráfico 2. Distribuição anual de meningite meningocócica em Salvador - BA identificados no HCM, nos anos de 1996 a 1999 (casos/100.000 hab.). Incidência anual média de 2,25/100.000 hab.	45
Gráfico 3. Distribuição dos casos de meningite meningocócica, por faixa etária, identificados no HCM, no período de 1996 a 1999, em Salvador-BA.	45
Gráfico 4. Distribuição dos casos (N=272) por sorogrupo de <i>N. meningitidis</i> , de isolados identificados no HCM no período de fevereiro de 1996 a janeiro de 1999.	47
Tabela 1. Frequência dos sorotipos e sorosubtipos de <i>N.meningitidis</i> , identificados no período de Fev/96 a Jan/99, no HCM	48
Gráfico 5. Distribuição dos sorotipos:sorosubtipos de <i>N. meningitidis</i> identificadas no Hospital Couto Maia- Salvador/BA, no período e Fev/96 a Jan/99.	49
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR, de isolados de <i>N. meningitidis</i> , para demonstrar o poder discriminatório do método, frente a diferentes sorogrupos, sorotipos e sorosubtipos. .	50
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR, de isolados de <i>N.meningitidis</i> , originados de diferentes regiões geográficas.	51

- Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR, representando os diferentes padrões obtidos, das amostras de *N. meningitidis*, identificadas no Hospital Couto Maia-Salvador/BA, no período de Fev/96 a Jan/99, 52
- Figura 11. Dendograma resumido com 73 de 218 isolados, representando os diferentes padrões obtidos no Ng-REP-PCR, quando aplicado a *Neisseria meningitidis*. 55
- Tabela 2. Distribuição de 196 isolados nos padrões identificados pelo critério de bandas idênticas de pacientes com meningite, no Hospital Couto Maia- Salvador/BA, no período e Fev/96 a Jan/99. 56
- Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR , de isolados de *N. meningitidis* pertencentes ao complexo ET-5, e isolados pertencentes ao tipo 4,7;P1.19,15 do estudo 57

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* DE CASOS DE MENINGITE NO HOSPITAL COUTO MAIA, EM SALVADOR-BA. SORAIA MACHADO CORDEIRO. INTRODUÇÃO - Infecções por *Neisseria meningitidis* estão associadas a altos índices de morbi-mortalidade. Em Salvador, a incidência anual média da meningite meningocócica, no período de fevereiro de 1996 a janeiro de 1999 foi de 2,25/100000 hab., acometendo, principalmente, crianças menores de 02 anos (14,19/100.000hab.), uma taxa de letalidade geral de 7,9% e 4,7% de seqüelas neurológicas. Assim, se faz necessário a disponibilidade de um método simples, eficaz na caracterização molecular deste patógeno, para um melhor entendimento na distribuição e transmissão da doença. **OBJETIVOS** - Este trabalho, teve como objetivos, descrever a distribuição fenotípica e genotípica da *Neisseria meningitidis* isolada de casos de meningite de Salvador-BA e validar a utilização do método da NgREP-PCR em estudos de vigilância epidemiológica. **METODOLOGIA** - A população do estudo foi formada por pacientes do Hospital Couto Maia, Salvador-BA, que tiveram cultura de líquido positiva para *Neisseria meningitidis*. Para a caracterização fenotípica, as amostras foram submetidas a testes de aglutinação, na determinação dos sorogrupos (A, B, C, W₁₃₅ e Y) e testes de dot-blot, utilizando anticorpos monoclonais, na determinação dos 18 sorotipos e 18 sorosubtipos e a caracterização genotípica foi realizada pela Reação da Polimerase em Cadeia - NgREP-PCR. **RESULTADOS** - Durante o período do estudo foram identificados no HCM, 272 casos de meningite meningocócica, dos quais, 258 tiveram isolados analisados. A distribuição dos sorogrupos, identificou o predomínio de sorogrupo B, em 79,8% (206 de 258) dos isolados, seguido do sorogrupo C, em 18,6% (48 de 258), do sorogrupo W₁₃₅, em 1,2% (3 de 258) e do sorogrupo Y em 0,4% (1 de 258), nenhum caso sorogrupo A foi identificado. A distribuição dos sorotipos e sorosubtipos demonstrou a predominância de 4,7;P1.19,15 (63,2%); 4,7;P1.7,1 (4,3%); 2a:P1.2 (3,5%); 4,3;P1.3 (1,9%); Outros (24,8%). Foram caracterizados pelo NgREP-PCR 84,5% (218 de 258). Através da análise visual, os isolados foram caracterizados e agrupados em 34 padrões correlacionados, sendo que, 16 desses padrões, abrangeram 91,7% do total das amostras. **CONCLUSÕES** - Através da análise pelo software GelCompar II versão 4.1, cada padrão correlacionado registrou um índice de similaridade, entre suas amostras, superior a 80%. Além disso, o método do NgREP-PCR foi capaz de identificar padrões que se correlacionaram perfeitamente à sorosubtipagem e principalmente, de identificar o clone dominante encontrado na população estudada. Assim, o NgREP-PCR pode ser utilizado como ferramenta em estudos de vigilância epidemiológica.

Palavras-chaves: Meningite meningocócica, Fenótipos, Genótipos, Biologia Molecular, Bahia.

ABSTRACT**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* ISOLATES FROM CASES OF MENINGITIS FROM HOSPITAL COUTO MAIA, SALVADOR-BA. SORAIA MACHADO CORDEIRO.**

INTRODUCTION - *Neisseria meningitidis* infections are associated with high rates of morbidity and mortality around the world. In Salvador, Brazil, the average annual incidence of meningococcal disease between February 1996 and January 1999 was 2.25/100,000 hab, with the highest attack rate among children younger than two years old (14.19/100,000hab. children per year). The overall case-fatality percentage was 7.9%. Among survivors, neurological sequelae were present in 4.7%.

OBJECTIVES - The aims of this work were to describe the phenotypic and genotypic distribution of *Neisseria meningitidis* causing of meningitis in Salvador-BA and to validate the use of a simple molecular typing method, NgREP-PCR for use epidemiological surveillance.

METHOD - The study population included patients admitted to Couto Maia Hospital (CMH), Salvador-BA, with meningococcal meningitis confirmed by isolation of *Neisseria meningitidis* from cerebrospinal fluid. Isolates were serogrouped by agglutination tests for serogroups A, B, C, W135 and Y. Isolates were serotyped by dot-blot using monoclonal antibodies for 18 serotypes and 18 sorosubtypes. A genotype was assigned using NgREP-PCR method, comparing visual and digital classification using GelCompar software (version 4.1).

RESULTS - During the study period, 272 cases of meningococcal meningitis were identified in CMH, and isolates were available from 258 cases. Serogroup B was the most prevalent serogroup accounting for 79,8% (206) of 258 isolates. Serogroup C accounted for 18.6% (48 of 258), while serogroups and W135 and Y accounted for 1.2% (3 isolates) and 0.4% (1 isolates) respectively. No isolates belonged to serogroup A. One serosubtype, 4,7:P1.19,15, was responsible for 63.2% of the isolates, type 4,7:P1.7,1 (4.3%), 2a:P1.2 (3.5%), 4,3:P1.3 (1.9%), and others in (24.8%) were also identified. NgREP-PCR was performed for 218 isolates (84.5%).

The isolates were classified by visual comparison into 34 genotypic patterns and 16 of these patterns included 91,7% of all isolates genotyped.

CONCLUSIONS - In GelCompar analysis, the similarity index of strains within the 16 patterns was greater than 80%. The NgREP-PCR method identified different patterns which correlated with the serosubtyping, including the identification of the dominant clone found in the study population. NgREP-PCR proved to be useful tool for epidemiologic surveillance.

Key words: Meningococcal meningitis, Phenotypes, Genotypes, Molecular Biology, Bahia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEISSERIA MENINGITIDIS

A doença meningocócica já é conhecida desde o início do século XIX e foi primeiramente descrita por Vieusseux, em Genebra, em 1805, acometendo, principalmente, crianças e jovens, sendo registrada 33 mortes (Vieusseaux, 1805). O isolamento em cultura foi em 1887, por Anton Weichselbaum, quando foram descritas as características bioquímicas da bactéria (Weichselbaum, 1887).

A espécie *Neisseria meningitidis* está classificada na família Neisseriaceae e caracteriza-se por ser um diplococo Gram – negativo, aeróbio, imóvel e não esporulado (Figura 1), com as paredes adjacentes achatadas, dando uma aparência cordiforme, quando observado através da coloração de Gram, possui tamanho entre 0,6-0,8 μ m, requer condições ideais de crescimento, temperatura entre 35-37°C, umidade aproximadamente de 50%, atmosfera de 3 a 10% de CO₂, em meio de agar chocolate (Volk e cols., 1996). Similar a outras bactérias Gram - negativas, apresenta-se envolvido por uma membrana externa composta por lipídios, proteínas e lipopolissacarídeos, renomeados lipo - oligossacarídeos, pois são compostos de cadeias de açúcar relativamente curtas (Jennings e cols.,1999; van Deuren e cols., 2000) (Figura. 2).

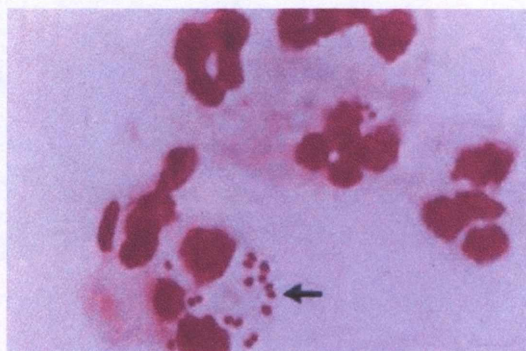


Figura 1. *Neisseria meningitidis* (seta) no líquido cérebro espinhal (coloração de Gram, 1000X). Os organismos são visíveis como diplococos gram-negativos intracelulares (Rosenstein, 2001).

A sequência completa do genoma da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B cepa MC58 (Tettelin e cols., 2000), mostrou que o genoma se compõe de 2,2 mega pares de bases, com uma média de G+C em torno de 51,5%. O genoma contém quatro códons de iniciação que dirigem a síntese de RNA ribossomal (rRNA) e 59 RNAs transportadores (tRNA) com especificidade para todos os 20 aminoácidos. Contém 2158 ORF's (Fase aberta de leitura), destas 53,7%, as funções dos genes já são conhecidas. Um fator requerido no comportamento comensal e ação patogênica do meningococo é sua capacidade para obter ou sintetizar nutrientes essenciais para sobrevivência (Web www.sciencemag.org/feature/data/1046515.SHL). As análises do genoma mostram que a glicose e maltose são os únicos açúcares utilizados para obtenção de energia (Tettelin e cols., 2000).

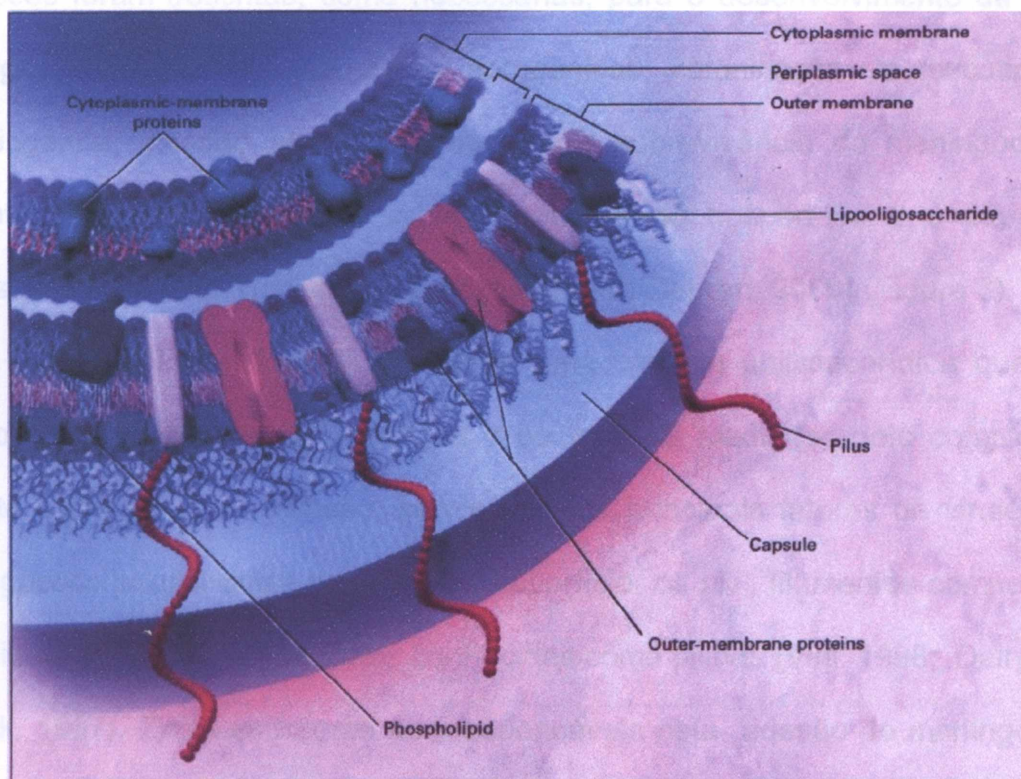


Figura 2. Visão de corte transversal da membrana celular do meningococo (Trad. Rosenstein, 2001).

1.2 PATOGENICIDADE

O meningococo é isolado da mucosa nasofaríngea como agente não patogênico de portadores assintomáticos (Arreaza e cols., 2000). A colonização meningocócica pode persistir por várias semanas até meses acometendo aproximadamente 10% de indivíduos saudáveis (Cartwright e cols., 1987; Caugant e cols., 1988). A sua transmissão, usualmente, acontece por contato direto com a secreção respiratória contaminada ou aerossóis, uma vez que o meningococo não sobrevive por longo período fora do seu único hospedeiro, o homem.

Meningococos podem, ocasionalmente, invadir e disseminar-se da nasofaringe para causar meningococemia, meningite, artrite e, mais raramente, conjuntivite purulenta, sinusite, endocardite e pneumonia primária. Pelo menos, quatro condições foram descritas, como necessárias, para o desenvolvimento da doença meningocócica: exposição a cepas patogênicas, colonização da mucosa nasoro-faríngea, invasão através da mucosa e sobrevivência do meningococo na corrente sanguínea, conforme o estado imune do hospedeiro e a capacidade agressiva da bactéria (Schwartz e cols., 1989; van Deuren, 2000) (Figura 3).

A espécie *N. meningitidis* apresenta uma cápsula polissacarídica que tem a função de proteção contra fagocitose e bacteriolise mediadas pelo complemento, durante o processo de invasão, sendo um dos principais fatores de virulência. O meningococo possui outra estrutura de superfície, os *pili*, filamentos compostos de subunidades protéicas repetitivas, conhecidas como pilinas (Virji, 1998; Dalrymple & Mattick, 1987). Estas estruturas são responsáveis pela adesão do meningococo à célula hospedeira, desta forma, são importantes na patogenicidade da bactéria, no tropismo pelo epitélio da nasofaringe humana e no efeito citopático. A variação

antigênica de proteínas do *pilus* é importante para sua função, pois o polimorfismo gerado, facilita a colonização de indivíduos em diferentes condições e no escape do mecanismo de defesa do sistema imune (Nassif e cols., 1994).

Estudos sugerem que os lipooligossacarídeos são importantes na ativação do complemento na doença meningocócica sistêmica (Fijen e cols., 1999; Vogel e cols., 1997). A ativação do complemento é essencial na proteção humana, durante a invasão pelo meningococo. O defeito em pelo menos um dos fatores do complemento entre C5 e C9 no hospedeiro, está associado com o aumento de risco de infecções meningocócicas recorrentes. Alteração na properdina aumenta o risco de meningococemia fulminante e morte. No processo de ativação do complemento, anafilotóxicas formadas, atuam como potentes mediadores inflamatórios que promovem coagulação (Brandtzaeg e cols., 1989; Fijen e cols., 1999).

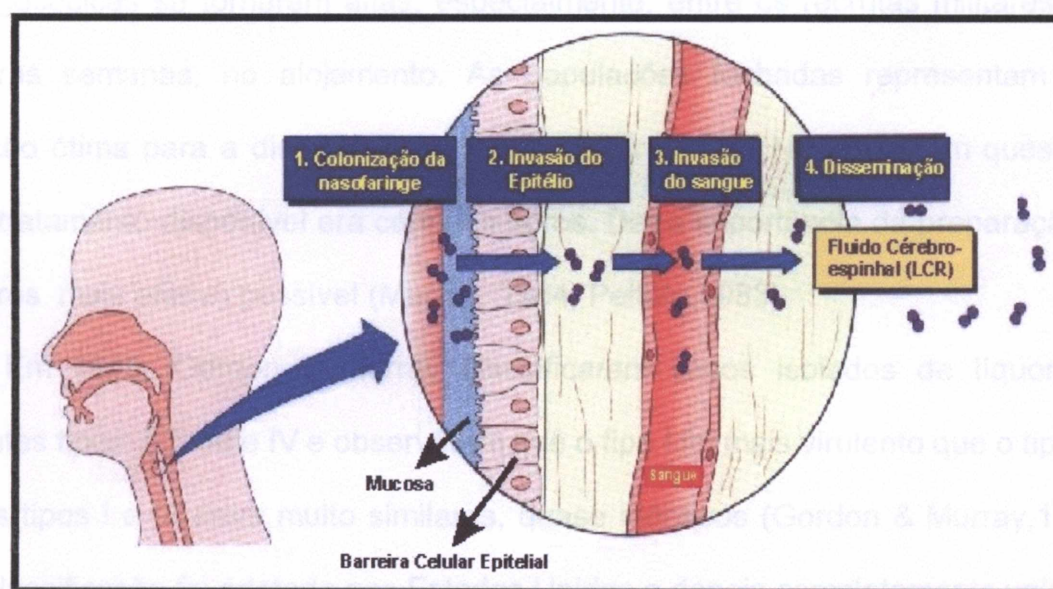


Figura 3. Colonização da *N. meningitidis* na mucosa nasofaringeana (Adaptado de Virji, 1998). A *N. meningitidis* entra na nasofaringe e adere às células não ciliadas do epitélio, em parte, através da ligação dos pili e de proteínas de opacidade. Os organismos aderidos são englobados pelas células, entram em vacúolos fagocíticos e podem transpor a células.

1.3 FENOTIPAGEM

O desenvolvimento de métodos de tipagem, tem dado maior significado às análises epidemiológicas da doença meningocócica, como na possibilidade de identificar a ocorrência de surtos em populações susceptíveis pela presença de cepas virulentas, como, também, no melhor entendimento dos determinantes que acarretam os surtos causados por essas cepas. A tipagem também auxilia na taxonomia de bactérias, uma vez que estas são caracterizadas pelos distintos fenótipos identificados.

A caracterização fenotípica da *N. meningitidis*, teve início logo após o isolamento e identificação da espécie, no final de século XIX, quando os microbiologistas começaram a caracterizar e classificar várias cepas, através de testes de aglutinação sorológica (Dopter,1909; Dopter & Pauron, 1914). Com o início da 2ª Guerra Mundial, intensificaram-se os esforços para a classificação do meningococo, pois os números de casos fatais e a incidência de doenças meningocócicas se tornaram altas, especialmente, entre os recrutas militares, nas primeiras semanas, no alojamento. As populações fechadas representam uma condição ótima para a disseminação de cepas virulentas. Na época em questão o único tratamento disponível era com anti-soros. Daí a importância da preparação de antisoros mais efetivo possível (Murray, 1964; Peltola,1983).

Em 1915, Gordon e Murray classificaram casos isolados de líquor nos seguintes tipos: I, II, III e IV e observaram que o tipo I foi mais virulento que o tipo II e que os tipos I e III eram muito similares, quase idênticos (Gordon & Murray,1915). Esta classificação foi adotada nos Estados Unidos e depois completamente validada por laboratórios durante anos. Com a identificação de outros sorogrupos a *N. meningitidis* foi re-classificada em função da especificidade imunológica dos

polissacarídeos capsulares, os meningococos podem ser classificados em 13 diferentes sorogrupos: A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E e W₁₃₅. Os sorogrupos A, B, C, W₁₃₅ e Y destacam-se por serem as mais freqüentes causas de doença invasiva (Vedros, 1987). A purificação da cápsula polissacarídica permitiu determinar que sua composição química é basicamente de homopolímeros ou heteropolímeros de repetidas unidades de monossacarídeos, dissacarídeos ou trissacarídeos (Rosenstein e cols., 2001) e deste modo foi determinada sua composição química (Volk e cols., 1996) (Quadro 1). Existem inúmeras técnicas que são utilizadas na detecção dos sorogrupos. A mais empregada atualmente é a soroaglutinação, pela reação do antígeno capsular e anticorpo policlonal específico (Vedros, 1987; Aakre e cols., 1998). Outras técnicas são a da co-aglutinação que emprega anticorpos monoclonais (mAbs) em técnica de enzima-imunoensaio (Rosenqvist e cols., 1990); a de ensaio *dot – blotting* (Rosenqvist e cols., 1990); o teste de látex potencializado por ultra-sonografia (Gray e cols., 1999), pelo teste específico *siaD* ou *ctrA* PCR através dos quais são identificados os sorogrupos B, C, W₁₃₅ e Y, o gene *siaD* é requerido para síntese do ácido polisiálico capsular e o gene *ctrA* codifica proteína de membrana externa responsável pela exportação do polissacarídeo capsular (Gray e cols., 1999; Porritt e cols., 2000, Tettelin e cols., 2000) e o PCR *Multiplex* que corresponde ao *siaD* que identifica os sorogrupos B, C, W₁₃₅ e Y e o *orf2*, o gene *orf2* é requerido para a síntese da cápsula do sorogrupo A, desta forma, identifica o sorogrupo A (Taha, 2000).

Quadro 1. Composição química da cápsula polissacarídica dos principais sorogrupos de *Neisseria meningitidis* (Volk e cols., 1996).

Sorogrupo	Cápsula polissacarídica
A	N- acetil O- acetil manosamina fosfato
B	α -2,8, ácido N-acetilneuramínico
C	α -2,9, ácido N-acetilneuramínico
W ₁₃₅	D-galactose e ácido-acetilneuramínico
Y	D-glicose e ácido N-acetilneuramínico

Os sorogrupos são subdivididos em sorotipos e sorosubtipos, de acordo as diferenças imunológicas das principais proteínas da membrana externa (Vedros, 1987). Os sorotipos são designados com base nas diferenças imunológicas das proteínas de membrana externa classe 2 e classe 3, Porina B (PorB), e os sorosubtipos são nomeados com base na especificidade imunológica da proteína de membrana externa de classe 1, Porina A (PorA). A nomenclatura de sorogrupo e sorotipo foi recomendada no subcomitê Família Neisseriaceae do Comitê Internacional em Nomenclatura Bacteriana, em 1948, onde ficou determinado que os sorogrupos seriam representados por letras maiúsculas e que, o sorotipo, por numerais arábicos (Branham, 1953;1958). Por exemplo, a designação B:4,7:P1.19,15, significa que a bactéria pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4,7 e sorosubtipo P1.19,15. As nomenclaturas designadas como Nt e nt significam que as proteínas de sorotipo e sorosubtipo não puderam ser identificadas pela técnica.

Atualmente existe uma variedade de técnicas empregando anticorpos monoclonais para identificação de sorotipos e sorosubtipos, como: soroaglutinação (Zollinger e cols., 1987), *dot-blotting* (Wedege e cols., 1993), radioimunoensaio (Zollinger e cols., 1978), ELISA (Crowe e cols., 1989) e aglutinação em látex (Wedege e cols., 1990). Até o momento foram identificados e classificados através da reação com anticorpos monoclonais 18 sorotipos e 18 sorosubtipos (Sacchi e

cols., 1998a e 1998b). A busca pela padronização dos *mAbs* (anticorpos monoclonais) tem permitido identificar novos tipos, como os *mAbs* que foram usados para identificar novos sorotipos, 7 e 10 e novo sorosubtipo P1.22a (Sacchi e cols., 2001). No entanto, o atual sistema utilizado na identificação dos sorotipos e sorosubtipos, ainda não é satisfatório, porque freqüentemente uma proporção dos isolados permanece não sorotipados, pela falta de anticorpos monoclonais que possam identificar toda a diversidade de epítomos de sorotipo e sorosubtipos (Sacchi e cols., 1998). Embora a fração seja pequena e até agora não inclui, na maioria das vezes, as cepas responsáveis por surtos. Nos EUA 15% dos isolados pertencentes ao sorogrupo B permanecem não tipados (Tondella e cols., 2000) e no Brasil em um estudo realizado em 12 estados, foi constatado que 4% dos isolados do sorogrupo B também permanecem não tipados (Sacchi e cols., 2001).

Devido a essas observações, o esquema para tipagem baseado na aplicação da seqüência direta do gene da proteína Por A, tem sido proposto como alternativa para a sorotipagem (Suker e cols., 1994; Feavers, 1996; Sacchi, 1998). McGuines e cols. em 1990 analisando seqüências de aminoácidos de três proteínas de classe 1 de diferentes sorosubtipos, observaram que existia uma região bem conservada, com alto grau de homologia estrutural e duas regiões de alta variabilidade, as chamadas região variável 1 (VR1) e região variável 2 (VR2) na Por A (McGuines e cols., 1990). As regiões hiper-variáveis de Por A, VR1 e VR2 correspondem a regiões das alças I e IV (van der Ley e cols., 1991; Derrick e cols., 1999) (Figura 4).

Essas variabilidades podem ocorrer devido a efeitos genéticos e podem ter significado em situações epidemiológicas uma vez que ao serem expressas na superfície levam a pressão negativa da resposta imune. Derrick e cols., observaram em 1999, que recombinações de partes ou da maioria dos genes podem ter

envolvimento na geração de subtipos, como se demonstrou em isolados do Canadá, pertencentes ao tipo 2a:P1.5,2 (Derrick e cols., 1999). As seqüências desses isolados se diferenciavam por numerosas substituições simples de base de regiões fora e dentro das regiões variáveis. Esses achados apontam que em adição com mutações, a variabilidade genética no PorA podem ocorrer por mecanismo de recombinação em regiões hiper-variáveis. Outros mecanismos identificados que geram variabilidade são duplicação de códon e duplicação de códons triplo em regiões hiper-variáveis, deleção de quatro códons inserção de IS1301 e mutação na região do promotor do gene de Por A, resultando na perda total de expressão (Derrick e cols., 1999). Todos esses mecanismos podem resultar em subtipos de importância epidemiológica pela possibilidade de estarem relacionados a surtos, podendo ser caracterizados pelo sequenciamento das regiões variáveis de Por A. Devido a esta limitação da sorotipagem e sorosubtipagem, o sequenciamento da Por A pode ser utilizado como método em testes de tipagem.

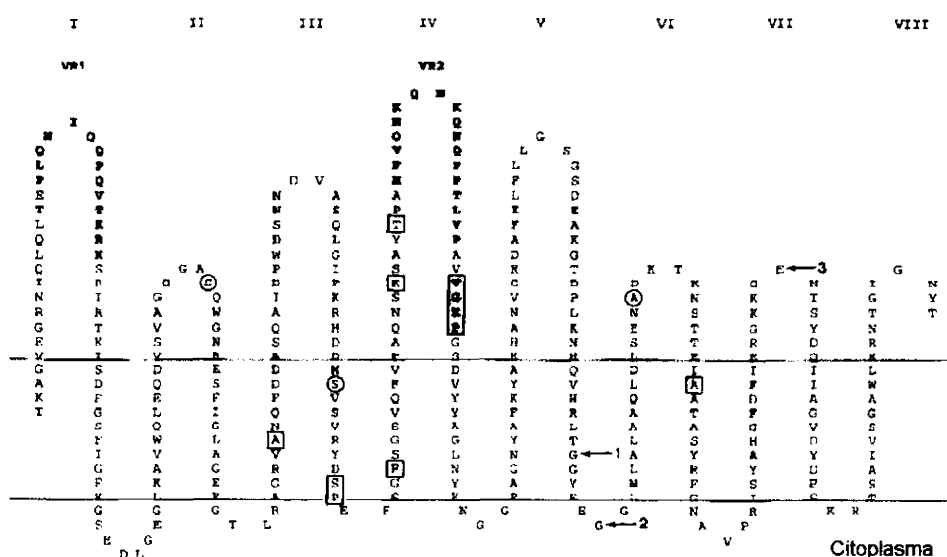


Figura 4. Topologia da proteína de Classe 1 do sorotipo P1.5a,10d baseado no modelo de van der Ley e cols., 1991, indicando os dez sítios de substituição, fora da VR1; Os círculos indicam sítios de mutações que levam a mudança de aminoácido e os quadrados expressam sítios com mutações silenciosas. As alças expostas na superfície da célula estão numerados em romano de 1 a 8. As duas regiões variáveis estão indicadas em negrito. (Adaptado de Jeifs e cols., 2000).

1.4 CLASSIFICAÇÃO PELO MLEE (MULTILOCUS ENZYME ELECTROPHORESIS)

Multilocus enzyme eletrophoresis tem sido extensamente usado em estudos de biologia populacional e filogenético, tanto em eucariontes quanto em procariontes e tem demonstrado ser útil diferenciando população genética de bactérias, especialmente, na caracterização do agente da doença meningocócica (Caugant, 1998). A técnica identifica variações alélicas em genes constitucionais pela migração eletroforética diferenciada em gel de agarose dos produtos destes genes (enzimas). Todas as bactérias isoladas podem ser caracterizadas pelo padrão dos alelos nos *loci* estudados. Pelo menos 15 *loci* são analisados como padrão para se obter uma discriminação adequada entre cepas de *N. meningitidis* (Selander e cols., 1986; Caugant, 1998).

O padrão alélico gerado determina um tipo eletroforético (ET) utilizando aproximadamente 15 enzimas, este tipo eletroforético corresponde ao genótipo do organismo (Selander e cols., 1986). O meningococo tem maior diversidade genética em comparação com outras bactérias. No entanto, apesar desta diversidade genética, uma proporção pequena, em torno de dez ETs, da *N.meningitidis* tem sido isolada repetidamente e têm sido causas de surtos por décadas e em várias partes do mundo, como o ET-5 (Caugant, 1998).

Existe micro-heterogenicidade genética entre cada complexo de ETs, como o ET-5, que são freqüentemente identificados como causa de surtos. Esses Ets, que comumente são associados à doença meningocócica, por todo o mundo sendo diferentes entre si, apenas por uma ou duas enzimas testadas no MLEE (Caugant e cols., 1986), o que, provavelmente, ocorre devido a eventos recombinantes recentes. Isto tem levado ao conceito de complexos clonais, também chamados de subgrupos,

grupos ou linhagens, que representam grupos de clones que são diferentes entre si, mas que apresentam correlação filogenética (Caugant, 1998).

1.5 EPIDEMIOLOGIA

As infecções por *N. meningitidis* são associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade por todo o mundo, ocorrendo de forma endêmica, epidêmica e hiperendêmica. A incidência anual média da doença meningocócica, durante os últimos 30 anos, variou de 1 a 3 por 100.000 habitantes, na maioria dos países industrializados, e de 10 a 25 por 100.000 habitantes em alguns países do terceiro mundo (Achtman, 1995; Caugant, 1998). Desde 1970, a incidência anual devido ao sorogrupo B tem aumentado, ficando em torno de 5 a 10/100.000 hab., em países da Europa, nas Américas e Sul da África (Caugant, 1986). O coeficiente de mortalidade da doença meningocócica, no Brasil, de 1988 a 1992 foi de 0,6/100.000 hab. no período, a taxa de letalidade foi de 18,3% a 21,5% no período (Ministério da Saúde-FUNASA, 1999) e no ano de 2000 foi registrada uma incidência anual de 2,06 / 100.000 hab no país (Ministério da Saúde-FUNASA, 2001).

Diferente das epidemias do sorogrupo A, que se caracterizam por elevado número de casos, muitas vezes como pandemias, primeiramente na África, a transmissão de doença meningocócica causada por isolados do sorogrupo B e C levam apenas a um aumento moderado da incidência, mas por outro lado podem durar várias décadas como hiperendêmias (Lystad & Aasen, 1991; Griffiss e cols., 1987). Uma região hiper-endêmica é caracterizada por níveis elevados de incidência persistindo por longo período de tempo (Olyhoek e cols., 1987). Nestas regiões, epidemias ainda podem ocorrer, sendo caracterizada quando em uma coletividade ou região o número de casos observados excede o número esperado

um determinado período de tempo, como aconteceu em São Paulo e Rio de Janeiro nas décadas de 70 e 80 (Ministério da Saúde-FUNASA, 2001).

Em regiões geográficas distintas no mundo, a distribuição da doença meningocócica e os sorogrupos isolados, variam de uma região para outra região. Nos Estados Unidos, a incidência anual média da doença meningocócica no período de 1992 a 1996 foi de 1/100.000 hab., com predomínio dos sorogrupos B, C e Y (Rosenstein e cols., 1999). No entanto, recentemente o sorogrupo Y aumentou de 2% em 1990-1992, para 37% em 1996-1998 (Lingappa e cols., 2001). Na Noruega, a incidência anual variou de 4-8/100.000 hab. entre 1988 e 1998, com predomínio dos sorogrupos B e C (Smith e cols., 1999). Já nos países do oeste e centro do continente Africano, a incidência anual média tem sido de 27/100.000 hab., com predomínio do sorogrupo A, que tem sido o principal sorogrupo identificado nas epidemias ocorridas em todo o mundo (Miller e cols., 1999). Em 1996 a Organização Mundial de Saúde relatou 153.000 casos de meningite, com mais de 16.000 mortes, na região do Subsaara, conhecida como "cinturão de meningite" (Tikhomirov e cols., 1997). Esta região que se estende do leste da Etiópia até o oeste do Senegal, representa uma ameaça recorrente à saúde pública, nos últimos cem anos, pela alta incidência da doença meningocócica do sorogrupo A (Schwartz e cols., 1989). Em 2000, um surto internacional devido ao sorogrupo W₁₃₅ ocorreu, associado aos peregrinos Hajj, que retornavam de Meca, Arábia Saudita (Popovic e cols., 2000).

No Brasil, ocorreram várias epidemias seqüências, devido aos sorogrupos A, B e C, na primeira metade da década de 70. As taxas de incidência anual dos sorogrupos A e C atingiram 170/100.000 hab. A partir de 1976, a ocorrência voltou a valores endêmicos. A década de 80 observou-se uma baixa incidência da doença,

com o predomínio do meningococo sorogrupo B. A partir de 1986, foi observado um aumento na incidência de casos, com vários surtos epidêmicos identificados em diversas regiões do país, provocados pela introdução do sorogrupo B, especificamente, pela cepa cubana 4,7:P1.19,15 (Sacchi e cols., 1992; Ministério da Saúde-FUNASA, 2001). Apesar do predomínio do sorogrupo B, a década de 90 foi caracterizada por uma diminuição proporcional da presença daquele sorogrupo e aumento progressivo do sorogrupo C (Ministério da Saúde-FUNASA, 2001).

A cidade de Salvador apresentou este mesmo perfil epidemiológico. Em 1973 a incidência anual das meningites meningocócicas foi de 4 / 100.000 hab. Nesta mesma década a incidência anual atingiu o índice de 39 / 100.000 hab., em 1975, associado principalmente ao sorogrupo C (Bryan e cols., 1990). Uma segunda epidemia ocorreu em 1978, devido ao sorogrupo A, atingindo uma incidência de aproximadamente 18 / 100.000 hab. A partir de 1978, a incidência da doença meningocócica atingiu o índice de 3,8 / 100.000 hab em 1982, com predomínio do sorogrupo B, seguido do sorogrupo C (Bryan e cols., 1990). No momento, o sorogrupo B é responsável por mais de 70% dos casos que ocorrem em micro surtos. Ainda, não há registros de epidemias, mas, está ocorrendo a transmissão de cepas hiperendêmicas, principalmente, dos sorogrupos B e C (Boletim Epidemiológico/Sesab-SUS, dez., 1999). Em 2000, a incidência, na Bahia, foi de 1,26 / 100.000 hab. (Ministério da Saúde-FUNASA, 2001).

Em todo o mundo epidemias e hiperendemias da doença, são associadas à disseminação de um número limitado de clones virulentos, identificados pelo MLEE, na população susceptível. Alguns estudos demonstraram que subgrupos e clones foram identificados em regiões específicas e que através da análise genotípica desses microrganismos foi observado que, cada epidemia ou hiperendemia foi

associada à propagação de um único clone (Wang e cois., 1992; Caugant, 1998) sendo os complexos clonais ET-5, ET-37, Grupo A4, Linhagem III, e Subgrupo I, III e V os principais identificados em todo o mundo (Caugant, 1998) (Quadro 2).

Quadro 2. Características sorológicas e fontes geográficas dos complexos clonais (ETs) pelo MLEE, responsáveis por epidemias de doenças meningocócicas no mundo (Adaptado Caugant, 1998).

Complexo Clonal	Designação de cepa	Sorogrupo	Principais Soro-Sorosubtipos	Fonte geográfica
Subgrupo I		A	4,21:P1.10	Global
Subgrupo III	África	A	4,21:P1.20,9	Global
Subgrupo V		A	4,21:P1.7,10	China
Complexo ET-5	Noruega Chile Cuba	B, C (<5%)	15:P1.7,16 15:P1.16 15:P1.15 15:P1.3,15 4:P1.12 4:P1.3 15:P12,13a 15:P1.3 4,7;P1.19,15	Global
Grupo A4	Holanda Brasil	B, C	2b:P1.2 2b:P1.10 2b:P1.3	Américas, Europa e África do Sul
Linhagem III	Holanda	B	4:P1.4	Europa, Nova Zelândia e Américas
Complexo ET-37		C, W ₁₃₅	2a:P1.5,2 2a:P1.5,10 2a:P1.5 2a:P1.15	Arábia Saudita *Peregrinos Hajj EUA, Canadá Austrália, Inglaterra Brasil

Complexo ET-5

Análises dos genótipos identificados pelo multilocus enzimático, em uma coleção de cepas da Dinamarca, estabelecido no início de 1940 e da Holanda e Noruega no início de 1960, identificaram que o primeiro isolado do complexo ET-5 foi de um paciente da Noruega, em 1969, cinco anos antes do primeiro relato da epidemia, devido a este complexo (Caugant, 1998). Isto indica, que a epidemia pelo complexo ET-5, não ocorra tão logo a cepa seja introduzida na população, devido à baixa transmissão do clone (Caugant,1998). A partir da década de 70 isolados pertencentes ao complexo ET-5 foi identificado em diversas partes do mundo sendo responsável por surtos em diversas regiões geográficas. A distribuição geográfica e temporal dos isolados, pertencentes ao complexo ET-5, é demonstrada na figura abaixo (Figura 5).

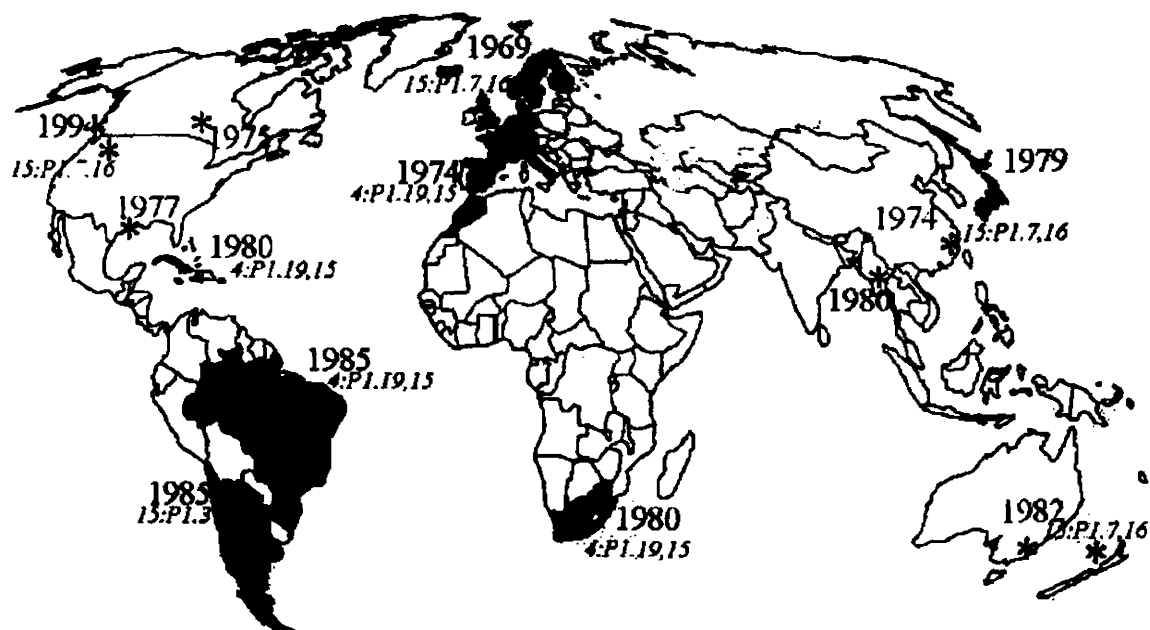


Figura 5. Distribuição geográfica de surtos causados por clones do complexo ET-5. As datas indicadas referem-se ao período da primeira identificação em cada região (Caugant, 1998).

O complexo ET-5 é formado por vários Ets, que descrevem o padrão típico de alelos nos loci, com diversos sorotipos e sorosubtipos, diferentes entre si, por apenas uma ou duas enzimas quando testadas no MLEE (Caugant e cols., 1986). Cada ET é constituído por bactérias com genótipos idênticos identificados pelo MLEE, supostamente, devido ao fato de que elas tenham se originado de uma mesma linhagem celular ancestral, sendo desta forma considerados membros de um mesmo clone (Caugant e cols., 1998; Yakubu e cols., 1999). O clone inicial foi identificado em 1975 na Noruega, durante uma epidemia causada por meningococos sorogrupo B, revelando que nos picos da epidemia, mais de 75% dos isolados dos pacientes, pertenciam ao complexo ET-5, sendo, ao final da epidemia, com sorogrupo B, embora 1% das cepas ET-5 foram sorogrupo C. Através da sorosubtipagem destes casos, demonstrou-se que a maioria das cepas ET-5 eram 15:P1.7,16.

Logo após a epidemia inicial, novos clones pertencentes ao grupo ET-5 foram identificados no mesmo período, na Espanha, uma alta incidência de doenças do sorogrupo B foi observada, onde clones do complexo ET-5, também foram identificados como responsáveis pela epidemia. Com o predomínio de sorotipo e sorosubtipo, 4:P1.19,15, com poucos isolados pertencentes ao sorotipo dominante na Noruega, indicando a mudança nas PorA e PorB neste grupo clonal de ET-5 (Caugant e cols., 1986). Grandes epidemias também ocorreram em Cuba, na década de 80, pelo mesmo clone da Espanha, agora conhecida por "cepa cubana". Esta cepa se propagou para Flórida-EUA e América Latina (Caugant e cols., 1986). Em 1994, foram notificados casos nos estados de Washington e Oregon, associados também a organismos do complexo ET-5, no entanto, com cepas com o mesmo padrão de sorotipos das cepas de ET-5 da Noruega, B:15:P1.7,16 (Reeves., 1995).

Um novo clone do complexo ET-5, também foi responsável por surtos que começaram em 1985, na cidade de Iquique, Chile, que depois se disseminou por todo o país, associado a um novo sorotipo e sorosubtipo, B:15:P1.3 (Caugant e cols.,1986; Cruz e cols.. 1990).

Desde 1994, casos de cepas sorogrupo C, pertencentes ao complexo ET-5, têm sido registrados, em Washington e Oregon-EUA. Swartley e cols. demonstraram que a troca da cápsula ocorreu por conversão do gene que codifica a polimerase capsular, *in vivo*. Presumivelmente, a co-colonização do sorogrupo B e C, na nasofaringe humana e a troca genética de genes responsáveis pela biossíntese da cápsula por transformação e permuta alélica, são eventos responsáveis pela mudança da cápsula (Swartley e cols.,1997). Esse mecanismo pode explicar a existência de cepas com múltiplos sorogrupos (Quadro 2), durante epidemias ou por períodos prolongados, mas com o mesmo padrão de sorotipos e sorosubtipos. Mesmo assim o mecanismo de pressão evolucionária, presumivelmente associada com resposta imune na população que selecionou ET-5 pertencente ao sorogrupo C, não é conhecido.

Os primeiros isolados identificados como ET-5, foram introduzidos no Brasil, em 1979, embora só fossem associados a aumento da incidência da doença, especialmente, em São Paulo, depois de 1985, por causa de epidemias. Entre 1980 –1986, a incidência anual média, na Grande São Paulo, foi em torno de 1,0-2,0/100.000 hab.; após a introdução da “cepa cubana” 4,7:P1.19,15, pertencente ao complexo ET-5, a incidência foi se elevando até atingir o índice 5/100.000hab., em 1990 (Sacchi e cols.,1992).

Complexo ET-37

O complexo ET-37, representa um grupo de clones associado a epidemias, nos últimos 40 anos, em todo o mundo. O primeiro surto do clone ET-37 foi documentado nas forças armadas americana, em 1960 (Wang e cols.,1993; Brundage e cols.,1987). Os sorogrupos B, C, W₁₃₅ e Y, estão relacionados neste complexo, presumivelmente, pela troca de cápsula, devido à recombinação gênica e são caracterizados pelos sorotipo 2a e sorosubtipos, P1.5,2 ou P1.5 (Caugant e cols.,1987; Craven,1978).

Este complexo foi responsável por um surto, no Brasil, em 1976, devido ao sorogrupo C (Caugant e cols., 1987). Cepas do sorogrupo B, pertencentes ao complexo ET-37, também foram identificadas em casos de meningites na China em 1974. A maioria das cepas sorogrupo C, isoladas nos EUA, Europa e em países da África, na década de 80, também pertenciam ao complexo ET-37 (Wang e cols., 1993). Na África, freqüentemente, foram encontrados isolados pertencentes aos sorogrupos Y ou W₁₃₅ (Guibourdenche e cols., 1996).

Entretanto, o impacto na doença desse complexo, está diminuindo por razões ainda não entendidas. Na última década, 10 a 20% das doenças meningocócicas, na Noruega, foram causadas por organismos do sorogrupo C pertencentes ao complexo ET-37 (Caugant,1998). Recentemente, contudo, no ano de 2000, foram relatados mais de 300 casos confirmados de doença meningocócica nos EUA, França, Inglaterra e Arábia Saudita, todas associados a peregrinos Hajj, cujos isolados bacterianos do complexo ET-37 pertenciam ao sorogrupo W₁₃₅ sorotipo e sorosubtipo, 2a:P1.5,2 (Popovic e cols., 2000; Claus e cols., 2001).

Grupo A4

Um outro complexo clonal associado a epidemias e hiperendemias é o grupo A4 (Caugant e cols., 1987) que pode estar associado aos sorogrupos C e B e geralmente caracterizado pelo sorotipo e sorosubtipo, 2b:P1.2 ou 2b:P1.10. A primeira identificação do grupo A4, foi feita na Holanda, em 1961 (Caugant e cols., 1990) e em 1970, foi causa comum de doença nos EUA, Canadá, Reino Unido, Islândia e muito outros países europeus e também foi responsável por epidemias do sorogrupo B, em 1979 na Cidade do Cabo, África do Sul. (Caugant e cols., 1990; 1987).

Nos últimos anos, clones do grupo A4 têm sido associados ao aumento de incidência de doenças do sorogrupo C, em crianças no Brasil, em particular, na grande São Paulo, no período de 1989-1990 onde ocorreu uma epidemia devido a este grupo, que representou 74% dos isolados pertencentes ao sorogrupo C, (Sacchi e cols., 1992). Neste mesmo período, cepas epidêmicas de *N. meningitidis* C:2b:P1.3 também foram responsáveis por epidemias em Curitiba, onde a incidência média anterior a este período era de 1,6/100.000 hab., atingindo o índice de 10,45/100.000 hab. em 1990 (Sacchi e cols., 1994).

Linhagem III

Um novo complexo denominado Linhagem III (Caugant e cols., 1990), foi identificado, na Holanda, em 1980, sendo que, em 1990 20% dos isolados pertenciam a este novo complexo (Scholten e cols., 1994). Este complexo foi encontrado com baixa frequência em outros países da Europa. Entretanto, no começo dos anos 90, na Nova Zelândia, ocorreu uma epidemia associada à introdução de cepas B:4:P1.4, pertencentes a Linhagem III (Carion e cols., 1997).

Cepas desse grupo foram recentemente encontradas no Chile, demonstrando que este clone, também, é encontrado no continente Americano (Caugant, 1998).

Subgrupos I e III

O sorogrupo A pode ser dividido em nove complexos ou subgrupos, destes os subgrupos- I e III, foram responsáveis por três pandemias, nos últimos 30 anos (Wang e cols., 1993). Os isolados de subgrupo I, pertencem ao sorotipo e sorosubtipo 4,21:P1.10 e do subgrupo III pertencem ao sorotipo e sorosubtipo 4,21:P1.20,9. O subgrupo I foi, primeiramente, descrito no Reino Unido, em 1941 (Achtman, 1995), mas epidemias do sorogrupo A ocorreram em vários países, durante a Segunda Guerra Mundial. Sendo identificado, em 1960 no Norte da África e em países do "cinturão de meningite meningocócica africano". Em 1970, propagou-se para o continente americano, onde causou surto da doença, no Brasil, EUA e Canadá (Olyhoek e cols., 1987; Peltola, 1991; Sacchi e cols., 1992). No mesmo período, também foi encontrado na Europa e na África, em epidemias na Nigéria e Ruanda, aparecendo estando na África do Sul em 1968 (Olyhoek e cols.,1987). Também surtos na Nova Zelândia e Austrália ocorreram entre 1980 e 1990 (Wang e cols., 1992).

Clones do subgrupo III, especialmente, o clone III-1, foram responsáveis por duas pandemias, ambas iniciadas na China, há 15 anos (Olyhoek e cols.,1987). Em 1974-1975, uma epidemia causada por isolados do sorogrupo C, em São Paulo, foi repentinamente substituída por uma epidemia mais grave, causada pelo sorogrupo A, que estava associada ao clone III-1, no entanto, poucos casos foram analisados pelo MLEE (Olyhoek e cols., 1987). Provavelmente essa cepa foi responsável por surtos em Salvador devido ao sorogrupo A. Muitas epidemias ocorreram ao longo das últimas décadas, tendo como responsável, o clone III-1, em 1990, na China,

(Olyhoek e cols., 1987) e em 1987, durante peregrinação Hajj, para Meca (Moore e cols., 1989). A introdução de cepas do subgrupo III no continente Africano depois da peregrinação Hajj, em 1987, levou ao aparecimento de epidemias e surtos fora do tradicional cinturão de meningite (Caugant, 1998).

1.6 VACINAS CONTRA A DOENÇA MENINGOCÓCICA

O alto índice da doença, em crianças, a sua rápida disseminação e a alta taxa de morbidade e mortalidade, indicam para a necessidade de pesquisas de vacinas contra a *N. meningitidis* (Pollard e Levin, 2000), sendo a distribuição de sorogrupos a base para a realização dos programas de vacinação. Uma vacina será eficaz, quando for imunogênica e capaz de produzir uma proteção duradoura, principalmente, na população alvo que tem mais risco de adquirir doença meningocócica, crianças até os quatro anos de idade (Requejo, 1997).

A vacina monovalente A, vem sendo utilizada em países africanos, durante as últimas décadas, mostrando eficácia em situações de epidemia (Erwa e cols., 1973; Wahdan e cols., 1973; Wang e cols., 1984). No entanto, estudos demonstram que cinco anos após a vacinação, os títulos de anticorpos retornam aos valores iniciais, principalmente, em crianças que tinham menos de quatro anos de idade na época da vacinação. A eficácia de 87% registrada após o primeiro ano de vacinação decaiu para 70% e 54% no 2º e 3º ano respectivamente (Ceessay e cols., 1993, Reingold e cols., 1985).

O mesmo ocorre com a vacina C, sobretudo em menores de dois anos de idade, pelo fato de que a resposta anticórpica ao polissacáride é T -independente e conseqüentemente não induz à memória imunológica nessas crianças, devido à imaturidade do sistema imune (Peltola, 1983). Por exemplo, a imunização realizada em São Paulo, durante a epidemia de 1971-74 apresentou fraca imunogenicidade

nesta faixa etária, mas, foi suficiente para diminuir o risco da doença, na faixa de 24 a 36 meses (Taunay e cols., 1975;1978). Estudos indicam uma efetividade entre 52 - 60%, em crianças menores de 2 anos de idade, que foram acompanhadas até dois anos após a vacinação (Rosenstein e cols., 1999).

Experiências têm sido avaliadas no uso de vacina capsular bivalente A e C, sobretudo na Nigéria (Mohammed & Zaruba, 1981) e no Brasil (Gotschiich e cols., 1978), onde resultados similares foram obtidos. Durante os anos epidêmicos de 1977 a 1980, na província de Bauchi, Nigéria, mais de 2,5 milhões de crianças de 3 a 15 anos de idade foram vacinadas com A e C, onde ocorreu um decréscimo significativo do número de casos da doença na região indicando que a vacinação em massa pode oferecer uma melhor expectativa na contenção de epidemias de meningite meningocócica (Mohammed & Zaruba, 1981). Em São Paulo entre 1972-1974 ocorreu uma epidemia devido aos sorogrupos A e C com um índice de 179 casos por 100.000 hab. Neste período 95% da população foi vacinada com a vacina bivalente A e C. (Gotschiich e cols., 1978). A partir de 1980, o índice da doença meningocócica ficou em torno de 1,0 a 1,4 casos por 100.000 hab (Sacchi e cols., 1992). Investigações sobre a eficácia desta vacina foram realizadas, e foi observado que apesar de está relacionada à diminuição do número dos casos após a sua aplicação, a idade tem sido um fator crucial para a soro-conversão e persistência dos níveis dos anticorpos, onde a soro-conversão contra o sorogrupo A foi observada nos menores de três meses de vida, no entanto, uma resposta significativa contra o sorogrupo C (Lepow e cols.,1986). Em um estudo realizado na África, a eficácia da vacina durante os dois anos após a vacinação foi estimada em 78% (Greenwood e cols., 1986) e cinco anos após a vacinação os níveis de anticorpos retornaram a valores pré-imunização (Ceasay e cols., 1992).

Em 1982, a vacina polissacarídica tetravalente, que confere proteção contra os sorogrupos A, C, Y e W₁₃₅, foi introduzida nos EUA. Extensas experiências com esta vacina, têm demonstrado segurança e os efeitos adversos são geralmente moderados (Lepow e cols., 1986). No entanto, vacinação de rotina, na infância, com a vacina tetravalente, não é recomendada, uma vez que é relativamente ineficaz nas crianças < de 2 anos, sendo pobremente imunogênica (Lepow e cols., 1986) e o risco em maiores de dois anos não é alto, não podendo ser beneficiadas pela proteção. Além disso, os polissacarídeos da vacina induzem uma resposta imune de células B, T-independente, não conferindo uma resposta imune adequada nesta faixa etária (WHO, 1998). Por esses motivos, a vacina tetravalente tem sido utilizada primariamente no controle de epidemias onde tem um aumento significativo no risco nas populações maiores de dois anos ou em outras situações de risco, como na imunização de recrutas militares (WHO, 1998).

Assim, como a vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b, polissacarídeos de meningococos A, C, Y, W₁₃₅ têm sido, quimicamente, conjugados com proteínas carreadoras. Essas vacinas conjugadas induzem à resposta de células B, T-dependente, resultando em uma resposta imune adequada que produz anticorpos anti-capsulares e também induz o aparecimento de memória imunológica dessas respostas, elevando os títulos de anticorpos nas doses subsequentes (Lepow e cols., 1999).

A utilização de vacinas conjugadas tem sido avaliada e estudos têm demonstrado que a utilização destas vacinas poderá reduzir de forma significativa a incidência da doença meningocócica. Um estudo realizado nos Estados Unidos para avaliar estratégias para o uso de vacinas conjugadas mostrou que a adição de sorogrupo Y na vacina conjugada contra sorogrupo C, usada na vacinação infantil,

poderá resultar na redução da incidência em torno de 48% das doenças meningocócicas no país (Lingappa e cols., 2001). Na Inglaterra foi realizada uma análise da eficácia da vacina conjugada contra o sorogrupo C, 11 meses após a sua introdução, e ficou demonstrada uma eficácia de 97% nos adolescentes e 92% nas crianças, -confirmando a superioridade da vacina conjugada sobre a vacina polissacarídica, as quais são ineficazes em crianças jovens (Ramsay e cols., 2001).

O sorogrupo B possui a cápsula polissacarídica fracamente imunogênica em humanos (Griffiss e cols.,1991), isto é atribuído a uma tolerância devido à sua semelhança com oligômeros α -(2→8) do ácido siálico ou ácido α -(2→8) N-acetil-neuramínico, presentes também nos glicopeptídeos humanos (Brisson e cols., 1992). Desta forma, as estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o sorogrupo B, tem como alvo, principalmente, os antígenos não-capsulares, como por exemplo, as proteínas da membrana externa (Frasch, 1989). Um aumento de anticorpos contra proteínas de membrana, que embora isoladamente não tenham poder bactericida, pode agir sinergicamente com os anticorpos anti-polissacarídicos pré-existentes, para elevar a atividade bactericida contra o meningococo B (Frasch e cols.,1976; Zollinger e cols., 1978;1987). Entretanto, a considerável diversidade antigênica das proteínas da membrana externa, bem como a variação temporal e geográfica, podem limitar a utilidade da vacina (Tondella e cols., 2000).

Na década passada, vacinas contra sorogrupo B, com diferentes composições de epítopos de Por A foram desenvolvidas, baseando-se na prevalência dos sorosubtipos, em diferentes áreas geográficas (Peeters e cols., 1996; Perkins e cols.,1998). Desta forma, a identificação da distribuição de sorosubtipos em uma região, se faz necessária para o desenvolvimento de vacinas apropriadas a cada situação local. Como exemplo a VA-MENGO-C-BC, produzida

pelo Instituto Finlay em Havana, Cuba (cepa cubana utilizada, CU385 B:4:P1.15) e a produzida no Instituto Nacional de Saúde Pública em Oslo, Noruega (cepa norueguesa utilizada, 44/76, B:15:P1.7,16), baseada em proteínas de membrana externa Classe 2; Sacchi e cols., demonstraram que em 10 estados brasileiros ocorre a prevalência de apenas três sorosubtipos (P1.19,15; P1.7,1; P1.7,16) do meningococo B, o que permitiria o uso de uma vacina baseada nesses tipos (Sacchi e cols., 2001).

A vacina cubana, VA-MENGO-BC, que consiste de 50 μ g de OMP e 50 μ g de polissacarídeo sorogrupo C por dose, preparada a partir da cepa CU385, B:4:P1.15, tipo predominante em Cuba e no Brasil, resultou numa proteção eficaz de 83% quando experimentada em cubanos de 10 a 16 anos de idade (Sierra e cols., 1994). Quando a vacina cubana foi aplicada em São Paulo no período de 1989-1990, numa população de 2,4 milhões de crianças de 3 meses a 6 anos de idade, a vacina cubana BC mostrou uma eficácia de 74% em crianças com mais de 4 anos de idade, porém a proteção não foi satisfatória para crianças com menos de 4 anos de idade, nas quais a eficácia ficou em torno de 37% (Milagres & Melles, 1993; Milagres e cols., 1994). A vacina norueguesa que é composta por 25 μ g de OMP, preparada a partir da cepa 44/76, B:15:P1.7,16, apresentou uma eficácia em torno de 57,2%, em um estudo realizado em crianças em idade escolar na Noruega em 1991 (Bjune e cols., 1991).

Apesar de que muitos esforços estejam sendo direcionados para a laboração de uma vacina adequada, tendo como base a distribuição dos sorotipos, já se sabe que os anticorpos monoclonais utilizados na sorosubtipagem, não são capazes de diferenciar todas as sequências variantes de Por A, o que pode explicar a perda da

reatividade do anticorpos anti-meningocócicos para algumas variantes de Por A (Pizza e cols., 2001).

Após o sequenciamento completo do genoma da cepa MC58, que pertence ao sorogrupo B, estudos têm sido desenvolvidos a fim de possibilitar a identificação de novas-proteínas de superfície que não mostram variabilidade na seqüência de DNA e aminoácidos entre cepas de *N. meningitidis*, que poderão ser usadas em vacinas efetivas, inclusive que sejam capazes de induzir imunidade contra outras cepas patogênicas do meningococo (Requejo, 1997; Pizza e cols., 2000).

1.7 GENOTIPAGEM E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

O processo de tipagem é importante epidemiologicamente, por ajudar a identificação dos surtos de infecção (Woods e cols., 1996), rotas de transmissão de patógenos (Daubek e cols., 2000), possíveis fontes da infecção (Kidd e cols., 2001), reconhecer, particularmente, cepas virulentas (Johnson e cols., 2000), monitorar programas de vacinação (Wedeg e cols., 1998), para demonstrar associação entre os casos ou entre casos e portadores durante um surto como também para monitorar mudanças epidemiológicas da doença (Roseinstein e cols., 1999; Olive & Bean, 1999; Yakubu e cols., 1999). Métodos de tipagem molecular são necessários, não somente para a epidemiologia e investigações genéticas de populações, mas também, para estudos relacionados ao desenvolvimento e aplicação de vacinas (Maiden e cols., 1998).

Vários métodos de tipagem molecular para *N. meningitidis*, que caracterizam isolados e que permitem discriminar níveis abaixo de espécie, são capazes de caracterizar toda e qualquer cepa. A técnica considerada o padrão-ouro para a tipagem de *Neisseria meningitidis*, é o MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) que determina o genótipo pela identificação de alelos de loci que codificam enzimas

constitutivas tipo "house-keeping". Alelos são identificados pela análise da variação de mobilidade eletroforética. O MLEE em geral identifica macro-variações na população bacteriana, sendo apropriado para estudo epidemiológico global de períodos relativamente longos, sendo a mais apropriada técnica para a identificação de linhagens hipervirulentas (Weis & Lind, 1998; Maiden e cols., 1998). No entanto, é uma técnica extremamente laboriosa, requer um tempo extenso para sua execução e o maior problema é a dificuldade de reproduzir resultados de uma mesma cepa entre laboratórios (Enright e Spratt, 1999). Como alternativa para o MLEE, foi desenvolvida a técnica do MLST (*multilocus sequence typing*) que consiste no sequenciamento direto de fragmentos internos de seis genes constitutivos, correspondentes às enzimas do MLEE. As vantagens do MLST são que uma maior discriminação entre populações de cepas pode ser detectada, o método é reproduzível entre laboratórios e os resultados podem ser facilmente comparados entre laboratórios, através de um banco de dados via *Internet*, possibilitando o monitoramento de cepas relacionadas a endemias ou epidemias de meningites meningocócicas. O MLST está sendo mais utilizado e tem sido considerada uma opção ao MLEE (Maiden e cols., 1998; Feavers e cols., 1999; Enright e Spratt, 1999). No entanto, o MLST é uma técnica que requer uma infraestrutura de alto custo, em equipamentos e reagentes que não são disponíveis na maior parte do mundo atingido pelas doenças meningocócicas.

Um outro grupo de métodos de tipagem possui a característica de detectar micro-variações no genoma, o que é necessário para distinguir cepas circulando dentro de uma região geográfica. Neste grupo, a técnica mais utilizada é o PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), através do qual o DNA bacteriano é digerido por enzimas de restrição que cortam sítios raros distribuídos no genoma e, em seguida,

os fragmentos são separados por eletroforese em campo pulsátil, gerando padrões de bandas polimórficos específicos para determinada cepa. O método é altamente reprodutível sendo um dos de melhor poder discriminatório e que já foi utilizado em diversos estudos de epidemiologia molecular (Bygraves & Maiden, 1992; Raymond e cols., 1997). No entanto, as limitações dos métodos são: o alto custo de enzimas e de outros reagentes, laboriosidade e de longo tempo de execução (5 a 7 dias), que reduzem a capacidade dos laboratórios em analisar grande número de amostras (Olive & Bean, 1999).

Outros métodos também podem ser utilizados na caracterização do meningococo, no entanto, são aplicados com menor frequência como: análises de endonuclease de restrição, RFLP (Bjorvatn e cols., 1992), ribotipagem (Stull e cols., 1988) e outros métodos baseados em PCR (Looveren e cols., 1998; Schmink e cols., 2001). Versalovic e cols. (1991), descreveram um método de tipagem bacteriana, fundamentado nos padrões dos fragmentos de DNA, cepa específica, obtidos de ampliações entre elementos repetitivos presente no genoma bacteriano.

Este método baseia-se nos resultados encontrados por Correia e cols., (1986) quando identificaram a seqüência repetitiva em *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*. Os sítios de inserção dessas regiões repetitiva são polimórficos entre cepas distintas, gerando um padrão de bandas também polimórfico. Esta técnica também pertence ao grupo de métodos que detecta micro-variações do genoma (Correia e cols., 1986; Versalovic e cols., 1991). O Rep-PCR (Reação de polimerase em cadeia de regiões palindrômicas extragênicas repetitivas do genoma), tem sido usado, com sucesso, para identificar polimorfismo entre cepas de *Bartonella* (Rodriguez-Barradas e cols., 1995), *Bacillus subtilis* (Versalovic e cols., 1991),

Citrobacter diversus (Woods e cols.,1992) *Staphilococcus aureus*, metilina resistente (DeVecchio e cols., 1995), *Streptococcus pneumoniae* (Ko e cols.,2000).

Para a *N. meningitidis*, este o método recebe a designação de NgREP-PCR (Woods e cols., 1996). A técnica é relativamente de fácil execução e aplicável a um grande ou- pequeno número de amostras (Olive& Bean, 1999). Através deste método, são amplificados múltiplos fragmentos que diferem de um isolado, para o outro, conforme sua proximidade clonal e filogenética. Métodos de tipagem baseados em Rep-PCR têm boa sensibilidade, especificidade é de execução rápida, que o torna atrativo, na rotina de vigilância local e investigações epidemiológicas (Versalovic & Lupski, 1995). No entanto, alguns trabalhos afirmam que o seu poder discriminatório é menor que o do MLEE e PFGE (Yakubu e cols., 1999). Podendo discriminar polimorfismos entre capas (taxonomia) mas não funciona nas situações epidemiológicas.

2 JUSTIFICATIVA

A natureza epidêmica dos surtos de doenças meningocócicas, mais os dados de letalidade, demonstram a importância de estudos epidemiológicos desse patógeno, entre os quais, aqueles relacionados à sua caracterização molecular.

Várias estratégias têm sido utilizadas para tipagem da *N. meningitidis*: *multilocus enzyme electrophoresis* (Selander, 1986), *multilocus sequence typing* (Maiden e cols., 1998; Feavers e cols., 1999), *pulsed-field gel electrophoresis* e PCR com *primers* arbitrários (Achtman, 1998). Estes métodos apresentam algumas dificuldades, incluindo disponibilidade limitada de reagentes, necessidade de capacidade técnica especializada, tempo de execução longo e execução extremamente laboriosa.

Diante das características de hiperendemia de doença meningocócica, no nosso estado e da importância de se caracterizar o patógeno, para identificar o modo de transmissão das cepas hipervirulentas, bem como na possibilidade de se utilizar a informação, na aplicação de medidas de prevenção, a disponibilidade de um método simples e eficaz de tipagem molecular poderá ser utilizado como ferramenta indispensável, em um estudo de investigação de epidemiologia molecular e na definição de políticas de saúde pública. O NgREP-PCR pode discriminar cepas como já descrito em estudos anteriores (Versalovic & Lupski, 1995; Woods e cols., 1996) e foi utilizado neste trabalho, como ferramenta, na identificação e caracterização de isolados de meningite meningocócica, para determinar as cepas relacionadas, clonalmente, e para validar a aplicação desse método na vigilância epidemiológica, em Salvador-BA.

Desta forma a caracterização molecular da *N. meningitidis* é de fundamental importância para os programas de vigilância epidemiológica, no controle da doença a nível de saúde pública, inclusive para a elaboração de vacinas específicas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar fenotípica e genotipicamente, a *N. meningitidis* isolada de casos de meningites de Salvador-BA.

3.2 ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Identificar as características clínicas e epidemiológicas da meningite meningocócica na população estudada;
- 3.2.2 Caracterizar a distribuição de sorogrupo e sorosubtipo de cepas de *N.meningitidis* isoladas dos casos de meningite durante um estudo populacional;
- 3.2.3 Validar o uso, como ferramenta nas investigações epidemiológicas, do método de tipagem baseado na amplificação por PCR das regiões extragênicas entre elementos repetitivos (NgREP-PCR);
- 3.2.4 Aplicar esse método de tipagem molecular na vigilância epidemiológica para identificar as cepas relacionadas clonalmente que contribuem na transmissão da doença meningocócica, em Salvador-BA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

Estudo do tipo corte-transversal em isolados de *N. meningitidis* de pacientes com meningite, referenciados para o Hospital Couto Maia, centro de referência para doenças infecciosas em Salvador, Bahia, responsável por mais de 95% da notificação, na cidade de Salvador.

4.2 PERÍODO DO ESTUDO

De 01 de fevereiro de 1996 a 31 de janeiro de 1999.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes de ambos os sexos e de todas as idades, atendidos no pronto atendimento do HCM, com suspeita de meningite e com uma cultura positiva de líquido por *N. meningitidis*. O caso era considerado suspeito, quando o paciente, no pronto atendimento, apresentava os padrões dos sinais e sintomas como: febre, cefaléia intensa, vômitos, alteração do sensório, dados vitais alterados, convulsões, manifestações cutâneas com púrpura, principalmente, se fossem acompanhadas de rigidez na nuca e em casos de crianças menores de oito meses, se apresentassem abaulamento de fontanela.

4.4 ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS

O isolamento de meningococos foi realizado no laboratório do Hospital Couto Maia, a partir do líquido, usando-se placas de agar chocolate, preparado com base *Trypticase Soy Ágar* (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubadas a 36° C, em lata com vela (ambiente de aproximadamente 3% de CO₂), por um período de 24 a 72 horas. Após

o crescimento bacteriano era feita a identificação de diplococos Gram negativos na coloração de Gram e aglutinação anti-soro específico para *N. meningitidis*, sorogrupos A, B e C (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Após o isolamento do meningococo, a placa de cultura era enviada ao CPqGM-FIOCRUZ, para continuidade do estudo experimental.

4.5 ESTOCAGEM BACTERIANA

Após novo repique em placa de agar chocolate, a amostra era incubada a 35° C, em estufa com ambiente de 5 % de CO₂, por um período de 24 horas. Após o crescimento era realizada a coloração de Gram para confirmação da ausência de contaminação e então a amostra era estocada a -70°C sob a forma de suspensão, em solução contendo 10% de glicerol (DIFCO) e 90% de BHI - Broth Infusion Heart (DIFCO).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROGRUPOS

O método de sorogrupagem (Vedros, 1987), foi realizado de acordo as instruções do fabricante (Difco), baseando-se na aglutinação macroscópica soro-específica de anti-soros produzidos em coelho contra os diversos antígenos capsulares (A, B, C, Y, W₁₃₅). Reagindo em paralelo a amostra, foram utilizadas as amostras ATCC 13090 pertencente ao sorogrupo B e ATCC 13102 pertencente ao sorogrupo C, como controles positivos e negativos; e salina para identificar reações falso-positivas por causa de auto-aglutinação (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA).

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS E SOROSUBTIPOS

As amostras foram enviadas para a Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) em São Paulo, centro de Referência Nacional para Meningite, onde foi realizada a sorosubtipagem. A tipagem foi realizada pela técnica de *dot-blot*, utilizando anticorpos monoclonais de acordo a lista abaixo (Sacchi e cols., 1998a e Sacchi e cols., 1998b) (Quadro 3). Os resultados de sorogrupos fornecidos também pelo IAL, foram usados para confirmar aos obtidos pela sorogrupagem realizada no CPqGM/FIOCRUZ, para analisar a concordância dos resultados.

Quadro 3. Anticorpos monoclonais utilizados na determinação dos sorotipos e sorosubtipos (SACCHI, et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b).

Anticorpos Monoclonais: Sorotipo		Anticorpos Monoclonais: Sorosubtipo	
1	10	P1.1	P1.12
2a	11	P1.2	P1.3a
2b	14	P1.3	P1.14
2c	15	P1.4	P1.15
4	16	P1.5	P1.16
5	17	P1.6	P1.19
7	19	P1.70	P1.20
8	21	P1.9	P1.22
9	22	P1.10	P1.22-1

4.8 GENOTIPAGEM POR REP-PCR

4.8.1 Primer

As seqüências repetitivas, REP, com 26 pares de bases, foram originalmente identificadas no DNA genômico em *N. gonorrhoeae* e, subseqüentemente, em *N. meningitidis* por Correia e cols., 1986. Os primers utilizados no presente estudo,

com 14 pares de bases, foram modificados por Versalovic e cois. (1991) a fim de identificar regiões extragênicas repetitivas designadas Ng-Rep, conforme abaixo:

NgREP-PCR1R - 5' ACA AAA ACC GGT AC 3'

NgREP 2 - 5' GTT AAT TCA CTA TA 3'

4.8.2 Cepas

Foram utilizadas as amostras de *N.meningitidis* isoladas de pacientes com meningite meningocócica, conservadas em freezer -70°C no LPBM do CPqGM-FIOCRUZ. Para a padronização da técnica e para validar a aplicabilidade como método de tipagem molecular, foram utilizadas como controles geográficos e temporais, cepas de outras cidades brasileiras da coleção de isolados fornecidos pelo IAL, São Paulo e pelo INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, de outros países, fornecidas pela Universidade da Califórnia, Berkeley/EUA, do CDC, Atlanta/ EUA, e as amostras padrões ATCC13077 (A:4,21:nt), ATCC13090 (B:NT:nt) e ATCC13102 (C:NT:P1.5), NCCLS, EUA (Quadro 4).

Quadro 4. Relação das amostras utilizadas na validação da NgREP-PCR.

Amostra	Ano de isolamento	Fornecedor	Origem geográfica	Sorotipo:sorosubtipo	MLEE
R-124	1990	INCQS/FIOCRUZ,RJ	Rio de Janeiro, Brasil	B:4,7:P1.7,1	-
R-04	1989	INCQS/FIOCRUZ,RJ	Rio de Janeiro, Brasil	B:4,7:P1.19,15	-
R-121	1990	INCQS/FIOCRUZ,RJ	Rio de Janeiro, Brasil	W135:19,10:P1.16	-
R-1563	1992	INCQS/FIOCRUZ,RJ	Rio de Janeiro, Brasil	C:2a:P1.3	-
R-1404	1992	INCQS/FIOCRUZ,RJ	Rio de Janeiro, Brasil	C:2b:P1.2	-
1215	1971	UCB,EUA	Egito	B:7:P1.5,2	-
610	1963	UCB,EUA	Norte da Europa	B:2a:P1.2	-
1322	1971	UCB,EUA	África	B:4,7:P1.7,16	-
2052	1980	UCB,EUA	EUA	B:NT:P1.5,2	-
559	1968	UCB,EUA	Coréia	B:4,7:P1.7,1	-
879	1969	UCB,EUA	Itália	C:2a:P1.5,2	-
1232	1971	UCB,EUA	Hawai	B:9:P1.2	-
1032	1970	UCB,EUA	EUA	B:NT:P1.9	-
N.1244	2000	IAL, SP	São Paulo, Brasil	C:2b:P1.3	-
N.1242	2000	IAL, SP	São Paulo, Brasil	C:2b:P1.3	-
N.412	2000	IAL, SP	Rio Grande do Sul, Brasil	B:4,7:P1.7,1	-
N.1141	2000	IAL, SP	Brasília, Brasil	B:4,7:P1.3	-
N.1185	2000	IAL, SP	São Paulo, Brasil	B:4,7:P1.3	-
N.248	2000	IAL, SP	Recife, Brasil	B:4,7:P1.19,15	-
N.150	1988	IAL, SP	São Paulo, Brasil	B:4,7:P1.19,15	ET-5
N.348	1988	IAL, SP	São Paulo, Brasil	B:4,7:P1.19,15	ET-5
N.49	1988	IAL, SP	São Paulo, Brasil	B:4,7:P1.19,15	ET-5
M1037	1993	CDC,Atlanta7EUA	Oregon, EUA	B:4,7:P1.7,16	ET-5
M3570	1997	CDC,Atlanta7EUA	Maryland, EUA	B:4,7:P1.7,16	ET-5
M3579	1997	CDC,Atlanta7EUA	Connecticut, EUA	B:15:P1.7,16	ET-5
M4291	-	CDC,Atlanta7EUA	Minnesota, EUA	B:19:P1.7,16	ET-5
M1019	1994	CDC,Atlanta7EUA	Califórnia,EUA	B:4,7:P1.7,16	ET-5
M262	1993	CDC,Atlanta7EUA	Califórnia, EUA	B15:P1.7	ET-5
M522	1992	CDC,Atlanta7EUA	Noruega	B:15:P1.7,16	ET-5

4.8.3 Extração de DNA

O método de extração de DNA foi uma modificação do protocolo de Rademaker & Bruijn (1997). As amostras congeladas, passaram por dois cultivos consecutivos em ágar chocolate a 35°C, por 24 horas, em atmosfera de 5% de CO₂ e em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana com alça bacteriológica de 0,001mm, de platina em 1,0 mL de salina tamponada (PBS, pH 7,4), com turvação

equivalente à escala 1,0 de McFarland (aproximadamente uma alça cheia). Esta suspensão foi centrifugada por 2 minutos x 13.500 rpm, a 4°C. A massa bacteriana foi ressuspensa em 100µL de Tris HCl 10mM, pH 8,0 e incubada em banho fervente por 15 minutos. Após centrifugação por 10 minutos x 13500 rpm, o sobrenadante foi diluído na proporção de 1:10; 1:100; 1:1000 em Tris HCL 10mM, pH 8,0, durante a padronização e utilizado imediatamente ou conservado a -20°C, em futuras reações.

4.8.4 NgREP-PCR

A mistura reagente foi preparada em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, contendo para cada reação: Tampão 10x (KCl 500mM, MgCl₂ 20mM, Tris - HCl 100mM); 2U Taq DNA polimerase recombinante (Gibco BRL, Nova York, EUA); 200µM de cada nucleotídeo, dNTPs (Gibco BRL); 1,0µM de cada primer NgREP 1R e NgREP 2; 2mM de MgCl₂ 100mM (Sigma); dimetil-sulfóxido 100% (Sigma) e água ultra-pura (Gibco BRL).

Em tubos tipo eppendorfs de 0,2 mL foi adicionado 5 µL de amostra e adicionado 45µL da mistura reagente e a amplificação foi feita em termociclador tipo Perkin Elmer 2400, seguindo as seguintes incubações: 95°C, por 7 minutos (pré-desnaturação); 35 ciclos de 90°C, por 30 segundos (Desnaturação), 38°C, por 1 minuto (Hibridização) e 65°C, por 8 minutos (Elongação); finalizando com 65°C, por 16 minutos.

4.8.5 Eletroforese

Os produtos da PCR foram visualizados contra luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE (Tris - acetato 0,04 M, EDTA 0,01M, pH 8,0), em corrente constante de 80 volts, por aproximadamente 2 horas, e em seguida, corados com brometo de etídio (10mg/mL). Em cada gel foi utilizado um

marcador externo de peso molecular 250pb DNA Ladder (Gibco BRL), aplicado em três posições por gel, nas laterais e centro do gel. As imagens foram digitalizadas pelo sistema de captura de imagem Eagle Eye II (Stratagene) e arquivadas como imagens.

4.8.6 Padronização da NgREP-PCR

Concentração de DNA

Durante a padronização da NgREP-PCR, foram avaliadas as condições de extração do DNA, tendo sido estabelecido a melhor condição para realização do PCR de fácil execução e para obter a concentração de DNA mais adequada a ser utilizada. Para a padronização, selecionamos os isolados: GNC01 (B:4,7:P1.19,15), primeira amostra do nosso estudo, e M610 (B:2a:P1.2), originado da Europa. A reação da PCR foi realizada em duplicata com o extrato bruto de DNA de cada isolado, com diluições de 1/10 e 1/100 de cada amostra e água como controle negativo para demonstrar a não contaminação da reação.

Conforme demonstrado na figura 6, através da análise das duplicatas, pode-se observar que houve boa reprodutibilidade intra-experimento. Pode-se observar, que na diluição de 1/10, o isolado GNC01 apresentou cinco bandas, contra dez, na diluição de 1/100. Já o isolado M610, apresentou sete bandas na primeira diluição, contra 11, na diluição de 1/100. Desta forma, a diluição de 1/10 foi escolhida, por apresentar bandas resolutas e com uma intensidade adequada, para facilitar a interpretação visual dos padrões, na eletroforese do gel (Figura 6).

A partir de então, os extratos de DNA de GNC01 e M610, foram utilizados como controles de qualidade, em todos os experimentos seguintes. Quando os padrões destas amostras não reproduziram corretamente, ou seja, quando os padrões desses isolados não correspondiam aos determinados na padronização, o

experimento foi repetido.

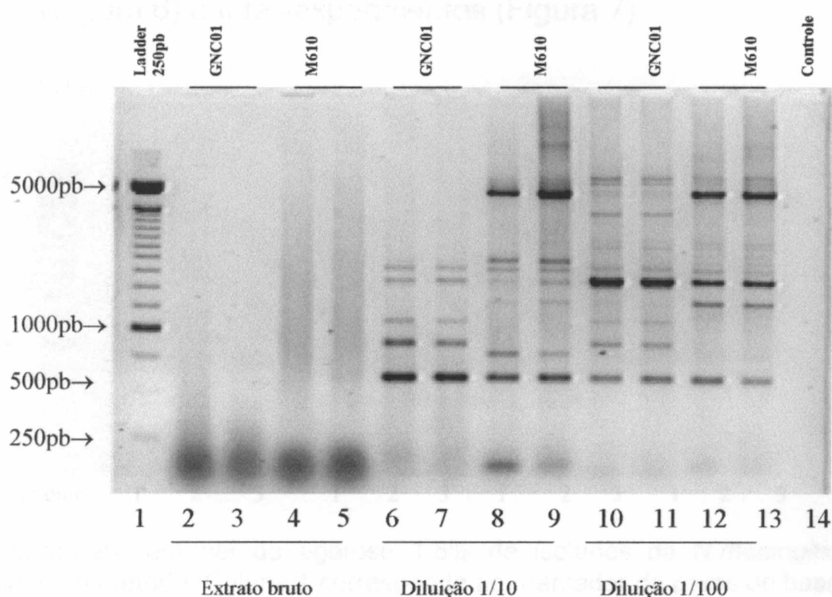


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amostras controle em duplicata e em diferentes diluições. Coluna 1 corresponde ao marcador de pares de bases Ladder 250pb; 2 e 3 correspondem ao extrato bruto de DNA do isolado GNC01; 4 e 5 ao extrato bruto do isolado M610; 6 e 7 o DNA na diluição de 1:10 do isolado GNC 01; 8 e 9 a diluição de 1:10 do isolado M610; 10 e 11 a diluição de 1:100 do isolado GNC01; 12 e 13 a diluição de 1:100 do isolado M 610 e; 14 o controle negativo da reação.

Reprodutibilidade

Outra etapa da padronização foi a avaliação da reprodutibilidade da técnica inter e intra-experimentos, uma vez que toda técnica de tipagem molecular, deve ter uma boa reprodutibilidade, quando repetida com a mesma cepa, para que possa ser utilizada com segurança em estudos de epidemiologia molecular.

Para a demonstração da boa reprodutibilidade da NgREP-PCR, foram realizados três experimentos consecutivos com quatro amostras (GNC01; M610; GNC18; GNC124), para observar a repetição dos padrões nos experimentos realizados (Figura 7). Nesta avaliação, os isolados examinados apresentaram o mesmo padrão de bandas nos três experimentos sendo que o GNC01 apresentou cinco bandas, o M610, sete bandas, o GNC18, seis bandas e o GNC124, quatro

bandas. Desta forma pode-se observar a reprodutibilidade da NgREP-PCR intra-experimento (Figura 6) e inter-experimentos (Figura 7).

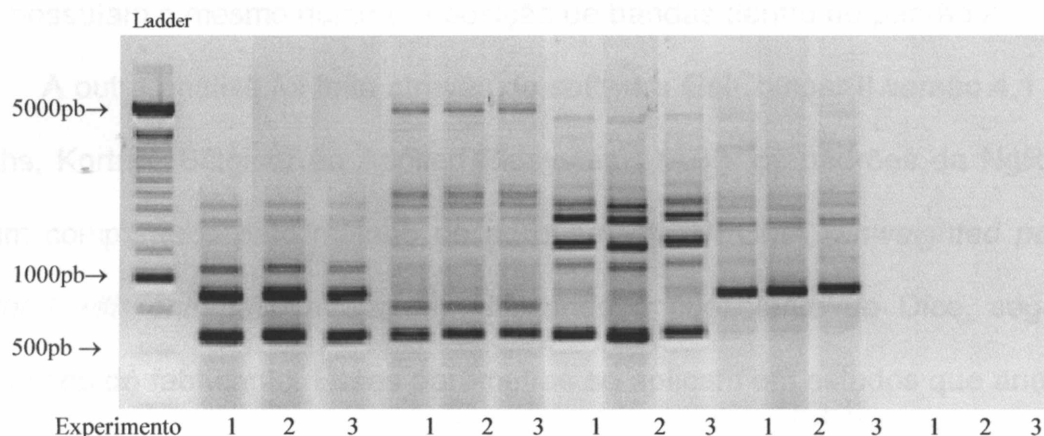


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de isolados de *N.meningitidis* para demonstrar reprodutibilidade do método. Coluna 1 corresponde ao marcador de pares de bases Ladder 250pb; 2, 3 e 4; 5, 6 e 7; 8, 9 e 10; 11, 12 e 13; e 14, 15 e 16; correspondem respectivamente aos produtos de PCR dos isolados GNC01, M610, GNC18, GNC124 e controle negativo, em três experimentos diferentes.

4.8.7 Análise dos produtos amplificados e determinação dos padrões genéticos

Foram realizados dois tipos de análises dos produtos amplificados para estratificar cepas em termos de relação genética entre si, detectados pelos padrões de bandas na eletroforese. Uma análise visual, tendo por base a posição e o tamanho das bandas em relação ao marcador de peso molecular e uma análise pelo software GelCompar II versão 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) da Applied Biosystems (ABI) baseado na posição e número de bandas.

Através da análise visual, o padrão foi definido como idêntico quando possuíam o mesmo número e posição de bandas, como isolados relacionados os que possuíam três bandas ou menos de diferença e como isolado não relacionado os que possuíam mais de três bandas de diferença dos outros isolados identificados durante a vigilância. Os isolados relacionados foram identificadas por uma letra do alfabeto (Ex. Padrão A), ou seja, isolados do padrão A refere-se a todas os isolados identificados durante o estudo, que possuíam até três bandas distintas

entre si e os isolados idênticos, dentro deste padrão, foram identificados por letra e por um número (Ex. Padrão A1), ou seja, no padrão A1, estão os isolados idênticos que possuíam o mesmo número e posição de bandas dentro do padrão A.

A outra análise foi feita através do software GelCompar II versão 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) da Applied Biosystems (ABI), os padrões da NgREP-PCR foram comparados pelo método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*), utilizando o coeficiente de Dice, segundo as instruções do fabricante. Esses parâmetros se aplicam em estudos que analisam as posições e os tamanhos das bandas a serem comparadas. A posição de tolerância de 1,5 % foi aplicada durante as comparações dos padrões (Shi e cols., 1996; Gillespie e cols., 2000 Lindstedt e cols., 2000) sendo determinada a partir da análise de igualdade entre os marcadores de pares de bases entre os experimentos. E significa dizer, até 1,5% de diferença entre duas bandas, eles são consideradas idênticas. A partir deste índice o programa também determina o índice de similaridade entre os padrões identificados.

Os padrões identificados foram, também, correlacionados com os resultados de fenotipagem (sorogrupos, sorotipos e sorosubtipos) e com os padrões obtidos das cepas de referência pertencentes ao complexo ET-5.

4.9 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram coletados dados epidemiológicos dos pacientes internados através de questionário e revisão de prontuários. As entrevistas foram realizadas estudantes de iniciação científica da Faculdade de Medicina para obter informações sobre idade, sexo, uso prévio de antibiótico, endereço e outros (Anexo I).

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram selecionados para o estudo e foram solicitados assinatura do termo de consentimento pós-informado e para a entrevista ao paciente e/ou o responsável, sob orientação e aprovação do Comitê de Ética do HCM e do CPqQM/FIOCRUZ (Anexo II e III).

4.11 ANÁLISES DE DADOS

O desenho deste estudo é descritivo e envolveu a coleta consecutiva de todos os isolados de casos de meningite meningocócica atendidos no HCM entre o período de fevereiro 96 a janeiro 99, sendo registrada uma perda de 5,2% dos isolados. Os dados da pesquisa foram cadastrados no sistema Epi-Info 6.04 (CDC, Mountain View, EUA) e os levantamentos de prevalência e as características da amostra foram obtidos através do programa Analsys desse sistema. O cálculo de incidência foi realizado baseado em informações obtidas no Censo IBGE realizado em 1996.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DE MENINGITE MENINGOCÓCICA

Durante o período do estudo, de fevereiro de 1996 a janeiro de 1999, foram identificados no Hospital Couto Maia, Salvador-BA, 272 casos de meningite meningocócica (Gráfico 1). Sendo, 56,2% provenientes de Salvador e 43,8% de outros municípios da Bahia, tendo em vista que este hospital é referência para doenças infecciosas do Estado. De dez-96 a fev-97, a meningite meningocócica demonstrou-se como uma doença endêmica com variações. Teve períodos de aumento de casos associados aos meses de inverno e um relativo aumento entre os meses de ago-98 a dez-98, correspondendo a uma micro-epidemia ocorrida em Salvador, quando foram registrados 34 casos sendo que 69,9% desses casos concentravam-se nos distritos sanitários de São Caetano/Valéria, Ferroviário e Liberdade.

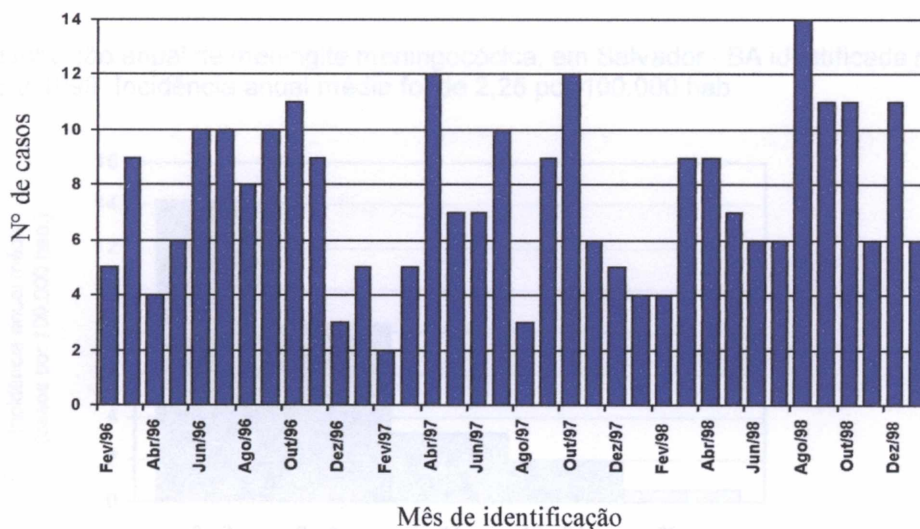


Gráfico 1. Distribuição dos casos de meningite meningocócica, no período de fev/96 a jan/99 (N=272) identificados no Hospital Couto Maia-Salvador/BA.

Baseado nos 56,2% (149 de 272) de casos que são moradores de Salvador, a incidência anual média foi de 2,25 casos por 100.000 hab. conforme censo (IBGE, 1996) (Gráfico 2). A faixa etária com maior incidência anual, foi entre menores de dois anos de idade, onde foi registrada uma incidência anual média de 14,19 por 100.000 hab (Gráfico 3). A distribuição por sexo demonstrou que 56,8% dos pacientes pertencem ao sexo masculino e 43,2% pertencem ao sexo feminino, registrando uma incidência nos homens de 2,73 casos por 100.000 hab. e nas mulheres de 1,82 casos por 100.000 hab.

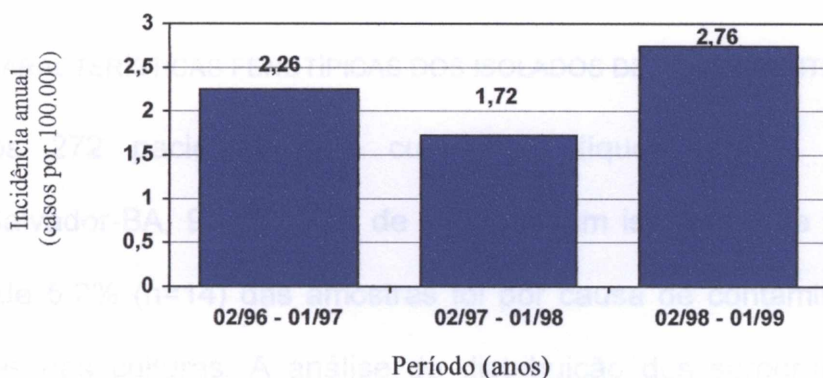


Gráfico 2. Distribuição anual de meningite meningocócica, em Salvador - BA identificada no HCM, nos anos de 1996 a 1999. Incidência anual média foi de 2,25 por 100.000 hab.

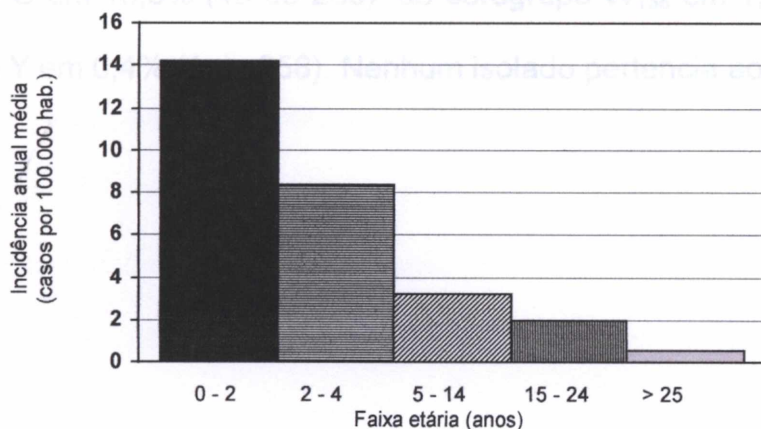


Gráfico 3. Distribuição dos casos de meningite meningocócica, por faixa etária, identificados no HCM, no período de 1996 a 1999, em Salvador-BA.

Os principais sinais e sintomas relatados na admissão do paciente, no pronto atendimento, foram: febre (98,1%), náusea e vômito (80,4%), cefaléia (71,9%), rigidez de nuca (39,5%) e convulsões (13,8%). Durante o internamento foi observado que 11,9% dos pacientes tiveram convulsões e 7,6% tiveram sinais neurológicos focais alterados com complicações e que, 7,2% dos pacientes necessitaram de atendimento em UTI, com uma duração média de três dias. A taxa de letalidade da doença foi de 7,9%, com um total de 21 mortes no total de 272 internações. A duração mediana de internamento foi de 1-40 dias. O índice de seqüelas foi de 4,7%, sendo a perda auditiva e ataxia, as mais freqüentes.

5.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS ISOLADOS DE *N. MENINGITIDIS*

Dos 272 pacientes com cultura de líquido positiva e identificados no HCM/Salvador-BA, 94,8% (258 de 272) tiveram isolados que foram analisados. A perda de 5,2% (n=14) das amostras foi por causa de contaminação ou perda nos repiques das culturas. A análise de distribuição dos sorogrupos demonstrou um predomínio do sorogrupo B, em 79,8% (206 de 258) das amostras, seguido do sorogrupo C em 18,6% (48 de 258), do sorogrupo W₁₃₅ em 1,2% (3 de 258) e do sorogrupo Y em 0,4% (1 de 258). Nenhum isolado pertencia ao sorogrupo A (Gráfico 4).

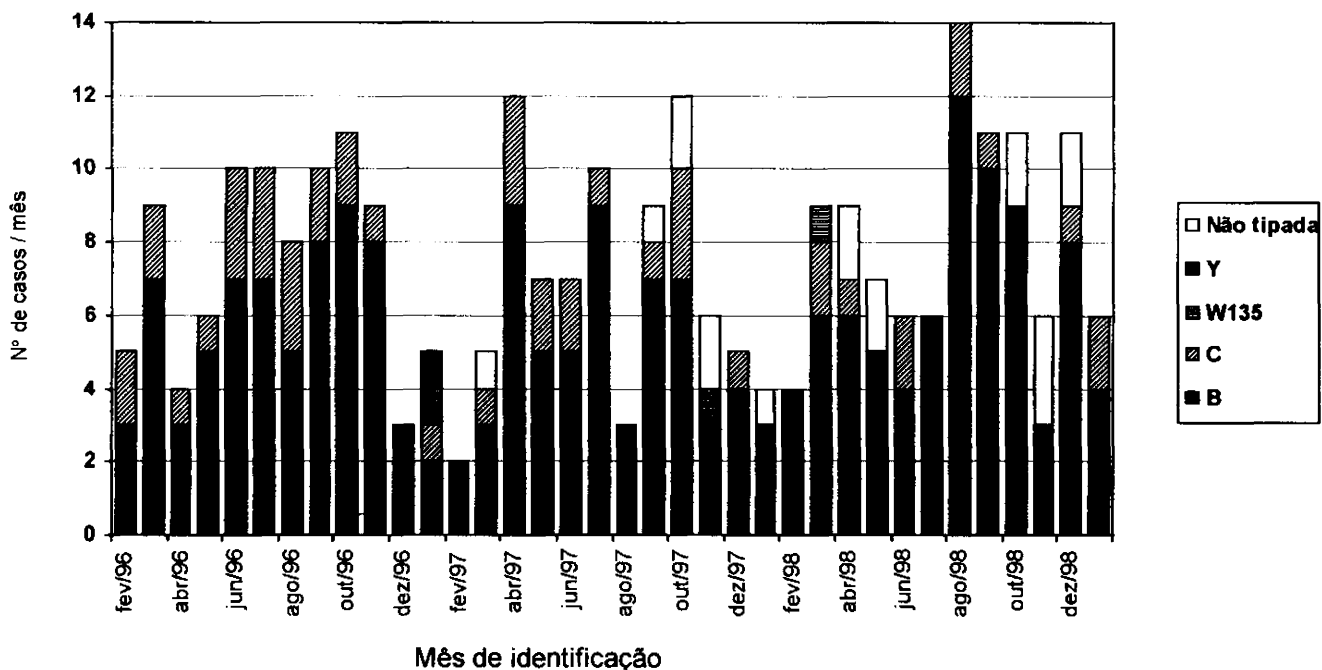


Gráfico 4. Distribuição dos casos (n=272) por sorogrupo de *N. meningitidis*, de isolados identificados no HCM no período de fevereiro de 1996 a janeiro de 1999.

Os resultados de sorotipo e sorosubtipo, do Instituto Adolfo Lutz/SP, demonstram o predomínio do sorotipo e sorosubtipo 4,7:P1.19,15, em 63,2% (163 de 258) das amostras, semelhante ao perfil da *cepa cubana* do complexo ET-5, seguido do 4,7:P1.7,1 em 4,3% (11 de 258), do 2a:P1.2 em 3,5% (9 de 258), do 4,7:P1.3 em 1,9% (5 de 258), do NT:nt em 2,3% (6 de 258), que corresponde a isolados que não foram identificados pela bateria de anticorpos monoclonais, e em 24,8% (64 de 258) outros correspondentes a 40 outras combinações de sorotipos e sorosubtipos, incluindo os parcialmente não tipáveis. Entre os 163 isolados do sorotipo e sorosubtipo 4,7:P1.19,15, 93,3% pertenciam ao sorogrupo B e somente 6,7% eram do sorogrupo C (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência dos sorotipos e sorosubtipos dos isolados de *N.meningitidis* identificados no HCM, no período de fevereiro/96 a janeiro/99.

Sorotipo e sorosubtipo	Frequência n (%)	% Sorogrupo B	% Sorogrupo C
4,7:P1.19,15	163 (63,2)	93,3	6,7
4,7:P1.7,1	11 (4,3)	100	0
2a:P1.2	9 (3,5)	0	100
NT:nt	6 (2,3)	0	100
4,7:P1.3	5 (1,9)	100	0
Outros*	64 (24,8)	59,4	34,4
Não tipadas	14(5,3)	-	-
Total	272(100)	79,8	18,6

* Foram identificados um total de 40 outras combinações de sorotipos e sorosubtipos, incluindo os parcialmente não tipáveis nestas 64 amostras.

O sorotipo e sorosubtipo 4,7:P1.19,15 ocorreu em praticamente todo o período do estudo, exceto entre Fev e Mar/97, enquanto que os demais sorotipos e sorosubtipos foram esporadicamente observados, como os tipos B:4,10:P1.1; C:4,21:nt; W135:19,10:P1.16. Os sorogrupos W135 e Y foram, respectivamente, responsáveis por 4,7% e 1,5% dos casos pertencentes a outros sorotipos e sorosubtipos. (Gráfico 5).

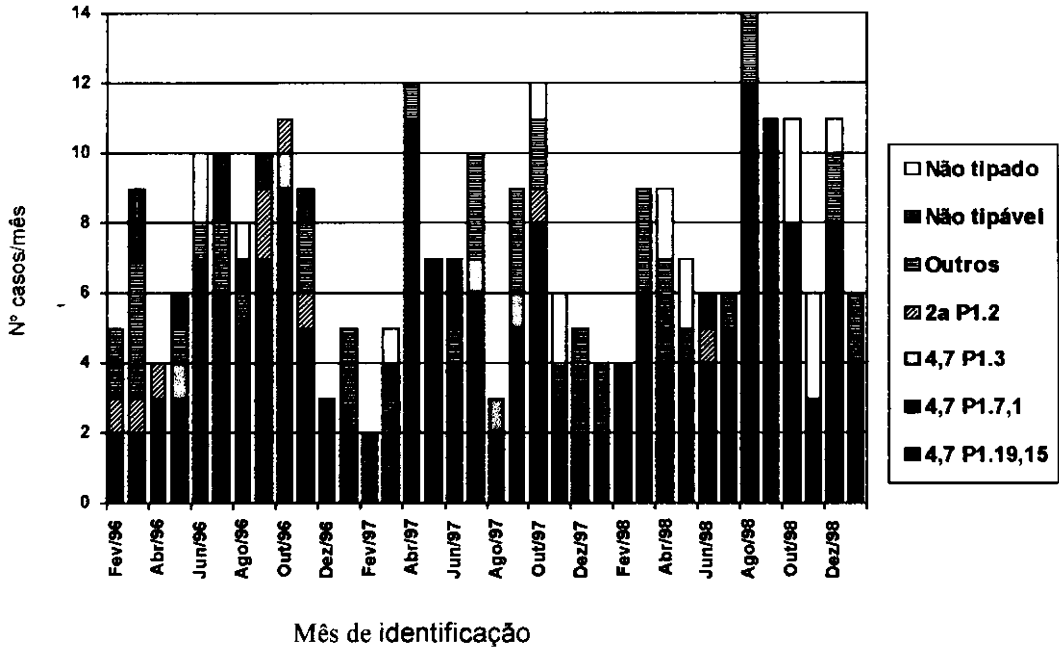


Gráfico 5. Distribuição dos sorotipos:sorosubtipos de *N. meningitidis* identificadas no período de fevereiro/96 a janeiro/99, no Hospital Couto Mala- Salvador/BA.

5.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

5.3.1 Avaliação do método

Discriminação dos sorogrupos, sorotipos e sorosubtipos

Após a padronização do método onde ficaram determinados quais seriam as condições ideais para a execução da técnica, foi realizada a validação do método, para que possa ser utilizado como ferramenta de tipagem molecular, através da determinação do seu poder discriminatório.

A primeira análise realizada foi para constatar se o método diferenciava amostras que possuíssem diferentes fenótipos. Para tanto foram selecionadas amostras padrões de ATCC e isolados do estudo pertencentes a diferentes sorogrupos, sorotipos e sorosubtipos. Através da análise da Figura 8, pode-se observar que o NgREP-PCR discriminou isolados pertencentes a sorogrupos distintos, inclusive, as amostras padrões ATCC13077, 13102 e 13090 que

pertencem aos sorogrupos A, C e B, respectivamente, como também isolados pertencentes ao mesmo sorogrupo, como entre os isolados do sorogrupo B, C e W₁₃₅. No entanto, pudemos observar que alguns isolados ainda apresentaram padrão de bandas idêntico, mesmo pertencendo a sorogrupos distintos, como entre os isolados do sorogrupo B e C e entre os sorogrupos W₁₃₅ e C.

A partir da análise dos sorotipos e sorosubtipos a que esses isolados pertenciam, foi observado que os isolados que possuíam diferentes sorogrupos com mesmo padrão de bandas, na realidade, correspondiam a amostras com mesmo sorotipo e/ou sorosubtipo. Por exemplo, os isolados GNC22 (B:4,7:P1.19,15) e GNC70 (C:4,7:P1.19,5) apresentaram o mesmo padrão de bandas pelo NgREP-PCR, bem como, os isolados GNC184 (W₁₃₅:2a:P1.5,2) e GNC270 (C:2a:P1.5). Além disso, foi observada a presença de isolados com sorosubtipos distintos, mas que apresentaram padrão de bandas idêntico, como o GNC22 (B:4,7:P1.19,15) e GNC32 (B:4,7:P1.7,1).

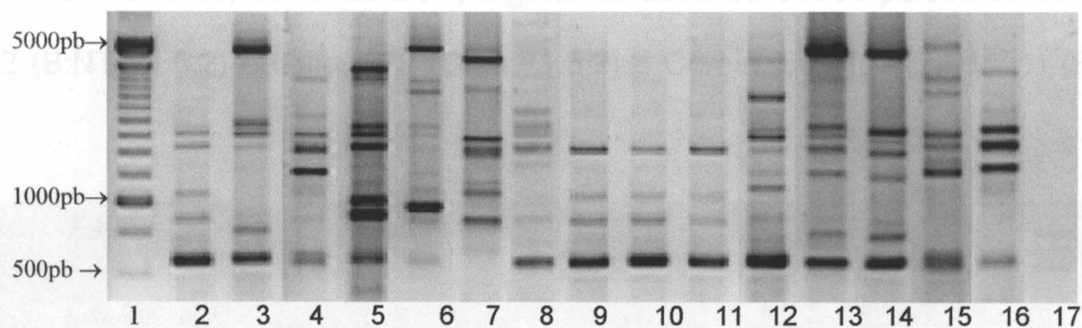


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR de isolados de *N. meningitidis* para demonstrar o poder discriminatório do método, frente a diferentes sorogrupos, sorotipos e sorosubtipos. Coluna 1 corresponde ao marcador de pares de bases Ladder 250pb; 2 a GNC01-B:4,7:P1.19,15; 3 a M610-B:2a:P1.2; 4 a ATCC13077-A:4,21:nt; 5 a ATCC13102-C:NT:P1.5; 6 a ATCC13090-B:NT:nt; 7 a GNC128-B:4,7:P1.3; 8 a GNC199-B:19:P1.4; 9 a GNC22-B:4,7:P1.19,15; 10 a GNC32-B:4,7:P1.7,1; 11 a GNC70-C:4,7:P1.19,15; 12 a GNC150-C:2b:P1.5,10; 13 a GNC270-C:2a:P1.5; 14 a GNC184-W₁₃₅:2a:P1.5,2; 15 a GNC91-W₁₃₅:19,10:P1.16; 16 a GNC88-Y:17,10:P1.5; 17 ao controle negativo.

Discriminação de isolados originados de diferentes regiões geográficas

Foram realizados experimentos com isolados originados de diferentes cidades brasileiras fornecidos pelo Instituto Adolfo Lutz, Centro de Referência Nacional para Meningite, do INCQS, Rio de Janeiro e de outros países da coleção de meningococo da Universidade da Califórnia, Berkeley/EUA, com a finalidade de permitir a associação de nossas cepas com as de distintas regiões geográficas, através do método aplicado neste estudo. Alguns isolados apresentaram padrões singulares, quando comparados aos da nossa população, como por exemplo, o padrão do isolado da Nigéria 1322 (B:4,7:P1.7,16). Porém, também, foram encontrados isolados com padrão de bandas idêntico aos obtidos no experimento anterior, sobretudo, aqueles com mesmos sorotipos e/ou sorosubtipos. Como exemplo, os isolados dos estados de São Paulo, N1242 (C:2b:P1.3) e N1244 (C:2b:P1.3) e Rio de Janeiro, onde os isolados R124 (B:4,7:P1.7,1) e R04 (B:4,7:P1.19,15) possuíam padrão semelhante, como também, alguns isolados de outros países como, EUA, 2052 (B:NT:P1.5,2) e Itália, 879 (C:2a:P1.5,2) e Coreia, 559 (B:4,7:P1.7,1) (Figura 9).

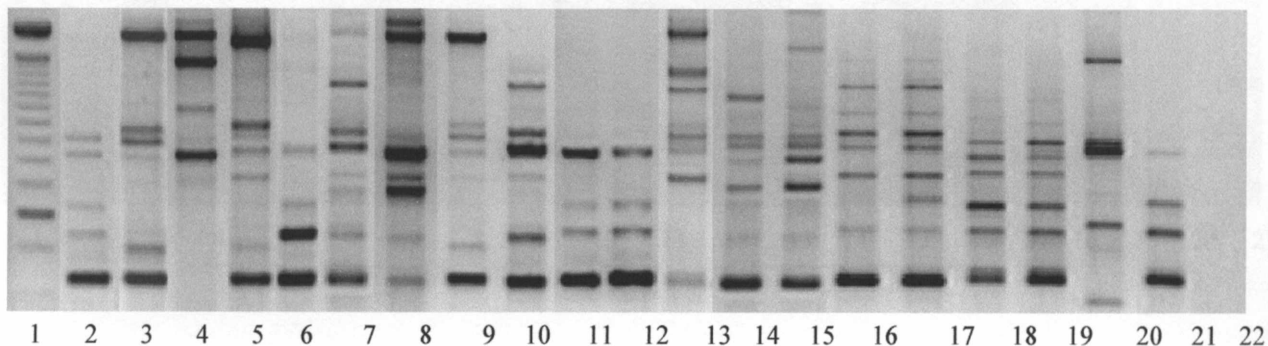


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR de isolados de *N. meningitidis* originados de diferentes regiões geográficas. Coluna 1 corresponde ao marcador de pares de bases Ladder 250pb; 2 a GNC01; 3 a M610 (Europa); 4 a 1322 (Nigéria); 5 a 2052 (EUA); 6 a 559 (Coreia); 7 a 1232 (Hawaii); 8 a 1215(Egito); 9 a 879 (Itália); 10 a 1032 (EUA); 11 a R124 (Rio); 12 a R04 (Rio); 13 a R121 (Rio); 14 a R1563(Rio); 15 a R1401(Rio); 16 a N1242(SP); 17 a N 1244(SP); 18 a N1185(SP); 19 a N1141(DF); 20 a N412(RS); 21 a N248(PE); 22 ao controle negativo.

5.4 VALIDAÇÃO DA NGREP-PCR PARA USO EM VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Do total de 258 isolados de *N. meningitidis* armazenados no LPBM/CPqGM, 218 (84,5%) foram tipados pelo NgREP-PCR. Os outros 40 isolados foram excluídos por pertencerem ao tipo 4,7:P1.19,15, uma vez que nas 123 amostras analisadas apresentaram padrão idêntico.

A análise visual foi realizada pela comparação dos números e posições das bandas, onde foram consideradas com pertencentes a um mesmo padrão as amostras que possuíram até três bandas de diferença e amostras idênticas, clones do padrão, as que possuíram o mesmo número e posição de bandas (Tabela 2). A análise visual constatou que o NgREP-PCR permitiu a identificação de 34 padrões distintos baseados no nº e posição de bandas (Tabela 2). Do total de padrões, 16 abrangeram 91,7% (200/218) do total das amostras e apresentaram clones múltiplos. Dezoito foram constituídos por clones singulares. Entre os clones, o A1 foi o principal identificado, presente em 72,4% (158/218) dos padrões (Figura 10).

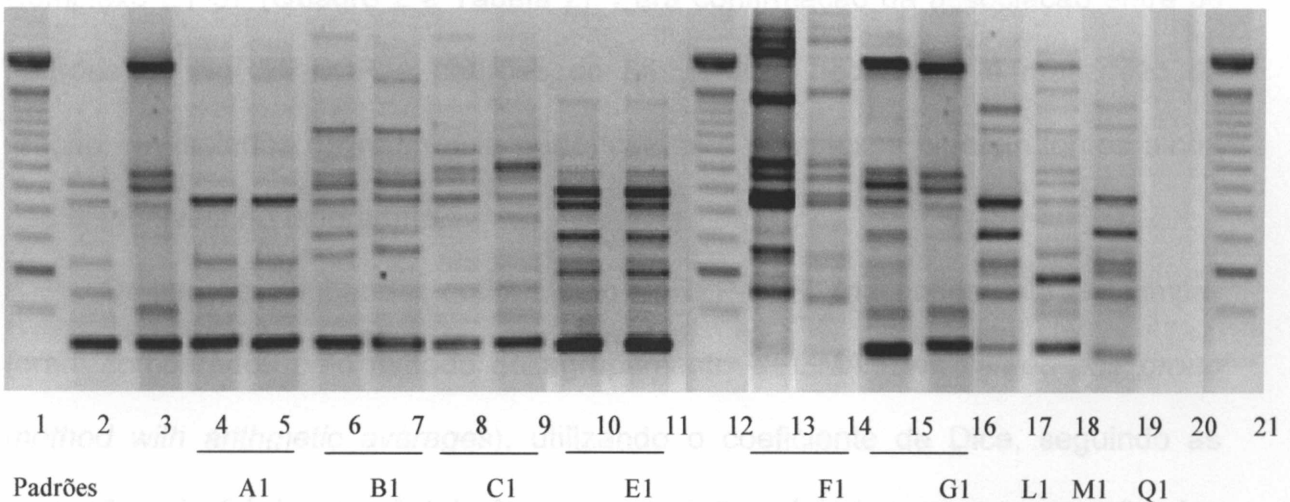


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR de isolados de *N. meningitidis* representando os diferentes padrões obtidos das amostras do Hospital Couto Maia no período de de Fev/96 a Jan/99. As colunas 1, 12 e 21 correspondem ao marcador de pares de bases Ladder 250pb; 2 a GNC01; 3 a M610; 4 a GNC111 B:4,7:P1.19,15; 5 a GNC32 B:4,7:P1.19,15; 6 a GNC46 C:2b:P1.5; 7 a GNC139 C:2b:P1.5; 8 a GNC128 B:4,7:P1.3; 9 a GNC136 B:4,7:P1.3; 10 a GNC27 C:2a:P1.5; 11 a GNC54 C:2a:P1.5,2; 13 a GNC209 C:NT:nt; 14 a GNC120 C:NT:nt; 15 a GNC02 C:2a:P1.5; 16 a GNC184 W₁₃₅:2a:P1.5,2; 17 a GNC186 C:17,7:P1.7,13; 18 a GNC170 C:4,7:P1.22-1,14; 19 a GNC79 B:7:nt; 20 ao controle negativo.

O padrão A associou-se, principalmente, às amostras pertencentes aos tipos B:4,7:P1.19,15, C:4,7:P1.19,15 e B:4,7:P1.7,1, onde, 97,5% (158/162) dos clones apresentaram um destes sorotipos e sorosubtipos que estão correlacionados ao complexo ET-5, *cepa cubana*. O padrão A também representou outros sorotipos e sorosubtipos que parecem ser variantes do tipo 4,7:P1.19,15 (4,7:P1.22-1.14, 4,7:nt; NT:P1.5,2, 14:P1.7,1, 4,10:nt, 4,7:nt), por apresentar semelhanças no sorotipo ou sorosubtipo e por possuírem o mesmo padrão no NgREP-PCR.

Através da NgREP-PCR foi possível, também, o agrupamento de amostras com outros sorotipos e sorosubtipos correlacionados, sendo estes sorosubtipos associados a outros grupos de clones hipervirulentos (Tabela 2). O padrão B foi associado às amostras pertencentes ao sorotipo C:2b:- -, sorotipo que está associado ao Grupo A₄. Já o padrão C, foi correlacionado ao tipo B:4,7:P1.3, presente em amostras pertencentes à Linhagem III. De uma forma geral, os padrões E e G foram associados aos tipos C:2a:- -, sorosubtipo que está associado ao Complexo ET-37 (Quadro 2 e Tabela 2). Para confirmação da associação entre os padrões da NgREP-PCR e padrões do MLEE será necessário a realização da reação em isolados de referência pertencentes a complexos hipervirulentos ainda não disponíveis no laboratório.

Os padrões de bandas obtidos pelo NgREP-PCR analisados pelo Gelcompar foram comparados pelo método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*), utilizando o coeficiente de Dice, seguindo as instruções do fabricante. A tolerância na posição adotada para comparação dos padrões foi de 1,5 % (Figura 11). A Figura 11 demonstra a correlação entre os padrões analisados pelo programa e em paralelo os padrões obtidos pela análise visual. As análises visual e automatizada pelo programa Gel Compar, apresentaram

boa coincidência de padrões, entretanto, as amostras designadas pela análise visual como E3 e B3, não foram classificadas pelo Gel Compar como pertencentes aos seus respectivos padrões. Além disso, o isolado GNC43 pertencente ao clone A1 pela análise visual, não foi classificado como idêntico no Gel Compar, quando visualmente ele pertencia a este padrão (Figura 11).

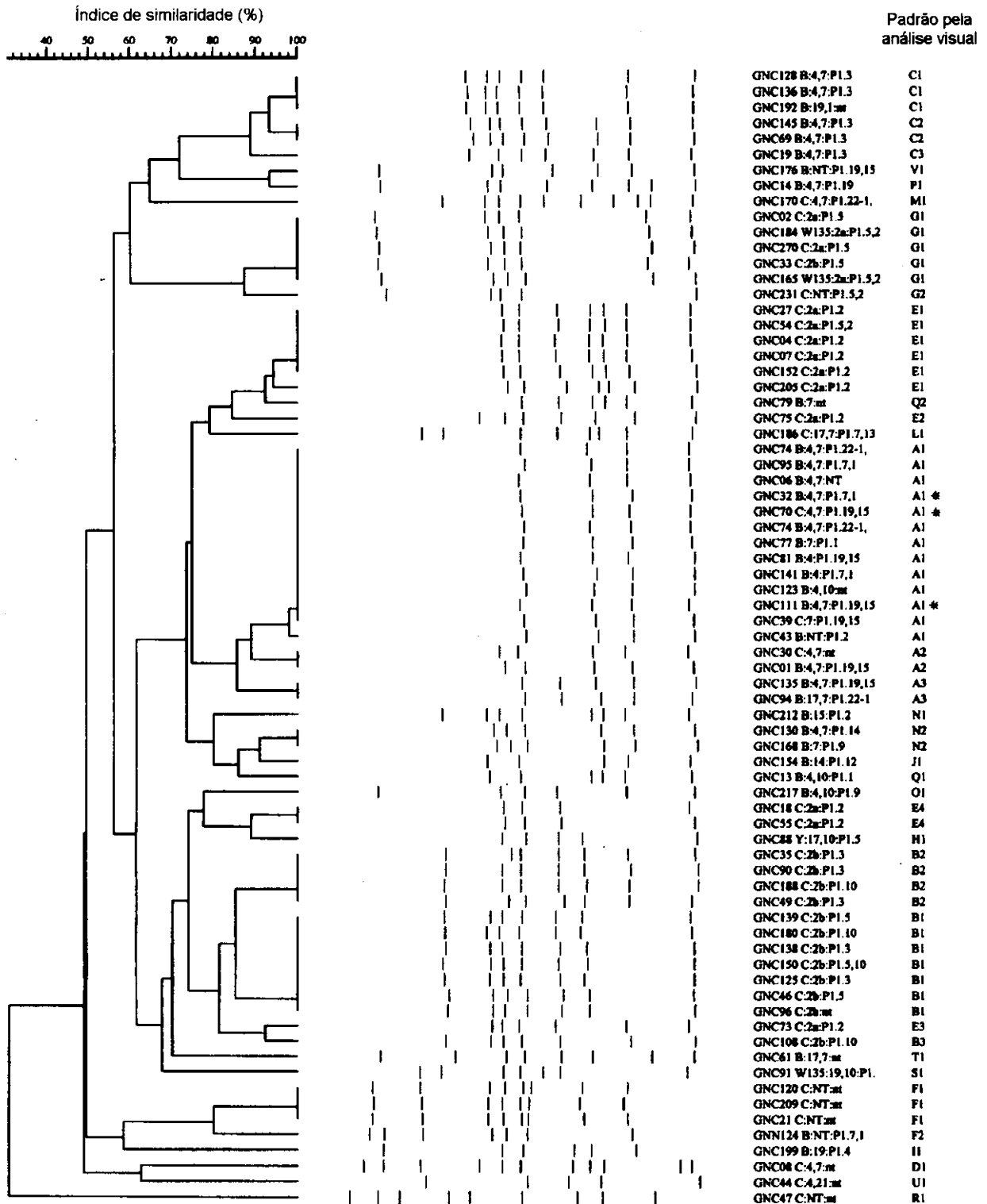


Figura 11. Dendrograma resumido com 73 de 218 isolados analisados, representando todos os diferentes padrões obtidos no Ng-REP-PCR, quando aplicado a *Neisseria meningitidis*.

* Os demais isolados do tipo B:4,7:P1.19,15 (n=124); B:4,7:P1.7,1 (n=10) e C:4,7:P1.19,15 (n=10) não representados nesta figura, pertencem ao padrão A1.

Tabela 2. Distribuição de 218 isolados nos padrões identificados pelo critério de bandas idênticas de pacientes com meningite no Hospital Couto Maia- Salvador/BA, no período e Fev/96 a Jan/99.

Padrão PCR	Nº. de bandas diferentes da referência	Nº isolados (N=218)	Sorogrupos, sorotipos e sorosubtipos envolvidos	* Índice de similaridade entre cepas no padrão correlacionado
A⁽¹⁾		162		
A1 ⁽²⁾	-	158	B:4,7:P1.19,15 C:4,7:P1.19,15 B:4,7:P1.7,1	
A2	1	02	B:4,7:P1.22-1.14	
A3	1	02	B:4,7:nt B:NT:P1.5,2 B:14:P1.7,1 B:4,10:nt B:4,7:P1.15 C:4,7:nt	85,5 - 88,9%
B		12		
B1	-	07	C:2b:P1.5 C:2b:nt	
B2	2	04	C:2b:P1.3	81,3 - 85,2%
B3	2	01	C:2b:P1.5,10 C:2b:P1.10	
C		06		
C1	-	03	B:4,7:P1.3	
C2	1	02	B:19,1:nt	88,8 - 93,3%
C3	2	01		
E		10		
E1	-	08	C:2a:P1.2	
E2	2	01	Ca:P1.5,2	84,5 %
E3	3	01		
F		04		
F1	-	03	C:Nt:nt	86,2%
F2	3	01	B:NT:P1.7,1	
G		06		
G1	-	05	C:2b:P1.5	
G2	1	01	W ₁₃₅ :2a:P1.5,2 C:2a:P1.5 C:NT:P1.5,2	86,4%
Outros	+3	18	-	-

Nota: Padrão corresponde aos isolados com até três bandas distintas⁽¹⁾. Clone de um padrão ou, simplesmente, clone corresponde aos isolados idênticos⁽²⁾.

* Índice de similaridade entre os padrões correlacionados, determinado pela análise realizada pelo programa UPGMA.

Correlação do clone predominante com cepas pertencentes ao complexo ET-5

Como descrito Tabela 1, 63,2% dos casos de meningite meningocócica, na Bahia, foram atribuídos a isolados do tipo 4,7:P1.19,15. Este tipo está relacionado à cepa cubana, já descrito na literatura como pertencente ao complexo clonal ET-5. Desta forma, tivemos como objetivo, comparar os padrões de bandas obtidos nos isolados do estudo classificados como 4,7:P1.19,15, com os padrões de isolados identificados previamente, como sendo pertencentes ao complexo ET-5, pelo MLEE, o método padrão de tipagem para o meningococo, fornecido pelo IAL e CDC, Atlanta/EUA.

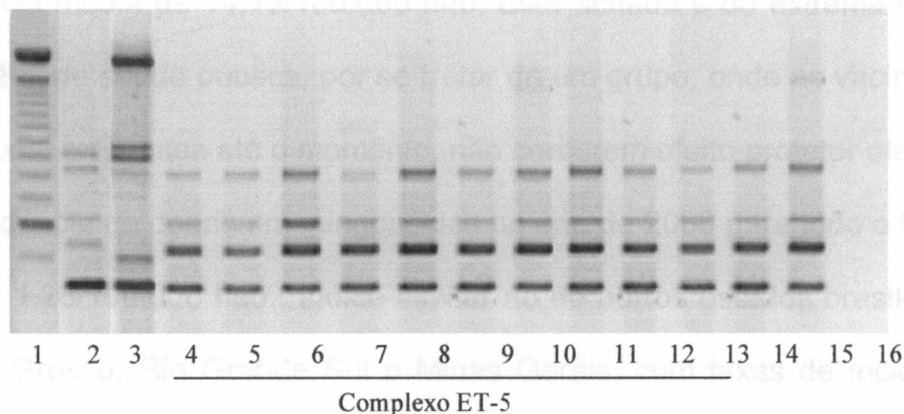


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da NgREP-PCR de isolados de *N. meningitidis* pertencentes ao complexo ET-5, e isolados pertencentes ao tipo B:4,7;P1.19,15 do estudo, pertencentes ao padrão A1. Coluna 1 corresponde ao marcador de pares de bases Ladder 250pb; 2 a GNC01; 3 a M610; 4a M1037; 5 a M3570; 6 a M3579; 7 a M4291; 8 a M1019; 9 a M262; 10 a M522; 11 a N150; 12 a N348; 13 a N49; 14 a GNC41; 15 a GNC43 e 16 ao controle negativo.

Todos os isolados pertencentes ao complexo ET-5, obtiveram o mesmo padrão, com quatro bandas idênticas entre si, como também o principal padrão identificado na população estudada, que corresponde aos isolados do tipo 4,7:P1.19,15, neste caso, representado pelos isolados do estudo GNC41 e GNC43 (Figura 10).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram identificados 272 casos de meningite meningocócica, no Hospital Couto Maia, no período de três anos. Os casos foram oriundos tanto de Salvador, como de cidades do interior, visto que o Hospital Couto Maia é referência para doenças infecciosas, no Estado da Bahia e atende cerca de 90% dos casos da doença em todo o estado (Cunha, 1996). A incidência da meningite meningocócica na cidade de Salvador-BA, foi de 2,25/100.000 hab. Estratificando-se a incidência pela faixa etária, poderemos observar que este índice médio é mais elevado entre as crianças menores de dois anos, onde foi registrada uma incidência média de 14,19/100.000 hab. Este achado é de extrema relevância para os órgãos de saúde pública, por se tratar de um grupo, onde as vacinas contra o meningococo, existentes até o momento, não conferem efeito protetor elevado.

A incidência da doença meningocócica no ano de 2000 para todo o Estado da Bahia foi de 1,26/100.000 hab., índice similar ao de outros estados brasileiros, tais como, Mato Grosso, Rio Grande Sul e Minas Gerais, com taxas de incidência de 1,24, 1,06 e 1,09/100.000 hab., respectivamente. As maiores incidências nacionais, neste mesmo ano, foram em Sergipe, São Paulo e Santa Catarina com índices de 4,08, 3,10 e 3,04/100.000 hab., respectivamente (Ministério da Saúde-FUNASA, 2001). Apesar de possuir característica endêmica em todo o país, a doença meningocócica pode atingir índices mais elevados em algumas regiões, devido, possivelmente, à ocorrência de microepidemias causadas por surtos esporádicos, como a que ocorreu na Grande São Paulo, entre os anos de 1997-1998, onde a incidência atingiu 6,8/100.000 hab., devido a ocorrência de surtos de doença pelo sorogrupo B (Sacchi e cols., 2001). Em nosso estudo, o pico da incidência ocorreu em 1998, quando a incidência atingiu 2,76/100.000 hab. (Gráfico 2), devido a uma

micro-epidemia ocorrida em Salvador no segundo semestre do referido ano. Essas observações reforçam a importância do estudo epidemiológico da meningite meningocócica, o que possibilita o bom entendimento da distribuição da doença, favorecendo a implantação de medidas de controle efetivas para a população, a partir do momento que se conhece melhor o patógeno a ela relacionado.

Como apresentado anteriormente, além das variações da incidência da doença meningocócica, a avaliação da diversidade do meningococo é crucial para o bom entendimento da meningite meningocócica. Para a realização do estudo da meningite meningocócica a distribuição dos sorogrupos foi crucial para o bom entendimento da doença.

O presente trabalho mostrou que, na população estudada, ocorreu o predomínio do sorogrupo B (80,2%), seguido do sorogrupo C (18,3%) e casos esporádicos de W₁₃₅ (1,1%) e Y (0,4%). Outras regiões do Brasil, tais como região Sul e Sudeste, apresentem um perfil semelhante. Por exemplo, no Rio Grande do Sul aproximadamente 50% dos isolados pertencem ao sorogrupo B (Secretaria Estadual do Rio Grande do Sul, 2001), e na cidade do Rio de Janeiro (Barroso, 1998), no período entre 1989-1992, o sorogrupo B representava 85% dos casos da doença meningocócica, seguido pelo sorogrupo C, com 13% do número de casos. No Rio de Janeiro, entre 1993-1995, observou-se que o sorogrupo B diminuiu sua frequência para 59%, enquanto que o sorogrupo C elevou-se para 40%, período em que ocorreu um pico epidêmico, com mais de 10 casos/100.000 hab. (Barroso, 1998). Nos EUA, a distribuição entre os anos de 1996-1998 foi de: B (27%), C (36%) e Y (29%), com um gradual aumento do sorogrupo Y (Lingappa e cols., 2001). Na Nigéria, como em outros países africanos, ocorre o predomínio do sorogrupo A (85%) (Campagne e cols., 2000).

O reconhecimento destes sorogrupos, permite a predição de cobertura de uma vacina candidata a figurar em campanhas de vacinação. Neste sentido, estratégias têm sido desenvolvidas para um adequado controle da meningite meningocócica como exemplo, o desenvolvimento de vacinas, tendo como base as características antigênicas dos polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A, C, W₁₃₅ e Y, com uso no controle de surtos e epidemias da doença (Peltola e cols., 1983; Sacchi e cols., 1992, 2001, Lepow e cols., 1999). Estas vacinas, apesar de terem sido testadas com boa eficácia em adultos, não obtiveram mesmo êxito em crianças, principalmente, nas menores de dois anos de idade, além do que, não protegem contra o sorogrupo B, predominante no Estado da Bahia.

Devido ao fato dos polissacarídeos capsulares do sorogrupo B serem considerados pobremente imunogênicos, outros antígenos capsulares e proteínas de membrana externa têm sido estudados como potenciais antígenos vacinais (Sierra e cols., 1994; Pizza e cols., 2000). Desde a última década vacinas multivalentes contendo epítomos de Por A, alguns dos principais peptídeos de membrana externa do meningococo, têm sido formuladas a partir dos sorosubtipos mais prevalentes (Perkins e cols., 1998; van der Voort e cols., 1996; Lingappa e cols., 2001). Desta forma, o contínuo monitoramento da distribuição dos sorosubtipos circulantes em uma determinada região, se faz necessária para avaliar a composição da vacina dos sorosubtipos predominantes e para predizer sua cobertura (Sacchi e cols., 2001).

Os sorotipos e sorosubtipos da *N. meningitidis* predominantes na população estudada, foram o 4,7:P1.19,15 (63,2%), seguido do tipo 4,7:P1.7,1 (4,3%) e do tipo 2a:P1.2 (3,5%). Estes resultados concordam com o levantamento nacional feito por Sacchi e cols. em 2000. Em Sergipe, os sorosubtipos 4,7:P1.19,15 e 4,7:P1.7,1 representaram 91% dos isolados de meningococo, no Distrito Federal esses

mesmos padrões correspondem a 91% dos isolados, no Rio de Janeiro, 83% e São Paulo, 80%. Apenas os estados de Paraná com 58%, Santa Catarina com 40%, e Rio Grande do Sul com 14%, não possuíam estes tipos, predominando sobre os demais (Sacchi e cols., 2001). Estes resultados indicam, que uma vacina multivalente preparada com os tipos de PorA P1.19,15, P1.7-1,1 e P1.7,16 e que incluísse outras variantes menos freqüentes, poderia dar excelente cobertura nacional. Entretanto, a eficácia seria, com certeza, de difícil predição, uma vez que muitos outros fatores, ainda não bem compreendidos afetam o nível da proteção (Sacchi e cols., 2001).

Tondella e colaboradores, 2000 analisaram o possível uso de uma vacina multivalente composta por epítomos dos sorosubtipos predominante nos EUA e constataram que, para atingir uma cobertura de 80% seria necessário o uso de uma vacina com 20 diferentes sorosubtipos (Cartwright e cols., 1999; Peeters e cols., 1996; Tondella e cols., 2000). Conseqüentemente pode-se concluir que, o uso de uma vacina multivalente seria viável, para uma limitada região geográfica, o que ocorre também com a vacina sorogrupo específico e, mais importante, ainda, é que parâmetros técnicos e logísticos, poderiam limitar um maior número de sorosubtipos em cada vacina (Tondella e cols.,2000).

A vacina cubana VA-MENGOC-BC, preparada a partir da cepa B:4:P1.15, tipo predominante em Cuba e no Brasil, resultou numa proteção eficaz de 83% quando experimentada em cubanos de 10 a 16 anos de idade (Sierra e cols., 1994). Quando aplicada em São Paulo, no período de 1989-1990, numa população de 2,4 milhões de crianças de 3 meses a 6 anos de idade, a vacina cubana BC mostrou uma eficácia de 74% em crianças com mais de 4 anos de idade, porém a proteção não foi

satisfatória para crianças com menos de 4 anos de idade, onde foi registrada eficácia em torno de 37% (Milagres & Melles, 1993; Milagres e cols., 1994).

Embora a sorotipagem seja largamente empregada para identificar epítomos candidatos à vacina contra o meningococo B, estudos têm mostrado, que apesar de serem capazes de estimular a resposta humoral bactericida no soro, como, também, promover proteção contra o desenvolvimento da doença meningocócica em ensaios clínicos, a definição de anticorpos anti-meningococo por sorosubtipagem são capazes de diferenciar entre protótipos, mas não as suas seqüências variantes. Uma alternativa é a tipagem de regiões variáveis de Por A, que permitem a identificação de regiões peptídicas inteiras, onde o epítopo de sorosubtipagem é localizado, assim a completa identificação e discriminação entre as variantes podem ser obtidas. Estas discriminações adicionais, que a tipagem de regiões variáveis provê, poderiam explicar a perda da reatividade de anticorpos anti-meningococo para algumas variantes da família de Por A (Sacchi e cols., 1998; 2001; Pizza e cols., 2001).

A partir das informações obtidas pelo sequenciamento completo do genoma da cepa MC58 (Tettelin e cols., 2000), pertencente ao sorogrupo B, outros candidatos potenciais para o desenvolvimento de vacinas têm sido investigados. Pizza e cols. identificaram sete proteínas que na presença de polissacarídeos capsulares da bactéria, são fortemente capazes de induzir imunidade contra a maioria das cepas do meningococo B e, possivelmente, contra outras cepas patogênicas de *N. meningitidis* (Pizza e cols., 2001). Estas proteínas estão sendo estudadas com a finalidade de se desenvolver uma vacina eficaz contra todas as cepas de *N.meningitidis*.

Outro fato importante observado em nosso estudo, foi o de que, 6,7% das amostras do sorotipo e sorosubtipo 4,7:P1.19,15 identificadas no HCM, pertenciam

ao sorogrupo C (Tabela 1). Dados da literatura evidenciam que a partir de 1994, casos de doença meningocócica sorogrupo C, pertencentes ao complexo ET-5, foram identificados nos estados de Oregon e Washington, EUA (Frasch e cols., 1989). Swartley e cols. (1997) identificaram novos isolados de meningococo em uma epidemia no Noroeste do Pacífico, que apresentaram marcadores genéticos similares, mas expressavam polissacarídeos capsulares diferentes, o que indicava que clones podem trocar o tipo da cápsula. Tendo sido demonstrado que a substituição de cápsula entre os sorogrupos B e C é resultante da recombinação alélica de um gene correspondente à enzima denominada poliaciltransferase. Presumivelmente, a co - colonização de cepas dos sorogrupos B e C e a recombinação gênica dos genes que sintetizam a cápsula, seja por transformação, seja por troca alélica, são eventos responsáveis pela troca de cápsula o que representa uma estratégia geral, pela qual o meningococo e outras bactérias capsulares, tende a causar surtos epidêmicos, escapando da imunidade induzida pela vacina ou adquirida naturalmente pela comunidade (Swartley e cols., 1997).

A sorotipagem e sorosubtipagem têm contribuído com informações úteis para a vigilância epidemiológica e no monitoramento de campanhas de vacinação, No entanto, requer constante monitoramento dos reagentes do painel de anticorpos para incluir novos tipos, sem falar na viabilidade da execução de testes que utilizam anticorpos monoclonais, que se limita a laboratórios de referência, devido ao alto custo e laboriosidade. Outro ponto, também importante, é de que muitos isolados permanecem ainda não tipáveis. Outra limitação do método é que algumas vezes diferenças na sorosubtipagem pode refletir mutações genéticas que não representam relevância epidemiológica (Yakubu e cols., 1999).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, inúmeros métodos de tipagem molecular foram desenvolvidos, como alternativa para estudos de epidemiologia molecular. Um desses métodos foi o REP-PCR (Versalvic & Lupski, 1995), que consiste na amplificação de regiões palindrômicas, curtas, repetitivas, que estão presentes em domínios extragênicos dos cromossomos de procariontes. Esta técnica foi adaptada para a caracterização de *N.meningitidis* e foi denominada NgREP-PCR.

No presente estudo, o método da NgREP-PCR permitiu a identificação de 34 padrões distintos de *N. meningitidis*, sendo que, 16 desses padrões corresponderam a 91,7% (200/218) do total das amostras analisadas. Os sorotipos e sorosubtipos relacionados a estes padrões predominantes (Tabela 2), estão correlacionados aos tipos descritos nos clones hipervirulentos, designados na literatura pelo *MLEE* como: complexo Et-5, Grupo A4, Linhagem III, Complexo Et-37 (Caugant, 1998). Quando foram analisadas as amostras de outros estados brasileiros e de outros países, pode-se observar que padrões idênticos aos descritos no presente trabalho foram encontrados, e parecem também, estar correlacionados aos clones hipervirulentos classificados pelo *MLEE*. O método da NgREP-PCR, já utilizado em outros estudos, demonstrou comprovadamente ser eficaz em estudos de epidemiologia molecular, uma vez que o NgREP-PCR gerou grupos genóticos, possivelmente, semelhantes aos clones hipervirulentos classificados pelo *MLEE* (Woods e cols.,1996). Uma desvantagem da NgREP-PCR é a não diferenciação entre isolados pertencentes às essas linhagens hipervirulentas. Os demais padrões corresponderam a clones singulares com sorotipos e sorosubtipos não agrupáveis pelo NgREP-PCR. Este método também pode ser utilizado na confirmação da soro -sorosubtipagem.

O método da NgREP-PCR, apresenta uma série de características que o torna uma técnica útil para tipagem, sendo eficaz quanto á discriminação entre isolados relacionados ou não a um surto, possuindo grau discriminatório, possivelmente, comparável com o MLEE, que é considerado o padrão-ouro para tipagem de *N.meningitidis* (Versalvic & Lupski, 1995; Woods e cols., 1996). O NgREP-PCR apresenta a vantagem de ser simples, requerendo apenas um termociclador e reagentes comuns utilizados nos estudos de biologia molecular. Sua execução é fácil, necessitando apenas de uma boa padronização, pois possui boa reprodutibilidade e é relativamente barato, quando comparado a outros procedimentos de tipagem molecular (Olive & Bean, 1999). Muitos isolados podem ser analisados em um curto período de tempo (van Belkum & Meis, 1994) e tem demonstrado melhor poder discriminatório que outros métodos de tipagem, como a ribotipagem (Appuhamy e cols., 1997).

Os elementos repetitivos presentes no genoma de *Neisseria meningitidis* foram descritos por Correia e cols. (1986), que são alvos no NgREP-PCR, , não têm uma função claramente definida. Alguns autores têm atribuído a estas regiões altamente conservadas, o papel na terminação da transcrição, enquanto outros admitiram que elas estabilizam o RNAm e organizam o domínio cromossomal *in vivo* (Higgins e cols., 1982; Newbury e cols., 1987).

O NgREP-PCR foi capaz de identificar, claramente, o sorotipo e sorosubtipo 4,7:P1.19,15 (Figura 11), tipo predominante que corresponde a *cepa cubana* pertencente ao complexo ET-5, onde 98,3% (121/123) dos isolados pertenciam ao padrão A1, um pertencia ao padrão A2 e um ao padrão A3. Os demais sorotipos e sorosubtipos pertencentes a este padrão, provavelmente, correspondem a variantes do 4,7:P1.19,15, a limitação do método de sorosubtipagem é que pode refletir

mutações genéticas que não representam relevância epidemiológica (Yakubu e cols., 1999).

Quando foram analisados os padrões dos isolados C:4,7:P1.19,15, que estão associados à troca de cápsula, podemos observar que todos os padrões obtidos foram idênticos aos de isolados B:4,7:P1.19,15, o que confirma a ocorrência da troca de cápsula uma vez que os isolados possuem o mesmo genótipo pelo NgREP-PCR. Desta forma fica evidenciado que, a combinação de várias estratégias de tipagem leva a caracterização ótima em um grupo de microrganismos.

Os resultados de caracterização molecular e epidemiológica dos isolados de *Neisseria meningitidis* obtidos neste estudo poderão servir como subsídio para a caracterização de microvariabilidades entre as cepas hipervirulentas e identificar determinantes de patogenicidade associados à transmissão da doença meningocócica, além de fornecer informações valiosas para a definição de políticas de saúde pública.

7 CONCLUSÃO

- A incidência anual média de meningite meningocócica no HCM no período fevereiro de 1996 a janeiro de 1999 foi de 2,25 por 100.000 hab. atingindo, sobretudo menores de dois (14,19 por 100.000 hab). Estes dados são semelhantes aos encontrados em outros estudos realizados no Brasil;
- A taxa de letalidade da meningite meningocócica foi de 7,9% e índice de seqüelas 4,7%, sendo a perda auditiva e a ataxia as mais freqüentes;
- A caracterização fenotípica revelou que os sorogrupos B e C de *Neisseria meningitidis* correspondem a 79,8% e 18,6% dos isolados, respectivamente;
- O principal sorotipo e sorosubtipo foi o 4,7:P1.19,15 (63,2%), que está presente na vacina cubana VA-MENGOC-BC; seguido do tipo 4,7:P1.7,1 (4,3%) e do 2a:P1.2 (3,5%);
- Foram identificados 4,3% (11/258) de isolados pertencentes ao fenótipo C:4,7:P1.19,15 que correspondem à troca de cápsula, o qual foi evidenciado pelo NgREP-PCR;
- O NgREP-PCR foi capaz de identificar 34 padrões distintos, dos quais, 16 correspondem a 91,7% (200/218) dos isolados;
- Os padrões de bandas identificados pelo NgREP-PCR tiveram alta correspondência com resultados de fenotipagem, uma vez que, os padrões identificados como idênticos ou relacionados, possuíam sorotipos e/ou sorosubtipos semelhantes;

- O método de tipagem molecular NgREP-PCR foi capaz de identificar todos os isolados do tipo 4,7.P1.19,15 , que correspondem à *cepa cubana* pertencente ao complexo ET-5, através de um padrão único;
- Os padrões identificados no presente estudo, sugerem que o NgREP-PCR seja capaz de diferenciar cepas hipervirulentas, uma vez que os sorotipos e sorosubtipos desses padrões, estão correlacionados aos dos complexos clonais, já descrito pelo *MLEE*. Desta forma o método poderá ser aplicado para vigilância e investigação epidemiológica, identificando as cepas hipervirulentas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAKRE, R. K.; JENKINS, A.; KRISTIENSEN, B.; FROHOLM, L. O. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* isolates from the Norwegian county of Telemark, 1987 to 1995. **J. Clin. Microbiol.**, **36**:2623-2668, 1998.
2. ACHTMAN, M. Global epidemiology of meningococcal disease. In: Cartwright, K. (Ed.). **Meningococcal disease**. Chichester. John Wiley & Sons, Ltd., 1995. p.159-175.
3. ACHTMAN, M. Epidemic spread and antigenic variability of *N. meningitidis*. **Trends Microbiol.**, **3**:186-192, 1995.
4. APPUHAMY, S.; PARTON, R.; COOTE, J. G.; GIBB, H.A. Genomic fingerprinting of *Haemophilus sommus* by a combination of PCR methods. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:288-91, 1997.
5. ARREAZA, L.; de la FONTE L.; VAZQUEZ, J. A. Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. **Antimicrobial agents and chemotherapy** **44**:1705-1707, 2000.
6. BARROSO, D. E. **Aspectos epidemiológicos e biológicos da infecção invasiva por *Neisseria meningitidis* na cidade do Rio de Janeiro:1989 a 1995**.1998.Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro.
7. BJORVATN, B.; HASSAN-KING, M.; GREENWOOD, B.; HAIMANOT, R. T.; FEKADE, D.; SPERBER, G. DNA Fingerprinting in the epidemiology of African serogroup A *Neisseria meningitidis*. **Scand. J. Infect. Dis.**, **24**:323-32, 1992.
8. BJUNE, G.; HOIBY, E. A.; GRONNESBY, J. K.; ARNESEN, O.; FREDRIKSEN, J. H. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. **The Lancet**, **338**:1093-96, 1991.
9. BLACKWELL, C. C.; WEIR, D. M.; JAMES, V.S.; CARTWRIGHT, K. A. V.; STUART, J. M.; JONES, D. M. The Stonehouse study: secretor status and carriage of *Neisseria* species. **Epidemiology and Infection**, **102**:1-10, 1989.

10. BRANDTZAEG, P; MOLLNES, T. E.; KIERULF, P. Complement activation and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. In: CONNOR, D. H.; CHANDLER, F. W.; SCHWARTZ, D. A.; MANZ, H. J.; LACK, E.E., (Ed.). **Pathology of Infectious Disease**. EUA:999. v.I, p.690-699.
11. BRANHAM, S. E. Reference strains for the serologic groups of meningococcus. In: *Vedros, N. A.* (Ed.): **Evolution of meningococcal disease**. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 33-37.
12. BRANHAM, S. E. Serological relationships among meningococci. In: *Vedros, N. A.* (Ed.): **Evolution of meningococcal disease**. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 33-37.
13. BRASIL, MS. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, III, Brasília, 1999.
14. BRASIL, MS. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, V, Brasília, 2001.
15. BRISSON, J. R.; BAUMANN, H.; IMBERETY, A.; PÉREZ, S.; JENNINGS, H.J. Helical epitope of the group B meningococcal α -(2 \rightarrow 8)-linked sialic acid polysaccharide. **Biochemistry**, 31:4996-5004, 1992.
16. BRUNDAGE, J. F. & ZOLLINGER, W. D. In: *Vedros, N. A.* (Ed.): **Evolution of meningococcal disease**. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 99-119.
17. BRYAN, J. P.; SILVA, H. R.; TAVARES, A.; ROCHA, H.; SCHELD, W. M. Etiology and mortality of bacterial meningitis in northeastern Brazil. **Rev. Infect. Dis.**, 12:128-35, 1990.
18. BYGRAVES, J. A. & MAIDEN, M. C. J. Analysis of the clonal relationships between strains of *N. meningitidis* by pulsed field electrophoresis. **J. Gen Microbiol.** 138:52-3, 1992.
19. CAMPAGNE, G.; GARBA, A.; FABRE, P.; SCHUCHAT, A.; RYALL, R.; BOULANGER, D.; BYBEL, M.; CARLONE, G.; BRIANTAIS, P.; IVANOFF, F.; XERRI, B.; CHIPPAUX, J. Safety and immunogenicity of three doses of a *N. meningitidis* A+C diphtheria conjugate vaccine in infants from Niger. **Pediatr. Infect. Dis.**, 19:144-50, 2000.

20. CARION, F.; VAN LOOVEREN, M.; GOOSSENS, H. New epidemiological features of meningococcal disease in Belgium. **Euro Surveillance**, **2**:80, 1997.
21. CARTWRIGHT, K. A.; STUART, J. M.; JONES, D. N.; NOAH, N. D. The stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. **Epidemiol. Infect.**, **99**:591-601, 1987.
22. CAUGANT, D. A. Population genetics and molecular epidemiology of *N. meningitides*. **APMIS** **106**:505-525, 1998.
23. CAUGANT, D. A.; BOL, P.; HOIBY, E. A.; ZANEN, H. C.; FROHOLM, L. O. Clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing systemic disease in the Netherlands, 1958-1986. **J. Infect. Dis.**, **162**:867-74, 1990.
24. CAUGANT, D. A.; FROHOLM, L. O.; BOVRE, K.; HOLTEN, E.; FRASCH, C. E.; MOCCA, L. F.; ZOLLINGER, W. D.; SELANDER, R. K. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic-disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, **83**:4927-31, 1986.
25. CAUGANT, D. A.; KRISTIANSEN, B.; FROHOLM, L. O.; BOVRE, K.; SELANDER, R. K. Clonal diversity of *Neisseria meningitides* from a population of asymptomatic carriers. **Infect. Immun.**, **56**:2060-2068, 1988.
26. CAUGANT, D. A.; MOCCA, L. F.; FRASCH, C. E.; FROHOLM, L.; ZOLLINGER, W. D.; SELANDER, R. K. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype and outer membrane protein pattern. **J. Bacteriol.**, **169**:2781-2792, 1987.
27. CAUGANT, D. A.; ZOLLINGER, W. D.; MOCCA, L. F.; FRASCH, C. E.; WHITTAM, T. S.; FROHOLM, L.; SELANDER, R. K. Genetic relationships and clonal population structure of serotype 2 strains of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, **55**:1503-1513, 1987.
28. CEESAY, S. J.; ALLEN, S. J.; MENON A.; TODD, J. E.; CHAM, K.; CARLONE, G. M.; TURNER, S. H.; GREENWOOD, B. Decline in meningococcal antibody levels in African children 5 years after vaccination and the lack of an effect of booster immunization. **J. Infect. Dis.**, **167**:1212-16, 1993.

29. CLAUS, H.; STOEVE SANDT, J.; FROSCHE, M.; VOGEL, U. Genetic isolation of meningococcal of the electrophoretic type 37 complex. *J. Bacteriol.*, **183**:2570-2575, 2001.
30. CORREIA, F. F.; INOUE, S.; INOUE, M. A 26-base-pair repetitive sequence specific for *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis* genomic DNA. *J. Bacteriol.*, **167**:1009-1015, 1986.
31. CRAVEN, D. E.; FRASH, C. E.; ROBBINS, J. B.; FELDEMAN, H. A. Serogroup identification of *N. meningitidis*: comparison of an antiserum agar method with bacterial slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.*, **7**:410-414, 1978.
32. CROWE, B. A.; WALL, R. A.; KUSECEK, B.; NEUMANN, B.; OLYHOEK, T.; ABDILLAHI, H.; HASSAN-KING, M.; GREENWOOD, B. M.; POOLMAN, J. T.; ACHTMAM, M. Clonal and variable properties of *N. meningitidis* isolated from cases and carriers during and after an epidemic in the Gambia, West Africa. *J. Infect. Dis.*, **159**:686-700, 1989.
33. CRUZ, C.; PAVEZ, G.; AGUILAR, E.; GRAWE, L.; CAM, J.; MENDEZ, F.; GARCIA, J.; RUIZ, S.; VICENT, P.; CANEPA, I.; MARTINEZ, M.; BOSLEGO, J.; ZOLLINGER, W.; ARTUR, J.; CAUGANT, D. Serotype-specific outbreak of group B meningococcal disease in Iquique, Chile. *Epidemiol. Infect.*, **105**:119-126, 1990.
34. CUNHA, S. C. **Epidemia de meningite em Salvador: detecção e controle.** 1996.f.Dissertação de mestrado, 1996. Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA.
35. DALRYMPLE, B. P. & MATTICK, J. S. An analysis of the organization and evolution of type 4 (MePhe) fimbrial subunit proteins. *J. Mol. Evol.*, **25**:261-269, 1987.
36. Del VECCHIO, V.G.; PETROZIELLO, J.M.; GRESS, M.J. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **33**:2141-2144, 1995.
37. DERRICK, J. P.; URWIN, R.; SUKER, J.; FEAVERS, I. M.; MAIDEN, M. C. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. *Infect. Immun.*, **67**:2406-2413, 1999.

38. DOMBEK, P. E.; JOHNSON L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of repetitive DNA sequence and the PCR to differentiate *E.coli* isolates from human and animal sources. **AEM**, **66**:2572-77, 2000.
39. DOPTER, C., & PAURON. Differentiation des parameningocoques entre eux par la saturation des agglutinins. In: *Vedros, N. A. (Ed.): Evolution of meningococcal disease*. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 33-37.
40. DOPTER, C. Etude de quelques germes isolés du rhinopharynx, voisins du meningocoque (parameningocoque). In: *Vedros, N. A. (Ed.): Evolution of meningococcal disease*. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 33-37.
41. ENRIGHT, M. C.; SPRATT B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol**, **7**:482-7, 1999.
42. ERWA, H. H.; HASEEB, M. A.; IDRIS, A. A.; LAPEYSSONNIE, L.; SANBORN, W.R. A serogroup A meningococcal polysaccharide vaccine. Studies in the Sudan to combat cerebrospinal meningitis caused by *N.meningitidis* group A. **Bull WHO.**, 301-5, 1973.
43. FEAVERS, I. M.; FOX, A.J.; GRAY, S.; JONES, D. M.; MAIDEN, M.C. Antigenic diversity of meningococcal outer membrane protein PorA has implications for epidemiological analysis and vaccine design. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **3**:444-450,1996.
44. FEAVERS, I. M.; GRAY S. J.; URWIN, R.; RUSSEL, J. E.; BYGRAVES, J. A.; KACZMARSKI, E. B.; MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. **J. Clin. Microbiol.**, **37**:3883-38877, 1999.
45. FIJEN, C. A. P.; van der BOGAARD, R.; SCHIPPER, M.; MANNENS, M.; SCHLESINGER, M.; NORDIN, F. G.; DANKERT, J.; DAHA, M. R.; SJOHOLM A. G.; TRUEDSSON, L.; KUIJPER, E. J. Properdin deficiency: molecular basis and disease association. **Mol. Immun.**, **36**:863-867, 1999.
46. FRASCH, C.E. Vaccines for prevention of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, **2**:134-8, 1989.
47. FRASCH, C.E.; PARKES, L.; McNELIS, R.; GOTSCHLICH. E.C. Protection against group B meningococcal disease. I. Comparison of group-specific and

- type-specific protection in the chick embryo model. *J. Exp. Med.*, **144**:319-29, 1976.
48. GILLESPIE, S.H.; DICKENS, A.; MCHUGH, T.D. False molecular cluster due to nonrandom association of IS6110 with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **28**:2081-86, 2000.
49. GORDON, M. H, & MURRAY, E. G. D. Identification of the meningococcus In: *Vedros, N. A. (Ed.): Evolution of meningococcal disease*. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 33-37.
50. GOTSCHLICH, E. C.; AUSTRIAN, R.; CVJETANOVIC, B.; ROBBINS, J. B. Prospects for the prevention of bacterial meningitis with polysaccharide vaccines. *Bull. WHO.*, **56**:509-18, 1978.
51. GRAY, S. J.; SOBANSKI, M. A; KACZMARSKI, E. B.; GUIVER, M.; MARSH, W. J.; BORROW, R.; BARNES, R. A.; COAKLEY, W. T. Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination and PCR as complementary methods for non-culture-based confirmation of meningococcal disease. *J. Clin. Microbiol*, **37**:1797-1801, 1999.
52. GREENWOOD, B.M.; SMITH, A.W.; HASSAN-KING, M. The efficacy of meningococcal polysaccharide vaccine in preventing group A meningococcal disease in The Gambia, West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80**:106-7, 1986.
53. GRIFFISS, J. M.; BRANT, B. L.; JARVIS, G. A. Natural immunity to *N. meningitidis*. In: *Vedros, N. A. (Ed.): Evolution of meningococcal disease*. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 99-119.
54. GRIFFISS, J.N.; YAMASAKI, R.; ESTABROOK, M.; KIM, J.J. Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:32-36, 1991. Suplemento 1.
55. GUIBOURDENCHE, M.; HOIBY, E. A.; RIOU, J. Y.; VARAINE, F.; JOGUET, C.; CAUGANT, D. Epidemics of serogroup A *N. meningitidis* of subgroup III in Africa, 1989-94. *Epidemiol. Infect.*, **116**:115-120, 1996.

56. HIGGINS, C. F.; AMES G. F.; BARNES, W. M.; CLEMENT, J. M.; HOFNUNG, M. A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, **298**:760-62, 1982.
57. JELFS, J.; MUNRO, R.; WEDEGE, E. CAUGANT, D. Sequence variation in the *porA* gene of a clone of *N. meningitidis* during epidemic spread. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **7**:390-395, 2000.
58. JENNINGS, M. P.; SRIKHANTA, Y. N.; MOXON, E. R.; KRAMER, M.; POOLMAN, J. T.; KUIPERS, B.; van der LEY, P. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. **Microbiology**, **145**:3013-3021, 1999.
59. JOHNSON, J. R.; O' BRYAN, T. Improved repetitive – element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *E.coli*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **7**:265-273, 2000.
60. KIDD, M.; ATHERTON, J. C.; LASTOVICA, A. J.; LOUW, J. A. Clustering of South African *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer disease patients is demonstrated by repetitive extragenic palindromic – PCR fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, **39**:1833-1839, 2001.
61. KO, A. I.; REIS, J.N.; COPPOLA, S. J.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LÔBO, T. S.; PINHEIRO, R. M.; SALGADO, K.; DOURADO, C. M. R.; TAVARES-NETO, J. ROCHA, H; REIS, M. G.; JOHNSON, W. D. J.; RILEY, L. W. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningites in Salvador, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, **30**:78-86, 2000.
62. LEPOW, M. L.; BEELER, J.; RANDOLF, M.; SAMUELSON, J.S.; HANKINS, W. Reactogenicity and immunogenicity of a quadrivalent combined polysaccharide vaccine in children. **J.Infect.Dis** **154**:1033-1036,1986.
63. LEPOW, M.L.; PERKINS, B. A.; HUGHES, P.A.; POOLMAN J.T. Meningococcal vaccines. In: PLOTKIN, S.A.; ORENSTEIN, W.A. (Eds.) **Vaccine**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999, p. 711-27.
64. LINDSTEDT, B.; HEIR, E.; VARDUND, T.; MELBY, K.; KAPPERRUD. Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* strains

- by amplified-fragment length polymorphism genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, **38**:3379-3387, 2000.
65. LINGAPPA, J. R.; ROSENSTEIN, N.; ZELL, E. R.; SHUTT, K. A.; SCHUCHAT, A.; PERKINS, B. A. Surveillance for meningococcal disease and strategies for use of conjugate meningococcal vaccines in the United States. *Vaccine*, **19**:4566-4575, 2001.
66. LOOVEREN, M. V.; VANDAMME, P.; HAUCHECORNE, M.; WIJDOOGHE, M.; CARION, F.; CAUGANT, D. A.; GOOSSENS, H. Molecular epidemiology of recent belgian isolates of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:2828-34, 1998.
67. LYSTAD, A. & AASEN, S. The epidemiology of meningococcal disease in Norway 1975-91. *NIPH Ann.*, **14**:57-66, 1991.
68. MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSEL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**:3140-3145, 1998.
69. McGUINNESS, B. T.; BARLOW, A. K.; CLARKE, I.N.; FARLEY, J.E.; ANILIONIS, A.; POOLMAN, J.T.; HECKELS, J.E. Deduced amino acid sequences of class 1 protein (PorA) from 3 strains of *N. meningitidis*: synthetic peptides define the epitopes responsible for serosubtype specificity. *J. Exp. Med.*, **171**:1871-1882, 1990.
70. MILAGRES, L. G. & MELLES, C.E. Imunidade conferida por vacinas antimeningocócicas. *Rev. Saúde Pública*, **27**:221-226, 1993.
71. MILAGRES, L.G.; RAMOS, S.R.; SACCHI, T.C.; MELLES, C.E.; VIEIRA, V. S. D.; SATO, H.; BRITO, G. S.; MORAES, J. C.; FRASCH, C.E. Immune response of Brazilian children to a *N. meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect. Immun.*, **20**:4419-4424, 1994.
72. MILLER, M. A.; WENGER, J.; ROSENSTEIN, N.; PERKINS, B. Evaluation of meningococcal meningitis vaccination strategies for the meningitis belt in Africa. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **18**:1051-1059, 1999.

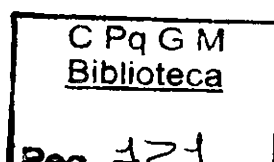
73. MOHAMMED, I. & ZARUBA, K. Control of epidemic meningococcal meningitis by mass vaccination. **Lancet**, 2:80-3, 1981.
74. MOORE, P. S.; REEVES, M. W.; SCHWARTZ, B.; GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Intercontinental spread of an epidemic group a *Neisseria meningitidis* strain. **The Lancet**, 7:260-263, 1989.
75. MURRAY, E. G. D. Proceeding of the roundtable on biology of the meningococcus symp and menincococcal meningitidis. In: *Vedros, N. A. (Ed.): Evolution of meningococcal disease*. Florida: CRC Press Inc., 1987.v. II, 33-37.
76. NASSIF, X; BERETTI, J.; LOWY, J.; STENBERG, P.; O'GAORA, P.; PFEIFER, J.; NORMARK, S.; SO, M., Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 91: 3769-3773, 1994.
77. NEWBURY, S. F.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E. C.; HILES, E. D.; HIGGINS, C.F. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**, 48:297-310, 1987.
78. OLIVE, D.M. & BEAN.P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, 37:1661-1669, 1999.
79. OLYHOEK, T.; CROWE, B. A.; ACHTMAN, M. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. **Rev. Infect. Dis.**,9:665-692, 1987.
80. PEETERS, C. C.; RUMKE, H.C.; SUNDERMANN, L.C; ROUPPE, E. M. Phase I clinical trial with a hexavalent Por A containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. **Vaccine**, 14:1009-1015, 1996.
81. PELTOLA, H. Meningococcal disease: still with us. **Rev. Infect. Dis.**, 5:71-91, 1983.
82. PERKINS, B.A.; JONSDOTTIR, K.; BRIEM, H.; GRIFFITHS, E.; PLIKAYTIS, B.D.; HOIBY, E.A.; ROSENQVIST. Immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal disease among young adults in Iceland. **J. Infect. Dis.**, 177:683-91, 1998.

83. PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M. M.; ARICÓ, B.; COMANDUCCI; JENNINGS, G.T.; GALEOTTI, C. L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D. W.; JEFFRIES, A. C.; SAUNDERS, N. J.; GRANOFF, D.W.; VENTER, J. C.; MOXON, E. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, **287**:1816-1820, 2000.
84. POLLARD, A. J. & LEVIN, M. Vaccine for prevention of meningococcal disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.** **19**:333-345, 2000.
85. POPOVIC, T.; SACCHI, C. T.; REEVES, M. W.; WHITNEY, A. M.; MAYER, L. W.; NOBLE, C. A.; AJELLO, G. W.; MOSTASHARI, F.; BENDANA, N.; LINGAPPA, J.; HAJJEH, R.; ROSENSTEIN, N. E. *Neisseria meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. **Emerg. Infect. Dis.**, **6**, CDC, Atlanta, 2000.
86. PORRITT, R. J.; MERCER, J. L.; MUNRO, R. Detection and serogroup determination of *Neisseria meningitidis* in CSF by polymerase chain reaction (PCR). **Pathology**, **32**:42-5, 2000.
87. RADEMAKER, J. L. & BRUIJN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: ANOLLÉS, C. & GRESSHOFF, P. M. **DNA markers: protocols, applications and overviews**. J.Wiley & Sons, Inc., 1997.
88. RAMSAY, M. E.; ANDREWS, N.; KACZMARSKI, E.B; MILLER, E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. **The Lancet**, **357**:195-196, 2001.
89. RAYMOND, N. J.; REEVES, M.; AJELLO, G.; BAUGHMAN, W.; GHEESLING, L. L.; CARLONE, G. M.; WENGER, J.D.; STEPHENS, D.S. Molecular epidemiology of sporadic (endemic) serogroup C meningococcal disease. **J. Infect. Dis.**, **176**:1277-84, 1997.
90. REEVES, M.W.; PERKINS, B.A.; WENGER, J.D. Epidemic associated *Neisseria meningitidis* detected by MLEE. **Emerg. Infect. Dis.**, **1**:53-4, 1995.

91. REINGOLD, A. L.; HIGHTOWER, A. W.; BOLAN, G. A.; JONES, E. E.; TIENDREBEOGO, H.; BROOME, C. V.; AJELLO, G.W.; ADAMSBAUM, C.; PHILLIPS, C.; YADA, A. Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. **Lancet**, 2:114-8, 1985.
92. REQUEJO, H. I. Z. Comportamento imunológico das vacinas antimeningocócicas. **Rev. Saúde Públ.**, 31:402-16,1997.
93. RODRIGUEZ-BARRADAS, M. C.; HAMILL, R. J.; HOUSTON, E. D.; GEORGHIOU, P.R.; CLARRIDGE, J. E.; REGNERY, R. L.; KOEHLER, J.E. Genomic fingerprinting of Bartonella species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 33:1089-93,1995.
94. ROSENQVIST, E.; WEDEGE, E.; HOIBY, E. A.; FROHOLM, L.O. Serogroup determination of *Neisseria meningitidis* by whole-cell ELISA, dot-blotting and agglutination. **APMIS**, 98:501-506, 1990.
95. ROSENSTEIN, N. E.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; LEFKOWITZ, L.; CARTTER, M. L.; DANILA, R.; CIESLAK, P; SHUTT, K. S.; POPOVIC, T.; SCHUCHAT, A.; HARRISON, L. H.; REINGOLD, A. L. The changing epidemiology of meningococcal disease in the USA, 1992-1996. **J. Infect. Dis.**, 180:1894-901,1999.
96. ROSENSTEIN, N. E.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; POPOVIC, T.; HUGHES, J.M. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med**, 344:1378-1388, 2001.
97. SACCHI, C. T.; LEMOS. A. P. S.; BRANDT, M. E.; WHITNEY, A. M; MELLES, C. E. A.; SOLARI, C. A.; FRASCH C. E.; MAYER, L. W. Proposed standardization of *N. meningitidis* Por A variable-region typing nomenclature. **Clin. Diagn. Lab. Immun.** 5:845-855, 1998.
98. SACCHI, C. T.; LEMOS. A. P. S.; BRANDT, M. E.; WHITNEY, A. M; MELLES, C. E. A.; SOLARI, C. A.; FRASCH C. E.; MAYER, L. Correlation between serological and sequencing analyses of the PorB outer membrane protein in the *N. meningitidis* serotyping system. **Clin. Diagn. Lab. Immun.**, 5:348-354, 1998.

99. SACCHI, C. T.; LEMOS, A. P. S.; POPOVIC, T.; MORAES, J. C.; WHITNEY, A. M.; MELLES, C. E. A.; BRONDI, L. M. G.; MONTEIRO, L. M. C.; PAIVA, M. V.; SOLARI, C. A.; MAYER, L. W. Serotypes and Por A types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: overview and implications for vaccine development. **J. Clin. Microbiol.**, **39**:2897-2903, 2001.
100. SACCHI, C. T.; PESSOA, L. L.; RAMOS, S. R.; MILAGRES, L. G.; CAMARGO, M. C. C.; HIDALGO, N. T.; MELLES, C. E. A.; CAUGANT, D. A.; FRASCH, C. E. Ongoing group B *N. meningitidis* epidemic in São Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. **J. Clin. Microbiol.**, **30**:1734-1738, 1992.
101. SACCHI, C. T.; TONDELLA, M. L. C.; LEMOS, A. P. S.; GORLA, M. C. O.; BERTO, B. D.; KUMIOCHI, N. H.; MELLES, C. E. A. Characterization of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup C strains in several Brazilian states. **J. Clin. Microbiol.**, **32**:1783-1787, 1994.
102. SACCHI, C. T.; ZANELLA, R. C.; CAUGANT, D. A.; FRASCH, C. E.; HIDALGO, N. T.; MILAGRES, L. G.; PESSOA, L. L.; RAMOS, R. R.; CAMARGO, M. C. C.; MELLES, C. E. A. Emergence of a new clone of serogroup C *N. meningitidis* in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **30**:1282-1286, 1992.
103. SCHMINK, S.; REEVES, M.W.; PLIKAYTIS, B.; POPOVIC, T. Random amplified polymorphic DNA assay as a rapid tool in screening for *N. meningitidis* serogroup C isolates of electrophoretic type 24. **J. Clin. Microb.**, **39**:1622-1625, 2001.
104. SCHOLTEN, R. J. P. M.; POOLMAN, J. T.; VALKENBURG, H. A.; BIJLMER, H. A.; DANKERT, J.; CAUGANT, D. A. Phenotypic and genotypic changes in a new clone complex of *Neisseria meningitidis* causing disease in Netherlands, 1958-1990. **J. Infect. Dis.**, **169**:673-6, 1994.
105. SCHWARTZ, B.; MOORE, P. S.; BROOME, C. V. Global epidemiology of meningococcal meningitis. **Clin. Microbiol. Rev.**, **2**:18-124, 1989. Suplemento.
106. Science Magazine, Complete genome sequence of *N. meningitidis* serogroup B strain MC58 web/ www.sciencemag.org/feature/data/1046515.SHL

107. Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Coordenação de controle de doenças transmissíveis agudas - Equipe de controle epidemiológico, Coordenadoria geral de Vigilância em Saúde & Sociedade de Pediatria do Rio Grande do Sul. I Simpósio Regional Sul e Sudeste sobre a vigilância epidemiológica das meningites. 29 p., 2001.
108. Secretaria Saúde da Bahia / Serviço Único de Saúde. Boletim epidemiológico, Ano V, out/dez; 1999.
109. SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **App. Environ. Microbiol.**, 51:873-84, 1986.
110. SHI, Z. Y.; LIU, P. Y.; LAU, Y.; LIN, Y.; HU, B. Epidemiological typing of isolates from an outbreak of infection with multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* by repetitive extragenic palindromic unit b1-primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, 34:2784-90, 1996.
111. SIERRA, V. G.; CAMPA, C.; TERRY, H.; ECHEVERRI, M.L. Epidemiologic and laboratory of the Cuban meningococcal vaccine BC, three years of follow-up. In: Pathobiology and Immunobiology of Neisseriaceae. In: INTERNATIONAL PATHOGENIC NEISSERIA CONFERENCE, 8., 1994 Mexico. p. 909-915.
112. SMITH, I.; LEHMANN, A. K.; LIE, L.; DIGRANES, A.; CAUGANT, D. A.; HOIBY, E. A.; FROHOLM, L. O.; HALSTENSEN, A. Outbreak of meningococcal disease in western Norway due to a new serogroup C variant of the ET-5 clone: effect of vaccination and selective carriage eradication. **Epidemiol. Infect.**, 123:373-382, 1999.
113. STULL, T. L.; LIPUMA, J. J.; EDLIND, T.D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. **J. Infect. Dis.**, 157:280-286, 1988.
114. SUKER, J.; FEAVERS, I.M.; ACHTMAN, M.; MORELLI, G.; WANG, J. F.; MAIDEN, M. C. J. The *porA* gene in serogroup A meningococci: evolution stability and mechanism of genetic variation. **Mol. Microbiol.**, 12:253-265, 1994.



115. SWARTLEY, J. S.; MARFIN, A. A.; EDUPUGANTI, S.; LIU, L. J.; CIESLAK, P.; PERKINS, B.; WENGER, J. D.; STEPHENS, D.S. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci**, **94**:271-276, 1997.
116. TAHA. M. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, **38**:855-857, 2000.
117. TAUNAY, A. E. Aspectos etiológicos da doença meningocócica. **Atual. Med.** **11**:21-32,1975.
118. TAUNAY, A. E.; FELDMAN, R. A.; BASTOS, C. O.; GALVÃO, P. A. A.; MORAES, J. S.; CASTRO, I.O. Avaliação do efeito protetor de vacina polissacarídica antimeningocócica do grupo C, em crianças de 6 a 36 meses. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **38**:77-82, 1978.
119. TETTELIN, H.; SAUNDERS, N. J.; HEIDELBERG, J.; JEFFRIES, A. C.; NELSON, K. E.; EISEN, J.A.; KETCHUM, K. A.; HOOD, D. W.; PEDEN, J. F.; DODSON, R. J.; NELSON, W. C.; GWINN, M. L.; DEBOY, R.; PETERSON, J. D.; HICKEY, E. K.; HAFT, D. H.; SALZBERG, S. L.; WHITE, O.; FLEISCHMANN, R.D.; DOUGHERTY, B. A.; MASON, T.; CIECKO, A.; PARKSEY, D. S.; BLAIR, E.; CITTONE, H.; CLARK, E. B.; COTTON, M. D.; UTTERBACK, T. R.; KHOURI, H.; QIN, H.; VAMATHEVAN, J.; GILL, J.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; PIZZA, M.; GRANDI, G.; SUN, L.; SMITH, H. O.; FRASER, C. M.; MOXON, E. R.; RAPPUOLI, R.; VENTER, J. C. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. **Science**, **287**:1809-1915, 2000.
120. TIKHOMIROV, E.; SANTAMARIA, M.; ESTEVES, K. Meningococcal disease: public health burden and control. **Rapp Trimest. Statist. San. Mond.** **50**:170-177, 1997.
121. TONDELLA, M. L. C.; POPOVIC, T.; ROSENTEIN, N. E.; LAKE, D. B.; CARLONE, G. M.; MAYER, L. W.; PERKINS, B.; ACTIVE BACTERIAL CORE SURVEILLANCE TEAM. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, **38**:3323-3328, 2000.

122. van BELKUM, A.; MEIS, J. Polymerase chain reaction – mediated genotyping in microbial epidemiology. **Clin. Infect. Dis.**, **18**:1017-8, 1994.
123. van der LEY, P.; HECKELS, J. E.; VIRJI, M.; HOOGERHOUT, P.; POOLMAN, J. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. **Infect. Immun.**, **59**: 2963-2971, 1991.
124. van-der VOORT, E. R.; van der LEY, P.; van der BIEZEN, J.; GEORGE, S.; TUNNELA, O.; van DIJKEN; KUIPERS, B.; POOLMAN, J. Specificity of human bactericidal antibodies against Por A P1.7,16 induced with a hexavalent meningococcal outer vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, **64**:2745-51, 1996.
125. van DEUREN, M. V.; BRANDTZAEG, P.; MEER, J. W. M. V. D. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. **Clin. Microb. Rev.**, **13**:144-66, 2000.
126. van LOOVEREN, M.; CAUGANT, D. A.; CHAPELLE, S.; CARION, F.; GOOSSENS, H. Interpreting the rising incidence of meningococcal disease in Belgian: the contribution of molecular typing. **J. Med. Microbiol.**, **50**:986-99, 2001.
127. VEDROS, N. A. Evolution of meningococcal disease, In CRC Press (ed), Development of meningococcal serogroups and serotyping, vol II, 33-54, Boca Raton, Florida, 1987.
128. VERSALOVIC, J. & LUPSKI, J. R. DNA Fingerprinting of *Neisseria* strains by rep-PCR. **Methods Mol. Cell. Biol.**, **5**:96-104, 1995.
129. VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. **Nucleic Acids Res.**, **19**:6823-6831, 1991.
130. VIEUSEAUX, M. Mémoire sur la maladie qui a regné a Geneve du printemps de 1805. *Journal de Médecine Chirurgie Pharmacie*, 11:163, 1805. In: *Medicina Tropical - Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias*. Batista, R. S.; Gomes, A. P.; Igreja, R.P.; Huggins, D.W. (ed) *Cultura Médica*, 521-259, 2000.
131. VIRJI, M. Glycosilation of the *Meningococcus* pilus protein. **ASM News**, **64**: 398-405, 1998.

132. VOGEL, U.; WEINBERGER, A.; FRANK, R.; MULLER, A.; KOHL, J.; ATKINSON, J.; FROSCH, M. Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, **65**:4022-4029, 1997.
133. VOLK, W. A.; GEBHARDT, B.M.; HAMMARSKJOLD, M; KADNER, R. J. In. **Essentials of medical microbiology**. 5 ed. Philadelphia: Copyright, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.348-355.
134. WAHDAN, M. H.; RIZK, F.; EI-AKKAD, A. M. A controlled field trial of serogroup A meningococcal polysaccharide vaccine. *Bull.WHO*, **46**:667-73, 1973.
135. WANG, J.; CAUGANT, D. A.; LI, X.; HU, X.; POOLMAN, J. T.; CROWE, B. A.; ACHTMAN, M. Clonal and antigenic analysis of serogroup A *N. meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in China. *Infect. Immun.* **60**:5267-5282, 1992.
136. WANG, J.; CAUGANT, D.; MORELLI, G.; KOUMARÉ, B.; ACHTMAN, A., Antigenic and epidemiological properties of the Et-37 complex of *N.meningitidis*. *J. Infect. Dis.*, **167**:1320-1329, 1993.
137. WANG, L. Y. & FRASCH, C. E. Development of *N. meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in mouse model. *Infect. Immun.* **46**: 408-414, 1984.
138. WEDEGE, E.; DALSEG, R.; CAUGANT, D.; POOLMAN, J. T.; FROHLOM, L. O. Expression of an inaccessible P1.7 subtype epitope on meningococcal class I proteins. *J. Med. Microbiol.* **38**:23-28, 1993.
139. WEDEGE, E.; HOIBY E.A.; ROSENQVIST E.; FROHOLM, L.O. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. *J. Med. Microbiol.* **31**:195-201, 1990.
140. WEDEGE, E.; HOIBY, E. A.; ROSENQVIST, E.; BJUNE, G. Immune responses against major outer membrane antigens of *N. meningitidis* in vaccines and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian Serogroup B protection trial. *Infect. Immun.*, **66**:3223-3231, 1998.
141. WEICHSELBAUM, A. Ueber die Aetiologie der akuten Meningitidis cerebrospinalis. *Otschr Med.* 1887;**5**:573-83. In: *Medicina Tropical - Abordagem*

- atual das doenças infecciosas e parasitárias. Batista, R. S.; Gomes, A. P.; Igreja, R.P.; Huggins, D.W. (ed) Cultura Médica, 521-259, 2000.
142. WEIS, N.; LIND, I. Usefulness of the DNA-fingerprinting pattern and the multilocus enzyme electrophoresis profile in the assessment of outbreaks of meningococcal disease. **Epidemiol. Infect.**, **116**:103-14, 1996.
143. WHO. Control of epidemic meningococcal disease. WHO practical guidelines 2nd edition, World Health Organization, 1998. (<http://www.who.int/emc-documents/meningitis/whoemcbac983.html>)
144. WOODS C. R.; KOEUTH, T.; ESTABROOK, M. M.; LUPSKI, J. R. Rapid determination of outbreaks-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. **J. Infect. Dis.**, **174**:760-767, 1996.
145. WOODS C. R.; VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* using DNA fingerprints generated by repetitive sequence based primers in the polymerase chain reaction (rep-PCR). **J. Clin. Microb.**, **30**:2921-9, 1992.
146. YAKUBU, D. E.; ABADI, F.J.R.; PENNINGTON, T. H. Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. **J. Med. Microbiol.**, **48**:1055-1064, 1999.
147. ZOLLINGER, W. D.; MANDRELL, R.E.; ALTIERI, P.; BERMAN, S.; LOWENTHAL, J.; ARTENSTEIN, M. S. Safety and immunogenicity of a *N. meningitidis* type 2 protein vaccine in animals and humans. **J. Infect. Dis.**, **137**:728-39, 1978.
148. ZOLLINGER, W.D.; BOSLEGO, J.; FROHOLM, L. O.; RAY, J. S.; MORAN, E. E.; BRANDT, B, L. Human bactericidal antibody response to meningococcal outer membrane protein vaccines. **Antonie van Leeuwenhoek**, **53**:403-11, 1987.

ANEXO I - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

ESTUDO DE MENINGITE MENINGOCÓCICA

I. Identificação do Paciente:

- A. Número de identificação do estudo
- B. Número de identificação no HCM (registro ou PA)
- C. Se pcte foi de outro hospital, qual? _____
- D. Data de admissão
- E. Nome _____

II. Critérios de Inclusão e Identificação Microbiológica

1. Coloração de Gram é positiva para *N. meningitidis*
2. Látex é positivo para *N. meningitidis*
3. Cultura do líquido é positiva para *N. meningitidis*
5. Hemocultura positiva para *N. meningitidis* (8=não fez)
6. Sorotipo do HC Maia (8=não fez)

iii. Entrevista: (1=entrevistado ; 2=revisão prontuário; 3=prontuário PA)

IIIb. Consentimento (1=s; 0=n; 9=ns; 8=nsa)

IV. Dados Demográficos

1. Idade (Se <1 ano, coloque 0)
Se <2 anos, idade do paciente em meses:
Se <1 mês, idade do paciente em dias:
2. Sexo (1=M, 0=F, 9=ns):
3. Procedência (1=Salvador, 0=Interior; 8=nsa; 9=ns):
- Rua: _____
- Bairro: _____ Cidade: _____
4. Escolaridade:
(1=analfabeto; 2= prim. grau (1a - 4a series); 3= prim. grau (5a - 8a series); 4=2º. grau (incompleto); 5=2º. grau (completo); 6=universidade(incompleta); 7=universidade comp)

V. Começo dos Sintomas : (1=s,0=n;8=nsa;9=ns)

- | | Dias antes do HCM |
|---|---|
| 1. Quando começou a doença: | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> |
| 2. Febre: <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> |
| 3. Dor de cabeça: <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> |
| 4. Convulsões: <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> |
| 5. Rigidez de nuca: <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> |
| 6. Náusea/vômito: <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> | <input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/> |

VI. Antecedentes médicos:

1. Doenças anteriores: 1) _____
2) _____
2. O paciente apresenta doença crônica (1=s,0=n;9=ns): Evidência: _____
- 2.1. Alcoolismo: Evidência: _____

VII. História de Hospitalizações Anteriores:

1. Foi internado de 0 a 3 dias antes de iniciar sintomas de meningite? Motivo: _____
2. a. Hospit. antes dessa doença, por mais de 24 h no último mês:
 Onde? _____ Dias?
- b. Hospit. nos últimos 2-3 meses (1=s, 0=n, 9=ns):
 Onde? _____ Dias?
- c. Hospit. nos últimos 4-6 meses (1=s, 0=n, 8=nsa, 9=ns):
 Onde? _____ Dias?
- d. Hospit. nos últimos 6 meses (1=s, 0=n, 8=nsa, 9=ns):
 Onde? _____ Dias?

VIII. História Epidemiológica do Paciente:

1. Paciente trabalha mais do que 20 horas/semana: Ocupação _____
2. Paciente vai para escola: (0= n, 1=s, 9=ns):
- 2.1. Se sim, Qual _____ Bairro: _____
3. Paciente vai para creche: (0=n, 1=s, 9=ns):
- 3.1. Se sim, qual _____ Bairro: _____
4. Horas fora de casa por dia? (1= <8 horas; 2 = 8-12 horas; 3 = 13-15 horas; 4= >16 horas; 9= ns):
5. Paciente fuma:
6. Conhece outro paciente com infecção meningocócica:
- 6.1. Se sim, quem : _____ Quando teve meningite: _____

IX. Informação sobre Contactantes:

1. Quantas pessoas moraram na casa por > 4 sem nos últimos 6 meses:
2. Quantos cômodos tem a casa
3. Morador da casa fuma
4. História de viagem no último mês (0=N, 1=S, 9=NS, 8=NSA)
- | | Paciente | Contactante |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. Viagem para fora da cidade da residência | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Se mora interior, viagem a Salvador | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Viagem para fora do Estado | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

X. Apresentação Clínica na Admissão:

1. Se Criança < 2 anos; qual o comprimento | Percentil
2. Dados Vitais:
 TAS = TAD = TAM =
3. Lesões de pele: (1=s, 0=n, 9=ns)
4. Tipo: { 1=púrpura/equimose (> 5 mm); 2=petéquia (< 5mm); 9=ns; 8=sem lesão}
5. Sinais neurológicos focais (1=s;0=n;9=ns):
- 5.1. Se sim, qual: _____
6. Consciente na admissão? (adultos)
- 6.1. Sensório do paciente: (adultos)
- | | |
|---|-------------------|
| 1=Alerta, orientado e capaz de obedecer comandos; | 5= Irresponsivo; |
| 2= Alerta, não bem orientado ou capaz de obedecer comandos; | 8= Não se aplica; |
| 3= Letárgico mas acordado; | 9= Não sabe; |
| 4= Acordado apenas à estimulação dolorosa vigorosa; | |
7. Se criança <2 anos sensório do paciente: (1=alerta/irritável; 2= sonolento/letárgico; 3= comatoso; =nsa; 9=ns)

XI. Informação Laboratorial na Admissão:

1. Em que dia de hospitalização o Hemograma foi feito
2. Contagem de leucócitos (em milhares): |
3. Leucograma diferencial: PMNs: % Bastões: %
4. Eritrograma: Hb: Ht: % Plaq: .000
5. Dados do Líquor: (0=n;1=s;9=ns;8=nsa)
- 5.1. Prejudicada:
- 5.2. Leucócitos: |
- 5.3. Predominância de PMN(>75%):
- 5.4. Glicose (mg/dl):
- 5.5. Proteína (mg/dl):

XII. Tratamento:

- 1. Esquema inicial incluiu (1=s, 0=n):
 - a. penicilina ou ampicilina
 - b. cloranfenicol
 - c. Rocefim (ceftriaxona)
 - d. ceftazidima
- 2. Para os casos que não começou com o Rocefim, foi incluída depois
- 3. Foi tratada com esteroide IV (1=s, 0=n, 9=n): quantos dias: dias
que dia começou: DIH

XIV. Evolução Clínica: Alta final

- 1. Data da alta: _____/_____/_____
- 2. Tipo de alta (1=curado; 2=transferido; 3 = outro diagnóstico; 4= óbito):
- 3. Dias internados no HCM:
- 4. Dias internados na UTI do HCM:
- 5. Convulsões durante o internamento (1=s;0=n;9=ns;8=nsa):
- 6. Evoluiu com sinais neurológicos focais (1=s, 0=n, 9=ns):
- 6.1. Se sim, Qual _____
- 7. Déficit neurológico na alta:
(0= não tem; 1= perda auditiva; 2=deficit motor; 3 = alt. nervos cranianos; 4 = ataxia ; 5= alteração estado mental)

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Consentimento para Investigação Clínica: Página 1

Título do Projeto: Estudo de Meningite Bacteriana no Hospital Couto Maia.

Paciente: _____ No. na Pesquisa: _____

Introdução:

As informações que se seguem descrevem o estudo e seu papel como participante. O entrevistador responderá todas as perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo do Estudo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo que estamos realizando no Hospital Couto Maia sobre meningite bacteriana. A meningite é uma inflamação que ocorre no cérebro, é uma doença grave que acomete principalmente crianças, mas pode ocorrer em qualquer idade.

O objetivo do nosso estudo é conhecer mais as bactérias que causam meningite, estudando como elas são transmitidas; quais são os fatores que fazem com que algumas pessoas apresentem um quadro mais grave que outras; porque algumas crianças parecem ter no sangue uma defesa (anticorpos) contra a bactéria e como elas adquiriram esta defesa. Obtendo estas informações teremos condições, no futuro, de implantar medidas para diminuir o número de pessoas com meningite.

Você está sendo convidado(a) a participar porque você tem meningite bacteriana confirmada por exames ou porque com certeza você não tem esta doença. Todo estudo científico deste tipo precisa comparar pessoas que tem a doença com pessoas que não tem; só assim, saberemos o que é realmente importante para a doença e o que é apenas coincidência.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar deste estudo após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas sobre o local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica e lerá seu prontuário médico para obter os resultados de seus exames no hospital.

Sigilo:

As perguntas feitas durante a entrevista ou as informações do seu prontuário médico ou dos seus exames serão confidenciais e apenas você e o investigador terão acesso a elas. Você não será identificado (a) em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista. Sua recusa em participar no estudo ou em parte do mesmo, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações como Hospital Couto Maia no

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Consentimento para Investigação Clínica: Página 2

Título do Projeto: Estudo de Meningite Bacteriana no Hospital Couto Maia.

Paciente: _____ No. na Pesquisa: _____


presente ou no futuro. Uma cópia deste formulário lhe será dada e você pode ficar com ela. Você não será responsável por nenhuma despesa relacionada a este estudo.

Com quem contatar:

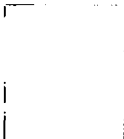
Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo você pode contatar a Dra. Cibele Dourado pelo telefone: (071) 312-0084. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor entre em contato com Dr. Edilson Sacramento, Presidente da Comissão de Ética do Hospital Couto Maia, pelo telefone (071) 312-0084. Tanto Dra. Cibele quanto Dr. Edilson podem ainda ser contatados no Hospital Couto Maia cujo endereço é Rua São Francisco, s/a, Monte Serrat, no. 40, CEP 40.425-001, Salvador, Bahia.

Consentimento:

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto em participar deste estudo.

_____	_____	_____
Assinatura do paciente	Data	Hora
		
Impressão datiloscópica do paciente		

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto que o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou guardião legal participe deste estudo.

_____	_____	_____
Assinatura do pai ou mãe ou guardião legal	Data	Hora
		
Impressão datiloscópica do pai ou mãe ou guardião legal		

_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

_____	_____	_____
Assinatura do Investigador	Data	Hora

ANEXO III - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Rua Waldemar Falcão, 121, CEP: 40295-001
Tel.: (071) 356 8785 Fax: (071) 356 4292
E-mail: sherlock@server01.cpqgm.fiocruz.br
Salvador - Bahia - Brasil

PARECER Nº 0038

Protocolo: 0038

Projeto de Pesquisa: "Epidemiologia Molecular das Meningites Bacterianas em Salvador/Bahia".

Pesquisador Responsável: Dr. Albert Ko

Instituição ou Departamento: CPqGM

Considerações: Foram atendidas e esclarecidas todas as pendências referentes aos aspectos éticos do Projeto "Epidemiologia Molecular das Meningites Bacterianas em Salvador/Bahia".

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga favorável o projeto supracitado.

Salvador, 30 de novembro de 1998


Dr. Italo A. Sherlock
Coordenador do CEP-CPqGM/FIOCRUZ

**CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DA BAHIA
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HOSPITAL COUTO MAIA**

Salvador 08 de novembro de 1998
Of. Nº

Prezado Dr. Mitermayer

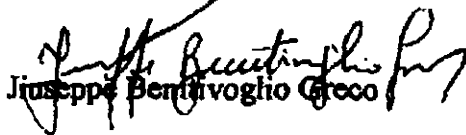
A Comissão de Ética Médica do Hospital Couto Maia após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado; "**Epidemiologia molecular das Meningites Bacterianas em Salvador**". Achou - o de alta relevância e, por não ferir nenhum capítulo do Código de Ética Médica, Declaração de Helsinque e a Declaração Universal do Direitos do Homem aprova o referido projeto para sua realização no Hospital Couto Maia.

A Comissão de Ética Médica do Hospital Couto Maia esta a disposição da referida equipe do projeto para qualquer orientação e esclarecimento.

Atenciosamente



Edilson Sacramento da Silva



Giuseppe Benivoglio Greco



Everaldo Benedito da Silva Costa

Ilmº Sr.
Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Nesta