

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

Gabriel Vitor Dias Souza

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *OATC* EM CEPAS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*
SOROGRUPO C ISOLADAS NO PERÍODO DE 1991 A 2019**

Rio de Janeiro

2021

Gabriel Vitor Dias Souza

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *OATC* EM CEPAS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*
SOROGRUPO C ISOLADAS NO PERÍODO DE 1991 A 2019

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutor: Ivano Raffaele Victorio de Filippis
Capasso

Preceptor: Maysa Beatriz Mandetta
Clementino

Rio de Janeiro

2021

Catologação na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Souza, Gabriel Vitor Dias

CARACTERIZAÇÃO DO GENE OATC EM CEPAS DE NEISSERIA MENINGITIDIS SOROGRUPO C ISOLADAS NO PERÍODO DE 1991 A 2019. / Gabriel Vitor Dias Souza. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.
40 f. : fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Tutor: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso.
Preceptora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Infecção Meningocócica. 2. Acetilação. 3. Vacinas Meningocócicas.
I. Título.

CHARACTERIZATION OF THE OAT C GENE OF NEISSERIA MENINGITIDIS SEROGROUP C FROM 1991 TO 2019.

Gabriel Vitor Dias Souza

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *OATC* EM CEPAS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*
SOROGRUPO C ISOLADAS NO PERÍODO DE 1991 A 2019

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: 22/02/2021.

Banca examinadora

Debora Ribeiro de Souza Santos (Mestre)

Fundação Oswaldo Cruz

Talita Coelho de Souza (Mestre)

Fundação Oswaldo Cruz

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora)

Fundação Oswaldo Cruz

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor) – Tutor

Fundação Oswaldo Cruz

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutora) – Preceptor

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a todos aqueles que com seus esforços me ajudaram a chegar onde estou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares por sempre me incentivarem a prosseguir ainda que o caminho fosse difícil.

Agradeço a Debora por toda a paciência, ensinamento, generosidade, profissionalismo, conselho e experiência que me transmitiu desde o primeiro dia. Muito do que aprendi foi porque você teve a paciência de me ensinar.

Agradeço aos meus amigos por alegrarem a minha vida com suas histórias e carinho.

Agradeço ao meu tutor e a minha preceptora por passarem seu conhecimento de forma abundante e sem restrições.

Agradeço em especial a todos os meus amigos de laboratório que me acolheram e me ensinaram muito do que sei hoje.

Agradeço a Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz, Subunidade de Sequenciamento de DNA-RJ pela parceria.

Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.

Carl Sagan

RESUMO

A doença meningocócica é causada pela bactéria *Neisseria meningitidis*, um patógeno exclusivamente humano e classificado em diferentes sorogrupos, sendo o A, B, C, Y, W e X os mais associados aos surtos epidêmicos ao redor do mundo. Características como uma rápida progressão da doença combinada com uma alta taxa de letalidade, que varia entre 7% a 70% de casos não tratados, associados a sequelas físicas ou neurológicas pós tratamento, em torno de 20% dos casos, demonstra a importância de se desenvolver métodos de vigilância, profilaxia e tratamento para essa infecção. No Brasil a taxa de letalidade é de 21,9%. Atualmente existem vacinas contra diferentes sorogrupos de *Neisseria meningitidis*, porém, estudos apontam que uma vacina desenvolvida utilizando cepas de-O-acetiladas contra o sorogrupo C conferem níveis de IgG duas vezes maiores e um efeito bactericida mais acentuado do que vacinas produzidas a partir de cepas O-acetiladas. Compreendendo a importância para a saúde pública que esse microrganismo representa, o presente estudo teve como objetivo avaliar a evolução do gene *OatC* responsável pela acetilação do polissacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C de amostras bacterianas isoladas no Brasil no período de 1991 a 2019, com a intenção de gerar dados a respeito da circulação de cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas no país. Para tal, realizou-se uma seleção das cepas depositadas na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária, as quais foram caracterizadas por métodos moleculares, sequenciadas para a obtenção de informações a respeito do gene *OatC* e avaliadas para sua classificação em O-acetiladas e de-O-acetiladas. O estudo demonstrou que a proporção de cepas de-O-acetiladas circulantes no país foi de 23%, superior a média de 13,5% encontrada para o Reino Unido e Estados Unidos, únicos países onde já foram realizados esse tipo de estudo. Conclui-se que a introdução de uma vacina do sorogrupo C conjugada produzida a partir de cepas de-O-acetiladas poderia trazer benefícios para a população sensível.

Palavras-chave: Infecção Meningocócica. Acetilação. Vacinas Meningocócicas.

ABSTRACT

Meningococcal disease is caused by the bacterium *Neisseria meningitidis*, an exclusively human pathogen classified into different serogroups, with A, B, C, Y, W and X being the most associated with epidemic outbreaks around the world. Features such as a rapid progression of the disease combined with a high lethality rate, ranging from 7% to 70% of untreated cases, associated with physical or neurological sequelae after treatment, in up to 20% of cases, demonstrates the importance of developing surveillance, prophylaxis and treatment methods for this disease. It is estimated that in Brazil, an endemic region for the disease, meningococcal disease is responsible for a lethality of 21.9%. Currently there are vaccines against different serogroups of *Neisseria meningitidis*, however, studies indicate that a vaccine developed through strains of de-O-acetylated against serogroup C confer IgG levels twice higher and a bactericidal effect more pronounced than vaccines produced from O-acetylated lineages. Understanding the importance for public health that this microorganism represents, the present study aimed to evaluate the evolution of the *OatC* gene responsible for the acetylation of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C of Brazilian isolates from 1991 to 2019, with the intention of generating data regarding the circulation of O-acetylated and de-O-acetylated strains in the country. With this purpose, a selection of the strains deposited in the Collection of Reference Bacteria in Sanitary Surveillance was performed. These strains were characterized by molecular methods and sequenced to obtain information about the *OatC* gene and evaluated for its classification in O-acetylated and de-O-acetylated. The study showed that the proportion of de-O-acetylated strains circulating in the country was 23%, well above the average of 13.5% found in the United Kingdom and United States, the only countries where this type of study has ever been conducted. It was concluded that the introduction of a conjugated serogroup C vaccine produced from de-O-acetylated strains could bring benefits to the sensitive population.

Key-words: Meningococcal Infections. Acetylation. Meningococcal Vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração em 3D da forma e agrupamento de centenas de microrganismos de <i>Neisseria meningitidis</i>	15
Figura 2 - Divisão das cepas entre as que contêm ou não informações relativas ao MLST e em O-acetiladas e de-O-acetiladas	29
Figura 3 - Árvore filogenética baseada na caracterização do gene <i>oatC</i> e divisão das cepas em grupos com características O-acetiladas e de-O-acetiladas	30
Figura 4 - Distribuição das cepas estudadas de acordo com o ano de depósito.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das cepas estudadas de acordo com o estado de origem	28
Tabela 2 - Distribuição das cepas de acordo com o Complexo Clonal	32

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CC	Complexo Clonal
DM	Doença Meningocócica
DTP	Vacina contra Difteria, Tétano e Coqueluche
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LOS	Lipo-oligossacarídeo
MenC	Vacina Meningocócica C conjugada
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
Neu5Ac	N-acetilneuramínico
oatC	O-acetiltransferases
Oac ⁺	Estrutura polissacarídica O-acetilada
Oac ⁻	Estrutura polissacarídica de-O-acetilada
ORF	Open Reading Frame
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PSC	Polissacarídeo capsular
ST	Tipo Sequencial
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
VOP	Vacina Oral da Poliomielite

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Histórico da meningite meningocócica no Brasil	12
1.2	O agente etiológico <i>Neisseria meningitidis</i>	14
1.3	Vigilância epidemiológica dos casos de <i>Neisseria meningitidis</i>	17
1.4	O Programa Nacional de Imunização no combate à doença meningocócica	18
1.5	A formação do polissacarídeo capsular e o gene <i>oatC</i>	21
1.6	Justificativa	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	METODOLOGIA	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Após a invenção do primeiro microscópio em 1674 por Antony Van Leeuwenhoek (1632 - 1723), o surpreendente mundo microbiológico pode enfim começar a ser descoberto. Partiu do próprio inventor as primeiras anotações e envio de cartas a Sociedade Real Britânica informando e divulgando sobre a descoberta dessas novas formas de vida, que a princípio foram chamados de “animáculos”, tornando assim a sociedade consciente da existência de tais seres (CARVALHO, 2010).

Ainda que a consciência a respeito da existência dos microrganismos tenha acontecido por volta de 1680, foi somente após os postulados de Louis Pasteur (1822 - 1895) que alguns cientistas fizeram a ligação entre doenças e os seus possíveis causadores. Tal teoria ficou conhecida como “A teoria microbiana da doença”, e causou grande confusão social, já que até aquele momento o ato de adoecer era associado aos castigos divinos por culpa dos pecados cometidos. Todavia, foi somente em 1876 que o médico alemão Robert Koch (1843 – 1910) finalmente conseguiu relacionar os microrganismos como possíveis causadores de doenças (REZENDE, 2009; DIAS, 2016).

Desde então, várias epidemias, endemias e surtos já acometeram a humanidade. Entre elas é possível citar a febre amarela, malária, gripe espanhola, cólera, tuberculose, difteria, coqueluche, sarampo, dengue, meningite, Síndrome da imunodeficiência adquirida e Vírus da imunodeficiência Humana (HIV/AIDS), Influenza e mais recentemente a pandemia causada pelo SARS-CoV-2. Os cientistas salientam que o processo de globalização e as suas várias implicações no modo de vida da população acelerou bastante a transmissão de agentes infecciosos que antes eram restritos a lugares específicos do planeta, fazendo com que novos surtos e epidemias surgissem a partir disso (UJVARI, 2008; BARATA, 2000; BERTUCCI-MARTINS, 2005; FORTES; RIBEIRO, 2014; CALIL, 2021).

1.1 Histórico da meningite meningocócica no Brasil

Para compreender os surtos de meningite meningocócica no Brasil, primeiro é preciso caracterizar essa doença. O termo meningite tem origem na junção da palavra grega *meninx* e do termo *meningo* que é originário do latim moderno e significam membrana, acrescido do sufixo médico *ite* que designa inflamação, ou seja, de um modo popular seria a inflamação das membranas. Essa patologia é caracterizada pela inflamação do espaço subaracnóideo e das membranas dura-máter, aracnoide e pia-máter, ocasionando sintomas que são dependentes

da idade e também do tipo de agente etiológico. Como o termo meningite é o nome dado à doença de uma forma geral, é de grande importância se ter em mente que os agentes causadores podem ser variados e ter a sua origem em fungos, vírus, bactérias, protozoários e algumas vezes como uma condição decorrente de quadros não infecciosos (SILVA *et al.*, 2017; BRANCO; AMORETTI; TASKER, 2007).

A meningite bacteriana é causada por diferentes microrganismos, tendo como os principais causadores as bactérias *Neisseria meningitidis* (meningococo), *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo). Os sintomas, que podem ou não estar presentes, variam de acordo com a faixa etária e incluem febre, cefaleia, fotofobia, vômitos, alteração na consciência, convulsões, rash cutâneo, petéquias, prostração e rigidez na nuca. Soma-se a esse quadro clínico a alta taxa de letalidade da doença e também as sequelas pós resolução que podem levar ao comprometimento neurológico, perda de audição, amputação de membros e cicatrizes na pele (PEREIRA, 2014).

Dentre os agentes etiológicos da meningite bacteriana, *N. meningitidis* merece especial destaque, por ser a causa tanto da meningite quanto da meningococemia que é a forma generalizada da infecção. Estima-se que a ocorrência da doença meningocócica (DM) seja de 500 mil casos por ano no mundo, com cerca de 50 mil óbitos, tendo uma progressão rápida e alta letalidade que varia entre 7 a 70%. Considerada uma doença endêmica e causadora de surtos em algumas partes do mundo, inclusive no Brasil, essa patologia alcança níveis de letalidade em torno de 21,9% no país (GUEDES *et al.*, 2018; CASTIÑEIRAS; PEDRO; MARTINS, 2006).

Uma das mais importantes epidemias de meningite enfrentadas no Brasil ocorreu entre os anos de 1971 a 1974 durante a época da ditadura militar, porém, a meningite é muito mais antiga e teve os registros dos primeiros casos no país em 1906 em São Paulo, ocorrendo mais dois surtos importantes em 1923 e 1945. Durante o período da ditadura militar o Brasil vivia o auge do seu milagre econômico, e divulgar para toda população que se iniciava um surto de meningite bacteriana causada por *N. meningitidis* estava fora de questão. A demora das autoridades competentes em escutar os profissionais da saúde e tomarem as medidas cabíveis levaram a ocorrência de dois surtos simultâneos da enfermidade, começando com um surto em 1971 pelo sorogrupo C, e antes que o mesmo tivesse fim, aconteceu outro em 1974 causado pelo sorogrupo A. Essa junção de dois surtos simultâneos desencadeou uma epidemia sem precedentes que até hoje ainda tem seus números de infectados e óbitos imprecisos. Estima-se que no decorrer da epidemia a proporção era de 200 casos por 100 mil habitantes. Tal número de casos assemelhou-se ao observado em surtos no chamado “Cinturão Africano

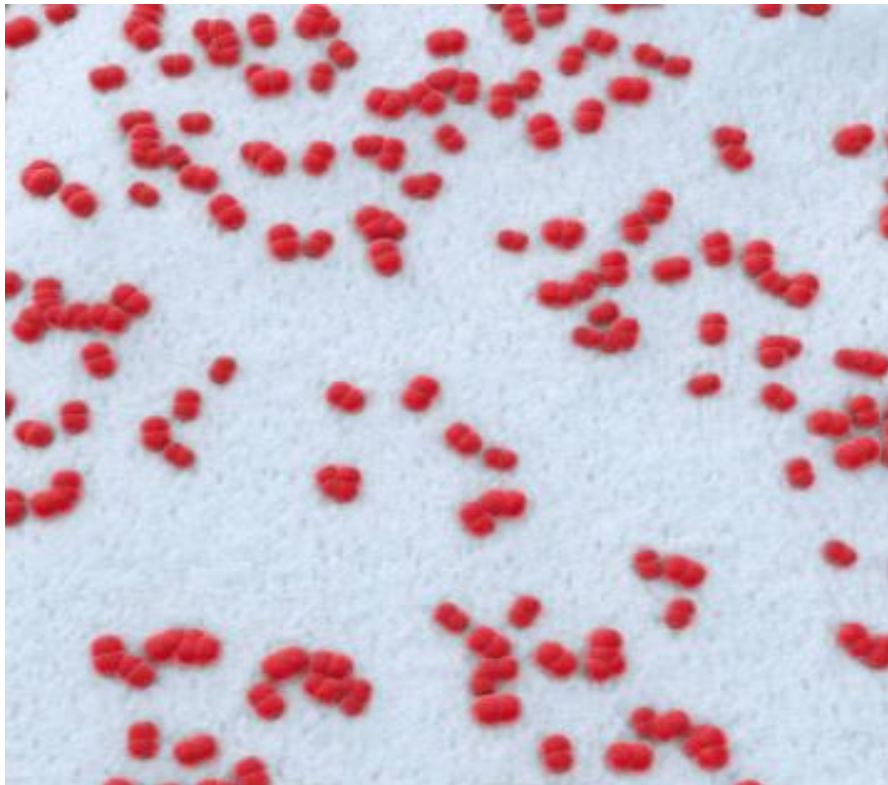
da Meningite”, área endêmica da doença que compreende 15 países e se estende do Senegal até a Etiópia (BARATA, 2000; SCHNEIDER; TAVARES; MUSSE, 2015).

Somente em 1974 com a situação completamente fora de controle e com um número registrado de 67 mil casos em apenas sete estados brasileiros foi que a verdade veio à tona e causou um grande pânico na população. A partir desse momento que medidas sanitárias de isolamento, higienização, proibição de contato e fechamento de escolas foram tomadas. Neste mesmo ano, e sem poder esconder a epidemia que tomava conta do país, foi assinado um acordo com o Instituto Pasteur Mérieux para importação de 80 milhões de doses da vacina contra meningite. Tal fato despertou no governo a necessidade de se ter laboratórios públicos para a produção de imunobiológicos em larga escala, a fim de atender a demanda interna e também poder contribuir para os vários momentos da saúde pública. Esse episódio foi um dos que contribuíram para a criação, na Fundação Oswaldo Cruz, de Bio-manguinhos e Farmanguinhos (SHUELER, 2020; BERNARDO, 2020).

1.2 O agente etiológico *Neisseria meningitidis*

Isolada e identificada pela primeira vez em 1887 por Anton Weichselbaum (1845-1920) de uma amostra de Líquido Cefalorraquidiano (LCR), *N. meningitidis*, conhecida como meningococo, é uma bactéria pertencente à família Neisseriaceae, diplococo Gram negativo, oxidase e catalase positiva, aeróbica, imóvel, fastidiosa e que apresenta uma morfologia celular com lados adjacentes convexos que lembram o formato de um “rim” ou “grão de café” (Figura 1). Seu cultivo pode ser realizado em ágar chocolate ou ágar sangue, à temperatura de 35°C em uma atmosfera entre 5% a 10% de dióxido de carbono (WEICHSELBAUM, 1887 APUD ROUPHAEL, STEPHENS, 2012).

Figura 1 – Ilustração em 3D da forma e agrupamento de centenas de microrganismos de *Neisseria meningitidis*



Fonte: (BURGSTEDT, 2018).

O meningococo faz parte exclusivamente da microbiota humana, sendo o ser humano o seu único hospedeiro natural. Esse microrganismo tem preferência por colonizar o trato respiratório superior, sendo comumente encontrado na nasofaringe. Estima-se que cerca de 8% a 25% da população humana tenha a sua nasofaringe colonizada por esses microrganismos sem apresentar sintomas da doença. Esse tipo de indivíduo é conhecido como portador assintomático e eventualmente por algum desequilíbrio patógeno-hospedeiro pode vir a desenvolver a enfermidade (FERREIRA, 2018; CARTWRIGHT *et al.*, 1987).

A prevalência do estado de portador é variável de acordo com a idade, onde nos primeiros anos de vida é considerada baixa, e atinge o pico na faixa etária entre 15 a 24 anos, chegando até a 35% de colonização em indivíduos nessa faixa. Além disso, o tempo de portador também varia, tendo períodos crônicos com duração de vários meses, intermitente com períodos intercalados de portador e não portador ou transitório onde o mesmo indivíduo só apresenta essa colonização uma vez e ela não volta a se repetir (NUNES, 2017; CARTWRIGHT *et al.*, 1987).

Estruturalmente o meningococo é composto por uma membrana interna, a citoplasmática, e outra externa, onde se encontram o pili, o lipooligossacarídeo, fosfolipídios

e as proteínas de membrana externa. Após a colonização da nasofaringe, a bactéria adere ao epitélio local e atravessa a mucosa, sobrevivendo aos mecanismos locais de defesa, graças ao importante papel dos seus fatores de virulência, entre os quais, a cápsula polissacarídica, as fimbrias e os pilis se destacam. Cada uma dessas estruturas desempenham um papel fundamental na virulência bacteriana, invasão do hospedeiro, desenvolvimento de vacinas ou identificação e classificação bacteriana (NUNES, 2017; RAMOS, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2013).

N. meningitidis pode ou não ser revestida por uma cápsula de natureza polissacarídica, que é um dos seus principais fatores de virulência. Essa estrutura auxilia na transmissão bacteriana de um hospedeiro infectado ou portador assintomático para outro, que ocorre através de gotículas de saliva ou secreção nasal via contato direto. A presença da cápsula nesse microrganismo torna o processo de invasão mais eficiente, ao diminuir a adesão às células epiteliais mediadas pelas proteínas de membrana externa e proteger o meningococo do sistema complemento por meio da desativação desse mecanismo de defesa em células hospedeiras pela presença do ácido siálico. Ademais, a cápsula polissacarídica tem influência nos eventos de colonização do hospedeiro e também na defesa bacteriana contra alguns mecanismos do sistema imunológico como a lise, fagocitose ou opsonização (PEREIRA, 2016; CARDOSO, 2014).

As variações antigênicas do polissacarídeo capsular (PSC) permitem a classificação dessa bactéria em 12 diferentes sorogrupos: A, B, C, H, I, K, L, W, X, Y, Z e E. Entretanto, apenas seis deles são frequentemente associados à doença, sendo o A, B, C, Y, W e X os responsáveis pela maioria dos surtos ocorridos. Existem vários métodos fenotípicos e genotípicos para a identificação de *N. meningitidis* tanto na sua forma isolada por meio de cultura bacteriana ou diretamente de espécime clínico. Nas últimas décadas vem merecendo um destaque especial a identificação molecular desse patógeno por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com a utilização de genes específicos tanto para a detecção a nível de espécie, como para identificação de alguns sorogrupos mais predominantes (DE FILIPPIS *et al.*, 2016; RAMOS, 2019).

A DM é a manifestação clínica da infecção por *N. meningitidis* e pode se apresentar de duas maneiras distintas: meningite ou sepse. Além disso, esses dois modos podem se manifestar de forma isolada ou concomitante. A DM é uma enfermidade de notificação compulsória e também um problema de saúde global que atinge todas as faixas etárias, porém, sua incidência é maior em crianças menores de cinco anos de idade, e em casos de surtos, a população de adultos jovens acaba sendo a mais afetada. Estima-se que a porcentagem de

letalidade da DM com o tratamento adequado fique em torno de 5% a 10%, e que mesmo com o tratamento correto há uma porcentagem de 10% a 20% dos infectados que podem apresentar sequelas pós recuperação (PEREIRA, 2016; CARDOSO, 2014; NUNES, 2017).

Atualmente existem duas linhas principais de defesa contra a DM, sendo a vacinação (dependente do sorogrupo) como forma preventiva e a antibioticoterapia como tratamento propriamente dito em casos de infecção. A antibioticoterapia deve ser iniciada assim que a suspeita de DM for confirmada, uma vez que essa doença apresenta uma letalidade elevada. A prescrição do antibiótico é feita de acordo com a idade do paciente e geralmente a droga de escolha utilizada pode ser a penicilina, ampicilina ou ceftriaxona. Além disso, também é recomendada a quimioprofilaxia para os contatos próximos dos infectados, sendo a rifampicina, ceftriaxona e ciprofloxacina recomendadas nesse caso (BRASIL, 2016; VAN DE BEEK *et al.*, 2006).

1.3 Vigilância epidemiológica dos casos de *Neisseria meningitidis*

A DM é um problema de saúde global, ocorrendo de forma esporádica ou sob a forma de surtos ou de epidemias. Apresenta taxas de incidência que variam de 1 a 1.000 casos por 100.000 indivíduos em diferentes partes do mundo. O número de casos pode variar amplamente ao longo do tempo e entre áreas geográficas, de acordo com a faixa etária e/ou sorogrupos (ROUPHAEL, STEPHENS, 2012; CRUM-CIANFLONE, SULLIVAN, 2016).

A epidemiologia da doença é dinâmica e sofre constantes mudanças de incidência, sendo também observado em relação aos sorogrupos. A DM ocorre normalmente como casos esporádicos, podendo afetar indivíduos de qualquer idade, mas apresentam as taxas de incidência mais elevadas no grupo de crianças menores de 1 ano. Contudo, picos de incidência também são observados em adolescentes e na população idosa (HALPERIN *et al.*, 2012; HARRISON *et al.*, 2011).

Os surtos de DM pelo sorogrupo C ocorrem em todo o mundo, especialmente em adolescentes e adultos jovens. O sorogrupo Y emergiu como uma causa importante de doença na América do Norte nos últimos 10 anos. Por outro lado, os sorogrupos W e X tem sido responsáveis por epidemias na África subsaariana desde 2002. Os sorogrupos atualmente associados a surtos em países industrializados são os sorogrupos B e C, que possuem maior incidência durante a infância. A incidência da DM na América do Norte, Austrália e no continente europeu é baixa, e tem como sorogrupos mais associados, os sorogrupos B, C e Y (SAFADI, BEREZIN, OSELKA, 2012; VETTER *et al.*, 2016; CAMPBELL *et al.*, 2016).

Na América Latina, a DM apresenta uma subnotificação dos casos, contendo os sorogrupos B e C como os mais associados à doença. Por outro lado, nos últimos anos, tem ocorrido um aumento do número de casos associados ao sorogrupo W, na Argentina, Chile, Uruguai e Brasil (SAFADI *et al.*, 2015; GENTILE *et al.*, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2018).

No Brasil, a DM é considerada endêmica, responsável por cerca de 22% das meningites bacterianas, com taxas de incidência que variam de 1,0-2,0 casos/100.000 habitantes por ano. No país, a epidemiologia da DM mudou ao longo do tempo. Na década de 1970, a maioria dos casos da doença foi causada pelos sorogrupos A e C, com uma incidência crescente de sorogrupo B ocorrendo em 1980 e 1990. Desde 2000, o sorogrupo C do complexo clonal ST-103 tem sido responsável pela maioria dos casos relatados e associado a surtos em todo o país (CORDEIRO *et al.*, 2018; SAFADI *et al.*, 2013).

Entre 2007 e 2009, a taxa de incidência de DM aumentou substancialmente em diferentes regiões do país, particularmente no estado da Bahia. Como resposta, o governo estadual introduziu a vacina conjugada contra *N. meningitidis* sorogrupo C para crianças < 5 anos de idade. Como a incidência continuou elevada entre os adultos jovens, houve uma ampliação do programa de vacinação para a faixa etária de 10 a 24 anos de idade. As campanhas revelaram-se altamente eficazes, reduzindo 50% da incidência de DM na população menor que 2 anos de idade no período de 2011 a 2012 (SAFADI *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2012).

1.4 O Programa Nacional de Imunização no combate à doença meningocócica

O Programa Nacional de Imunização (PNI), incluso no Sistema Único de Saúde, foi criado em 1973 como uma iniciativa do Ministério da Saúde com a finalidade de controlar, eliminar e erradicar as doenças imunopreveníveis no Brasil. Esse programa que tem a sua coordenação compartilhada entre as Secretarias Federal, Estaduais e Municipais de Saúde, é reconhecido nacional e internacionalmente, como uma das mais relevantes intervenções na história da saúde pública. O PNI desde a sua criação vem apresentando grandes vitórias, tais como: a erradicação da poliomielite, do vírus autóctone da rubéola e uma melhora significativa nas taxas de mortalidade infantil e de expectativa de vida da população brasileira (GADELHA, 2020; LIMA, PINTO, 2017).

A partir da criação do PNI várias iniciativas foram implementadas, entre elas, a ampliação da extensão vacinal a todos os municípios brasileiros (uma vez que até aquele momento as vacinas eram compradas individualmente por cada estado), a criação de

mecanismos para assegurar o suprimento gratuito de imunobiológicos e a implementação de estratégias de mobilização social que resultaram em uma substancial elevação das coberturas vacinais. Diante dessa demanda nacional por imunobiológicos, ficou ainda mais evidente a necessidade de um maior rigor pela qualidade dos soros e vacinas utilizados no país (DOMINGUES *et al.*, 2015).

O primeiro calendário nacional de vacinação foi lançado em 1977 e se manteve até 1989. Seu público alvo eram apenas crianças abaixo de 1 ano de idade e fornecia quatro tipos diferentes de vacinas: Bacilo Calmette Guerin (BCG), Vacina Oral da Poliomielite (VOP), Vacina Difteria, Tétano e Coqueluche (DTP) e a Vacina contra o Sarampo. Já entre os anos de 1990 e 2000 houve a expansão do calendário vacinal para as outras faixas etárias e o incremento de mais seis vacinas para proteção populacional. Desde então várias outras vacinas foram incluídas no PNI, inclusive a MenC no ano de 2010, totalizando um quadro de quinze vacinas para crianças, cinco para adolescentes e cinco para adultos e idosos (NÓVOA *et al.*, 2020; DOMINGUES *et al.*, 2015).

As vacinas polissacarídicas atualmente disponíveis contra meningite oferecem proteção para os sorogrupos A, C, W e Y. Tais vacinas, assim como ocorre com outras vacinas polissacarídicas não-conjugadas, não geram resposta imune adequada em crianças abaixo de 2 anos de idade em função da ausência de resposta consistente aos antígenos T independentes nessa faixa etária. Outra característica importante dessas vacinas é que, mesmo nos pacientes acima de 2 anos de idade, a proteção conferida é de duração limitada, não sendo capaz de induzir memória imunológica. Apresentam, ainda, a possibilidade de induzir hiporresponsividade em doses subsequentes. Isso faz com que essas vacinas polissacarídicas não sejam usadas de maneira rotineira, estando indicadas apenas para grupos de alto risco ou em presença de surtos ou epidemias (DANZIG, 2004).

A conjugação dos polissacarídeos às proteínas carreadoras (toxina diftérica ou o toxóide tetânico) muda a natureza da resposta antipolissacarídica para uma resposta T dependente. As células B, ao reconhecerem o polissacarídeo, processam o carreador proteico conjugado e apresentam os epítomos peptídicos às células T-CD4+. Esse complexo antigênico induz a produção de níveis elevados de anticorpos, inclusive em lactentes jovens, maior avidéz dos anticorpos e maior atividade bactericida sérica. Induzem, ainda, a formação de populações de linfócitos B de memória, de duração prolongada, propiciando uma excelente resposta em casos de reexposição. Além disso, essas vacinas têm a capacidade de reduzir a colonização da nasofaringe, diminuindo o número de portadores entre os vacinados e a

transmissão da doença na população, conferindo a população uma imunidade de rebanho (GRANOF, FEAVERS, BORROW, 2004; LESINSKI, WESTERINK, 2001).

As primeiras vacinas conjugadas, desenvolvidas na década de 1980, continham os oligossacarídeos capsulares dos meningococos A e C conjugados à toxina mutante diftérica. Os primeiros estudos com essas vacinas comprovaram a presença de boa imunogenicidade, indução de memória imunológica e aceitável perfil de segurança. Entretanto, a baixa prevalência de DM causada pelo sorogrupo A em países desenvolvidos direcionou o desenvolvimento de vacinas conjugadas meningocócicas para controlar a doença causada pelo sorogrupo C. Assim, foi desenvolvida uma vacina meningocócica monovalente conjugada contra o meningococo C contendo um polissacarídeo com um grupo acetil, conjugado à toxina mutante diftérica (Meningitec® - Laboratório Wyeth, e Menjugate® - Laboratório Chiron). Essas vacinas mostraram-se imunogênicas em lactentes, pré-escolares, crianças maiores, adolescentes e adultos (RICHMOND *et al.*, 2000).

Posteriormente, estudos de caracterização antigênica dos meningococos constataram que cerca de 12% das cepas de meningococos do sorogrupo C causadores de doença não continham em sua cápsula polissacarídica o radical O-acetil. Esse achado sugeriu a possibilidade de que a resposta imune, baseada fundamentalmente em anticorpos grupo-específicos, produzida pelas vacinas que utilizavam polissacarídeos com o radical O-acetilado pudesse ser ineficaz contra cepas sem o radical O-acetil. Foi, então, desenvolvida uma vacina que utiliza um polissacarídeo de-O-acetilado conjugado ao toxóide tetânico (Neisvac-C® - Laboratório Baxter). Essa vacina de-O-acetilada induz a produção de anticorpos direcionados contra haptenos presentes tanto nas cepas de meningococo com quanto naquelas sem o radical acetil, gerando assim, uma resposta mais abrangente e maiores títulos de anticorpos bactericidas séricos (BORROW *et al.*, 2000; SNAPE, POLLARD, 2005; SAFADI, BARROS, 2006).

O esquema de imunização de rotina atualmente licenciado no Brasil para as vacinas meningocócicas conjugadas à toxina mutante diftérica (Meningitec® e Menjugate®) é de três doses, a partir dos 2 meses de idade, com intervalo mínimo de 1 mês entre as doses e para a vacina meningocócica conjugada ao toxóide tetânico (Neisvac-C®) é de duas doses, a partir dos 2 meses, com intervalo mínimo de 2 meses entre as doses. Para crianças acima de 1 ano de idade, adolescentes e adultos, qualquer uma das vacinas deverá ser usada em dose única (SAFADI, BARROS, 2006).

1.5 A formação do polissacarídeo capsular e o gene *oatC*

Os PSC são polímeros de alto peso molecular que contêm uma unidade de repetição que pode ser um único monossacarídeo ou um oligossacarídeo com estrutura linear ou ramificada. Os PSC constituem o principal fator de virulência de muitas bactérias patogênicas que causam doenças invasivas, constituindo, portanto, parte essencial de várias vacinas contra doenças causadas por organismos encapsulados (HARRISON *et al.*, 2011).

Muitas bactérias patogênicas possuem uma cápsula polissacarídica que delimita a célula, regula o fluxo de nutrientes e a protege contra desidratação. A cápsula polissacarídica do meningococo possui a função de proteção contra mediadores do hospedeiro e fagocitose, possibilitando sua sobrevivência durante a invasão da corrente sanguínea e no ambiente intracelular da célula humana (SPINOSA *et al.*, 2007).

Os sorogrupos B, C, Y e W possuem suas cápsulas compostas por ácido siálico. O ácido siálico refere-se a uma família de nove carbonos derivados do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), encontrados em um número limitado de microrganismos patogênicos. O ácido siálico na célula hospedeira evita a ação do sistema imunológico (ROSESTEIN *et al.*, 2001; VIMR *et al.*, 2004).

Os mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese da cápsula de *N. meningitidis* foram identificados e os genes envolvidos nesse processo e na translocação para a superfície celular são agrupados em um único *locus* cromossômico denominado *cps*. Os genes necessários para a expressão capsular são constituídos por cinco regiões (A-E). A região A é responsável pela síntese do polissacarídeo, a região B participa no processo de modificação do lipídeo, a região C é responsável pelo transporte do polissacarídeo para o exterior da célula, a região D é envolvida na síntese do Lipo-oligossacarídeo (LOS) e a função da região E ainda não é bem conhecida (HARRISON *et al.*, 2011; GUDLAVALLETI *et al.*, 2007).

As mudanças na expressão ou estrutura da cápsula (por exemplo, hipo ou hiper encapsulamento, troca de cápsula, acetilação) podem influenciar os testes diagnósticos ou levar à fuga imune. A perda ou redução da regulação da cápsula também é crítica na biologia meningocócica, facilitando a fixação de meningococos, a formação de micro colônias e a colonização das mucosas humanas (STEPHENS *et al.*, 2009).

Mais de 40 tipos diferentes de modificações ocorrem naturalmente na estrutura do ácido siálico, como grupos acetil, metil, lactil, sulfato e fosfato. A acetilação influencia muitas propriedades da molécula do ácido siálico. Em alguns agentes patogênicos, a acetilação do

PSC está envolvida no reconhecimento imune (CLAUS *et al.*, 2004; GUDLAVALLETI *et al.*, 2007).

As O-acetiltransferases (*oatC*) são enzimas muito comuns em bactérias e possuem a capacidade de modificar substratos como carboidratos, aminoácidos e xenobióticos. A sua importância biológica está ligada a acetilação da cápsula e parece ser dependente de espécies ou subespécies. Tais enzimas podem ser encontradas no citosol ou associadas/integradas à membrana interna, e incluem membros de diferentes famílias de proteínas. A função da acetilação é importante, pois altera as propriedades físico-químicas do PSC, em alguns patógenos, a acetilação do PSC está envolvida no reconhecimento imunológico. Dessa forma, a acetilação parcial ou a migração dos grupos O-acetil entre diferentes hidroxilas modifica o grau de heterogenicidade dos polissacarídeos e pode influir sobre a imunogenicidade (BERGFELD *et al.*, 2009).

Em *N. meningitidis* sorogrupo C, o gene *oatC* codifica modificações no PSC devido às alterações na O-acetiltransferase do meningococo. Ao analisar a cepa 2120 (acetilada (OAc⁺), Complexo Clonal (CC) 11, uma sequência aberta de leitura (Open Reading Frame-ORF) foi encontrada próxima ao gene *siaD* e nomeada *oatC*. Através de buscas no *Genbank* e *Swiss-prot*, os autores observaram que a sequência não possuía homologia com qualquer outro gene ou proteína (CLAUS *et al.*, 2004).

Em meningococos com cápsula composta de ácido siálico, a região A do *locus cps* compreende os genes *siaA-siaD*, com o *siaC* codificando enzimas requeridas para a ativação da síntese do ácido siálico e o *siaD* codificando polisialiltransferases de diferentes sorogrupos. O gene *oatC* apresenta diversas características, entre elas é possível destacar o seu tamanho de 1.383 pb, um conteúdo A+T de 71% e de ser transcrito com o operon *sia*, responsável por participar na síntese do ácido siálico (VOGEL *et al.*, 2004).

Foi sugerido por estudos que os polissacarídeos correspondentes aos sorogrupos B e C são quimicamente e imunologicamente diferentes. O PSC do sorogrupo C pode apresentar as formas O-acetilada (OAc⁺) ou de-O-acetilada (OAc⁻), enquanto que o PSC do sorogrupo B apresenta-se apenas de-O-acetilado. Nos sorogrupos C, W e Y, o ácido siálico pode ser modificado pela acetilação. A maioria das cepas do sorogrupo C produzem um polissacarídeo OAc⁺, um homopolímero de ácido N-acetilneuramínico com grupos O-acetil nas posições C₇ ou C₈ do ácido siálico (BURRAGE, 2002; JENNINGS, *et al.*, 1977).

Em 1976, utilizando método de imunofluorescência, Apicella e Feldman concluíram que 15% das cepas do sorogrupo C circulantes nos Estados Unidos (EUA) possuíam polissacarídeo OAc⁻. Posteriormente, estudos de caracterização antigênica dos meningococos

no Reino Unido constataram que 12% das cepas sorogrupo C causadoras de doença não continham o radical O-acetil em sua cápsula polissacarídica, sendo, portanto, OAc⁻ (APICELLA, FELDMAN, 1976; BORROW *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de uma vacina contendo o polissacarídeo OAc⁻ conjugado ao toxóide tetânico (MCC-TT- Neisvac-C[®] - Laboratório Baxter) apresentou níveis de IgG duas vezes maiores e a atividade bactericida mais acentuada quando comparada a vacina MenC, que contém o PSC OAc⁺. Michon *et al.* (2000) demonstraram que a imunogenicidade dos polissacarídeos era inversamente correlacionada ao grau de acetilação: PSC OAc⁺ mostrou ser menos imunogênico quando comparado ao PSC OAc⁻. Ensaio clínicos conduzidos nas décadas de 1970 e 1980 sugeriram que o polissacarídeo OAc⁻ poderia substituir o polissacarídeo acetilado no desenvolvimento da vacina. A vacina produzida com o PSC OAc⁻ (Neisvac-C[®]) foi introduzida em 32 países. É importante ressaltar que ambas as vacinas conferem proteção contra cepas OAc⁺ ou OAc⁻ (MICHON *et al.*, 2000; FUSCO *et al.*, 2007; RICHMOND *et al.*, 2001).

1.6 Justificativa

A DM é uma enfermidade de progressão rápida e um problema de saúde global que atinge todas as faixas etárias, tendo sua incidência maior em crianças menores de 5 anos de idade, e em casos de surtos, a população de adultos jovens. Estima-se que a porcentagem de letalidade da DM com o tratamento adequado fique em torno de 5% a 10%, e que mesmo com o tratamento correto há uma porcentagem de 10% a 20% dos infectados que podem apresentar sequelas pós recuperação. Atualmente já existem vacinas baseadas no PSC e conjugadas com toxoide tetânico que são utilizadas de modo preventivo para evitar os surtos e epidemias da DM, porém, a atividade bactericida do polissacarídeo OAc⁻ foi maior quando comparada ao PSC acetilado nas posições C₇ e C₈, sendo o último, dez vezes maior quando comparado ao PSC acetilado no C₇ (FUSCO *et al.*, 2007). A vacina produzida a partir do PSC OAc⁻ induz a produção de anticorpos direcionados contra haptenos presentes tanto nas cepas de meningococo com e sem o radical O-acetil, gerando, assim, uma resposta mais abrangente e maiores títulos de anticorpos bactericidas (SNAPE, POLLARD, 2005). Tais evidências sugerem que vacinas produzidas com o PSC OAc⁻ podem garantir maior imunogenicidade quando comparadas à vacina contendo o PSC OAc⁺.

De acordo com o estudo (Michon *et al.*, 2000), o estado de acetilação do PSC, tem influência direta na imunogenicidade de vacinas preparadas a partir de cepas OAc⁺ ou OAc⁻.

A definição da porcentagem de cepas de *N. meningitidis* C O-acetiladas circulantes no país, poderá contribuir para determinar a melhor estratégia a se seguir para uma imunização mais eficiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a evolução do gene *oatC* responsável pela acetilação do polissacarídeo capsular em amostras de *N. meningitidis* sorogrupo C dos isoladas no Brasil no período de 1991 a 2019.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a frequência de meningococos sorogrupo C O-acetilados e de-O-acetilados entre as cepas depositadas na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária – CBRVS do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde no período de 1991 a 2019;
- Relacionar o tipo de PSC com genótipo;
- Avaliar o benefício da utilização de uma vacina produzida a partir de cepa de-O-acetilada no Brasil.

3 METODOLOGIA

Para a realização desse trabalho as cepas vacinais do sorogrupo C contendo o polissacarídeo O-acetilado (denominada C11), que foi cedida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz, e de-O-acetilado (denominada M99), cedida pelo *Public Health Laboratory*, Manchester, Inglaterra, serviram como referência em todas as análises deste estudo. Essas cepas de referência foram depositadas na CBRVS e identificadas como P4344 e P4400, respectivamente.

Foram selecionadas 324 cepas de *Neisseria meningitidis* da CBRVS isoladas de pacientes com DM. As ampolas liofilizadas foram abertas e hidratadas em *Trypticase Soy Broth* (TSB) ou caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e cultivadas em meio de cultura em base ágar Columbia com 5% de sangue equino lisado (ágar chocolate) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Após o crescimento das colônias, as mesmas foram avaliadas quanto as suas características morfológicas (diplococos Gram-negativos) através do método de coloração de Gram.

A extração do DNA genômico foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®) de acordo com o protocolo para Gram-negativos do próprio fabricante. A integridade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,7% por meio do digitalizador de imagens ImageQuant 300 (GE). O DNA das amostras foi quantificado pelo Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific. Diluições foram realizadas para uma concentração de uso de 50 ng/μL de DNA. A confirmação da espécie foi realizada por *nspA*-PCR, e a confirmação dos sorogrupos foi realizada por *siaD*-PCR (BORROW *et al.*, 2000). Para o desenvolvimento deste estudo, as cepas selecionadas foram caracterizadas por metodologia molecular com a utilização da PCR convencional. A reação de PCR foi realizada com volume total de 25 μL, contendo 5 μL de DNA (40-50 ng/μL), 12,5 μL de mastermix universal GoTaq® (Promega), 1 μL (50 pmol/μL) de cada iniciador e 5,5 μL de água.

Para a confirmação da espécie utilizou-se a *nspA*-PCR para amplificação do gene *nspA* por meio dos iniciadores *nspA1*: 5'-AGCACTTGCCCACTGATTG-3' e *nspA2*: 5'-GGAACGGACGTTTTTGACAG-3', com tamanho de 480 pares de base (pb). Destas 324 cepas, 48 ainda não tinham seu sorogrupo conhecido, sendo caracterizadas neste estudo como sorogrupo C por meio da *siaD*-PCR com a utilização dos iniciadores *siaDcF*: 5'-TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3' e *siaDcR*: 5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3', com tamanho de 250pb. Após essa identificação apenas 12 cepas foram confirmadas como sorogrupo C, perfazendo um total de 288 cepas.

Após uma análise desse grupo, foram retiradas cepas que já haviam tido o seu PSC classificado em outro estudo, totalizando 127 amostras para serem caracterizadas neste estudo.

O gene *oatC* foi analisado por meio do sequenciamento de uma região de 1.383 pb. Para tal, o gene foi amplificado por meio dos iniciadores HC51: 5'-ATGTCAATCAATACGTTTG-3' e HC381: 5' CGCATATCAGGATTGGAATAG-3 que foram utilizados para amplificação dessa região (BORROW *et al.*, 2000).

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com kit FastAP Thermosensitive Alkaline, fornecido pela Thermofisher Scientific (QIAGEN). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando 1 µL de Big Dye® Terminator (Applied Biosystems) para marcação dos nucleotídeos, 1 µL do iniciador HC51: 5'-ATGTCAATCAATACGTTTG-3', 1,5 µL *Sequencing Buffer* e 6,5 µL da amostra, com um volume total de 10 µL por reação. As etapas de precipitação foram realizadas com a adição de 30 µL e 50 µL, respectivamente, de soluções de isopropanol a 75% e etanol a 75% previamente preparadas. O sequenciamento dos genes foi realizado em colaboração com a Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ, no sequenciador automático ABI PRISM 3730.

Os dados brutos contendo as sequências recebidas da Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ foram traduzidos para proteínas por meio da utilização da ferramenta de bioinformática EMBOSS Transeq, disponível na plataforma *European Bioinformatics Institute* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/). O alinhamento das sequências traduzidas das cepas de referência (OAc- e OAc+) com as cepas clínicas foi realizado utilizando o *software* BioEdit, versão 7.0, desenvolvedor Tom Hall, para a distinção entre as sequências das cepas com polissacarídeos O-acetilado e de-O-acetilado. A confecção da árvore filogenética foi feita por meio do *software SplitsTree* versão 5.0.

Os dados da análise das cepas por MLST foram obtidos a partir de outro estudo do grupo de pesquisa de meningites realizado no Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ (AZEVEDO *et al.*, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a seleção e definição das cepas que seriam utilizadas no estudo foi realizada a abertura das ampolas com o posterior crescimento dos microrganismos para avaliação das colônias quanto às suas características morfológicas. Para confirmação da espécie utilizou-se a *nspA*-PCR, seguido da *siaD*-PCR para confirmação do sorogrupo C, que foi o de interesse neste estudo.

As 127 cepas utilizadas são provenientes dos estados da Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo, Ceará e Santa Catarina, distribuídas entre eles conforme demonstrado na tabela 1. Segundo os dados atualizados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil (DATASUS), no período de 2007 a 2020, houve 8.805 mil casos confirmados do sorogrupo C, seguido pelo B com 2.648, W135 com 814, Y com 261 e A com 46 casos, sendo os estados mais afetados São Paulo, Bahia e Minas Gerais.

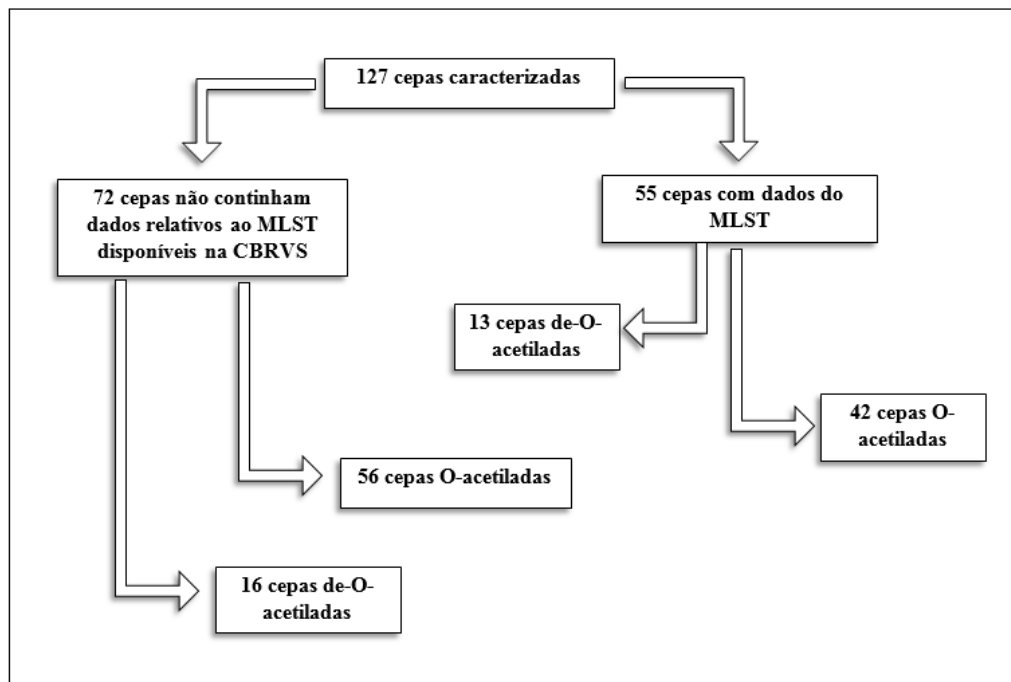
Tabela 1 – Distribuição de 127 cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C, isoladas no Brasil entre 1991 e 2019, de acordo com o estado de origem

Estado	Número de cepas
Bahia	54
Pernambuco	51
Rio de Janeiro	11
São Paulo	3
Ceará	3
Santa Catarina	2
Desconhecido	3
Total	127

Fonte: (Do autor, 2021).

Das 127 cepas estudadas, 55 continham informações a respeito das análises realizadas por MLST. Destas 55 cepas, 13 (23,6%) foram caracterizadas como de-O-acetiladas e 42 (76,4%) como O-acetiladas. Para as outras 72 cepas, não haviam dados relativos ao MLST, sendo classificadas somente em O-acetiladas 56 (78%) e de-O-acetiladas 16 (22%) (Figura 2).

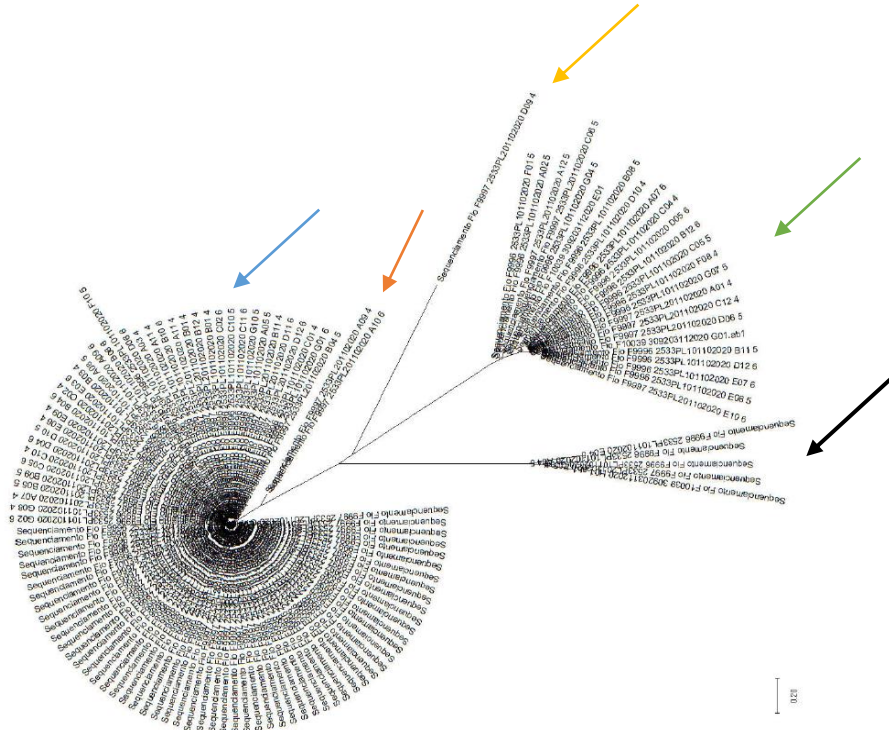
Figura 2 – Separação das cepas entre as que contêm ou não informações relativas ao MLST disponíveis na CBRVS e suas classificações em O-acetiladas e de-O-acetiladas



Fonte: (Do autor, 2021).

A avaliação inicial das cepas estudadas revelou uma porcentagem de 77,2% de microrganismos O-acetilados e 22,8% de-O-acetilados, demonstrando uma taxa acima da encontrada nos Estados Unidos e Reino Unido, que apresentaram respectivamente, 15% e 12%, para a ocorrência de cepas de-O-acetilados (BORROW *et al.*, 2000). Na figura 3 está representada uma árvore filogenética radial onde as proteínas OatC das 127 cepas estudadas foram comparadas com as cepas de referência O-acetilada (4344) e de-O-acetilada (4400). Dessa forma fica claro o agrupamento dos dois tipos de PSC onde a seta azul e laranja indicam as cepas O-acetiladas e as setas amarela, verde e preta indicam as de-O-acetiladas. As modificações encontradas na *OatC* das cepas indicadas pela seta amarela e preta foram diferentes das encontradas no grande grupo marcado pela seta verde, mas suficientes para classificar essas cepas em de-O-acetiladas.

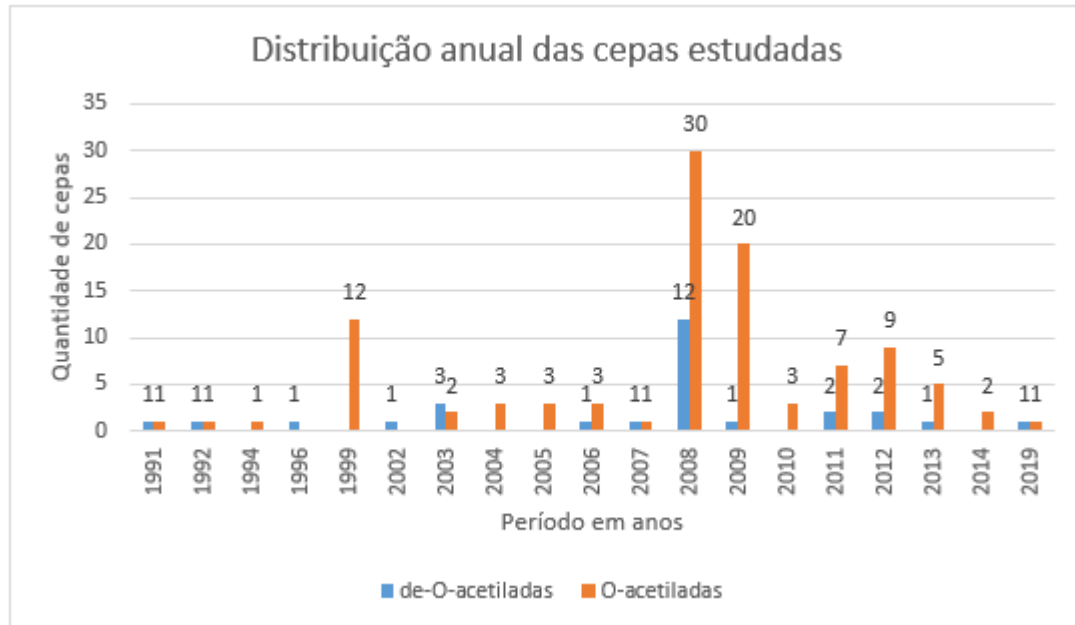
Figura 3 – Árvore filogenética baseada na caracterização do gene *oatC* e divisão das cepas em grupos com características O-acetiladas (seta azul e laranja) e de-O-acetiladas (seta amarela, verde e preta)



Fonte: (Do autor, 2021).

Em relação ao período de tempo avaliado neste estudo, a cepa de-O-acetilada mais antiga data de 1991, e a distribuição por período de tempo da frequência das cepas de-O-acetiladas e O-acetiladas é demonstrada na figura abaixo (Figura 4):

Figura 4 – Comparação e distribuição entre os anos de 1991 a 2019 das 127 cepas estudadas de acordo com o ano de depósito na CBRVS e sua classificação em de-O-acetiladas e O-acetiladas



Fonte: (Do autor, 2021).

Por meio da figura 4 é possível notar a distribuição temporal das cepas caracterizadas neste estudo. É importante demonstrar que nos anos de 2008 e 2009 houve um maior número de cepas recebidas, o que pode ser decorrente do surto que aconteceu no estado da Bahia nesse período, já que a maioria das amostras desse ano foi proveniente deste estado. Ainda no período de 2008 a proporção entre o número de amostras de-O-acetiladas correspondeu a 28,5% desse total, demonstrando uma alta circulação de microrganismos com essa característica entre as cepas estudadas. Um estudo realizado em 2013 (SARDINHA *et al.*, 2013) relatou que a circulação do CC103 no Brasil iniciou em 2006. Nosso estudo mostra que 37% das cepas do CC103 são de-O-acetiladas, enquanto para outros CC essa proporção é mais baixa. Esse dado pode sugerir uma associação do CC103 às cepas de-O-acetiladas. No entanto a proporção de cepas de-O-acetiladas no período anterior a circulação do CC103 (1991-2005) é similar ao período seguinte quando o CC103 começou a circular no país. Dessa forma, é possível que a proporção de cepas do sorogrupo C com PSC de-O-acetilado tenha uma distribuição homogênea entre todos os CC. Esses dados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição das 127 cepas estudadas de acordo com o Complexo Clonal e sua caracterização em de-O-acetiladas e O-acetiladas

Complexo Clonal	de-O-acetilada	O-acetilada	Total de cepas
CC-103	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8
CC-11	2 (28,5%)	5 (71,5%)	7
CC-8	1 (25%)	3 (75%)	4
CC-35	-	2	2
CC-32	-	2	2
CC-41/44	-	1	1
CC-269	-	1	1
Não agrupadas em CC	7 (23%)	23 (77%)	30
Não avaliadas por MLST	16 (22%)	56 (78%)	72
Total	29 (23%)	98 (77%)	127

Fonte: (Do autor, 2021).

5 CONCLUSÃO

- A circulação de cepas de *N. meningitidis* do sorogrupo C de-O-acetiladas estudadas é de 23% do total do sorogrupo que corresponde a um aumento de mais de 50% da média de cepas encontradas nos únicos países onde este estudo já foi realizado, Reino Unido e EUA onde a média foi de 13,5%.
- Não há uma associação clara de cepas de-O-acetiladas com CC. No entanto, por circular mais na população brasileira, o CC103 sugere apresentar uma maior incidência de cepas de-O-acetiladas.
- No Brasil a circulação de cepas do sorogrupo C de-O-acetiladas é 1,5 vezes maior do que em outros países. Dessa forma, a introdução de uma vacina do sorogrupo C conjugada produzida a partir de cepas de-O-acetiladas poderia trazer benefícios para a população sensível.

REFERÊNCIAS

- APICELLA, M. A.; FELDMAN, H. A. Meningococcal group C subgroup determinant detected by immunofluorescence. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 152, p. 289-91, 1976.
- AZEVEDO, A. C.; FRANCO, N. E. C.; ROCHA, M. R. C.; ANDRADE, C.; TORRES, M. C.; DE FILIPPIS, I. Molecular surveillance of brazilian meningococcal isolates serogroup c in the pre and post-men-c-vaccination period: Emergence of ST-3780. **Infect. Genet. Evol.**, v. 78, 2020.
- BARATA, R. B. Cem anos de endemias e epidemias. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 333-345, 2000. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232000000200008 Acesso em: 15 jan. 2021.
- BERGFELD, A. K.; CLAUS, H.; LORENZEN, N. K.; SPIELMANN, F.; VOGEL, U.; MÜHLENHOFF, M. The polysialic acid-specific O-acetyltransferase OatC from *Neisseria meningitidis* serogroup C evolved apart from other bacterial sialate O-acetyltransferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 1, p. 6-16, 2009.
- BERNARDO, A. Escolas fechadas, hospitais lotados, eventos cancelados e dados censurados: o Brasil da meningite de 1974. **BBC News Brasil**, Rio de Janeiro, 28 mar. 2020. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-52058352> Acesso em: 15 jan. 2021.
- BERTUCCI-MARTINS, L. M. Memória que educa: Epidemias do final do século XIX e início do XX. **Educação revista**, Curitiba, n. 25, p. 75-89, jun. 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-40602005000100006 Acesso em: 15 jan. 2021.
- BORROW, R.; LONGWORTH, E.; GRAY, S. J.; KACZMARSKI, E. B. Prevalence of de-O-acetylated serogroup C meningococci before the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 189-91, 2000.
- BRANCO, R. G.; AMORETTI, C. F.; TASKER, R. C. Doença meningocócica e meningite. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. 46 - 53, mai. 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572007000300006&script=sci_arttext&tlng=pt Acesso em: 15 jan. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de **Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços**. Guia de Vigilância em Saúde: [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 773 p. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/25/GVS-online.pdf> Acesso em: 21 mar. 2021.

BURGSTEDT. **Ilustração 3d de centenas de patógenos da meningite chamados meningococcus**. 4 ago. 2018. 1 fotografia. Disponível em: <https://br.depositphotos.com/stock-photos/neisseria.html?filter=all>. Acesso em: 21 mar. 2021.

BURRAGE, M. *et al.* Effect of vaccination with carrier protein on response to meningococcal C conjugate vaccines and value of different immunoassays as predictors of protection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4946-54, 2002.

CALIL, G. G. A negação da pandemia: reflexões sobre a estratégia bolsonarista. **Serv. Soc. Soc.**, n. 140, p. 30-47, 2021. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-66282021000100030&lng=en&nrm=iso Acesso em: 21 mar. 2021.

CAMPBELL, H. *et al.* Presentation with gastrointestinal symptoms and high case fatality associated with group W meningococcal disease (MenW) in teenagers, England, July 2015 to January 2016. **Euro. Surveill.**, v. 21, n. 12, 2016.

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

CARDOSO, C. W. **Efetividade da vacina meningocócica C conjugada e caracterização da *Neisseria meningitidis* em Salvador, Bahia**. 2014. 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2014.

CARTWRIGHT, K. A.; STUART, J. M.; JONES, D. M.; NOAH, N. D. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. **Epidemiol Infect.**, v. 99, n. 3, p. 591 – 601, 1987.

CARVALHO, I. T de. **Microbiologia Básica**. 1.ed. Recife: EDUFRPE, 2010.

CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; PEDRO, L. G. F.; MARTINS, F. S. V. Doença meningocócica. **Centro de Informação em saúde para Viajantes – Cives**, Rio de Janeiro, out. 2006. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/dm/dm-iv.html#:~:text=Estima%2Dse%20a%20ocorr%C3%Aancia%20de,uma%20letalidade%20de%20at%C3%A9%2040%25>. Acesso em: 15 jan. 2021.

CLAUS, H. *et al.* Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 227-39, 2004.

CORDEIRO, S. M. *et al.* Dissemination of the ST-103 clonal complex serogroup C meningococci in Salvador, Brazil. **Microbes Infect**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2018.

CRUM-CIANFLONE, N.; SULLIVAN, E. Meningococcal Vaccinations. **Infect. Dis. Ther.**, v. 5, n. 2, p. 89-112, jun. 2016.

DANZIG, L. Meningococcal vaccines. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 23, n. 12, p. 285 – 92, 2004.

DE FILIPPIS, I. *et al.* Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical

samples. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 20, n. 4, p. 335-341, 2016. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702016000400335. Acesso em: 22 jan. 2021.

DIAS, I. da S. A **História do surgimento da Microbiologia**: fatos marcantes. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 13 jul. 2016. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/pt/destaques/novidades-sobre-a-micro/384-a-historia-do-surgimento-da-microbiologia-fatos-marcantes> Acesso em: 15 jan. 2021.

DOMINGUES, C. M. A. S. *et al.* Programa Nacional de Imunização: a política de introdução de novas vacinas. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v. 6, n. 4, p. 3250-74, out. 2015. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5560379>. Acesso em: 15 jan. 2021.

FERREIRA, I. E. **Identificação de *Neisseria meningitidis* em portadores assintomáticos através da técnica de PCR em tempo real**. 2018. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

FORTES, P. A. C.; RIBEIRO, H. Saúde Global em tempos de globalização. **Revista Saúde e Sociedade**, v. 23, n. 2, p. 366-375, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/sausoc/v23n2/0104-1290-sausoc-23-2-0366.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2021.

FUSCO, P. C. *et al.* Protective meningococcal capsular polysaccharide epitopes and the role of O acetylation **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 577-84, 2007.

GADELHA, C. A. G. Programa Nacional de Imunizações: o desafio do acesso universal no século XXI. **Rev. Ciênc. Saúde coletiva**, v. 25, n. 11, nov. 2020. Disponível em: <https://www.scielosp.org/article/csc/2020.v25n11/4234-4234/pt/> Acesso em: 15 jan. 2021.

GENTILE, A. *et al.* Meningococcal disease in children in argentina a 3-year active sentinel hospital surveillance study. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 36, n. 3, p. 296-300, mar. 2017.

GRANOFF, D. M.; FEAVERS, I. M.; BORROW, R. Meningococcal vaccines. *In*: PLOTKIN, S.; ORENSTEIN, W.A. (ed.). **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2004.

GUDLAVALLETI, S. K. *et al.* Comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p.7972-80, nov. 2007.

GUEDES, J. C. *et al.* Doença meningocócica: situação epidemiológica atual no Brasil. **Revista de Pediatria SOPERJ**, v. 18, n. 2, p. 24-27, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.31365/issn.2595-1769.v18i2p24-27>. Acesso em: 15 jan. 2021.

HALPERIN, S. A. *et al.* The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 30 Suppl 2, p. 26-36, maio 2012.

HARRISON, L. H. *et al.* The Global Meningococcal Initiative: recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 29, n. 18, p. 3363-3371, abr. 2011.

JENNINGS, H. J. *et al.* Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Infectious Disease.**, v. 136, n. Suppl., p. 78-83, 1977.

LESINSKI, G. B.; WESTERINK, M. A. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. **J Microbiol Methods.**, v. 47, n. 2, p. 135-49, 2001.

LIMA, A. A.; PINTO, E. S. O contexto histórico da implantação do Programa Nacional de Imunização (PNI) e sua importância para o Sistema Único de Saúde (SUS). **Scire Salutis**, v. 7, n. 1, out 2017. Disponível em: <http://sustenere.co/index.php/sciresalutis/article/view/SPC2236-9600.2017.001.0005/1008>. Acesso em: 15 jan. 2021.

MICHON, F. *et al.* Structure activity studies on group C meningococcal polysaccharide protein conjugate vaccines: effect of *O*-acetylation on the nature of the protective epitope. **Developmental Biology**, v. 103, p. 151–160, 2000.

NÓVOA, T. A. *et al.* Cobertura vacinal do programa nacional de imunizações (PNI). **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 7863 – 7873, ago. 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/12969/10902> Acesso em: 15 2021.

NUNES, A. M. P. B. **Colonização por *Neisseria meningitidis* entre adolescentes após introdução da vacina meningocócica C conjugada em Salvador Brasil.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2017.

PEREIRA, D. N. **Meningites Bacterianas.** 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

PEREIRA, D. da S. G. **Avaliação da combinação de vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em desenvolvimento no Brasil.** 2016. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Doenças Infecciosas e parasitárias) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

RAMOS, C. B. ***Neisseria meningitidis* – características e epidemiologia da doença meningocócica.** 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

REZENDE, J. M. **À sombra do plátano: crônicas de história da medicina.** São Paulo: Editora Unifesp, 2009.

RICHMOND, P. *et al.* Meningococcal C polysaccharide vaccine induces immunologic hyporesponsiveness in adults that is overcome by meningococcal C conjugate vaccine. **J Infect Dis.**, v. 181, n. 2, p. 761-4, 2000.

- RICHMOND, P. *et al.* Evaluation of de-O-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: reactogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against O-acetylated and de-O-acetylated serogroup C strains. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2378-82, abr. 2001.
- RODRÍGUEZ, M. *et al.* Características epidemiológicas y microbiológicas em casos confirmados de enfermedad meningocócica en Cuba, 1998-2007. **Vaccimonitor**, v. 22, n. 2, p. 1-8, ago. 2013.
- ROSENSTEIN, N. E. *et al.* Meningococcal disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 18, p. 1378-88, 2001.
- ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology. **Methods Mol. Biol.**, v. 799, p. 1-20, 2012.
- SAFADI, M. A. P.; BARROS, A. P. Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 3, p. 35-44, jul. 2006. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572006000400005 Acesso em: 15 jan. 2021.
- SAFADI, M. A. P.; BEREZIN, E. N.; OSELKA, G. W. A critical appraisal of the recommendations for the use of meningococcal conjugate vaccines. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 195-202, 2012.
- SAFADI, M. A. P. *et al.* The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945-2010: an unpredictable and changing landscape. **Epidemiol Infect**, v. 141, n. 3, p. 447-458, 2013.
- SAFADI, M. A. P. *et al.* The current situation of meningococcal disease in Latin America and updated Global Meningococcal Initiative (GMI) recommendations. **Vaccine**, v. 33, n. 48, p. 6529-6536, 2015.
- SARDINHA, G. *et al.* Replacement of Neisseria meningitidis C cc11/ET-15 variant by a cc103 hypervirulent clone, Brazil 2005-2011. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 76, n. 4, p. 524-5, 2013. Disponível em: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.008. Acesso em: 4 fev. 2021.
- SILVA, R. O da S. *et al.* Meningite Bacterianas. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva**, v. 2, n. 3, p. 40-52, 2017.
- SCHNEIDER, C.; TAVARES, M.; MUSSE, C. O retrato da epidemia de meningite em 1971 e 1974 nos jornais O Globo e Folha de S. Paulo. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 9, n. 4, p. 1-13, out. 2015. Disponível em: <https://www.reciis.icict.fiocruz.br/index.php/reciis/article/view/995>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- SCHUELER, P. Criação de Bio-Manguinhos, uma resposta à epidemia de meningite de 1974. **Notícias e Artigos Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 13 abr. 2020. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1773-criacao-de-bio-manguinhos-uma-resposta-a-epidemia-de-meningite-de-1974>. Acesso em: 15 jan. 2021.

SNAPE, M. D.; POLLARD, A. J. Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Lancet Infect Dis.**, v. 5, n. 1, p. 21 – 30, 2005.

SPINOSA, M. R. *et al.* The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. **Infection and immunity.**, v. 75, n.7, p. 3594-603, 2007.

STEPHENS, D. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 27, n. 2, p. 71-7, 2009.

UJVARI, S. C. A história da disseminação dos microrganismos. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 171-182, 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-40142008000300011&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 15 jan. 2021.

VAN DE BEEK, D. *et al.* Community-acquired bacterial meningitis in adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 1, p. 44-53, 2006. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra052116> Acesso em: 15 jan. 2021.

VETTER, V. *et al.* Routinely vaccinating adolescents against meningococcus: targeting transmission & disease. **Expert Rev. Vaccines**, v. 15, n. 5, p. 641-658, maio 2016.

VIMR, E. R.; KALIVODA, K. A.; DESZO, E. L.; STEENBERGEN, S. M. Diversity of microbial sialic acid metabolism. **Microbiol. Molecular Biology Reviews**, v. 68, n.1, p. 132-53, 2004.

VOGEL, U. *et al.* Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cnl). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2898-901, 2004.