

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

Guilherme Gonçalves Sardinha

**DETECÇÃO DE COMPLEXOS CLONAIIS HIPERVIRULENTOS DE
MENINGOCOCOS POR PCR EM TEMPO REAL**

Rio de Janeiro

2013

Guilherme Gonçalves Sardinha

**DETECÇÃO DE COMPLEXOS CLONAIIS HIPERVIRULENTOS DE
MENINGOCOCOS POR PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Sardinha, Guilherme Gonçalves

Detecção de complexos clonais hipervirulentos de meningococos por PCR em tempo real/ Guilherme Gonçalves Sardinha. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

115 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

1. Neisseria meningitidis. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Vigilância Sanitária.
I.Título.

TÍTULO EM INGLES

Guilherme Gonçalves Sardinha

**DETECÇÃO DE COMPLEXOS CLONAIIS HIPERVIRULENTOS DE
MENINGOCOCOS POR PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dra. Lúcia Martins Teixeira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Maria Regina Branquinho
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sílvio e Angélica que me deram toda a educação para que eu pudesse chegar até essa conquista. A minha namorada Maryna, por me apoiar em todos os momentos difíceis. Aos meus irmãos Bianca e Wagner por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador e amigo Ivano, por todos os ensinamentos e por me aceitar em 2009 como aluno de IC.

À Dra. Maysa, por todas as dicas ao longo desses anos e por, gentilmente e pacientemente, revisar esta dissertação

À Cátia, Cláudia, Carlos, Jandira e todos os colegas do Laboratório de Microorganismos de Referências do Depto. de Microbiologia pelo excelente convívio e amizade.

Ao Dr. Eugênio, Jaciara e Nathalia do Setor de Vacinas contra Hib do Depto. de Microbiologia pela aprendizagem em conjunto e amizade.

À Dra. Maria Regina Branquinho por compartilhar seus conhecimentos e o equipamento para uma nova empreitada para mim que seria a PCR em Tempo Real.

Ao Professor Sérgio Alves por me ajudar com seus conhecimentos em estatística.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde por ter me proporcionado a oportunidade de realizar estágio e pós-graduação.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A doença meningocócica (DM) é uma enfermidade aguda, grave, de evolução rápida com taxas de mortalidade de 15 a 20% e que atinge principalmente as faixas etárias mais jovens, considerada um grave problema de saúde pública mesmo em países desenvolvidos. A DM está associada à colonização da nasofaringe de humanos, único hospedeiro, por uma bactéria Gram negativa, *Neisseria meningitidis*. O método considerado “padrão ouro” para a tipificação molecular da *Neisseria meningitidis* é o MLST, que consiste no sequenciamento de 7 genes “*Housekeeping*”, o MLST é uma técnica complexa que exige uma demanda de custo e tempo, tornando-se inviável sua implementação em laboratórios públicos que recebem amostras de Nm, uma estratégia que poderá contornar este obstáculo seria a PCR em tempo real que com poucas reações e em poucos dias fornecerá o perfil de MLST de isolados com alta porcentagem de confiabilidade. O objetivo do estudo é detectar os complexos clonais do MLST causadores dos grandes surtos de DM através de sondas específicas pela PCR em Tempo Real Qualitativa. A análise pelo MLST de 98 isolados estudados caracterizou todos os 15 isolados do sorogrupo B como integrantes do complexo clonal ST-32/ET-5 além de outras 11 cepas do sorogrupo C. O ST-103 foi o complexo clonal predominante entre as cepas do sorogrupo C com 43 isolados, outros STs foram encontrados para o sorogrupo C, ST-11 (n=11), ST-41/44 (n=2), ST-8/4A (n=9), ST-35 (n=1), ST-269 (n=1) e outros 5 isolados não foram associados a nenhum complexo clonal. A análise pela PCR em Tempo Real forneceu dados importantes como a caracterização de grande número dos isolados com 100% de certeza e de outros isolados com probabilidade acima de 75%. A PCR em Tempo Real qualitativa mostrou ser uma ferramenta rápida e sensível no auxílio a estudos epidemiológicos para controle de surtos regionais quando há a necessidade de ações rápidas por parte das autoridades de saúde pública.

ABSTRACT

Meningococcal disease (MD) is an acute illness, severe, rapidly evolving with mortality rates of 15 to 20% and that primarily affects younger age groups, considered a serious public health problem in developed countries. DM is associated with colonization of the nasopharynx of human host by Gram negative bacteria, *Neisseria meningitidis* (Nm). The method considered the "gold standard" for molecular typing of *Neisseria meningitidis* is the MLST, which consists in sequencing of 7 genes "*Housekeeping*", the MLST is a complex technique that requires a time and cost consuming, making it impractical implementation in public laboratories that receive Nm samples, a strategy that could circumvent this obstacle would be the real-time PCR with few reactions in a few days could provide the MLST profile of isolates with a high percentage of reliability. The objective in this study is to detect the MLST clonal complexes causing major outbreaks of DM through specific probes for Real Time PCR Qualitative method. The analysis by MLST of 98 isolates studied featured all 15 isolates of serogroup B as clonal complex ST-32/ET-5 plus 11 other strains of serogroup C. The ST-103 was the predominant clonal complex among strains of serogroup C isolates with 43. Others STs were found for serogroup C, ST-11 (n=11), ST-41/44 (n=2), ST-8/4A (n=9), ST-35 (n=1), ST-269 (n=1) and other five isolates were not associated with any clonal complex. The analysis by Real Time PCR provided important data such as the characterization of large numbers of isolates with 100% certainty and other isolates with probability above 75%. The Real-Time PCR using the qualitative method proved to be a highly useful tool to aid in rapid and epidemiological studies for outbreak control is necessary when regional rapid actions of public health authorities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Alinhamento dos alelos do gene <i>aroE</i> do cc ST-103 em ordem de frequência, realizado no Bioedit.....	28
Figura 2: Distribuição dos complexos clonais entre as cepas para os sorogrupos B e C	32
Figura 3: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas do gene <i>adh aroE pdhC pgm</i>	39
Figura 4: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas do gene <i>aroE gdh pdhC pgm</i>	40
Figura 5: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas do gene <i>abcZ fumC pdhC pgm</i>	41
Figura 6: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas do gene <i>adh gdh e pdhC</i>	42
Figura 7: Teste dos iniciadores na concentração de 3µM e sondas a 1µM.	43
Figura 8: Threshold e ΔR_n utilizando o kit <i>JumpStarttmTaq ReadyMixtm</i>	44
Figura 9: Threshold e ΔR_n utilizando o kit <i>Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)</i>	45
Figura 10: Número de cepas e probabilidade de caracterização do cc para as cepas do ST-103.	51
Figura 11: Número de cepas e probabilidade de caracterização do cc para as cepas do ST-32, ST-11 e ST-41	51
Figura 12: Esquema de um dos alelos do gene <i>abcZ</i> do MLST de <i>N. meningitidis</i> , apresentando a posição e o número dos sítios polimórficos conhecidos.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de iniciadores e sondas utilizados.....	30
Tabela 2	Perfil alélico do ST central dos principais cc e distribuição dos cc entre os sorogrupos no Brasil e no mundo.....	34
Tabela 3	Distribuição dos complexos clonais entre os sorogrupos B e C no Brasil e no mundo.....	35
Tabela 4	Sorogrupo, ano de isolamento e cc das cepas estudadas.....	36
Tabela 5	Genes utilizados para análise por PCR em tempo real e porcentagem de frequência dos alelos centrais.....	38
Tabela 6	Probabilidade de determinação do cc ST-32 a partir da detecção das sondas.....	46
Tabela 7	Probabilidade de determinação do cc ST-103 a partir da detecção das sondas.....	47
Tabela 8	Probabilidade de determinação do cc ST-11 a partir da detecção das sondas.....	47
Tabela 9	Probabilidade de determinação do cc ST-41 a partir da detecção das sondas.....	48
Tabela 10	Resultados da eficiência da detecção dos alelos pela PCR em tempo real e comparação com o MLST.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>abcZ</i>	<i>Putative ABC transporter</i>
<i>adk</i>	<i>Adenylate kinase</i>
<i>aroE</i>	<i>Shikimate dehydrogenase</i>
cc	Complexo clonal
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
DM	Doença meningocócica
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>fumC</i>	<i>Fumarate hydratase</i>
EMGM	<i>European Meningococcal Disease Society</i>
ET	<i>Electrophoretic Type</i> (Tipo eletroforético)
<i>gdh</i>	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
HRM	<i>High resolution Melt</i>
LACEN	Laboratório Central
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LMR	Laboratório de microorganismos de referência
LOS	Lipooligossacarídeo
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
Nm	<i>Neisseria meningitidis</i>
ng	Nanogramas

OMP	<i>Outer Membrane Proteins</i> (Proteínas de membrana externa)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMV	<i>Outer Membrane Vesicles</i> (Vesículas de membrana externa)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>pdhC</i>	<i>Pyruvate dehydrogenase subunit</i>
<i>pgm</i>	<i>Phosphoglucomutase</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ST	<i>Sequence type</i> (Tipo sequencial)
T _m	<i>Temperature melting</i>
TSB	Caldo Triptona de soja
μM	Micromolar
μL	Microlitro
VR	<i>Variable region</i> (Região Variável)
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	13
1.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA	14
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.4 DIAGNÓSTICO	16
1.5 TRATAMENTO.....	17
1.6 VACINAS	17
1.7 TIPIFICAÇÃO MOLECULAR	19
1.7.1 Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)	19
1.7.2 Multilocus Sequence Typing (MLST).....	19
1.8 PCR EM TEMPO REAL.....	21
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 AMOSTRAGEM.....	26
4.2 CULTIVO DAS CEPAS	26
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	26
4.4 DETERMINAÇÃO DOS “ <i>SEQUENCE TYPES</i> ” (ST) E DOS COMPLEXOS CLONAIIS (cc)	27
4.5 DETERMINAÇÃO DAS ASSINATURAS GENÉTICAS	27
4.6 PCR EM TEMPO REAL.....	28
4.6.1 Desenho de iniciadores e sondas	29
4.6.2 Protocolo de reação	32
4.7 DETERMINAÇÃO DOS COMPLEXOS CLONAIIS PELA PCR EM TEMPO REAL.	33
5 RESULTADOS	34
5.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPLEXOS CLONAIIS MAIS FREQUENTES	34
5.2 DETERMINAÇÃO DOS GENES DO MLST MAIS CONSERVADOS	37
5.3 DETERMINAÇÃO DAS ASSINATURAS GENÉTICAS	38
5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL	43

5.4.1 Verificação da melhor concentração de iniciadores e sondas	43
5.4.2 Comparação entre a eficiência dos Kits	44
5.5 MODELO ESTATÍSTICO DE PROBABILIDADE	46
5.6 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PCR EM TEMPO REAL COM O MLST	48
5.7 DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS APRESENTADOS	54
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO.....	61
8 PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIA.....	63
ANEXO A	
Artigo submetido para publicação	70
ANEXO B	
Resultado preliminar do HRM.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neisseria meningitidis* (Nm)

A Nm ou meningococo é uma bactéria Gram negativa, imóvel, não esporulada e encapsulada, da família *Neisseriaceae*, que se apresenta sob a forma de diplococo cujo único hospedeiro é o homem. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que de 10 a 25% da população alberguem em algum momento a Nm assintomaticamente, esta taxa pode aumentar em períodos epidêmicos (WHO, 2003). Uma parte dos colonizados (cerca de 1%), no entanto, desenvolvem a doença quando a bactéria atravessa o epitélio e chega até a corrente sanguínea, podendo causar septicemia ou meningococemia. A partir do sangue, o meningococo pode atravessar a barreira hemato-encefálica e infectar as meninges causando meningite (STEPHENS et al, 2007).

A Nm possui duas membranas, uma interna e outra externa, que revestem uma camada rígida de peptidoglicano, também chamada de parede celular. Cerca de 50% da parte exterior que cobre a membrana externa é constituída por moléculas de lipooligossacarídeo (LOS) que constituem a endotoxina bacteriana (BRICKS, 2002). A membrana externa é circundada por uma cápsula polissacarídica e sua composição antigênica permite a classificação do meningococo em 13 sorogrupos diferentes: A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E e W135, sendo os sorogrupos A, B, C, Y, e W135 responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de DM no mundo. A expressão da cápsula polissacarídica pode variar sendo um fator de virulência importante do microorganismo, interferindo na ativação do complemento e evitando a fagocitose por macrófagos (STEPHENS *et al.*, 2007).

Os meningococos são também classificados em sorotipos e sorosubtipos, de acordo com a composição antigênica das proteínas porinas inseridas na membrana externa, que são chamadas de *Outer Membrane Proteins* (OMP). Essas porinas podem ser das classes 2 ou 3 (PorB) e classe 1 (PorA) (SÁFADI; BARROS, 2006). Uma proteína também importante para a representação do meningococo é a FetA, reguladora da captação de ferro, sua expressão é essencial para o crescimento da bactéria *in vivo*. A FetA está ancorada na membrana externa ficando exposta ao sistema imune (SCHRYVERS; STOJILJKOVIC, 1999). Seguindo as recomendações da *European Meningococcal Disease Society* (EMGM), a representação dos meningococos deve incluir o sorogrupo, seguido das variantes das duas regiões variáveis (VR1

e VR2) do gene *porA* e da variante do gene *fetA* além do tipo sequencial (ST) e do complexo clonal (cc) como no exemplo a seguir: **C:P1.5,2-1:F5-4:ST-11(cc11)**. A determinação das variantes do gene *porB* por sua alta variabilidade é recomendada como informação complementar à PorA e FetA, quando for necessário um maior caráter discriminatório (THOMPSON et al, 2003).

1.2 DOENÇA MENINGOCÓCIA

A doença meningocócica (DM) é uma enfermidade aguda, grave e de rápida evolução com taxas de mortalidade de 15 a 20% e que atinge principalmente as faixas etárias mais jovens. A DM está associada à colonização da nasofaringe de humanos, único hospedeiro, por uma bactéria Gram negativa, *Neisseria meningitidis*, e pode se apresentar de várias formas (ROSENSTEIN et al., 2001). A transmissão do microorganismo pode ocorrer por contato direto com secreções da nasofaringe do doente ou de um portador assintomático (CARVALHANAS, 2005). A severidade da DM está relacionada ao nível de LOS secretada no plasma ou no líquido cefalorraquidiano, responsável pela resposta inflamatória do paciente (UNKMEIR et al, 2002). Alguns fatores de virulência, fatores imunológicos e interação com o hospedeiro auxiliam na transmissão e sobrevivência do agente etiológico em vias aéreas humanas durante o período de invasão ao hospedeiro (STEPHENS, 2009). A apresentação da doença pode envolver uma variedade de sintomas mimetizando outras infecções o que acaba por interferir no diagnóstico correto da doença. A melhor classificação das manifestações da DM foi proposta da seguinte forma:

A bacteremia sem septicemia é um quadro infeccioso leve da via respiratória superior. A Hemocultura é positiva pra meningococo sem antibioticoterapia prévia (SCHELD et al, 1999).

A meningococemia sem meningite se caracteriza pela invasão do microorganismo na corrente sanguínea levando à trombose de pequenos vasos e comprometimento múltiplo dos órgãos. É frequente o aparecimento de petéquias de tamanho pequeno no tronco e em membros inferiores, que podem coalescer e ocasionar hemorragias mais severas, seguindo-se de coagulação intravascular disseminada ocasionando choque generalizado, rápida hipotensão e destruição bilateral das glândulas adrenais (síndrome de Waterhouse-Friderichsen)

(ROSENSTEIN et al, 2001). Pode ser observada, uma forma mais branda da meningococemia, em que os sintomas são apenas febre, artrite e raras petéquias.

A meningite se caracteriza pela invasão do microorganismo nas meninges, membranas que revestem a massa encefálica e a medula, ocasionando uma inflamação purulenta. Manifesta-se inicialmente com febre alta, prostração, vômitos, falta de apetite, rigidez da nuca e coma, que são os chamados sinais meníngeos, é frequente também o aparecimento de petéquias. No entanto, crianças pequenas podem apresentar inicialmente apenas sinais inespecíficos como febre e vômito. O estado do paciente pode variar desde consciente até o coma (CARVALHANAS, 2005).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A DM é endêmica em praticamente todos os países do mundo. Nos países desenvolvidos a doença ocorre com uma incidência de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes, nessas regiões o sorogrupo predominante é o B, que pode ser responsável por até 80% dos casos de DM em alguns países europeus, 40% dos casos na América do Norte e também com uma alta porcentagem de casos na Nova Zelândia (WILDER-SMITH, 2008). Na África, em uma região conhecida como “cinturão da meningite” a incidência da DM é bastante alta, podendo atingir 0,5 a 1% da população com até 1000 casos por 100.000 habitantes. No “cinturão da meningite” os sorogrupos A e B são predominantes, assim como também em alguns países asiáticos (BRICKS, 2002, ZHANG et al, 2008) estudos recentes em regiões fora do “cinturão de meningite” realizado por Pavón e colaboradores (2011) evidenciaram um crescente número de DM causadas pelo sorogrupo W-135. No Brasil a doença meningocócica apresenta incidência de 3-4 casos por 100.000 habitantes, com 2500 a 3000 casos por ano e letalidade de 15 a 20% segundo dados do Boletim Epidemiológico MS/SVS/SINAN 2009. Os sorogrupos mais frequentes no país são o B e o C que juntos, são responsáveis por mais de 90% dos casos. Nos últimos 5 anos a incidência de cepas do sorogrupo C vem aumentando significativamente em todo o país, tendo sido detectados surtos causados por esse sorogrupo em diversos estados brasileiros. Com a introdução da vacina meningocócica contendo o polissacarídeo C, espera-se que diminua o número de casos de DM causados por este sorogrupo nos próximos anos.

1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da doença meningocócica inclui o reconhecimento de sinais como febre, “rash” cutâneo, estado neurológico alterado e petéquias. Entretanto, o diagnóstico deve ser confirmado através de métodos laboratoriais, pois estes sintomas são comuns a meningites por outros agentes e o desenvolvimento dos sinais mais específicos, como “meningismo” e petéquias, acontecem geralmente após algumas horas de infecção, ou permanecem ausentes. O líquido cefalorraquidiano (LCR) coletado através de punção lombar e o sangue, habitualmente estéreis e também outros líquidos biológicos como líquido pleural, sinovial ou pericárdico devem ser examinados através de análise citológica, bioquímica e bacteriológica. O aspecto do LCR deve ser analisado imediatamente após a sua retirada. A pleocitose confere um aspecto opalescente, contagens maiores de células bacterianas tornam o LCR turvo, aspecto purulento é um forte indicativo de Nm. A observação do LCR por microscopia após coloração pelo Gram, onde são visualizados diplococos Gram negativos intra ou extracelulares, de tamanho variável pode ser usado como diagnóstico presuntivo (JANDA; KNAPP, 2003).

O teste de aglutinação em látex baseado na composição da cápsula polissacarídica pode ser utilizado como um diagnóstico rápido, mas é preciso cuidado na interpretação, pois pode haver ocorrência de resultados falsos positivos (PERKINS et al, 1995).

A cultura para identificação de *Neisseria meningitidis* é realizada através da inoculação de amostras suspeitas em meio de Ágar chocolate (Mueller-Hinton + 5% sangue de coelho ou equino), a placa é incubada em estufa com atmosfera de 5 – 10% de CO₂ por 24-48 horas a 37°C e as colônias se apresentam de forma convexa, brilhantes e com aproximadamente 1 mm de diâmetro. A confirmação da espécie pode ser realizada pela observação de diplococos Gram negativos por microscopia, teste positivo da oxidase e fermentação da glicose e maltose.

O diagnóstico da DM também pode ser feito através da reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões gênicas específicas e conservadas do meningococo. Frosch e colaboradores (1992) descreveram uma proteína de membrana externa integrante de um complexo sistema de transporte responsável pela translocação do polissacarídeo capsular para a superfície do meningococo, de ocorrência exclusiva e altamente conservada na espécie, codificada pelo gene *ctrA*. Esse alvo vem sendo utilizado para desenvolver iniciadores e sondas específicas para o diagnóstico de infecção por *Neisseria meningitidis*. Estudos recentes, no entanto,

relatam a existência de isolados com polimorfismo no gene *ctrA* que podem gerar resultados falso negativos em diagnóstico pela PCR, especialmente quando se detecta apenas um gene alvo (JATON et al, 2010). O gene *nspA* que codifica uma proteína cuja função ainda não foi definida, também tem sido utilizado para detecção de *Neisseria meningitidis* em material clínico pela PCR. Este gene que codifica uma proteína de membrana externa altamente conservada na espécie demonstrou reproduzir em um estudo, um resultado confiável com 100% de resultado positivo nos casos já confirmados, com especificidade e sensibilidade não afetada pelo tratamento com antibióticos (De FILIPPIS et al, 2005).

1.5 TRATAMENTO

A DM é uma enfermidade de desenvolvimento rápido e potencialmente fatal, a antibioticoterapia deve ser iniciada o mais rápido possível, preferencialmente logo após a punção lombar. Atualmente o antibiótico mais comumente usado é o Ceftriaxona na posologia de 100mg/kg/dia, por via intravenosa 1x/dia ou 12/12h, num período de 7-10 dias.

O Ministério da Saúde também preconiza o uso de Penicilina G.Cristalina na posologia de 200.000-400.000 UI/kg/dia até 15g por via intravenosa 4/4h por 7-10 dias) e Ampicilina (200-400mg/kg/dia, intravenosa 4/4h ou 6/6h, por 7-10 dias). Para profilaxia e eliminação de colonização em portadores assintomáticos, pela sua eficácia e poucos efeitos colaterais é prescrita a administração de Rifampicina na dose de 600mg/dose para adultos e para criança na faixa entre 5-10mg/kg/dia até 600mg, ambos 12/12hr (FUNASA/MS 2000). Em regiões epidêmicas, com instalações de saúde precárias e baixa disponibilidade de antibióticos, como algumas áreas da África, a primeira escolha para tratamento é o Cloranfenicol oleoso, por sua ação prolongada (WHO, 2003).

1.6 VACINAS

Vacinas eficazes contra os diversos sorogrupos da NM utilizando o polissacarídeo capsular foram introduzidas em diversos países entre as décadas de 1970 e 1980. Hoje, a nova estratégia vacinal é utilizar o polissacarídeo capsular conjugado a uma proteína carreadora como exemplo o toxóide tetânico ou diftérico com o objetivo de aumentar a imunogenicidade da vacina e promover uma resposta T-dependente conferindo assim memória imunológica ao

vacinado, diferente do que ocorria com vacinas contendo apenas o polissacarídeo que estimulam uma resposta T-independente (SAFADI; BARROS, 2006). Recentemente foi introduzida no calendário vacinal nacional uma vacina polissacarídica conjugada contra o sorogrupos C apresentando eficácia superior às vacinas já existentes no comércio contra esse sorogrupo.

Apesar da eficácia comprovada das vacinas contra os sorogrupos A, Y, C e W135, ainda não existe uma vacina eficaz no combate ao sorogrupo B, devido ao polissacarídeo B presente na cápsula bacteriana apresentar em sua estrutura o ácido α 2-8 *N*-acetilneuramínico (ácido polisiálico), de estrutura homóloga aos ácidos siálicos presentes nas células nervosas do tecido neural humano. Essa característica do polissacarídeo B confere incapacidade de indução de uma resposta imune eficaz. Além disso, a possível utilização de uma vacina contendo o polissacarídeo B poderia induzir doenças autoimunes (LIONEL et al, 2010).

A análise antigênica de proteínas da membrana externa fornece uma avaliação funcional dos genes envolvidos na imunogenicidade das cepas circulantes, permitindo determinar a diversidade antigênica dos isolados e a necessidade de produção de novos compostos vacinais. Na tentativa de se desenvolver novas vacinas, novas estratégias vêm sendo seguidas como a utilização de proteínas da membrana externa como antígenos em associação ao polissacarídeo capsular, na forma de vesículas chamadas OMV (*outer membrane vesicles*), que são formadas naturalmente pelas bactérias *in vivo*. Sabe-se que a imunogenicidade produzida a partir das OMV está predominantemente relacionada à proteína da membrana externa PorA muito mais abundante nessas preparações. Essa proteína possui alta variabilidade em suas regiões variáveis, porém estudos com vacinas experimentais mostraram que a proteína PorA foi a maior indutora de resposta imunológica entre outras OMPs presentes nas OMVs. No entanto vacinas baseadas na PorA não são heterólogas e a proteção é específica para cada variante de PorA, dificultando sua utilização em populações com alta variabilidade de sorosubtipos. Da mesma forma estudos sobre a imunogenicidade de outra proteína da membrana externa, PorB foram inconclusivos apresentando resultado favorável apenas contra cepas homólogas isoladas de surtos regionais, levando a uma baixa capacidade de controle endêmico (PIZZA et al, 2000).

1.7 TIPIFICAÇÃO MOLECULAR

1.7.1 *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE)

O “Multilocus Enzyme Electrophoresis” é uma técnica baseada na identificação de variações alélicas em genes constitucionais pela migração eletroforética diferenciada em geral de agarose dos produtos destes genes (enzimas). O padrão alélico gerado determina um tipo eletroforético (ET) e o ET corresponde ao genótipo do organismo estudado (SELANDER et al, 1986). O MLEE foi extensamente usado em estudos de biologia populacional e filogenético e demonstrou ser útil na diferenciação genética de bactérias, especialmente, na caracterização do agente da DM (CAUGANT, 1998). Todas as bactérias isoladas podem ser caracterizadas pelo padrão dos alelos nos “*loci*” estudados. Pelo menos 15 “*loci*” são analisados como padrão para obter uma discriminação adequada entre cepas de *N.meningitidis*.(CAUGANT, 1998; SELANDER et al, 1986).

1.7.2 *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

Em 1998 Maiden e colaboradores desenvolveram um método de tipificação molecular a partir do "*Multilocus Enzyme Electrophoresis*" (MLEE) chamado "*Multilocus Sequence Typing*" ou MLST. O MLST é um procedimento único para a caracterização de espécies bacterianas através do sequenciamento de fragmentos internos de 7 genes constitutivos chamados “housekeeping genes” que no caso do meningococo são: *abcZ* (putative ABC transporter), *adk* (adenylate kinase), *aroE* (shikimate dehydrogenase), *fumC* (fumarate hydratase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *pdhC* (pyruvate dehydrogenase subunit) e *pgm* (phosphoglucomutase). Aproximadamente 400-600 pb de cada gene são utilizados podendo ser sequenciados em ambas as fitas com um sequenciador automático de DNA. Para cada gene, as diferentes sequências presentes em cada isolado são designadas como alelos distintos e, para cada isolado, os alelos de cada um dos 7 “locus” definem perfil alélico ou tipo sequencial (ST) do isolado. Cada isolado de uma espécie é, portanto indistintamente caracterizado por uma série de 7 números inteiros que correspondem aos alelos dos 7 genes constitutivos.

No MLST o número de diferentes nucleotídeos é ignorado e cada sequência recebe um número alélico diferente quando difere da outra por um ou mais nucleotídeos. O racional desse método é que um simples evento genético resultando em um novo alelo pode ocorrer por uma simples mutação pontual de um único nucleotídeo ou por recombinação (o que geralmente leva a mudanças em diferentes regiões).

Muitas espécies bacterianas apresentam variações suficientes em seus genes “*housekeeping*” com muitos alelos por “locus”, podendo formar bilhões de perfis alélicos distintos utilizando 7 genes. Por exemplo, uma espécie com uma média de 30 alelos por “locus”, chegaria a formar 20 milhões de genótipos distintos.

O MLST foi desenvolvido a partir do bem estabelecido MLEE, com a diferença de que os alelos são designados diretamente por sequenciamento de 7 genes distintos e não pela determinação da mobilidade eletroforética de seus produtos como no MLEE (CAUGANT, 1998; SELANDER, et al,1986).

A grande vantagem do MLST é que os dados das sequências são únicos e não subjetivos e os perfis alélicos de cada isolado podem ser facilmente comparados “on-line” com outros depositados em um banco de dados central. Os perfis alélicos podem também ser obtidos pela amplificação dos 7 genes diretamente do material clínico (LCR ou sangue). Assim o microorganismo pode ser caracterizado mesmo quando não pode ser cultivado.

No MLST, isolados que apresentam total relação genética entre si, possuem STs idênticos e os que possuem STs diferentes, mas apresentam até 4 alelos iguais são classificados no mesmo complexo clonal (cc). Por exemplo: um isolado com o perfil alélico *abcZ=2 adk=3 aroE=4 fumC=3 gdh=8 pdhC=248 pgm=6*, foi submetido ao banco de dados sendo identificado pelo curador como **ST-2994**, pertencendo ao complexo clonal **ST-11** por possuir semelhança alélica em 4 ou mais genes com o ST central do complexo clonal que é o **ST-11**.

O MLST tem sido aplicado em diversos países para monitorar a disseminação das linhagens de meningococos chamadas de hipervirulentas ou hiperinvasivas durante os últimos 12 anos (ACHTMAN et al., 2001; CLARKE et al., 2001; ENRIGHT; SPRATT, 1999; FEAVERS et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2004; DE FILIPPIS; VICENTE, 2005). O método permitiu o desenvolvimento de um grande banco de dados com milhares de sequências de genes de *N. meningitidis* e outras espécies bacterianas, que pode ser livremente

acessado para a determinação dos STs e complexos clonais. O banco de dados está disponível em <http://pubmlst.org/neisseria> (JOLLEY et al, 2004).

1.8 PCR EM TEMPO REAL

A técnica de PCR convencional permite a visualização dos fragmentos amplificados por eletroforese após a amplificação de fragmentos gênicos ou extra-gênicos a partir do DNA genômico do microorganismo alvo. Dessa forma, o resultado obtido pela PCR é considerado qualitativo, informando se aquele fragmento de gene ou região intergênica foi detectado ou não pelos iniciadores. Na PCR em tempo real, utilizando o método *Taqman*®, que usa em conjunto um par de iniciadores e pelo menos uma sonda, a amplificação de uma determinada região é acompanhada pela hibridização dessa sonda específica ao fragmento amplificado que emite mais ou menos fluorescência de acordo com o número de cópias amplificadas. Outro método de detecção é baseado na emissão de fluorescência de um fluoróforo chamado SYBR GREEN®, que é um agente intercalante de dupla fita de DNA, porém a principal limitação desse método é a emissão de fluorescência de produtos inespecíficos e produtos de dímeros de iniciadores, devido à quantificação inespecífica de qualquer dupla fita de DNA. Portanto, faz-se necessária uma análise posterior da curva de dissociação para eliminação de resultados inespecíficos (WEIGHARDT, 2004). Dessa forma, a PCR em tempo real, permite a determinação quantitativa da região-alvo, além de sua detecção sem a necessidade da visualização em gel de eletroforese (PARASHAR et al, 2007). Além disso, a alta especificidade da sonda permite detectar mutações pontuais chamadas SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que normalmente seriam difíceis de serem detectadas por uma PCR simples. A PCR em tempo real vem sendo utilizada como uma alternativa para a PCR convencional devido ao seu baixo risco de contaminação, protocolo simples e rápido, alta especificidade e sensibilidade (ESPY et al, 2006).

A potência da PCR em tempo real tem sido expandida para diversas aplicações como, acompanhamento de eficácia do tratamento medicamentoso, genotipagem para resistência a antibióticos, identificação de espécies e subespécies de diferentes organismos (PARASHAR, 2007). Jatou e colaboradores (2010), obtiveram resultados negativos falsos para detecção de meningococos em cultura negativa de líquido, conflitando com os resultados da coloração de Gram que apresentavam diplococos Gram-negativos sendo a detecção baseada na PCR do

gene *ctrA*. Após a amplificação e sequenciamento do gene completo concluiu-se que a não detecção deste gene se devia a um raro polimorfismo do gene *ctrA* presente em algumas cepas de *Neisseria meningitidis*, na região de anelamento dos iniciadores utilizados para a PCR. Para evitar esse problema, a PCR em tempo real pode ser utilizada, desenhando-se sondas específicas para a detecção de regiões polimórficas do gene.

Em nosso estudo, a PCR em tempo real será utilizada de maneira qualitativa para a detecção rápida e específica de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) como assinaturas genéticas que caracterizam determinados alelos dos genes do MLST, específicos para os principais STs hipervirulentos circulantes no país. A detecção dessas assinaturas genéticas através da PCR convencional é bastante difícil, pois essa técnica não apresenta especificidade suficiente para detectar cepas com polimorfismo de poucos nucleotídeos em uma determinada região genômica. Dependendo da localização do polimorfismo, os iniciadores utilizados na PCR convencional podem anelar em regiões com sequências não compatíveis, resultando em ampliações inespecíficas. A determinação de um Complexo Clonal específico pode ser conseguida por PCR em tempo real de forma rápida e segura, sem a necessidade do sequenciamento dos 7 genes que compõe o esquema do MLST, agilizando a obtenção de resultados em estudos epidemiológicos.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A DM é uma doença grave e com grande impacto na saúde mundial, com altas taxas de morbidade, e de mortalidade, difícil diagnóstico por apresentar alguns sintomas iniciais inespecíficos, com rápido desenvolvimento do quadro clínico da doença e com surtos recorrentes causados por cepas hipervirulentas. O aumento da ocorrência de cepas com diminuição da sensibilidade a determinados antibióticos, pode ainda ocasionar um aumento da taxa de letalidade em até 50% (WHO, 1998). A introdução de uma vacina conjugada contra o sorogrupo C no programa nacional de imunização tem eficácia apenas contra cepas desse sorogrupo, não tendo ação sobre meningococos do sorogrupo B que ainda circulam no país. A diminuição da circulação do sorogrupo C após a introdução da nova vacina conjugada poderá levar a um novo aumento da incidência do sorogrupo B para o qual não existe até o momento vacina eficaz disponível no mundo (DE FILIPPIS, 2009). Estudos vêm sendo realizados para se determinar os alvos a serem introduzidos em uma possível nova vacina contra o meningococo B, entre esses alvos destacam-se algumas proteínas da membrana externa que apresentaram alta imunogenicidade e poderiam ser usadas como alvos vacinais para todos os sorogrupos de meningococos (GIULIANI et al, 2006; JESSOURON et al, 2004; JODAR et al, 2002).

A principal ferramenta para determinar as cepas a serem incluídas numa futura vacina, é o estudo epidemiológico das cepas circulantes no país. Com esse objetivo, a Europa desenvolveu um Centro de estudos do meningococo (European Monitoring Group for Meningococci - <http://neisseria.org/nm/emgm/>) responsável por monitorar os clones hipervirulentos que circulam na região não só dentro das atribuições da vigilância epidemiológica ativa, mas também para que o país possa ter dados importantes sobre os genótipos circulantes para determinar as melhores vacinas a serem introduzidas contra a doença meningocócica. Estudos mostram que certos complexos clonais são mais comuns em determinados países. No caso do Brasil, o complexo clonal mais frequente entre as cepas do sorogrupo B é o ST-32 seguido do ST-41 (DE FILIPPIS et al, 2005; de LEMOS, 2007). Para as cepas do sorogrupo C prevalece o complexo clonal ST-11 e mais recentemente o ST-103 (Dados em publicação). Atualmente a determinação dos complexos clonais só é possível pelo sequenciamento dos 7 genes do MLST e submissão das seqüências ao banco de dados *Neisseria.org* para a

determinação dos STs e seus complexos clonais. Apesar de ser um método muito bem estabelecido e considerado o “padrão ouro” para estudos epidemiológicos, o MLST requer grande trabalho e alto custo de reagentes e equipamentos. A implementação da PCR na caracterização das cepas circulantes no país, quanto aos complexos clonais, por PCR em tempo real proposto em nosso estudo poderá fornecer um resultado confiável, de forma mais rápida e com menor custo de reagentes e equipamentos. Além disso, contribuirá com dados epidemiológicos para as estratégias de produção de vacinas, que apesar da eficácia da antibioticoterapia ainda continua sendo a melhor estratégia no combate à doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar uma estratégia para a detecção de assinaturas genéticas em genes do MLST para determinar os clones hipervirulentos circulantes no país pelo método da PCR em tempo real (*Real Time-PCR*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o grupo de complexos clonais hipervirulentos mais frequentes entre linhagens de meningococos dos sorogrupos B e C por MLST.
- Determinar os genes do esquema do MLST mais conservados para cada complexo clonal.
- Determinar as “assinaturas genéticas” de cada gene que identificam cada complexo clonal.
- Padronização da PCR em tempo real para a detecção das “assinaturas genéticas”.
- Detectar as “assinaturas genéticas” utilizando os iniciadores e sondas desenhadas para cada complexo clonal por PCR em tempo real.
- Comparar os resultados da PCR em tempo real com o sequenciamento dos genes do MLST.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

Foram selecionadas 98 cepas de meningococos do sorogrupo B (n=15) e C (n=83) para o estudo de MLST e destes, 82 foram analisadas pela PCR em tempo real, sendo sorogrupo B (n=15) e sorogrupo C (n=67). Esses isolados foram obtidos da coleção de pesquisa do Laboratório de Microorganismos de Referência (LMR) do INCQS onde se encontravam preservados por liofilização em ampolas seladas à vácuo em refrigerador a -20°C. As cepas foram isoladas durante os anos de 1996 a 2009 de pacientes com meningite meningocócica ou meningococemia.

4.2 CULTIVO DAS CEPAS

As ampolas contendo o líófilo foram hidratadas com caldo TSB (triptona de soja), e em seguida foi realizado repique em placa com meio de cultura ágar chocolate (Mueller-Hinton 70°C + 5% sangue de coelho ou equino). A placa foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas a 37°C. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi coletado com o auxílio de uma alça bacteriológica com volume de 10µl para a extração do DNA genômico.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico dos isolados foi extraído e purificado utilizando o kit *DNEasy® tissue 250* da marca *Qiagen*, seguindo o protocolo do fabricante, o DNA extraído foi dosado em triplicata utilizando o *Qubit® Fluorometer*. Após a dosagem, o DNA foi armazenado a -20°C.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS “*SEQUENCE TYPES*” (ST) E DOS COMPLEXOS CLONAIIS (cc)

Para a determinação dos STs e complexos clonais mais frequentes entre as cepas incluídas no estudo, foi utilizado o método do “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) com o sequenciamento dos genes *abcZ* (putative ABC transporter), *adk* (adenylate kinase), *aroE* (shikimate dehydrogenase), *fumC* (fumarate hydratase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *pdhC* (pyruvate dehydrogenase subunit) e *pgm* (phosphoglucomutase). O protocolo da reação da PCR e os iniciadores utilizados para a amplificação e o sequenciamento dos fragmentos dos genes se encontram disponíveis no banco de dados em <http://pubmlst.org/neisseria/info/>. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados e enviados em placas de 96 poços para a plataforma DNA PDTIS-FIOCRUZ para sequenciamento em sequenciador automático *ABI 3730XL*. As sequências obtidas a partir do sequenciamento foram analisadas pelos programas Sequencher 5.0 e Bioedit 7.0 e submetidas ao banco de dados do MLST.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS ASSINATURAS GENÉTICAS

Para a determinação dos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) também chamadas de assinaturas genéticas, as sequências dos diferentes alelos de cada um dos genes do MLST foram obtidas por *download* no banco de dados <http://pubmlst.org/neisseria/info/> e alinhadas com o software *BIOEDIT* disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (HALL, 1999) (Fig. 1).

Figura 1: Alinhamento dos alelos do gene *aroE* do cc ST-103 em ordem de frequência, realizado no Bioedit (Hall, 1999).



As sondas que detectam as duas formas alélicas diferentes do ST para cada gene (assinatura genética) estão em amarelo e cinza e as regiões de anelamento dos iniciadores em verde.

Após o alinhamento as “assinaturas genéticas” foram determinadas a partir de regiões únicas de cada alelo e duas sondas de reconhecimento foram criadas para cada região. Uma específica para o alelo central e outra para os alelos que apresentam polimorfismos naquela região. A escolha dos alelos candidatos à detecção foi feita de acordo com a porcentagem de frequência deste alelo dentro dos STs que compreendem o complexo clonal, sendo preferencialmente escolhidos genes que apresentavam alelos com frequência acima de 70% e que também apresentassem SNPs adequados para desenho de sondas. Todos os dados referentes aos alelos, sequências, STs e complexos clonais foram obtidos *in silico* através do banco de dados <http://pubmlst.org/neisseria/info/>.

4.6 PCR EM TEMPO REAL

Para os experimentos de PCR em tempo real foi utilizada o termociclador *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* existente no Depto. de Microbiologia do INCQS e o *Applied Biosystems 7500 Real-Time Fast PCR System* da Plataforma de PCR em Tempo Real

do Instituto Oswaldo Cruz-IOC, Fiocruz. Para a visualização dos resultados e análises dos parâmetros das reações, como *Threshold Cycle* (Ct) e ΔRn foi utilizado o software do equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, fornecido pelo fabricante. Para as reações foram utilizados e comparados o kit *JumpStarttmTaq ReadyMixtm* e o kit *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)*. Os dois kits na versão “Master Mix” consistem em um mix de tampão específico para a reação, dNTPs, enzima polimerase e $MgCl_2$. As reações foram realizadas sem a utilização do ROX como referência, e o tipo de ensaio utilizado foi a Quantificação Absoluta, porém apenas em caráter qualitativo.

4.6.1 Desenho de Iniciadores e sondas

Os iniciadores e sondas utilizados foram desenhados utilizando o software disponível em http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi. Os iniciadores foram testados nas concentrações de $3\mu M$, $0,5\mu M$ e $0,2\mu M$ e as sondas da marca *Sigma Aldrich*® foram aliquotadas na concentração de $10\mu M$ e diluídas em soluções de trabalho com concentrações de $1\mu M$, $0,75\mu M$ e $0,4\mu M$, seguindo recomendações do manual do fabricante. Os iniciadores foram desenhados para que amplificassem fragmentos de aproximadamente 150bp, considerado ideal para reações de PCR em tempo real. A amplificabilidade dos iniciadores foi simulada *in silico* através do site <http://insilico.ehu.es/> e testados com a PCR convencional, onde todos os iniciadores amplificaram bandas específicas e do tamanho esperado. As sondas foram desenhadas de acordo com os seguintes parâmetros:

- *Temperature Melting* (T_m) das sondas $10^\circ C$ acima que a T_m dos iniciadores.
- Evitar resíduos de guanina na extremidade 5´da sonda.
- Posicionar a sonda próxima aos iniciadores *forward* ou *reverse*.

Tabela 1: Lista de iniciadores e sondas utilizados.

Iniciadores	Tamanho do fragmento (bp)
adk32-F: AACGCATCGCGCAAGAC	121
adk32-R: TCGATTTCAACGACTGCAT	
adk32-P1: TCTTGTTTGACGGTTTCCCGCGCACATT (FAM/MGB) → alelo central	
adk32-P2: TCCTGTTTCGACGGTTTCCCGCGCACGCT (VIC/MGB) → alelo 2ário	
pdhC32-F: GAACGACTACCACGTCTT	126
pdhC32-R: TGTTCGCCAATGCG	
pdhC32-P1: ACTGACGGTTTCGGCCGTTCCGACAGT (MGB\FAM) → alelo central	
pdhC32-P2: TACTGACGGCTTCGGCCGCTCCGACAGC (FAM\MGB) → alelo 2ário	
pgm32-F: ACCAAAGACGGCAACAT	175
pgm32-R: AGCTGTGGCCGTTTT	
pgm32-P1: AGCCGCAATCCTAAAGCCAAAGTGA (FAM/MGB) → alelo central	
pgm32-P2: AACCGCAATCCCGGCGCGAAAGTCA (FAM/MGB) → alelo 2ário	
aroE32-F: ATCATCATCAACGGC	175
aroE32-R: GCATACCCAGTCCGT	
aroE32-P1: TCTAAACGGTCAGATTCCCGATATTCCG (FAM/MGB) → alelo central	
aroE32-P2: CTTGAGCGGTCAGCTTCCTCCCGTCAGT (FAM/MGB) → alelo 2ário	
aroE103-F: CTTGCCTACGATATGGT	144
aroE103-R: CGTAAATCCGCGCCA	
aroE103-P1: CTGCGCGGCAAAACCGTTTTTAGATTTTGAC (FAM/MGB) → alelo central	
aroE103-P2: CGAAGCGGCGAAGGAGTTTTTGGATTTTGCC (FAM/MGB) → alelo 2ário	
pdhC103-F: CCTGCTGCACCGCGA	134
pdhC103-R: GGATATAGTCGGTAGCG	
pdhC103-P1: CCATCGAAACCGAACGCTTCAA (FAM\MGB) → alelo central	
pdhC103-P2: CTGTCGAGGTAGAACGCTTCAA (FAM\MGB) → alelo 2ário	
pgm103-F: CCAAAGACGGCAACA	168
pgm103-R: GGCCGGTTTTTTCC	
pgm103-P1: AAGAACACGGCGGCAAAGCCATAA (FAM/MGB) → alelo central	
pgm103-P2: AAGAACACGGCGGCAACCTGTGA (FAM/MGB) → alelo 2ário	

gdh103-F: ATGTTTCGAGCCGCTG 164
gdh103-R: TCCATCGCAGTCATG
gdh103-P1: TTGACCATCGCCGAACAGCTCGGT (FAM/MGB) → alelo central
gdh103-P2: CTTACCATCGCCGAGCAGTTGGGC (FAM/MGB) → alelo 2ário

abcZ11-F: ATTTATTGCGCCGTT 115
abcZ11-R: TTCCAGCCGTCCCTTC
abcZ11-P1: CCACCGCGTCGGCCATGA (FAM/MGB) → alelo central
abcZ11-P2: TCATCATGTCAGCCATGAGT (FAM/MGB) → alelo 2ário

fumC11-F: TGCACCATTCCCTGA 133
fumC11-R: GTCAGCAAGCCCAAC
fumC11-P1: CTGGTTACTGCGTTAAACCGTAAAATCGGC (FAM\MGB) → alelo central
fumC11-P2: CTCGTTACCGCGTTGAACCGCAAAAATCGGT (FAM\MGB) → alelo 2ário

pdhC11-F: AAGAAGTCATTGCCGGTG 145
pdhC11-R: TTTTCGGCTTCCAGCG
pdhC11-P1: AATTGCTGAAAGCCGACTTCGGCGTGG (FAM/MGB) → alelo central
pdhC11-P2: AGCTGCTGAAAGCCGACTTCGGCGTAG (FAM/MGB) → alelo 2ário

pgm11-F: AGCCCGAATCCTAAA 139
pgm11-R: CGGTTTTTTTTCATGG
pgm11-P1: TGTCAAATCCACCCGCTGCTGACCCCG (FAM/MGB) → alelo central
pgm11-P2: CGTCAAATCCACCCGCTGCTGCTGCGCCT (FAM/MGB) → alelo 2ário

aroE41-F: CTTGCCCTACGATATGG 179
aroE41-R: GCTTTCATGTATTCGAT
aroE41-P1: CCCGGCAATCGGGCGCGAAACAAACCGCC (FAM/MGB) → alelo central
aroE41-P2: CACGAGCATCGGTGCGGCCAAAACTGCC (FAM/MGB) → alelo 2ário

gdh41-F: CGTGCAGTTGACCAT 128
gdh41-R: CTTCCATCGCAGTCAT
gdh41-P1: AGCAGTTGGGCGTGGAAGACGCGGC (FAM\MGB) → alelo central
gdh41-P2: AACAGCTCGGTGTGGAAGAGCGCGGC (FAM\MGB) → alelo 2ário

adk41-F: CGACTGCAAAAACGGTT 131
adk41-R: GGTCGACAATCACG
adk41-P1: TGACGGTTTCCCGCGCACATTGGCACAA (FAM/MGB) → alelo central

adk41-P2: CGACGGTTTCCCGCGCACGCTGGCACAG (FAM/MGB) → alelo 2ário

pdhC41-F: ATTTGGTCTTGCCCA 151

pdhC41-R: AGTCGGTAGCGGCA

pdhC41-P1: CATCCGCTGGAAGCCGAAAAAGTACCT (FAM/MGB) → alelo central

pdhC41-P2: AATCCTTTAGAAACTGCAAAAGTACCG (FAM/MGB) → alelo 2ário

Fam/Vic= Reporter ; MGB= Quencher

4.6.2 Protocolo de reação

O protocolo de reação foi padronizado utilizando as especificações do fabricante dos kits para um volume de 25µL. Foram testados diversos protocolos para a amplificação dos genes *adk* do cc32, gene *aroE* do cc 103, gene *abcZ* do cc11 e o gene *gdh* do cc41 a fim de encontrar o que apresentasse o menor Ct e maior ΔR_n , caracterizando assim a detecção eficiente daquele alelo. A Tm média dos iniciadores foi de 45°C e das sondas de 57°C. O protocolo mais adequado foi:

Ciclagem:

- 95°C por 10'
 - 95°C por 15''
 - 55°-60°C por 1'
- } 40X

Concentração final dos reagentes na reação:

Master Mix	→	1x
Iniciadores	→	3µM
Sonda	→	1µM
DNA da Amostra	→	3,5ng

4.7 DETERMINAÇÃO DOS COMPLEXOS CLONAIIS PELA PCR EM TEMPO REAL

A determinação dos complexos clonais por PCR em tempo real foi realizada através da seleção de 4 genes de cada complexo clonal estudado. Os genes cujos alelos centrais apresentavam frequência $\geq 70\%$ foram analisados e foram desenhadas até duas sondas para detecção das assinaturas genéticas presentes nos alelos. A detecção destes 4 alelos centrais pela PCR em tempo real nos permite classificar a cepa estudada quanto ao seu complexo clonal, a detecção de alelos secundários junto a análise pode determinar uma forte tendência da cepa ter origem naquele complexo clonal analisado, essa tendência pode ser confirmada por estudos estatísticos de probabilidade. Todos os resultados obtidos pela PCR em tempo real foram comparados ao MLST, realizado previamente, para a confirmação de que a detecção daquele alelo foi eficiente.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPLEXOS CLONAIIS MAIS FREQUENTES

Para a determinação dos complexos clonais mais frequentes entre os clones hipervirulentos, as 98 cepas selecionadas no estudo foram tipificadas pelo método de MLST. O perfil do ST central dos principais complexos clonais está representado na tabela 2.

Tabela 2: Perfil alélico do ST central dos principais cc e distribuição dos cc entre os sorogrupos no Brasil e no Mundo.

Complexo Clonal	abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm
ST-32/ET-5	4	10	5	4	6	3	8
ST-11/ET-37	2	3	4	3	8	4	6
ST-41/44	3	6	9	5	9	6	9
ST-8/A4	2	3	7	2	8	5	2
ST-103	8	4	6	17	5	18	2

Para a determinação dos complexos clonais mais frequentes no Brasil e no Mundo, foi realizada uma busca no banco de dados do MLST que permitiu a escolha dos cc a serem utilizados no estudo de acordo com a tabela 3..

Tabela 3: Distribuição dos complexos clonais entre os sorogrupos B e C no Brasil e no mundo.

Sorogrupo/cc	Mundo (%)	Brasil (%)
B/cc32	14,2	62,3
B/cc41	22,8	16
B/cc269	6,8	0,9
Total isolados	9054	212
C/cc11	39	18,1
C/cc8	9	9,4
C/cc103	2,1	18,8
Total isolados	2503	138

Dados obtidos no banco de dados pubmlst.org

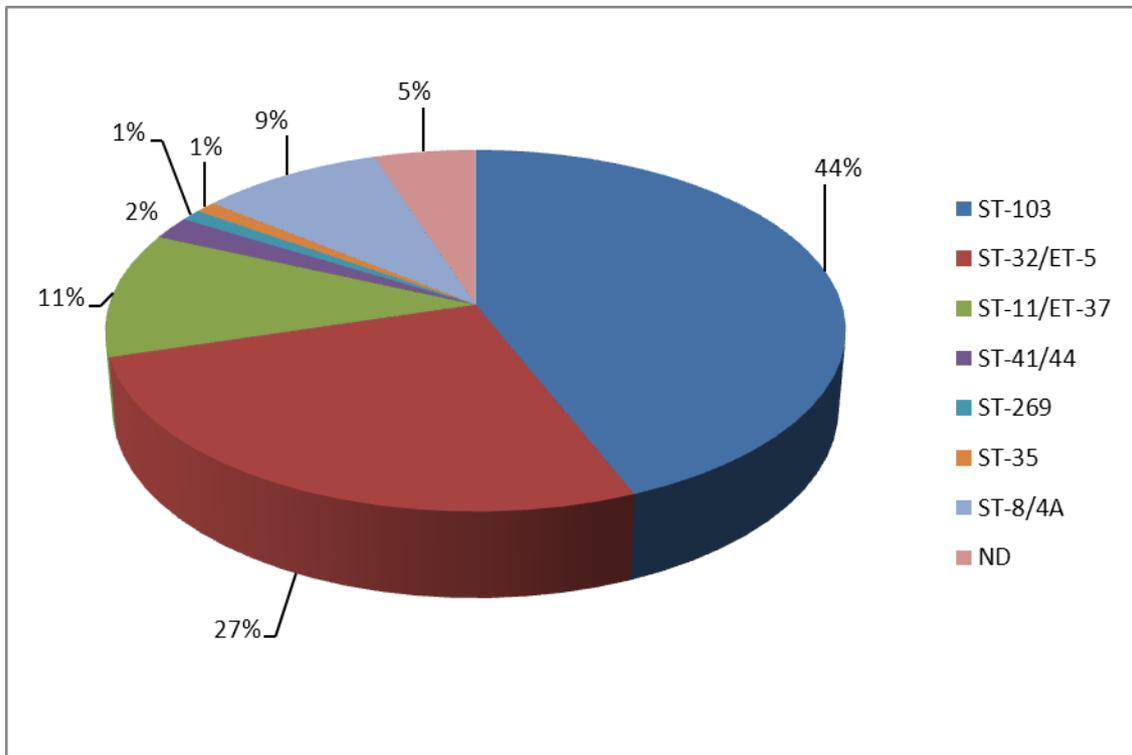
A tabela 4 abaixo apresenta os complexos clonais encontrados entre os 98 isolados tipificados pelo MLST em nosso estudo.

Tabela 4: Sorogrupo, ano de isolamento e cc das cepas estudadas.

Cepa	Sorogrupo	Ano	CC	Cepa	Sorogrupo	Ano	CC
P2634	B	2003	ST-32	P3140	C	2007	ST-103
P2636	B	2003	ST-32	P3141	C	2007	---
P2638	B	2003	ST-32	P3142	C	2007	ST-103
P2647	B	2003	ST-32	P3143	C	2007	ST-103
P2653	B	2003	ST-32	P3144	C	2007	ST-103
P2682	B	2004	ST-32	P3145	C	2007	ST-103
P2684	B	2004	ST-32	P3146	C	2007	ST-103
P2686	B	2004	ST-32	P3147	C	2007	ST-103
P2706	B	2004	ST-32	P3201	B	2008	ST-32
P2715	B	2004	ST-32	P3202	B	2008	ST-32
P3099	C	2008	ST-103	P3203	B	2008	ST-32
P3100	C	2008	ST-103	P3282	C	1996	ST-11
P3101	C	2008	ST-103	P3284	C	1996	ST-8/A4
P3102	C	2008	ST-32	P3285	C	1996	ST-11
P3103	C	2008	ST-103	P3286	C	1996	ST-11
P3104	C	2008	ST-103	P3287	C	1997	ST-8/A4
P3105	C	2008	ST-103	P3288	C	1997	ST-8/A4
P3106	C	2008	ST-103	P3289	C	1997	ST-11
P3107	C	2008	ST-32	P3290	C	1998	ST-11
P3108	C	2008	ST-41/44	P3291	C	2000	---
P3109	C	2008	---	P3292	C	2001	ST-103
P3110	C	2008	ST-32	P3293	C	2003	ST-32
P3111	C	2008	ST-32	P3294	C	1996	ST-11
P3112	C	2008	---	P3295	C	1996	ST-32
P3113	C	2008	ST-103	P3296	C	1996	ST-32
P3114	C	2008	ST-103	P3297	C	1996	ST-11
P3115	C	2008	ST-103	P3298	C	1996	ST-11
P3117	C	2002	ST-269	P3299	C	1996	ST-11
P3118	C	2002	ST-103	P3300	C	1996	ST-8/A4
P3119	C	2002	ST-103	P3301	C	1996	ST-32
P3120	C	2002	ST-103	P3302	C	1996	ST-8/A4
P3121	C	2002	ST-103	P3303	C	1996	ST-11
P3122	C	2004	ST-32	P3305	C	1996	ST-41/44
P3123	C	2005	ST-103	P3306	C	1996	ST-35
P3124	C	2006	ST-103	P3307	C	1996	ST-11
P3126	C	2008	ST-103	P3308	C	1996	ST-8/A4
P3127	C	2008	ST-103	P3309	C	1996	ST-32
P3128	C	2008	ST-103	P3310	C	1997	ST-32
P3129	C	2008	ST-103	P3311	C	1997	ST-8/A4
P3130	C	2008	ST-103	P3313	C	1997	ST-8/A4
P3131	C	2008	ST-103	P3314	C	1997	ST-8/A4
P3132	C	2008	ST-103	P3331	B	2009	ST-32
P3133	C	2008	ST-103	P3362	B	2009	ST-32
P3134	C	2008	ST-103	P3475	C	2009	ST-103
P3135	C	2008	ST-103	P3476	C	2009	ST-103
P3136	C	2008	ST-103	P3477	C	2009	ST-103
P3137	C	2008	ST-103	P3478	C	2009	---
P3138	C	2008	ST-103	P3479	C	2009	ST-103
P3139	C	2008	ST-103	P3480	C	2009	ST-103

A distribuição dos clones hipervirulentos entre as cepas do estudo está representada na Figura 2 em porcentagem:

Figura 2: Distribuição dos complexos clonais entre as cepas para os sorogrupos B e C.



ND= Não determinado.

5.2 DETERMINAÇÃO DOS GENES DO MLST MAIS CONSERVADOS

Para cada complexo clonal foram selecionados 4 genes que apresentaram menor variação de alelos para a construção das sondas, seguindo a definição de complexo clonal de haver 100% de similaridade em pelo menos quatro alelos para que duas cepas possam pertencer ao mesmo complexo clonal. Foram selecionados genes que apresentavam uma assinatura genética favorável ao uso da sonda e que fosse frequente em no mínimo 70%, preferencialmente 80%, de todos os isolados daquele complexo clonal existentes no banco de dados. Na tabela 3 estão listados os genes utilizados e a frequência dos alelos escolhidos nos isolados:

Tabela 5: Genes utilizados para análise por PCR em tempo real e porcentagem de frequência dos alelos centrais.

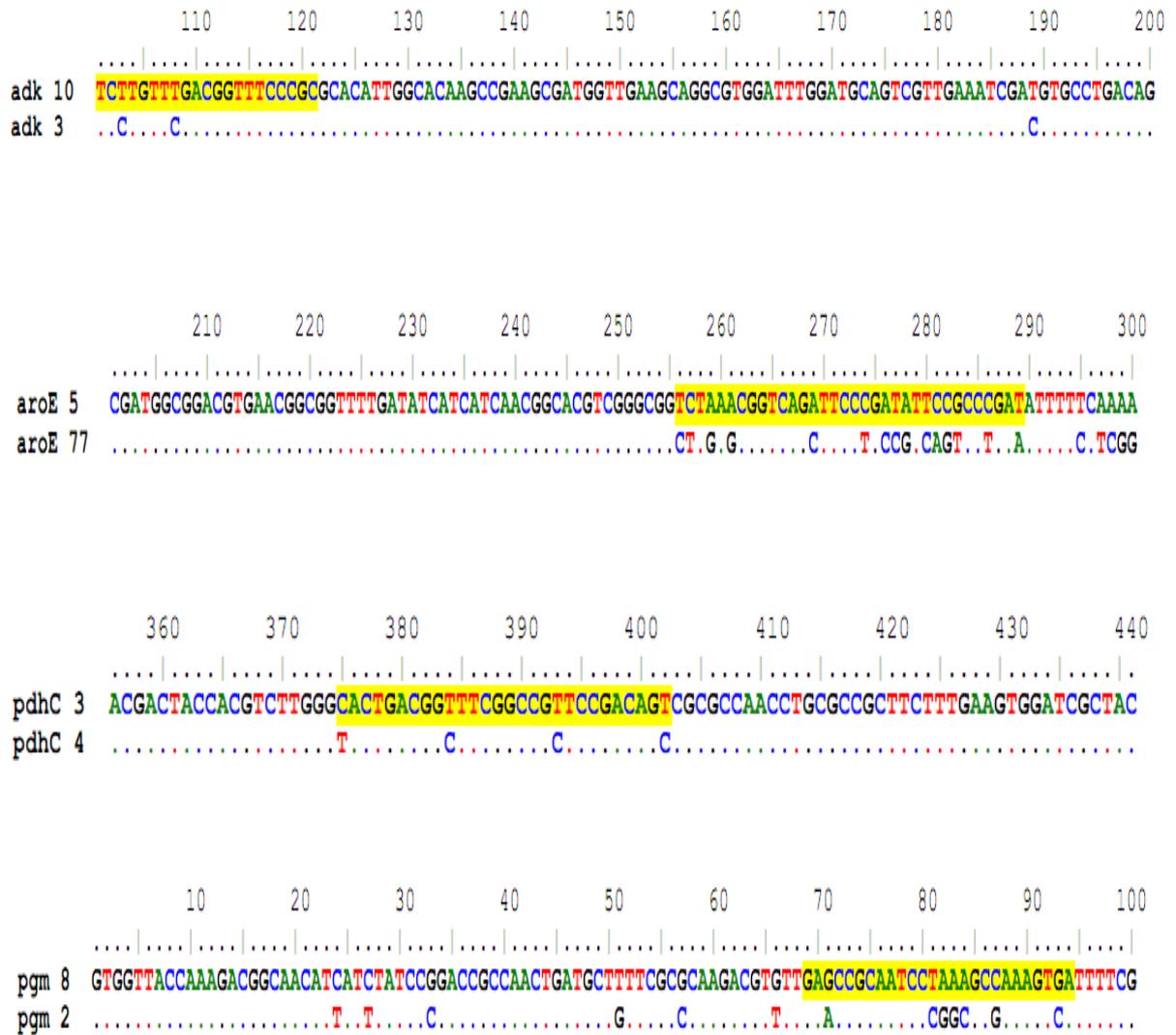
Complexos Clonais	Genes			
ST-103	<i>aroE</i> (83,8%)	<i>gdh</i> (81,1%)	<i>pdhC</i> (83,3%)	<i>pgm</i> (87,4%)
Alelo central	6 (70,3%)	5 (77,6%)	18 (77,3%)	2 (83,9%)
Alelo 2ário	9 (13,5%)	1 (3,5%)	6 (6%)	9 (3,5%)
ST-32/ET-5	<i>adk</i> (95%)	<i>aroE</i> (90,6%)	<i>pdhC</i> (91,4%)	<i>pgm</i> (90,8%)
Alelo central	10 (93,3%)	5 (85,7)	3 (90,3%)	8 (88,6%)
Alelo 2ário	3 (1,9%)	77 (5,14)	4 (1,1%)	2 (2,2%)
ST-11/ET-37	<i>abcZ</i> (95,4%)	<i>fumC</i> (93%)	<i>pdhC</i> (94%)	<i>pgm</i> (93%)
Alelo central	2 (95,4%)	3 (93%)	4 (94,1%)	6 (93,7%)
Alelo 2ário	8 (0,9%)	53 (1,2%)	110 (0,9%)	20 (0,9%)
ST-41/44	<i>adk</i> (89,1%)	<i>aroE</i> (80,6%)	<i>gdh</i> (80,2%)	<i>pdhC</i> (82,7%)
Alelo central	6 (86,4%)	9 (78,1%)	9 (74,3%)	6 (78,4%)
Alelo 2ário	7 (2,7%)	34 (2,5%)	11 (5,9%)	22 (4,3%)

5.3 DETERMINAÇÃO DAS ASSINATURAS GENÉTICAS

A determinação das assinaturas genéticas foi realizada utilizando o software *Bioedit*® com o qual alinhamos todos os alelos de cada gene selecionado para os complexos clonais estudados com o objetivo de determinar a melhor região para o desenho de iniciadores em regiões conservadas e da sonda na região do SNP ou polimorfismo que determina o alelo (“*hotspot*”). Duas regiões específicas dos dois alelos com maior porcentagem de frequência foram selecionadas. Esses alinhamentos são mostrados nas figuras abaixo.

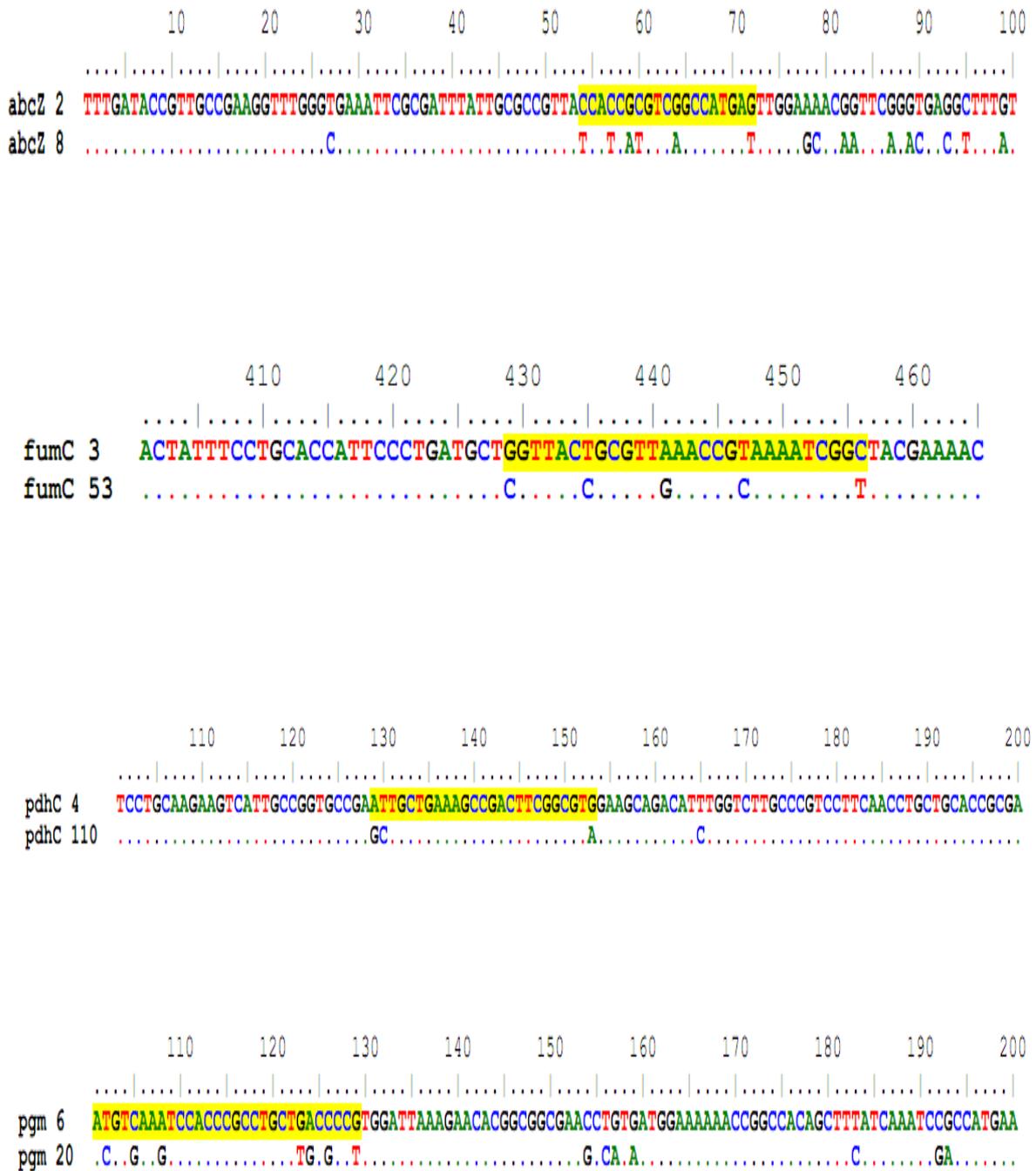
Alinhamentos dos alelos do complexo clonal ST-32:

Figura 3: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos genes *adk*, *aroE*, *pdhC* e *pgm*.



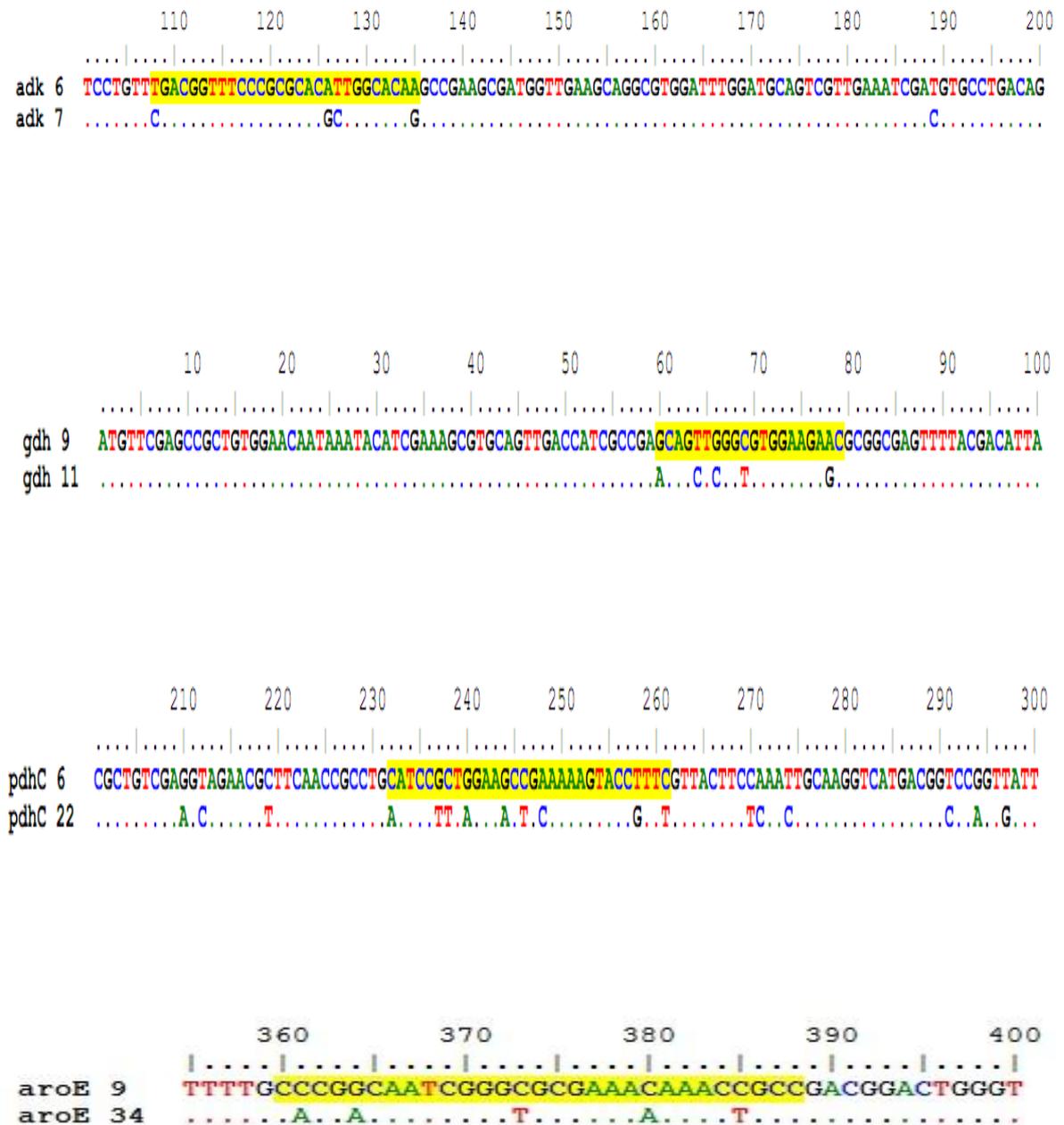
Alinhamentos dos alelos do complexo clonal ST-11:

Figura 5: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas do gene *abcZ*, *fumC*, *pdhC* e *pgm*.



Alinhamentos dos alelos do complexo clonal ST-41\44 :

Figura 6: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos genes *adk*, *gdh*, *pdhC* e *aroE*.

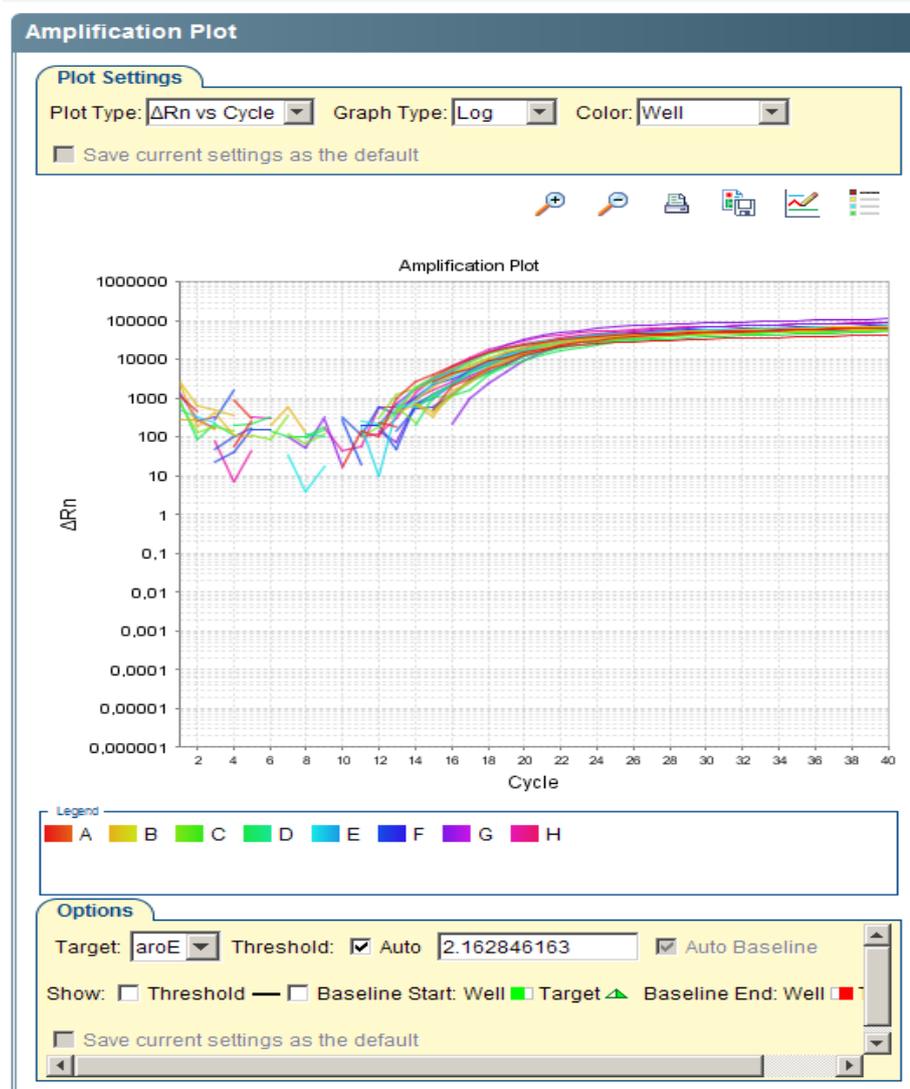


5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL

5.4.1 Verificação da melhor concentração dos iniciadores e sondas

A avaliação da melhor concentração para os iniciadores e sondas resultou na combinação de iniciadores a $3\mu\text{M}$ e sonda a $1\mu\text{M}$, apresentando C_t mais adequado (entre 18-25), maior ΔR_n e boa fase exponencial em todas as amostras testadas, sugerindo uma boa eficiência de reação, além da emissão de fluorescência sem ruídos.

Figura 7: Teste dos iniciadores na concentração de $3\mu\text{M}$ e sondas a $1\mu\text{M}$.

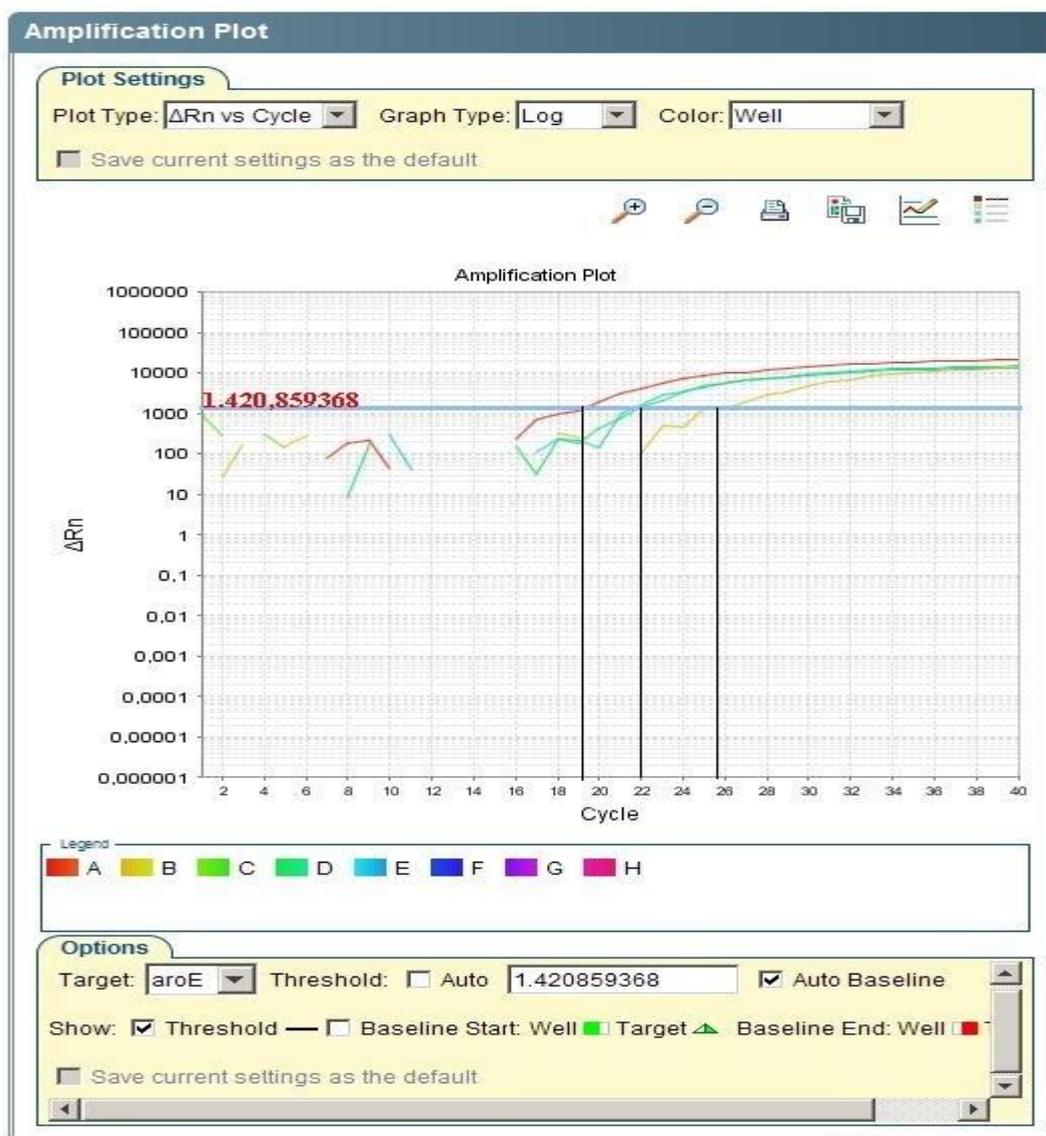


Reação de PCR em tempo real de cepas dos cc ST-103 e ST-32 com boa amplificação utilizando iniciadores e sondas nas concentrações de $3\mu\text{M}$ e $1\mu\text{M}$ respectivamente.

5.4.2 Determinação da eficiência dos Kits da qPCR

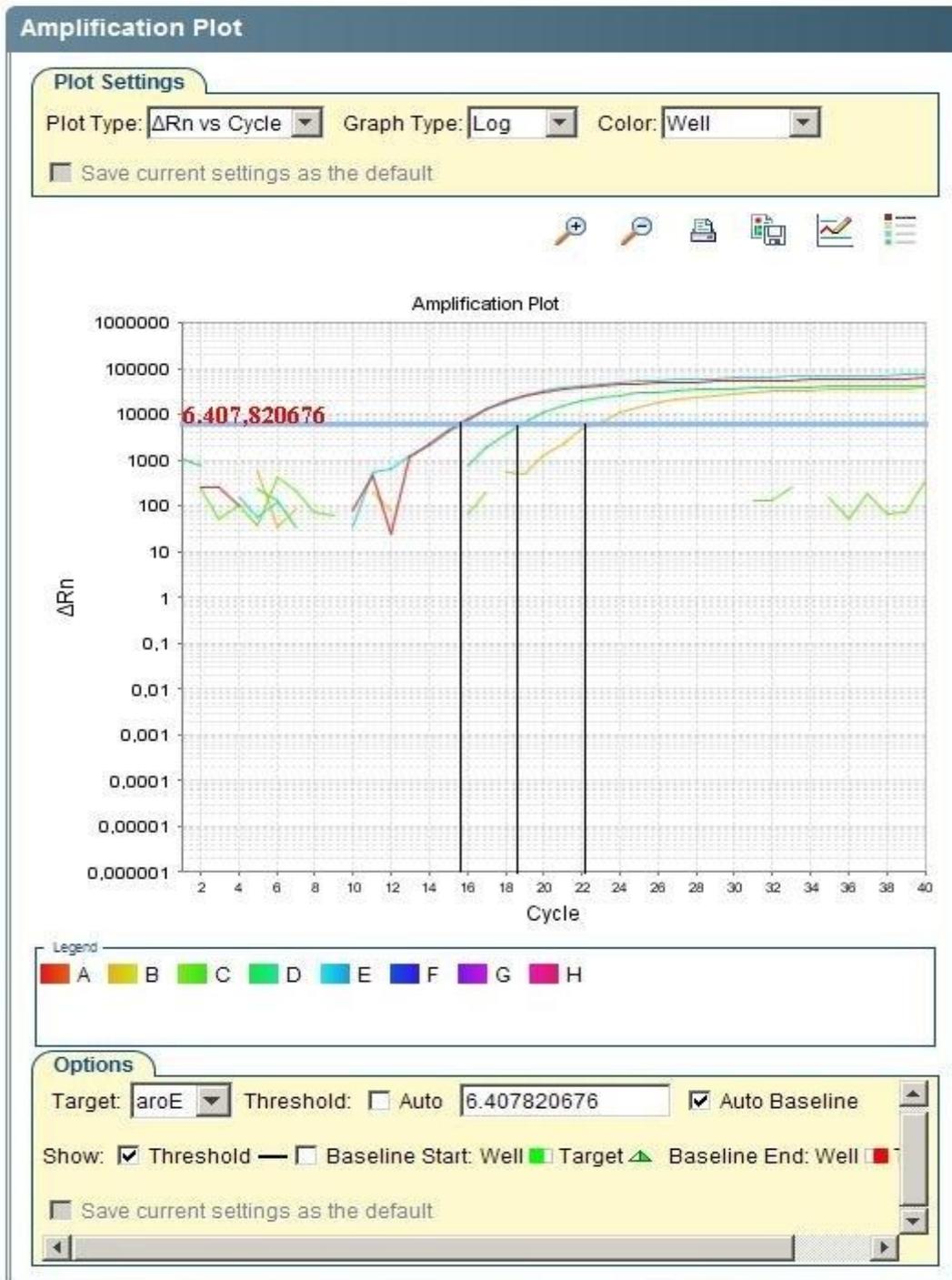
Foram utilizados os seguintes kits nas reações da qPCR: *JumpStarttmTaq ReadyMixtm* (SIGMA) e *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)* (THERMO). Estes foram comparados para analisar qual forneceria melhor eficiência na amplificação apresentando menor Ct entre as cepas testadas. Foram utilizados os iniciadores e sondas do gene *aroE* do cc103 e as cepas P3101, P3115 e P3145.

Figura 8: Threshold e ΔRn utilizando o kit *JumpStarttmTaq ReadyMixtm*.



Threshold e Ct de diferentes alelos de cepas utilizadas na comparação entre os Kits

Figura 9: Threshold e ΔRn utilizando o kit *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)*.



Comparação dos valores de Ct menores para as mesmas amostras da figura anterior utilizando o kit *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)*.

A comparação entre os kits testados resultou na escolha do *Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)* pois apresentou menor Ct nas cepas testadas quando comprado com o kit *JumpStarttmTaq ReadyMixtm*.

5.5 MODELO ESTATÍSTICO DE PROBABILIDADE

Para a comparação dos resultados obtidos pela PCR em tempo real com o MLST foi criado um modelo estatístico com base na porcentagem de frequência dos alelos primários e os alelos secundários a partir do valor n de isolados para cada complexo clonal (Tabelas 6,7,8 e 9). O número em porcentagem na última coluna se refere à probabilidade daquele padrão de ser o complexo clonal indicado. Se todos os alelos detectados correspondem ao alelo primário, a probabilidade daquela amostra pertencer ao cc indicado é sempre de 100% conforme determinado pelo método MLST. No entanto se um dos alelos detectados é o alelo secundário, a probabilidade pode variar de 76,2% até 85,3% de acordo com o total de número de amostras presentes no banco de dados.

Tabela 6: Probabilidade de determinação do cc ST-32.

<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	Probabilidade (%)
1	1	1	1	100
1	1	1	2	78,2
1	1	2	1	77,7
1	2	1	1	79,1
2	1	1	1	76,7

1= Detecção do alelo central; 2: Detecção do alelo secundário

Tabela 7: Probabilidade de determinação do cc ST-103.

<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	Probabilidade (%)
1	1	1	1	100
1	1	1	2	79,8
1	1	2	1	82,4
1	2	1	1	82,4
2	1	1	1	85,3

1= Detecção da sonda do alelo central; 2: Detecção da sonda do alelo secundário

Tabela 8: Probabilidade de determinação do cc ST-11.

<i>abcZ</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>pdhC</i>	Probabilidade (%)
1	1	1	1	100
1	1	1	2	76,6
1	1	2	1	76,8
1	2	1	1	76,4
2	1	1	1	76,2

1= Detecção da sonda do alelo central; 2: Detecção da sonda do alelo secundário

Tabela 9: Probabilidade de determinação do cc ST-41 a partir da detecção das sondas.

<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	Probabilidade (%)
1	1	1	1	100
1	1	1	2	81,8
1	1	2	1	83,5
1	2	1	1	82,0
2	1	1	1	78,9

1= Detecção da sonda do alelo central; 2: Detecção da sonda do alelo secundário

5.6 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA PCR EM TEMPO REAL COM O MLST

Após a determinação da melhor concentração dos iniciadores e o kit mais eficiente, as amostras foram testadas quanto à especificidade com as sondas dos alelos centrais e secundários para os genes escolhidos para seu complexo clonal correspondente determinado pelo MLST. A tabela10 apresenta os resultados obtidos no estudo quanto à sonda detectada, o resultado encontrado pelo MLST e a porcentagem de certeza para a classificação de seu complexo clonal do MLST, a partir da PCR em tempo real.

Tabela 10: Resultados da detecção dos alelos pela PCR em tempo real e comparação com o MLST.

Cepas	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>FumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	cc (MLST)	cc (RT-PCR)
P2634	n/a	3	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	75% ST-32
P2636	n/a	3	3	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	50% ST-32
P2638	n/a	3	3	n/a	n/a	1	2	ST-32/ET-5	ND
P2647	n/a	1	3	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	75% ST-32
P2653	n/a	1	1	n/a	n/a	3	3	ST-32/ET-5	50% ST-32
P2682	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P2684	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P2686	n/a	1	1	n/a	n/a	2	1	ST-32/ET-5	77,7% ST-32
P2706	n/a	1	1	n/a	n/a	2	1	ST-32/ET-5	77,7% ST-32
P2715	n/a	1	1	n/a	n/a	n/a	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3099	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3100	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3101	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3102	n/a	1	1	n/a	n/a	1e2	2	ST-32/ET-5	75% ST-32
P3103	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3104	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3105	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3106	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3107	n/a	1	1	n/a	n/a	1e2	1	ST-32/ET-5	75% ST-32
P3108	n/a	1e2	1e2	n/a	1e2	1	n/a	ST-41/44	ND
P3110	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32

P3111	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3112	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3113	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3114	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3115	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3118	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3119	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3120	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3121	n/a	n/a	1	n/a	1	1	3	ST-103	100% ST-103
P3122	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3123	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3124	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3126	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3127	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3128	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3129	n/a	n/a	1	n/a	1	1	3	ST-103	100% ST-103
P3130	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3131	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3133	n/a	n/a	1	n/a	1	1	3	ST-103	100% ST-103
P3134	n/a	n/a	1	n/a	1	1	3	ST-103	100% ST-103
P3136	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3137	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3138	n/a	n/a	1	n/a	1	1	3	ST-103	100% ST-103
P3139	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3140	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103

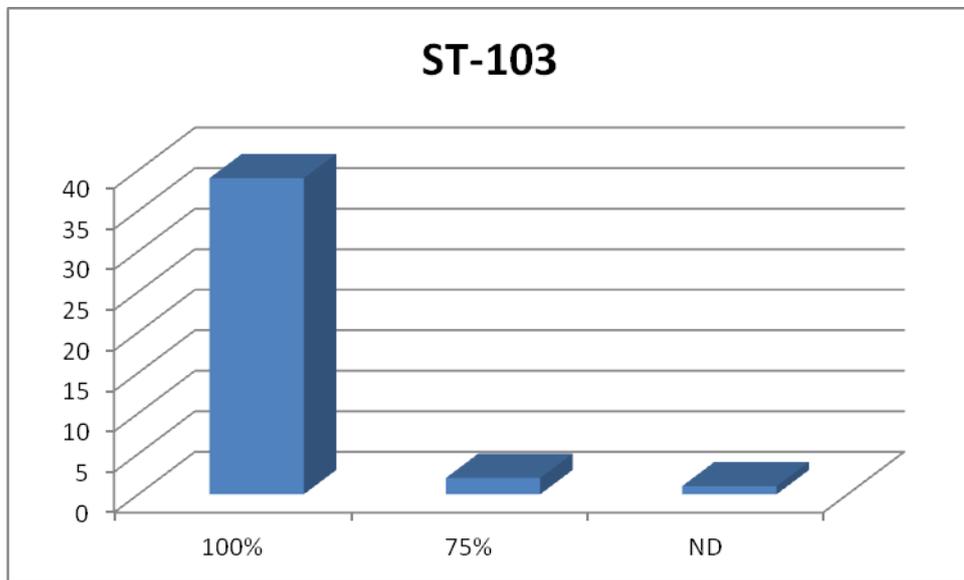
P3143	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3144	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3145	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3146	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3147	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3201	n/a	3	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	75% ST-32
P3202	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3203	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3282	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3283	n/a	n/a	1	n/a	1	1	3	ST-103	75% ST-103
P3285	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3286	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3289	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3290	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3292	n/a	n/a	2	n/a	1	1	3	ST-103	ND
P3293	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3294	1e2	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3295	n/a	1	1	n/a	n/a	1	2	ST-32/ET-5	78,2% ST-32
P3296	n/a	1	1	n/a	n/a	3	1	ST-32/ET-5	75% ST-32
P3297	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3298	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3299	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3301	n/a	1	1	n/a	n/a	1	2	ST-32/ET-5	78,2% ST-32
P3303	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1e2	1	ST-11/ET-37	ND
P3305	n/a	1e2	1e2	n/a	1e2	1	n/a	ST-41/44	ND

P3307	1	n/a	n/a	1e2	n/a	1	1	ST-11/ET-37	75% ST-11
P3309	n/a	1	1	n/a	n/a	3	1	ST-32/ET-5	75% ST-32
P3310	n/a	1	1	n/a	n/a	1e2	1	ST-32/ET-5	75% ST-32
P3312	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3331	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3362	n/a	1	1	n/a	n/a	1	1	ST-32/ET-5	100% ST-32
P3475	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3476	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3478	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3479	n/a	n/a	1	n/a	1	1	1	ST-103	100% ST-103
P3480	n/a	n/a	1	n/a	1	1	3	ST-103	75% ST-103

N/a = Não se aplica; 1= Sonda alelo central; 2= Sonda alelo Secundário; 3= Sem hibridização.

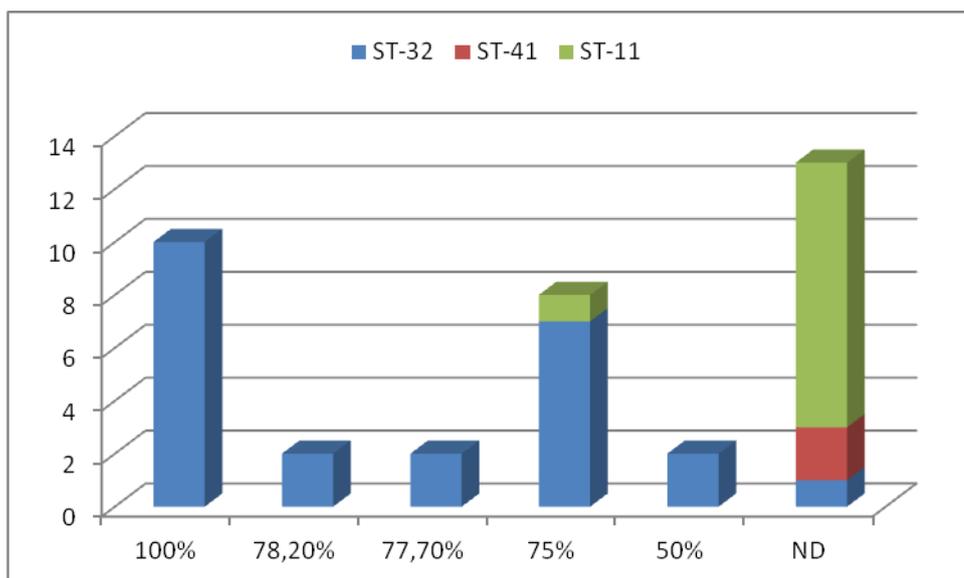
As figuras 10 e 11 ilustram resumidamente os resultados encontrados e expostos na tabela 10.

Figura 10: Número de cepas e probabilidade de caracterização do cc para as cepas do ST-103



ND= Não determinado

Figura 11: Número de cepas e probabilidade de caracterização do cc para as cepas do ST-32, ST-11 e ST-41



ND= Não determinado

5.7 DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS APRESENTADOS

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, foi verificado o Ct médio para cada amostra isolada e aplicado teste de desvio padrão a fim de avaliar a reprodutibilidade dos ensaios. O desvio padrão médio entre os Cts das duplicatas foi de 0,8. Considerado satisfatório para uma análise estritamente qualitativa.

6 DISCUSSÃO

A doença meningocócica (DM) é uma enfermidade aguda, grave, de evolução rápida com taxas de mortalidade de 15 a 20% que atinge principalmente as faixas etárias mais jovens. A DM está associada à colonização da nasofaringe de humanos, único hospedeiro, pela bactéria Gram negativa *Neisseria meningitidis*. A antibioticoterapia quando iniciada rapidamente melhora significativamente o prognóstico do paciente, porém o diagnóstico tardio da doença dificulta esta estratégia, a prevenção por vacinação é, portanto a melhor forma de controle da DM. A introdução de uma vacina eficaz requer o monitoramento da epidemiologia de cepas circulantes causadoras de surtos de DM. Atualmente, o MLST é considerado uma das estratégias mais sensíveis e confiáveis na tipificação molecular das cepas de *N. meningitidis*. No entanto, é um método laborioso cuja demanda de tempo e de custo são relativamente elevados, o que dificulta sua implementação em laboratórios públicos para monitorar a epidemiologia do meningococo.

Uma estratégia que poderia contornar este obstáculo seria a PCR em tempo real que em pouco tempo e a um custo menor forneceria o perfil de MLST de isolados com alta porcentagem de confiabilidade.

Os complexos clonais estão distribuídos entre os sorogrupos de uma maneira relativamente uniforme, isto é, cada sorogrupo apresenta complexos clonais específicos com maior frequência. No Brasil, os sorogrupos B e C são responsáveis por cerca de 94% dos casos de DM cujos complexos clonais mais frequentes estão demonstrados na Tabela 3, onde são apresentados também os complexos clonais desses mesmos sorogrupos em isolados em todo o mundo. Entre as cepas do sorogrupo B utilizadas em nosso estudo encontramos apenas o cc32. O cc41 foi encontrado entre algumas cepas do sorogrupo C e devido à sua importância epidemiológica dentro do sorogrupo B com 22,8% dos casos de DM, optamos por mantê-lo no quadro de detecção pela PCR em tempo real. O cc103 foi caracterizado em 2,1% dos isolados C no mundo, porém foi bastante frequente nas cepas C do nosso estudo. O cc ST-11, causador de numerosos surtos e epidemias nos Estados Unidos, Canadá e Europa (CAUGANT, et al 1998; WHALEN, et al, 1995), é responsável por 39% dos casos de DM pelo sorogrupo C em todo mundo, em nosso estudo foi o segundo complexo clonal mais frequente nesse sorogrupo.

No Brasil, 5 complexos clonais são responsáveis por cerca de 93% dos casos de DM invasiva dos sorogrupos B e C, o que confirmado por nossos resultados obtidos pelo MLST (Tabela 4; Figura 2). Dos 98 isolados analisados o ST-32 foi associado a 100% dos isolados do sorogrupo B. Para este sorogrupo no entanto, não foi encontrado o ST-41 descrito como cc característico do sorogrupo B em estudos realizados no Brasil no período entre 1988 e 2006 (De FILIPPIS, et al. 2012). Já os isolados do sorogrupo C, apresentaram os complexos clonais ST-41 (2%) ST-11 (13%) apenas em isolados da década de 90, este último cc tem sido caracterizado em isolados do sorogrupo C no estado de São Paulo desde 1976 (DE LEMOS et al, 2007). Com um total de 43 (50%) isolados nota-se um aumento significativo do ST-103 em cepas do sorogrupo C isoladas a partir do ano de 2001 em substituição ao ST-11, diversos estudos na região Sul e Sudeste do Brasil relatam esta emergência do cc ST-103 e o associam a contínua alta incidência de DM pelo sorogrupo C no Brasil (DE LEMOS, et al, 2007; BAETHGEN, et al, 2008.). Outras 11 cepas do sorogrupo C também apresentaram perfil alélico referente ao complexo clonal ST-32, característico do sorogrupo B. Esta alteração pode ser explicada pelo fenômeno de “*capsule switching*”, onde cepas do sorogrupo B sofrem uma modificação em sua estrutura polissacarídica onde o α -2,8, ácido *N*-acetilneuramínico é alterado para α -2,9 ácido *N*-acetilneuramínico por transferência horizontal de regiões do gene *siaD* responsável pela biosíntese da cápsula polissacarídica porém o seu perfil de MLST segue inalterado. Essa alteração capsular pode ser um importante mecanismo de virulência possibilitando o escape dessas cepas de vacinas polisacarídicas (SWARTLEY et al, 1997). Castiñeiras e colaboradores identificaram este fenômeno de “*capsule switching*” em isolados sorogrupo C do complexo clonal ST-32 no estado do Rio de Janeiro durante o período de 2000-2009. No sorogrupo C foram ainda encontradas 9 cepas do complexo clonal ST-8. Um isolado de 1996 e outro de 2002 foram relacionados aos complexos clonais ST-35 e ST-269, respectivamente. A baixa frequência do ST-35 pode ser explicado pelo fato de ter sido descrito como sendo um complexo clonal associado a isolados de portadores assintomáticos em um estudo realizado na República Tcheca, Grécia e Noruega (YAZDANKAH, et al. 2004). Esses resultados reiteram a importância epidemiológica dos complexos clonais ST-103, ST-32, ST-11 e ST-41 dentro do cenário da doença meningocócica e das cepas hipervirulentos no Brasil, pois representam 92,6% de todos os complexos clonais circulantes no país.

O estudo inicial para determinar os complexos clonais aqui descritos, trouxe outras informações epidemiológicas relevantes sobre a circulação dos cc no Brasil. Alguns isolados

do estado da Bahia, apresentam uma subvariante do complexo clonal ST-11 chamada ET-15 que foi descrita pela primeira vez em 1986 no Canadá e posteriormente em diferentes países da Europa e nos Estados Unidos, que consiste em uma mutação de um único nucleotídeo no gene *fumC* e que foi associada a surtos com altas taxas de letalidade (WHALEN et al., 1995; KRIZOVA et al., 1995; KACZMARSKI et al., 1997; KRESMASTINOU et al., 1999; GARNIER et al., 2011; JACKSON et al., 1995). Esse dado nos levou a procurar essa subvariante em outras cepas do mesmo estado e de outros estados do NE para determinar a prevalência dessa variante em um determinado período. Os resultados obtidos com as cepas disponibilizadas pelos LACENS dos estados de PE e BA, mostraram que a variante ET-15 apresentou maior ocorrência no período de 1996 a 2000 somente na Bahia quando o complexo clonal ST-11 era o mais frequente. A partir de 2000 o complexo ST-11 foi sendo substituído pelo ST-103 e a variante ET-15 não foi mais encontrada. Esses resultados foram submetidos para publicação em revista indexada (ANEXO B).

Apesar dos genes sequenciados pelo MLST serem constitutivos e também conhecidos como “*housekeeping genes*” e, portanto apresentarem uma taxa de mutação baixa, cada gene dentro do banco de dados possui de 424 a 675 alelos e uma taxa de 54-94% de sítios polimórficos específicos. O gene *abcZ* por exemplo com um fragmento de 433bp apresenta 53 sítios polimórficos que apresentam as 4 bases diferentes para alelos distintos, outros sítios polimórficos podem apresentar uma variação menor em número de bases, mas ainda definem novos alelos (JOLLEY & MAIDEN, 2013), (Figura 12). A ocorrência dessas mutações em determinadas regiões do gene constituem “assinaturas genéticas” ou “*hotspots*” que determinam um alelo específico permitindo o uso de sondas específicas para sua detecção. Apesar das assinaturas genéticas bem determinadas e a especificidade do método adotado, as sondas desenhadas para detectar essas assinaturas nos genes *fumC* e *pdhC* do complexo clonal ST-11 e as sondas para os genes *adk*, *aroE*, e *gdh* do complexo clonal ST-41 apresentaram inespecificidades. Os alelos possuem assinaturas específicas, no entanto as sondas para cada alelo amplificaram as duas assinaturas distintas. Essa inespecificidade pode ter ocorrido devido à presença de polimorfismos característicos das duas assinaturas genéticas. Outra hipótese poderia ser a temperatura de anelamento da reação muito baixa o que poderia favorecer a hibridização da sondas em regiões inespecíficas. O aumento da temperatura de anelamento das reações eliminou essa inespecificidade em alguns isolados. Todas as outras sondas para os genes dos demais complexos clonais apresentaram alta especificidade (tabela10).

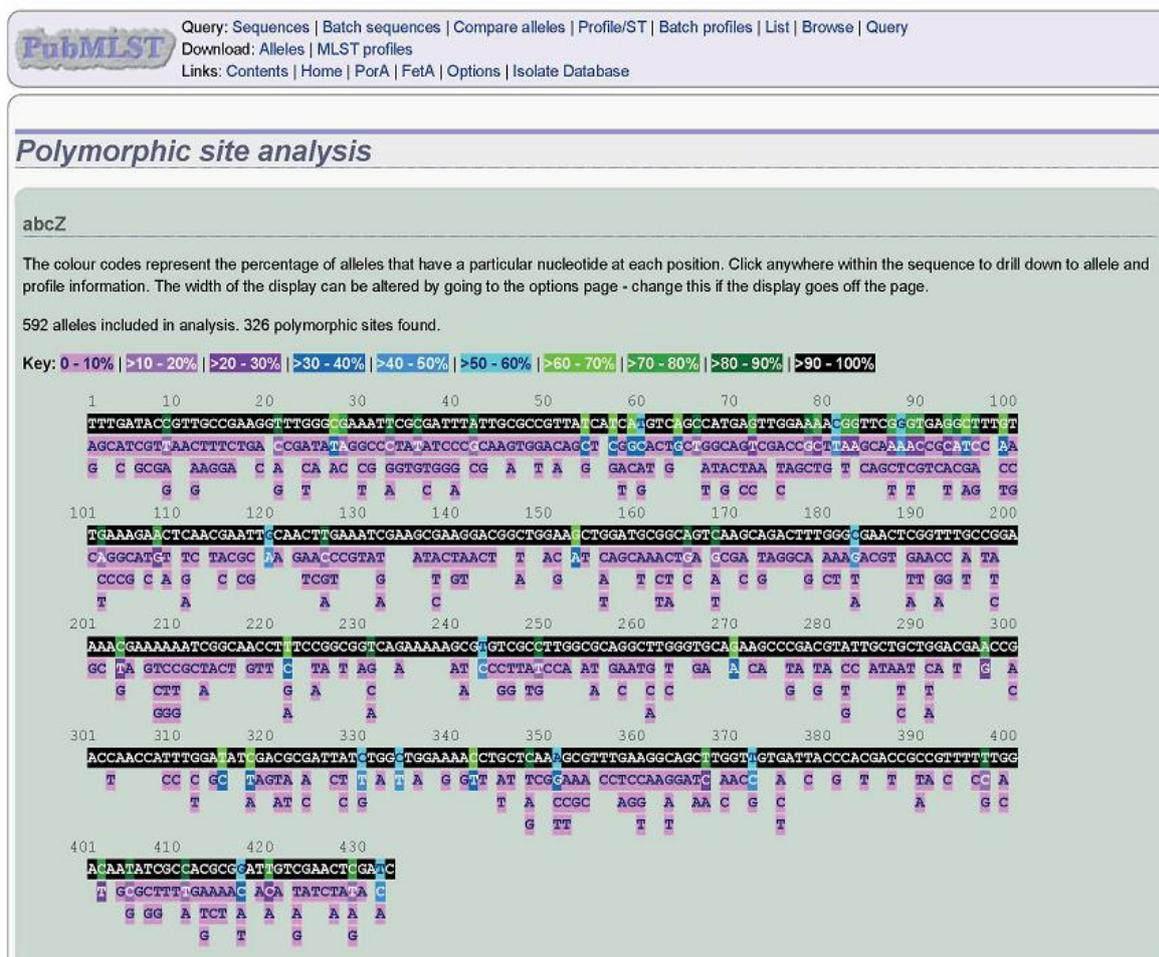
Apesar de não haver na literatura referências do uso desse método para tipificação molecular de *Neisseria meningitidis*, Shabat e colaboradores (2010) utilizaram a detecção de SNPs pela PCR em tempo real para avaliação de resistência à fluoroquinolona em *Mycoplasma bovis*, a fim de validar um método com menor consumo de tempo e padronização operacional. O sequenciamento do produto da PCR detectou uma mutação pontual no gene *parC* que modificava o sítio de reconhecimento da droga levando à resistência. O desenho de sondas apropriadas e a padronização da técnica de SNPs na PCR em tempo real mostraram-se um método seguro, rápido e de fácil execução que auxilia tanto na vigilância epidemiológica quanto na discussão sobre as formas de tratamento a enfermidades causadas por *Mycoplasma bovis*.

Outro estudo utilizou a PCR em tempo real para investigação de resistência antimicrobiana em *Neisseria gonorrhoeae* com a finalidade de contornar os custos e consumo de tempo do sequenciamento realizado pelo MLST. A análise sequencial selecionou 14 SNPs entre os 7 genes do MLST de 86 isolados e foram realizados ensaios de PCR *High Resolution Melting* (HRM), concluindo que a abordagem do perfil de SNPs seria uma alternativa simples e efetiva, e poderia ser utilizada como complemento para esquemas de tipificação para *Neisseria gonorrhoeae* (WHILEY et al., 2013).

As sondas desenhadas para a detecção do cc ST-103 apresentaram boa especificidade caracterizando 39 isolados como pertencentes ao complexo clonal ST-103 concordando em 100% com os resultados obtidos pelo MLST. Além disso, a PCR em tempo real caracterizou outros 2 isolados como integrantes do cc ST-103 com probabilidade de 75% e 1 isolado não pode ser detectado por esta abordagem. As sondas desenhadas para este complexo clonal mostraram-se específicas e de rápida detecção para o cc ST-103 que vem causando grandes surtos de DM pelo sorogrupo C no Brasil nos últimos anos. Outros 11 isolados foram caracterizados como cc ST-32 com 100% de concordância com o MLST e outros 12 isolados apresentaram grande probabilidade de pertencer a este complexo clonal com porcentagens de 78,2; 77,7 e 75% pela PCR em tempo real e apenas 3 isolados apresentaram resultados com probabilidade abaixo de 75%. Os complexos clonais ST-11 e ST-41 apresentaram ampliações com as duas sondas sinalizando a presença de inespecificidades das mesmas e a necessidade de uma melhor avaliação quanto à escolha das “assinaturas genéticas” para desenho de sondas mais específicas para a detecção destes complexos clonais como no caso dos complexos clonais ST-103 e ST-32.

Neste estudo, nós descrevemos e avaliamos um novo *Taqman*® SNP PCR em tempo real para a tipificação de complexos clonais de *Neisseria meningitidis* circulantes no Brasil, até então não encontrado na literatura. Embora preliminares, nossos resultados podem ser considerados promissores na detecção rápida e segura de complexos clonais, além de um custo menor que aquela necessária para o MLST. Por outro lado, em eventuais falhas na detecção pela PCR em tempo real as cepas poderão ser descartadas como pertencentes aos principais complexos clonais circulantes, ou ser submetidas posteriormente ao MLST convencional com seqüenciamento direto dos 7 genes. Ainda assim, a metodologia aqui proposta trará vantagens, pois reduzirá muito o número de amostras a serem seqüenciadas e informaria à vigilância epidemiológica rapidamente os complexos clonais hipervirulentos circulantes.

Figura 12: Esquema de um dos alelos do gene *abcZ* do MLST de *N. meningitidis*, apresentando a posição e o número dos sítios polimórficos conhecidos (ref).



Nova ferramenta que auxilia e facilita a procura de “assinaturas genéticas” para desenho de sondas.

7 CONCLUSÕES

- O complexo clonal ST-32/ET-5 há mais de 20 anos, continua sendo o cc predominante entre as cepas do sorogrupo B.
- O complexo clonal ST-103 vem substituindo o ST-11/ET-37 nos últimos 12 anos e hoje predomina como causador dos grandes surtos de DM causados pelo sorogrupo C. A especificidade das sondas para a detecção das “assinaturas genéticas” características dos genes dos complexos clonais ST-103 e ST-32/ET-5 apresentou resultado seguro e eficiente, com 100% de caracterização em 72% dos isolados somando estes dois cc.
- Apesar da eficiência do método, estudos complementares são necessários para uma detecção mais eficiente dos complexos clonais ST-11/ET-37 e ST-41/44 lineage 3.
- A PCR em tempo real qualitativa através do método *Taqman*® mostrou ser um método rápido e de menor custo quando comparado com o método de MLST, no auxílio a estudos epidemiológicos para controle de surtos regionais, podendo ser aplicado em laboratórios regionais de referência para vigilância epidemiológica.

8 PERSPECTIVAS

Adicionalmente ao estudo realizado utilizando a tecnologia Taqman[®], tivemos a oportunidade de testar a metodologia HRM (*High Resolution Melting*) no aparelho *RotorGene Q* da Qiagen. Essa metodologia consiste em detectar variações de temperatura de até 0,2 °C no T_m de diferentes fragmentos amplificados por uma reação de PCR convencional, pela emissão de fluorescência através de um corante intercalante de DNA. As diferenças de T_m detectadas entre duas ou mais amostras, são plotadas em forma de curvas, onde o início do "*melting*" ou abertura das fitas depende de seu T_m. Assim, duas fitas que tenham apenas um sítio polimórfico, irão apresentar curvas diferentes, pois as aberturas das fitas ocorrerão em tempos disintos por causa dos diferentes T_m. Dessa forma podemos determinar a curva dos alelos "padrões" de um ou mais complexos clonais e compará-las com amostras desconhecidas. Por ser uma detecção de alta resolução, seria possível se determinar padrões para vários cc. Além disso, a reação utiliza um Master Mix com o agente intercalante *EvaGreen*[®], apresenta custo mais baixo que as sondas do sistema *Taqman*[®]. No único experimento realizado, obtivemos um resultado interessante com amostras pertencentes ao cc ST-103 onde foi possível detectar a diferença entre os dois alelos quando submetidos ao sistema HRM de acordo com a figura no ANEXO B, onde a cepa P3127 alelo 6 (central) para o gene *aroE* e a cepa P3143 alelo 9 (secundário) foram utilizados como padrão para caracterização da cepa P3290 com alelo desconhecido. O HRM caracterizou esta cepa como alelo 6 para o gene *aroE*, com alto grau de confiabilidade (Confidence Threshold = 90%).

Nossa perspectiva é de continuar os estudos no desenvolvimento dessa metodologia tanto com o sistema *Taqman*[®] quanto com o HRM para determinar qual o melhor em termos de especificidade, sensibilidade e custo para possível implantação em laboratórios de referência em vigilância epidemiológica, não só para o monitoramento de DM, mas podendo também ser aplicado a outros agentes etiológicos. Os resultados obtidos nesse estudo serão submetidos para publicação.

REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M. et al. Molecular epidemiology of serogroup A meningitidis in Moscow. **Emerg. Infect. Disease**. v. 7, p.420-427. 2001.

BAETHGEN, L.F.; et al. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. **Trop. Med. Int. Health**. v. 13, n. 1, p. 31-30, 2008.

Boletim epidemiológico SINAN/SVS/MS, 2009

BRICKS, L. F. Doenças meningocócicas - morbidade e epidemiologia nos últimos 20 anos: revisão. **Pediatria**; v. 24, n. 3/4, p. 122-31, 2002.

CARVALHANAS, T. R. M. P. Meningites Bacterianas. **Rev. Prática Hospitalar**. São Paulo, v. 7, n. 38, mar/abr 2005.

CAUGANT, D.A. Population genetics and molecular epidemiology of *N. meningitidis*. **APMIS**. v. 106, p. 505-525. 1998

CDC: Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Center for control disease and prevention, 1998. Disponível em: <<http://www.cdc.org>>

CLARKE, S.C.; DIGGLE, M.A.; EDWARDS, G.F. Semiautomation of multilocus sequence typing for the characterization of clinical isolates of *Neisseria meningitidis*. **J. Med. Microbiol**. v. 39, p. 3066-3071. 2001

DE FILIPPIS, I.; VICENTE, A.C. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. v. 53, n. 3, p. 161-167, 2005

DE FILIPPIS, I. The quest for a broad vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup B: implications of genetic variations of surface-exposed proteins. **J. Med. Microbiol**. v. 58, p. 1127-1132, 2009.

DE FILIPPIS, I. et al. Molecular Epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup B in Brazil. **PLoS One**. v. 7, n. 7, p. e33016, 2012.

DE LEMOS, AP. et al. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. **J Clin Microbiol**. v. 45, n. 4, p. 1266-1273, 2007.

DOENÇAS Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. v. 1, p. 117.

ENRIGHT, M.C.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol.** v. 7, p. 482-487. 1999.

ESPY, M.J. et al. Real Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. **Clin. Microbiol. Rev.** v.19, p.593-595. 2006

FEAVERS, I.M. et al. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. **Journal Clinical Microbiol.** v. 37, p. 3883-3887. 1999.

FROSCH, M. et al. Conserved outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* involved in capsular expression. **Infection and Immunity.** v. 60, n. 3, p.798-803. 1992.

GARNIER, F. et al. Emergence of 2 *Neisseria meningitidis* serogroup C clones in a French county. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v. 69, n. 3, p. 280-2. 2011.

GIULIANI, M.M.; et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 103, n. 29, p. 10834-9. 2006

HALL T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95\98\NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** v.41, p. 95-98

JACKSON, L.A. et al. Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States. An emerging threat. *JAMA.* 1995. v. 273, n. 5, p. 383-9.

JANDA, W.M. & KNAPP J.S. *Neisseria* and *Moxarella catarrhalis*. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** Washington: American Society for Microbiology, 2010. v. 1, p. 585-608.

JATON, K. et al. False-negative PCR result due to gene polymorphism: the example of *Neisseria meningitidis*. **J. Clinical Microbiology.** v. 48, n. 12, p. 4590-1, 2010.

JELFS, J. et al. Sequence variation in the *porA* gene of a clone of *Neisseria meningitidis* during epidemic spread. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 7, n. 3, p. 390-5. 2000

JELFS, J. et al. Genetic characterization of a new variant within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis* associated with outbreaks in various parts of the world. **Epidemiol. Infect.** v.125, n. 2, p. 285-98. 2000

JESSOUROUN, E. et al. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. **Vaccine.** v. 22, n. 20, p. 2617-25. 2004

JODAR, L. et al. Development of vaccines against meningococcal disease. **Lancet.** v. 359, n. 9316, p. 1499-508. 2002

- JOLLEY, K.; MAIDEN, M. Automated extraction of typing information of bacterial pathogens from whole genome sequence data: *Neisseria meningitidis* as an exemplar. **Euro Surveill.** v.8, n. 4. p. 20379, 2013.
- KREMASTINO, J. et al. Recent emergence of serogroup C meningococcal disease in Greece. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 23, n. 1, p. 49-55, 1999.
- KRIZOVA, P., AND M. MUSILEK.. Changing epidemiology of meningococcal invasive disease in the Czech republic cause by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a: P1.2(P1.5), ET-15/37. **Cent. Eur. J. Public Health.** v. 3, p. 189–194, 1995
- KACZMARSKI E.B. Meningococcal disease in England and Wales: 1995. **Commun Dis Rep CDR Rev.** v. 7, n. 4, p. R55-9, 1997.
- LIONEL, K.K. et al. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. **The New England Journal of Medicine;** v. 362, p.1511-1520, 2010.
- MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde (FUNASA). **Manual para o Diagnóstico Laboratorial das Meningites Bacterianas.** Manual de orientação: Brasília: COMEM/ASPLAN/FNS, p.66. 2000.
- PARASHAR, D.; CHAUCHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; KATOCH, V.M. Applications of Real Time PCR technology to mycobacterial research. **Indian. J. Med. Res.** v. 4, p. 385-98. 2007.
- PAVÓN, A.B. et al. Epidemiology, molecular characterization and antibiotic resistance of *Neisseria meningitidis* from patients ≤ 15 years in Manhica, rural Mozambique. **PloS One.** v. 6, p. 6, n. 319717. 2011.
- PERKINS, M.D.; MIRRET, S.; SELLET, L.B. Rapid bacterial antigen detection is not clinical useful. **J. Clinical Microbiology.** v. 33, n. 6, p. 1486-1491. 1995.
- PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidate against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science;** v. 287, n. 5459, p. 1816-1820, 2000.
- ROSENSTEIN, N.E. et al. Meningococcal disease. **The New England Journal of Medicine.** v.18, p. 1378-1388. 2001.
- SCHRYVERS, A.B.; STOJILJKOVIC, I. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. **Molecular Microbiology;** v.32, n. 6, p.1117-1123, 1999.
- SÁFADI, M.A.; BARROS, A.P. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. **J. Pediatr.;** v. 82, n. 3 Suppl, p.35-44, 2006.
- SELANDER, R.K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **App. Environ. Microbiol.** v. 51, n. 873-84, 1986.

SCHELD, W.M.; WENGER, J.D.; SOUZA, A.Q. Meningococcal infections. In: GUENAT, R.L.; WALTER, D.H.; WELLER, P.F. **Tropical infections diseases principles, pathogens and practice**. [s.l.]: Churchill Livingstone, 1999. v.1, cap 30, p.365-380.

SHABAT, B.M. et al. Development and evaluation of a novel single-nucleotide-polymorphism real-time PCR assay for rapid detection of fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma bovis*. **J Clin Microbiol**. v. 48, n. 8, p. 2909-15. 2010.

STEPHENS, D.S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **J. Vaccine**. v. 27, n. 2, p. 71-77. 2009

STEPHENS, D.S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. **Lancet**. v. 369, n. 9580, p. 2196-210. 2007

SWARTLEY, J. S. et al. Capsule Switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc Nat Acad Sci U S A**. v. 94, n. 1, p. 271-276. 1997.

TAKAHASHI, H. et al. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing. **J. Med. Microbiol**. v. 53, p. 657-662. 2004.

THOMPSON, E.A.; FEAVERS, I.M.; MAIDEN, M.C. Antigenic Diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. **Microbiology**. v. 149, pt 7, p. 1849-58. 2003.

TSANG, R.S. et al. Phenotypic and genetic characterization of a unique variant of serogroup C ET-15 meningococci (with the antigenic formula C:2a:P1.7,1) causing invasive meningococcal disease in Quebec, Canada. **J. Clin. Microbiol**. v. 42, n. 4, p. 1460-5, 2004

TYLER, S.; TSANG, R. Genetic analysis of Canadian isolates of C:2a:P1.2,5 and B:2a:P1.2,5 *Neisseria meningitidis* strains belonging to the hypervirulent clone of ET-15. **Can. J. Microbiol**. v. 50, n. 6, p. 433-43, 2004.

UNKMEIR, A. et al. Lipooligosaccharide and Polysaccharide capsule: Virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determinate Meningococcal interection with human dendriect cells. **Infect. Immun**. v.70, p. 2454-2462, 2002.

URWIN, R., RUSSEL, J.E., THOMSON, E.A. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococcal: implications for vaccine design. **Infect.Immun**. v. 72, n. 10, p. 5955-5962, 2004.

VOGEL, U.; CLAUS, H.; FROSC, M.; CAUGANT, D.A. Molecular basis for distinction of the ET-15 clone within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol**. v. 38, n. 2, p. 941-2. 2000.

WHALEN CM, HOCKIN JC, RYAN A, ASHTON F. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. **JAMA**. v. 273, n. 5, p. 390-4. 1995.

WHILEY, D.M. et al. Real-Time PCR genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using 14 informative single nucleotide polymorphisms on gonococcal housekeeping genes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, n. 2, p. 322-8. 2013

WHO. **Control of epidemic meningococcal disease: WHO practical guidelines.** 2. ed. Washington, 2003.

WILDER-SMITH, A. Meningococcal disease: Risk for international travellers and vaccine strategies. **Travel Medicine and Infectious Disease**; v. 6, p. 182–186, 2008.

YASDANKHAH, S.P. et al. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from Czech, Greece and Norway. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, n. 11, p. 5156-53. 2004.

ZHANG, X. et al. Genetic Characteristics of serogroup A meningococci circulating in China, 1956-2005. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 14, n. 6, p. 555-61. 2008.

ANEXO A

Artigo aceito para publicação na *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*

Elsevier Editorial System(tm) for Diagnostic
Microbiology and Infectious Disease
Manuscript Draft

Manuscript Number: DMID-13-149

Title: Replacement of Neisseria meningitidis C cc11/ET-15 variant by a cc103 hypervirulent clone, Brazil 2005-2011.

Article Type: Note

Keywords: Neisseria meningitidis C, Meningococcal disease, MLST, Hypervirulent clone, Brazil.

Corresponding Author: Dr. Ivano de Filippis, PhD

Corresponding Author's Institution: Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saude, Rio de Janeiro, Brasil

First Author: Guilherme G Sardinha, MSc

Order of Authors: Guilherme G Sardinha, MSc; Soraia M Cordeiro, PhD; Erica D Gomes, Nurse; Cinthia S Romanelli, MSc; Claudia F Andrade, Biologist; Joice Reis, PhD; Ivano de filippis, PhD

Abstract: Outbreaks caused by serogroup C meningococci in the North-East region of Brazil from 2005 to 2011 were associated to the emergence of variant ET-15 of cc11 which has been replaced by cc103 from 2006 to date. Possible vaccine selection of cc103 should be closely monitored specially because of the presence of strains with reduced susceptibility to antibiotics.

Your Submission

ees.dmid.0.208c12.b761fca7@eesmail.elsevier.com em nome de Diagn Microbiol Infect Dis [dmid@jmilabs.com]

Enviado: domingo, 14 de abril de 2013 15:55

Para: Ivano R V de Filippis Capasso

Ms. Ref. No.: DMID-13-149R1

Title: Replacement of Neisseria meningitidis C cc11/ET-15 variant by a cc103 hypervirulent clone, Brazil 2005-2011.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Dear ivano,

I wish to confirm acceptance your paper "Replacement of Neisseria meningitidis C cc11/ET-15 variant by a cc103 hypervirulent clone, Brazil 2005-2011." in Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.

The editors and staff of Diagnostic Microbiology and Infectious Disease wish to thank you for submitting this manuscript. Please consider the journal in the future for the publication of your excellent work in this field.

With kind regards,

Mariana Castanheira, PhD
Associate Editor
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

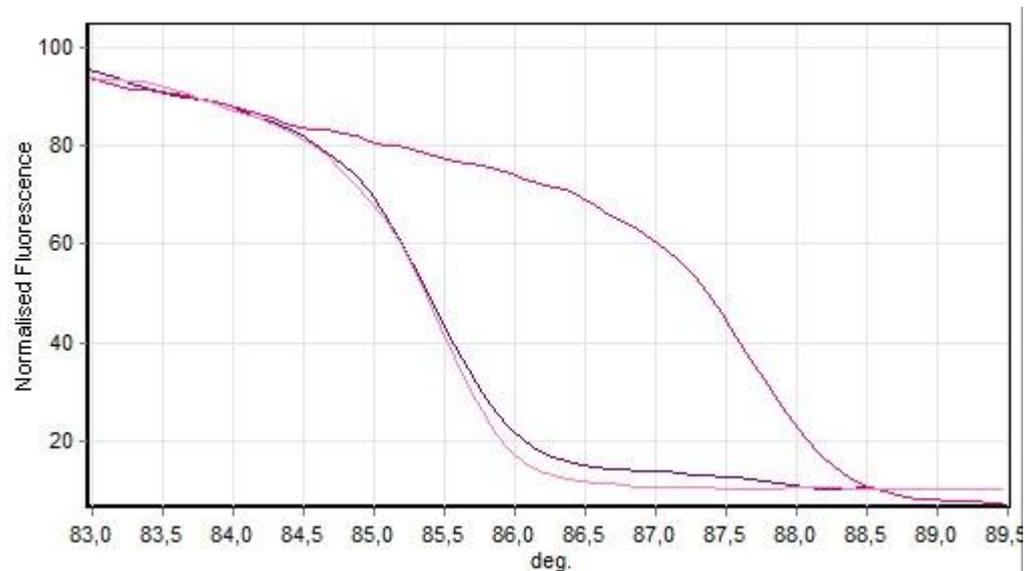
ANEXO B

HRM Report

HRM Analysis Information

Confidence Threshold	% 90
Normalisation Region 1	82.97-84.47
Normalisation Region 2	88.04-89.54
Sample Page	Page 1

Normalised Graph for HRM A.HRM



No.	Colour	Name	Genotype
1	■	aroE P3143	Alelo 9
2	■	aroE P3127	Alelo 6
3	■	aroE P3290	Desconhecido