

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

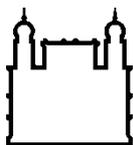
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical

**TIPAGEM MOLECULAR DE *Neisseria meningitidis* E INVESTIGAÇÃO
DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO AMAZONAS, 2000 A 2010**

LUCIETE ALMEIDA SILVA

Rio de Janeiro
2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical

TIPAGEM MOLECULAR DE *Neisseria meningitidis* E INVESTIGAÇÃO DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO AMAZONAS, 2000 A 2010

Luciete Almeida Silva

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical (área de concentração Diagnóstico, Epidemiologia e Controle).

ORIENTADORES: Prof. Dr. David Eduardo Barroso

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho-Costa

RIO DE JANEIRO

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Luciete Almeida

Tipagem molecular de *Neisseria meningitidis* e investigação da
doença meningocócica no Amazonas, 2000 a 2010 / Luciete Almeida
Silva. – Rio de Janeiro, 2016.

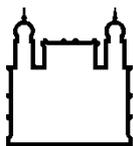
xvi, 76 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2016.

Bibliografia: f. 63-72

1. Doença meningocócica. 2. Tipagem molecular. 3. Amazonas. I.
Título.

CDD 616.82



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical

TIPAGEM MOLECULAR DE *Neisseria meningitidis* E INVESTIGAÇÃO DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO AMAZONAS, 2000 A 2010

Luciete Almeida Silva

ORIENTADORES: Prof. Dr. David Eduardo Barroso
Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho-Costa

Aprovada em: 03/05/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Márcio Neves Boia – IOC/FIOCRUZ (Revisor e Presidente da banca)
Prof. Dra. Ilana Teruszkin Balassiano (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Paulo Feijó Barroso (UFRJ/RJ)
Prof. Dra. Marise Dutra Asensi (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos (IOC/FIOCRUZ)

SUPLENTE

Prof. Dra. Cristiane da Cruz Lamas (INI/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 03 de maio de 2016



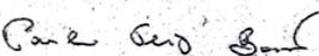
Ministério da Saúde

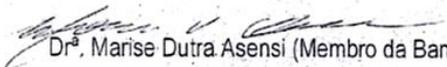
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Luciete Almeida Silva**, sob orientação do Dr. David Eduardo Barroso e Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa. Ao terceiro dia do mês de maio de dois mil e dezesseis, realizou-se às nove horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **"Tipagem molecular de *Neisseria meningitidis* e investigação da doença meningocócica no Amazonas, 2000 a 2010"** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Márcio Neves Bóia - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Ilana Teruszkin Balassiano - IOC/FIOCRUZ; Dr. Paulo Feijó Barroso - UFRJ/RJ; Dr^a. Marise Dutra Asensi - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Elba Regina Sampaio de Lemos - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Cristiane da Cruz Lamas - INI/Fiocruz e Dr. Marcio Galvão Pavan - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 03 de maio de 2016.

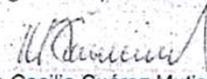

Dr. Márcio Neves Bóia (Presidente da Banca):


Dr^a. Ilana Teruszkin Balassiano (Membro da Banca):


Dr. Paulo Feijó Barroso (Membro da Banca):


Dr^a. Marise Dutra Asensi (Membro da Banca):


Dr^a. Elba Regina Sampaio de Lemos (Membro da Banca):


Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):


Martha C. Suárez Mutis
SIAPE 1556844
COORDENADORA PG MEDICINA TROPICAL
IOC

conferir com o original
13/05/2016

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha amada e querida Mãe Dona Lindalva Almeida Silva, (*in memoriam*), aquela que me ensinou o verdadeiro sentido do amor em família. Mãe a despedida e enorme a saudade é tamanha, mas o meu carinho e amor por você terá sempre a capacidade de alcançar as grandes conquistas, dedico essa força a você, meu amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar nessa caminhada através da sua luz divina, sempre me abençoando, me dando força para superar as dificuldades, as alegrias, as tristezas e a vitória de estar aqui neste momento.

Sempre se é feliz quando se tem uma boa família. Eu não seria tão feliz se eu não tivesse a minha, obrigada família.

Aos meus orientadores Dr. David Eduardo Barroso e Dr. Felipe Aníbal Carvalho-Costa, do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, pela dedicação dispensada para o desenvolvimento do projeto de pesquisa e da elaboração final da tese.

Ao Dr. Roberto Sena, ex-Diretor do Instituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Amazonas, pelo incentivo indispensável para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz, Diretor do Instituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Amazonas, pelo convívio que fez crescer e aprimorar a minha visão científica.

Ao Dr. Bernardino Cláudio de Albuquerque, Diretor da Fundação de Vigilância em Saúde, da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SUSAM), pelo apoio fundamental para o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Felipe Naveca, vice-diretor de pesquisa, e Víctor C. de Souza, Responsável Técnico da Plataforma de Genômica, do Instituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Amazonas, pelo suporte técnico para a genotipagem das bactérias de interesse.

Não poderia deixar de agradecer ao Prof. Lee H. Harrison, a Profa. Jane Marsh, a Sra. Jessica Schlackman e a Sra. Chinelo Ezeonwuka, Infectious Diseases Epidemiology Research Unit, University of Pittsburgh School of Medicine and Graduate School of Public Health, Pittsburgh, USA, pelo auxílio técnico e financeiro (Fogarty International Center Global Infectious Diseases Research Training Program grant, National Institutes of Health, to the

University of Pittsburgh [D43TW006592]) para a execução da genotipagem.

Aos colegas Alcirema Amaral, Alfredo Augusto Braga Vieira de Aguiar Filho, Adelaide da Silva Nascimento, Diana Felícia de Araujo Margarido, Andreia de Fátima Lima Santos, Ana Alzira Cabrinha, Antônio Alcirley da Silva Balieiro e Patrícia Carvalho da Silva Balieiro, da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SUSAM), pelo auxílio na coleta dos dados secundários.

Tenho a satisfação de agradecer à Diretora do Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (LACEN/AM), Tírza Peixoto Mattos, e da Responsável pelo Setor de Bacteriologia, Ana Lúcia Stone de Souza, pela cessão das amostras de *Neisseria meningitidis* deste estudo.

À Mônica de A. F. M. Magalhães e Gabrielle da Silva Pereira, do Laboratório de Geoprocessamento (LabGeo) do Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica (ICICT), FIOCRUZ, pelo trabalho de geoprocessamento.

À Dra. Ana Paula de Lemos, Dra. Tania Sueli de Andrade e toda a equipe do Setor de Bacteriologia e de Coleção de Culturas, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, pelo fornecimento das amostras de *Neisseria meningitidis* liofilizadas incluídas neste estudo.

À colega Kátia Maria da Silva Lima pela disponibilidade em ajudar nas correções do trabalho.

Às colegas Elaine Fontes Queiroz de Amorim, Lirna Salvioni da Silva e Raiana Silveira Gurgel, do Instituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Amazonas, pelo apoio técnico.

Às colegas Beatriz Coronato Nunes e Andréia Cristiane Lima Fernandes do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, pelo auxílio nas metodologias de tipagem molecular.

À Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, Chefe do Laboratório de Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para a Saúde, pelo apoio ao desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Agradecemos à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-Rio de Janeiro, na pessoa da Dra. Martha Cecília Suarez-Mutis, por toda a atenção dispensada a esta doutoranda.

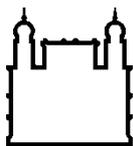
Agradecemos à equipe da Secretaria Acadêmica do Instituto Oswaldo Cruz, em particular a Sra. Livia Agualuza Mangeon, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEAM) pelo apoio da bolsa contemplada no Programa de Formação de Doutores em Áreas Estratégicas (PDAEST), em parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Este trabalho recebeu suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), através do Edital Universal Amazonas (protocolo 021/2011).

“The same relationship between initiation of treatment and favorable results could be applied to the antibiotic drugs which later relayed, and more or less replaced, the sulfonamides. However, there remained the question: how to dispense efficient treatment to patients scattered over large territories where there were no medical facilities? The answer was very difficult, if not impossible. This led to the second question: could people be protected against meningococcal infection?”

Lapeyssonnie L. – Milestones in meningococcal disease. In: Vedros NA. Evolution of meningococcal disease. 1987



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

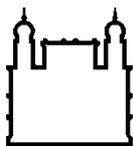
TIPAGEM MOLECULAR DE *Neisseria meningitidis* E INVESTIGAÇÃO DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO AMAZONAS, 2000 A 2010

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

LUCIETE ALMEIDA SILVA

Neisseria meningitidis, uma bactéria capsulada, é o agente etiológico da doença meningocócica, a qual é reconhecida como uma das principais emergências médicas. Há uma carência de estudos epidemiológicos sobre a doença meningocócica (DM) no Amazonas, o que a torna uma doença negligenciada pela sua importância no diagnóstico diferencial das febres hemorrágicas. Este trabalho teve como objetivo analisar o padrão da doença meningocócica no Estado do Amazonas entre 2000 e 2010, num período que antecede a introdução no programa nacional de imunização infantil da vacina conjugada contra o sorogrupo C no ano de 2010. O estudo inclui a análise dos casos notificados e a tipagem genética dos isolados clínicos pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e o sequenciamento de três genes codificadores de proteínas da membrana externa, além do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os resultados mostraram que no período do estudo, 948 casos de DM foram notificados por 58 dos 62 municípios do estado, com uma maior concentração em Manaus (81%; 769/948). Houve uma mudança no perfil epidemiológico com o aumento dos casos de doença pelo sorogrupo C a partir de 2007 (2007-2010 = 68%), associado a um maior número de casos acima de 10 anos de idade e alta letalidade (2007-2010 = 25%). O deslocamento dos casos clínicos para indivíduos acima de 10 anos tem implicação para a atual estratégia de imunização apenas para crianças com menos de 2 anos. A genotipagem revelou uma população de *N. meningitidis* bastante diversa, prevalecendo o ST-5996 (complexo clonal [cc]32) do sorogrupo B (43%) e o ST-11401 (cc103) do sorogrupo C (61%), o qual é um novo ST identificado neste estudo. Mudança de cápsula de B para C foi identificado dentre as cepas do cc32: ST-639 e ST-5996. A resistência aos principais antibióticos de importância clínica foi um evento raro entre as bactérias estudadas. Com esses resultados espera-se contribuir para melhoria das medidas de controle e na avaliação futura do impacto da introdução da vacina conjugada na epidemiologia da doença meningocócica no Amazonas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Neisseria meningitidis MOLECULAR TYPING AND INVESTIGATION OF
MENINGOCOCCAL DISEASE IN THE AMAZON, 2000-2010

ABSTRACT

PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

LUCIETE ALMEIDA SILVA

Neisseria meningitidis, a capsulated bacterium, is the causative agent of meningococcal disease, which is recognized as major medical emergencies. There is a lack of epidemiological studies on meningococcal disease (MD) in the Amazon, which makes it a disease neglected by its importance in the differential diagnosis of hemorrhagic fevers. This study aimed to analyze the pattern of meningococcal disease in the state of Amazonas between 2000 and 2010, a period before the introduction in the national childhood immunization program of the serogroup C conjugate vaccine in 2010. The study includes the analysis of reported cases and genetic typing of clinical isolates by *Multilocus Sequence Typing technique* (MLST) and sequencing of genes encoding three outer membrane proteins, in addition to the antimicrobial susceptibility profile. During the study period, 948 cases of MD were reported by 58 of the 62 municipalities in the state, with a higher concentration in Manaus (81%; 769/948). There was a change in the epidemiological profile with the increase in cases of disease caused by serogroup C from 2007 (2007-2010 = 68%), associated with an increased number of cases above 10 years of age and high case fatality rate (2007-2010 = 25%). The displacement of clinical cases for individuals above 10 years has implications for the current strategy for immunization only for children under 2 years. Genotyping revealed a diverse population of *N. meningitidis*, prevailing ST-5996 (clonal complex [cc] 32) of serogroup B (43%) and ST-11401 (cc103) of serogroup C (61%), which is a new ST identified in this study. Capsular switching from B to C was identified among strains of cc32: ST-639 and ST-5996. Resistance to antibiotics of clinical significance was a rare event among the studied bacteria. These results are expected to contribute to improved control measures and the future impact assessment of the introduction of the conjugate vaccine in the epidemiology of meningococcal disease in the Amazon.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia e clínica da doença meningocócica.....	2
1.2 Métodos de diagnóstico para doença meningocócica	7
1.3 O agente etiológico	9
1.4 Métodos para caracterização de <i>Neisseria meningitidis</i>	10
1.4.1 Tipagem fenotípicas	10
1.4.2 Tipagem genotípicas	11
1.5 Controle e quimioprofilaxia	16
1.6 Vacinas	17
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Modelo do estudo	22
4.2 Local e população do estudo	22
4.3 Fonte de dados	22
4.4 Descrição do aspecto clínico	23
4.5 Geoprocessamento.....	23
4.6 Cálculo das taxas de incidência.....	24
4.7 Tratamento estatístico	24
4.8 Análise das amostras de <i>Neisseria meningitidis</i>	24
4.9 Seleção e caracterização das amostras	24
4.10 Conservação das amostras	24
4.10.1 Extração do DNA.....	24
4.10.2 Caracterização fenotípica	25
4.10.3 Caracterização genotípica.....	25
4.11 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	34

5.	RESULTADOS	35
5.1	Casos de doença meningocócica no Amazonas.....	35
5.1.1	Variação na incidência da doença meningocócica.....	35
5.1.2	Distribuição geográfica.....	36
5.2	Descrição dos casos clínicos de doença meningocócica	39
5.3	Distribuição da doença meningocócica por faixa etária e sexo.....	39
5.3.1	Taxa de letalidade da doença meningocócica.....	41
5.4	Quadro clínico da doença meningocócica	42
5.5	Caracterização fenotípica de <i>N. meningitidis</i>	43
5.5.1	Variação na frequência dos sorogrupos	43
5.5.2	Variação na frequência dos sorotipos e subtipos.....	44
5.6	Diversidade genética de <i>Neisseria meningitidis</i>	46
5.6.1	Cepas isogênicas com diferenças na cápsula	49
5.6.2	Correlação dos STs com FHbp.....	49
5.7	Perfil de susceptibilidade aos antibióticos	50
6.	DISCUSSÃO	51
7.	PERSPECTIVAS	61
8.	CONCLUSÕES	62
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
10.	ANEXOS	73
	ANEXO A – ASPECTOS ÉTICOS	73
	ANEXO B – FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE DOENÇA MENINGOCÓCICA E MENINGITES	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global da doença meningocócica de acordo com a sua frequência ¹¹ .	2
Figura 2. Petéquias (< 3 mm Ø) e manchas equimóticas em uma criança com meningite e septicemia (Fotografia da Dra. Luciana G. F. Pedro) ²⁷	6
Figura 3. Diplococos Gram negativos e estrutura da superfície de <i>Neisseria meningitidis</i> (modificado de Rosenstein et al. ⁴¹).....	9
Figura 4. Estrutura de superfície de <i>Neisseria meningitidis</i> . Classificação sorológica de <i>N meningitidis</i> é baseada na cápsula (sorogrupo), nas proteínas da membrana externa – PorB (sorotipo) e PorA (subtipo) – e lipopolissacarídeos (imunotipo). Outras proteínas de importância da membrana externa são os novos componentes vacinais: FHbp e NadA (modificado de Sadarangani & Pollard ²⁴).....	14
Quadro 1. Vacinas antimeningocócicas licenciadas e comercializadas atualmente (Modificado das referências 10 e 32). *CRM ₁₉₇ é uma proteína mutante não tóxica da toxina de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	18
Figura 5. Taxa anual de incidência (casos/100.000 habitantes) da doença meningocócica no estado do Amazonas e na cidade de Manaus, 2000 - 2010.....	35
Figura 6. Distribuição da doença meningocócica no estado do Amazonas no período de 2000 a 2010.....	36
Figura 7. Distribuição da doença meningocócica no município de Manaus no período de 2000 a 2010.....	37
Figura 8. Distribuição anual dos casos novos de doença meningocócica no Amazonas, 2000 – 2010.....	38
Figura 9. Distribuição anual dos casos novos de doença meningocócica em Manaus, 2000 - 2010.....	38
Figura 10. Distribuição da doença meningocócica de acordo com os grupos etários.....	40
Figura 11. Frequência dos sinais e sintomas da doença meningocócica.....	43
Figura 12. Distribuição anual dos casos confirmados de acordo com o sorogrupo B e C no período de 2000 a 2015.....	44
Figura 13. Perfil de soro-subtipos de <i>Neisseria meningitidis</i> do sorogrupo B isolados de pacientes no estado do Amazonas no período de 2002 a 2010.....	45
Figura 14. Perfil de soro-subtipos de <i>Neisseria meningitidis</i> do sorogrupo C isolados de pacientes no estado do Amazonas no período de 2002 a 2010.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificidade, linhagem e origem dos anticorpos monoclonais (mabs) utilizados na sorotipagem de cepas de <i>Neisseria meningitidis</i>	25
Tabela 2. Condições de ciclagem da PCR dos genes do MLST.	26
Tabela 3. <i>Primers</i> de amplificação do MLST para <i>N. meningitidis</i> ⁵¹	27
Tabela 4. Condições de ciclagem da reação de sequenciamento do MLST ⁷²	28
Tabela 5. <i>Primers</i> de sequenciamento do método MLST para <i>N. meningitidis</i> ⁵¹	28
Tabela 6. Condições de ciclagem para amplificação dos genes <i>fetA</i> , <i>porA</i> , <i>porB</i> , <i>fHbp</i> de <i>N. meningitidis</i> ⁷²	30
Tabela 7. <i>Primers</i> para amplificação dos genes <i>fetA</i> , <i>porA</i> , <i>porB</i> , <i>fHbp</i> de <i>N. meningitidis</i> ^{73,74,75}	31
Tabela 8. Condições de ciclagem para o sequenciamento dos genes <i>fetA</i> , <i>porA</i> , <i>porB</i> , <i>fHbp</i> de <i>N. meningitidis</i> ⁷²	32
Tabela 9. <i>Primers</i> de sequenciamentos dos genes <i>fetA</i> , <i>porA</i> , <i>porB</i> de <i>N. meningitidis</i> ^{73,74,75} ...	32
Tabela 10. Critérios de interpretação das CIM dos antimicrobianos testados ⁷⁶	34
Tabela 11. Taxas de letalidade de acordo com os grupos etários.	41
Tabela 12. Taxas de letalidade de acordo com as formas clínicas.	42
Tabela 13. Frequência dos sinais e sintomas da doença meningocócica de acordo com o grupo etário.	43
Tabela 14. Genotipagem de 196 cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> associados com doença invasiva no Amazonas, 2002 – 2010.	47
Tabela 15. Mudança de cápsula entre <i>Neisseria meningitidis</i> com perfis antigênicos idênticos do complexo clonal ST-32 (cc32) isolados de doença invasiva no Amazonas.	49
Tabela 16. Correlação dos principais STs com FHbp-P (identidade peptídeo)	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

.xls	Excel
Ø	Diâmetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
ATCC	<i>American type culture collection</i>
bp	Pares de bases
cc	complexo clonal
CIM	Concentração inibitório mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CRNM	Centro de referência nacional de Meningite
DM	Doença meningocócica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ET	<i>Electrophoretic Type</i>
EtOH	Etanol
Fet A	Regulador de ferro
fH	Fator H humano
FVS	Fundação de Vigilância e Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de geografia e estatística
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
LabGeo	Laboratório de Geoprocessamento
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas
LCE	Liquor cérebro espinhal
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MLEE	Eletroforese de multilocus enzimático
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>

ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milimetro cúbico
MWS	Membrana “Wash solution”
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
NT	Não sorotipável
nt	Não sorosubtipável
<i>P</i>	Probabilidade de significância
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PorA	porina A
PorB	porina B
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPM	Rotação por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SIG	Sistema de Informações Geográficas
SINAM	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
ST	Tipo sequenciado
SUSAM	Secretaria de estado de Saúde do Amazonas
TAE	Tris-acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TSB	Caldo triptona de soja
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Ultravioleta
USA	Estados Unidos da América
VR	Regiões variáveis
X ²	Qui-quadrado
XXI	Século vinte um

1. INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis é o agente etiológico da doença meningocócica, uma doença invasiva grave considerada uma das principais emergências médicas e uma séria ameaça ao bem-estar das pessoas em todo o mundo, a qual pode apresentar as seguintes formas clínicas: meningite, meningite com septicemia ou septicemia.^{1,2}

A doença meningocócica (DM) foi descrita pela primeira vez por Vieusseux, em Genebra, na Suíça, durante um surto ocorrido em 1806. A bactéria responsável pela doença foi identificada inicialmente em 1884 por Marchiafava e Celli na Itália, mas, somente em 1887 foi cultivada por Weichselbaum.^{3,4}

No Brasil, os primeiros casos de meningite meningocócica foram registrados no ano de 1906. No entanto, somente na década de 1970 foi registrada uma grande epidemia de doença meningocócica em todo o país, quando os sorogrupos A e C acarretaram duas ondas epidêmicas coincidentes. Isto motivou a realização de uma campanha de vacinação nacional utilizando a vacina antimeningocócica A+C.^{5,6}

Na década de 2000, foram registrados no país cerca de 30.000 (trinta mil) casos de doença meningocócica na forma de meningite, meningite com septicemia, ou septicemia; algo em torno de 20% desses casos morreram e o número de sobreviventes com sequelas permanentes é desconhecido⁷. Essa doença ocorre em todo o território nacional, com predomínio na região sul e sudeste (68%). Uma maior concentração da doença em área urbana, pelo menos em parte, pode ser explicada pela localização de laboratórios de microbiologia, capacitados para identificação de patógenos meníngeos e pela qualidade do sistema de vigilância.

No ano de 1998 a incidência da doença meningocócica em Manaus, quando havia o predomínio claro do sorogrupo B (> 90%), motivou uma campanha com a vacina antimeningocócica B+C (Va-Mengoc-BC[®], Finlay). A campanha de vacinação foi estendida à população com até 14 anos de idade, quando foram vacinadas com a primeira dose 449.449 (quatrocentos e quarenta e nove mil, quatrocentos e quarenta e nove) indivíduos e, 1 mês mais tarde, 317.123 (trezentos e dezessete mil centos e vinte e três) indivíduos receberam a segunda dose. No entanto, há uma carência de estudos epidemiológicos sobre a doença meningocócica no estado do Amazonas, o que a torna uma doença negligenciada pela sua importância no diagnóstico diferencial das febres hemorrágicas. Ademais, se deve levar em consideração que o tratamento eficiente para esta emergência médica não pode ser oferecido para parte da população dispersa no vasto território daquele estado, o que aumenta o desafio para o controle da enfermidade. Em relação à etiologia da doença meningocócica, as

informações disponíveis ficam restritas à caracterização fenotípica, i.e., sorogrupo e sorotipo.

Deste modo, há necessidade de um melhor entendimento da epidemiologia da doença meningocócica naquele estado por meio de métodos de vigilância molecular, num período que antecede a introdução no programa nacional de imunização infantil da vacina conjugada contra o sorogrupo C no ano de 2010. Assim, torna-se fundamental um estudo clínico e epidemiológico, a fim de gerar informações para a revisão das medidas de controle e a introdução de novos modelos de acompanhamento da doença, que permitirá melhor avaliação futura do impacto da introdução da vacina conjugada na epidemiologia da doença meningocócica no Amazonas.

1.1 Epidemiologia e clínica da doença meningocócica

A doença meningocócica ocorre em todos os continentes, com maior predomínio na África, Ásia e América do Sul (Figura 1). Na África subsaariana, na extensa faixa territorial denominada "cinturão da meningite", a incidência de infecção meningocócica aumenta acentuadamente no final da estação seca, normalmente resultando em grandes epidemias em períodos muito curtos (Figura 1). As epidemias são predominantemente, causadas pelo sorogrupo A, porém surtos mais recentes foram causados pelos sorogrupos C, W e, em menor proporção, X.⁸ Nas Américas e Europa há um predomínio dos sorogrupos B e C, porém um aumento dos casos de doença meningocócica pelo sorogrupo W foi observado na América do Sul nos anos 2000.^{9,10}



■ cinturão da meningite ■ zona epidêmicas □ casos esporádicos

Figura 1. Distribuição global da doença meningocócica de acordo com a sua frequência¹¹.

A distribuição temporal dos casos demonstra uma variação sazonal, com o maior percentual ocorrendo no inverno. As populações mais carentes são as mais afetadas pela doença meningocócica, porém não são bem conhecidos os fatores de risco relacionados com esta tendência. Nos países desenvolvidos também se observa uma associação entre nível socioeconômico baixo e uma maior incidência da doença. As residências pequenas e mal ventiladas, a aglomeração, o índice de pessoas por dormitório, o consumo de tabaco, as migrações e o registro de infecções virais concomitantes (cofatores) têm sido associados com a incidência da doença e a prevalência de portadores.^{10,12,13}

A epidemiologia da doença meningocócica usualmente apresenta variações marcantes quando são estudadas regiões ou períodos diferentes. No contexto da doença meningocócica a palavra epidemia pode referir-se a diferentes eventos, relacionados a áreas geográficas distintas no mundo. Portanto, condições epidêmicas podem ser definidas para uma determinada localidade, como uma incidência inaceitavelmente alta e requerendo medidas urgentes de controle. Assim, o índice endêmico relativo a uma população definida e as flutuações por este afetadas é que definem uma situação epidêmica.¹⁴

Pequenas modificações no padrão epidemiológico da doença meningocócica são difíceis de serem consideradas, assim como, a tendência. No momento há necessidade do desenvolvimento de uma metodologia capaz de analisar, com poder de predição, as mudanças iniciais do padrão epidemiológico. No entanto, algumas mudanças do padrão epidemiológico podem ajudar a distinguir uma situação epidêmica de um padrão endêmico e as suas flutuações sazonais. As crianças são as mais afetadas, especialmente, as lactentes. Em condições endêmicas cerca de 60% dos casos ocorrem em menores de 10 anos, o que justifica a sua inclusão entre as doenças da infância. No entanto, a mudança na distribuição dos pacientes por faixa etária, com uma grande proporção dos casos envolvendo adolescentes e adultos jovens, indica que uma epidemia pode estar em curso. A mudança no padrão das formas clínicas e o aumento da chance de falecer pela doença meningocócica, também ajudam a reconhecer a possibilidade de um surto emergente na comunidade.^{8,15,16,17}

Um novo aspecto da epidemiologia da doença meningocócica tem sido a ocorrência de surtos localizados (*cluster*) entre adolescentes, como o resultado de contato na escola, na universidade, bares, discotecas ou clubes de esportes. A quase totalidade desses surtos tem sido associada com doença pelo sorogrupo C. O aumento da doença entre adolescentes provoca uma alteração no perfil epidemiológico, como consequência da vasta rede de contatos sociais deste grupo. A possibilidade de aquisição intradomiciliar da infecção meningocócica fica reduzida nessa situação, enquanto que os grupos sociais extradomiciliares

e os contatos de escola passam a ter uma importância maior na transmissão da bactéria na comunidade.^{18,19,20}

A distribuição dos pacientes pelo sexo mostra um predomínio da doença nos homens. Entretanto, entre os pacientes com mais de 50 anos há um claro predomínio da doença nas mulheres.²¹

Não incluindo os dados das epidemias, estima-se que aproximadamente 500.000 casos novos de doença meningocócica ocorrem anualmente em todo o mundo; 50.000 destes casos são fatais e 60.000 recuperam-se com seqüelas.¹⁴ No Brasil a doença meningocócica é registrada em toda a sua extensão geográfica, onde 31.457 casos foram reportados entre 2000 e 2010; cerca de 20% destes casos morreram e os sobreviventes com sequelas permanentes, são desconhecidos.⁷ A maioria das notificações é das regiões sul e sudeste (68%; 21.459) e, em outras regiões, nas metrópoles, um dado provavelmente relacionado à existência de estrutura para o diagnóstico e a notificação dos casos, o que de algum modo deve mascarar a importância da doença nas áreas rurais, justamente onde as estratégias de tratamento são o maior desafio.

N. meningitidis é essencialmente um comensal bem adaptado da mucosa da nasofaringe humana, desde que a progressão da colonização para a invasão e a agressão do hospedeiro é um evento relativamente raro¹. A invasão da corrente sanguínea frequentemente ocasiona meningite ou septicemia. Essas manifestações clínicas evoluem em poucas horas com o início da bacteremia, podendo ocorrer separadamente ou juntas².

Os pacientes com doença meningocócica apresentam sintomas prodrômicos, geralmente, na semana anterior à admissão hospitalar. Os sintomas sugerem infecção do trato respiratório superior: dor de garganta, coriza, tosse e otalgia. A presença de febre nessa fase somente é descrita por uns poucos. Os pródromos, eventualmente, podem ser provocados por uma infecção viral do trato respiratório, que ocasionalmente atuaria como um fator predisponente^{21,22}.

Um quadro de febre súbita acompanhada de dor de garganta, artralgia ou mialgia sugere o diagnóstico de doença meningocócica. Dor nas costas e astenia também são queixas frequentes. A história clínica na admissão hospitalar, frequentemente, é de febre, rigidez de nuca, vômitos e púrpura. A púrpura é uma das manifestações mais significantes encontrada nos doentes, o qual deveria ser visto como um sinal de mau prognóstico imediato²¹.

A classificação dos pacientes por formas clínicas é essencial para a compreensão da doença meningocócica e o seu controle. A distinção entre a septicemia e a meningite meningocócica tem importantes implicações, por serem entidades clínicas distintas e

demandarem condutas terapêuticas diferenciadas. A meningite meningocócica é uma infecção do sistema nervoso central, com alterações características no líquido cérebro-espinhal (LCE) e uma letalidade em torno de 5% ou menos. Por outro lado, a meningococemia é uma infecção sistêmica grave, relacionada com um quadro de choque séptico por bactéria Gram negativa, com uma letalidade que segundo a literatura varia de 15% a 80%^{21,22,23,24}.

O quadro clínico dos pacientes com meningite meningocócica não difere da descrição clássica observada para as outras etiologias bacterianas de meningite piogênica. Em fase inicial pode haver apenas um quadro febril abrupto inespecífico, com posterior desenvolvimento de cefaleia, vômitos e rigidez de nuca. Alteração do nível de consciência e convulsão podem fazer parte da evolução, assim como alteração do comportamento. A meningite comumente está associada à púrpura, o que indica a presença concomitante de septicemia. A presença de púrpura nesta situação deveria sempre sugerir o diagnóstico clínico de doença meningocócica (Figura 2). Pode haver ainda a presença de hipotensão ou choque, um indicativo de mau prognóstico^{16,25}

A septicemia meningocócica pode ser dividida em leve, grave ou crônica, tendo como base a evolução clínica. A meningococemia é corretamente definida pela ausência de meningite (LCE ≤ 10 céls/mm³), porém pacientes com uma celularidade do LCE de até 100 céls/mm³ apresentam evolução que caracteriza a septicemia meningocócica²⁶. Um componente de encefalite ou sinais de irritação meníngea, eventualmente, podem estar presentes mesmo com a análise inicial do LCE estando normal^{22,25}. Inicialmente o aspecto das lesões cutâneas da doença meningocócica, um sinal clínico de manifestação septicêmica, pode ser maculo-papular ou urticariforme, com posterior evolução para as lesões com aspecto hemorrágico (Figura 2).



Figura 2. Petéquias (< 3 mm Ø) e manchas equimóticas em uma criança com meningite e septicemia (Fotografia da Dra. Luciana G. F. Pedro)²⁷.

Um amplo espectro clínico tem sido documentado com menor frequência associada à infecção por *N. meningitidis* como artrite, panoftalmite, conjuntivite, endocardite, pericardite, faringite, pneumonia, osteomielite, epiglote, celulite orbital, uretrite, salpingite e infecção cervical¹⁶.

O reconhecimento precoce da doença meningocócica é essencial para um prognóstico favorável. Entretanto ainda existe confusão e desconhecimento sobre a apresentação dos aspectos clínicos da doença, o que acaba por prejudicar o diagnóstico na fase inicial, retarda o tratamento específico e afeta a educação da população através de informes sobre a doença. O prognóstico da doença meningocócica é variável de acordo com a forma clínica, as condições do atendimento, a disponibilidade de serviço de saúde e a percepção dos médicos e leigos acerca da doença. A maioria das séries de casos aponta uma letalidade global em torno de 10%, com as mortes ocorrendo principalmente em pacientes com sinais e sintomas de meningococemia.²⁸

Informações sobre a doença devem ser dadas em uma tentativa de melhorar o prognóstico, incluindo o tratamento precoce com antibióticos e o treinamento de agentes de saúde das comunidades, a fim de reconhecer o exantema hemorrágico. Em áreas rurais ou de floresta, protocolos de tratamento de curto prazo e antibióticos com esquemas de administração simples, são fundamentais, em particular com a possibilidade de injeção intramuscular e dose única.¹⁰ Uma dose diária de ceftriaxona (100 mg/Kg até um máximo de

4 g) administrada por via intramuscular parece ser um opção adequada para o tratamento da doença meningocócica, considerando as circunstâncias encontradas naquela região, a sua eficácia e a facilidade de uso.²⁹ A ocorrência de doença meningocócica em comunidades de área rurais ou de floresta na região amazônica representa um desafio para a saúde pública, onde a prevenção por vacinas é a melhor opção, devido à complexidade do tratamento das formas graves.³⁰

A importância do reconhecimento precoce da doença meningocócica é essencial para uma área endêmica de malária, pois algumas infecções bacterianas, como por *N. meningitidis*, ocorrem concomitantemente em casos de malária grave (infecção mista). Este é um problema adicional para o reconhecimento da doença meningocócica pois a malária cerebral não é facilmente distinguível de meningite bacteriana e encefalite viral.¹⁶ A punção lombar deve ser seriamente considerada em pacientes com malária cerebral diagnosticada clinicamente, mesmo quando a parasitemia por *Plasmodium* é detectada, porque não exclui a coexistência de meningite bacteriana.³¹

O transporte no Amazonas é normalmente possível por barcos ou por aeronaves, que transportam pessoas e mercadorias entre as principais cidades ao longo dos rios principais e seus afluentes. Isso agrava o prognóstico de pacientes do interior com doenças que ameaçam a vida, porque a assistência médica está ausente nas aldeias ou mesmo precária na cidade mais próxima, que pode estar localizada a poucas horas ou dias de distância. A percepção da população e os profissionais de saúde sobre a doença meningocócica é outro problema sério, porque a sintomatologia inicial - febre, dor de cabeça, dor de garganta e mialgia - são indistinguíveis daqueles relacionados a outras doenças infecciosas diagnosticadas de modo muito mais prevalente.³² Além de apresentações atípicas, as manifestações que sugerem um diagnóstico de outras doenças infecciosas menos graves também podem ocorrer. Os sintomas gastrointestinais - náuseas, vômitos e diarreia - podem preceder o exantema hemorrágico e outros aspectos mais característicos de meningococemia, especialmente em uma criança ou um paciente idoso, por vezes, sugerindo o diagnóstico de gastroenterite.¹⁶ Assim, raramente é pensado como um diagnóstico diferencial da febre hemorrágica infecciosa numa fase inicial, resultando em atraso no diagnóstico e, portanto, no início da terapia específica.

1.2 Métodos de diagnóstico para doença meningocócica

O diagnóstico da doença meningocócica inicialmente é clínico, o qual deve ser precoce e bem estabelecido devido ao elevado potencial fatal da doença. Para tal é necessário

um alto grau de suspeição do médico assistente. A confirmação do diagnóstico clínico é feito por métodos laboratoriais para a identificação de agentes bacterianos. No caso em tela, a melhor alternativa deveria incluir uma abordagem com diferentes técnicas para o diagnóstico bacteriológico convencional e molecular. Dentre os métodos de diagnóstico convencional se destacam a bacterioscopia, a cultura e o teste do látex, enquanto os métodos moleculares despontam o ensaio de PCR e PCR em tempo real.

O exame direto pela bacterioscopia de material como líquido cérebro-espinhal (LCE), secreção da conjuntiva, líquido sinovial, biópsia (*punch*) ou fluido aspirado de lesões purpúricas possuem valor diagnóstico. O material de eleição deve ser corado, preferencialmente, pelo método de coloração de Gram.³³

Nos pacientes a bactéria pode ser habitualmente isolada da nasofaringe, das lesões cutâneas (púrpura), do líquido sinovial, do sangue, do LCE ou de secreção conjuntival. O isolamento primário é obtido com sucesso quando empregamos o agar Müller-Hinton (MH) suplementado com 5% de sangue de carneiro ou coelho. A maioria dos caldos comerciais para hemocultura serve para o isolamento de *N. meningitidis*, o que permite a semeadura de sangue ou líquido sinovial. A temperatura ótima de crescimento fica entre 35 e 37°C. Apresentam necessidades essenciais para o desenvolvimento, como a presença de umidade e CO₂, que estimulam o crescimento. As culturas diariamente verificadas sem crescimento após 72h são dadas como negativas. As hemoculturas mantidas em estufa, preferencialmente com agitação, não devem ser descartadas com menos de uma semana, procedendo-se repiques para meio sólido com 2, 5 e 7 dias.³³

A detecção de antígenos de meningococos em fluídos orgânicos é possível através do teste do látex. Esse teste contém anticorpos polivalentes para os sorogrupos A/B/Y, C/W. O teste imunológico permite ao laboratório a identificação presuntiva, porém um resultado negativo não exclui o diagnóstico.³³

A técnica da reação da polimerase em cadeia (*PCR*) vem sendo empregada para o diagnóstico da infecção por *N. meningitidis* através da detecção do DNA genômico extraído diretamente do LCE, do sangue ou de material de biópsia. Esse ensaio vem sendo apontado como uma ferramenta fundamental para ampliar a vigilância epidemiológica da doença meningocócica, especialmente em áreas remotas^{35,36}. O ensaio de *PCR* em tempo real também tem sido empregado para o diagnóstico da doença meningocócica³⁷, porém a sensibilidade se equivale a do ensaio convencional. Como o seu custo é muito superior, em particular quando inclui a genotipagem, o seu emprego somente se justifica em laboratórios com uma alta demanda de exames, portanto a implementação do protocolo de

PCR em tempo real não deve ser baseada na visão equivocada de vários relatos que tendem a generalizar a ideia de que o PCR quantitativo, em geral, tem uma sensibilidade aumentada comparada com a técnica convencional de PCR ou ELISA-PCR³⁸.

1.3 O agente etiológico

N. meningitidis, uma bactéria Gram negativa encapsulada, pertence à classe *Proteobacteria*, subclasse- β . A classe *Proteobacteria* inclui um grupo amplo e fisiologicamente diverso de bactérias Gram negativas, fototróficas e não-fototróficas.³⁹ Dentre as espécies do gênero *Neisseria*, *N. meningitidis* é a única capsulada. A morfologia observada pela bacterioscopia de cultura ou de espécimes clínicos é de cocos Gram negativos, normalmente dispostos em pares (diplococos), com os lados adjacentes côncavos, o que lembra a forma de feijão ou rim (Figura 3). Possuem cerca de 0,6 a 0,8 micra de diâmetro. Não formam esporos ou possuem flagelos na superfície externa. A presença de fímbrias (*pili*) é notada com frequência, porém as células são imóveis. A superfície externa é revestida por uma cápsula em virtualmente todas as amostras isoladas de pacientes, e algo em torno de 50% das amostras isoladas de portadores.⁴⁰ A cápsula é composta por uma longa cadeia de carboidratos, chamados de polissacarídeos capsulares, os quais possuem um lipídeo numa extremidade. A cápsula, além de ser um mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, serve como uma proteção contra a dessecação (Figura 3).

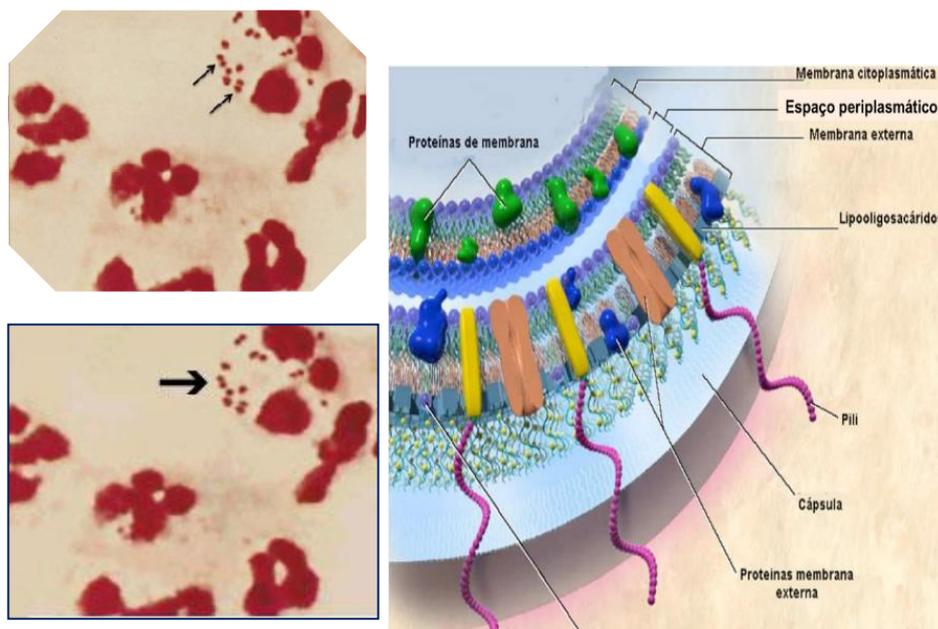


Figura 3. Diplococos Gram negativos e estrutura da superfície de *Neisseria meningitidis* (modificado de Rosenstein et al.⁴¹).

1.4 Métodos para caracterização de *Neisseria meningitidis*

1.4.1 Tipagem fenotípicas

A caracterização de *N. meningitidis*, tanto de isolados em cultura como diretamente de espécimes clínicos, é essencial para uma resposta eficaz à saúde pública e, conseqüentemente, a aplicação de medidas de prevenção e controle na comunidade. Os primeiros métodos de caracterização a alcançarem ampla aceitação foram abordagens imunológicas que identificavam variantes antigênicas da cápsula (sorogrupo ou sorotipo) e de antígenos subcapsulares (soro-subtipo).⁴² A classificação fenotípica de *N. meningitidis* tem como base os antígenos de superfície externa, como os polissacarídeos capsulares, as proteínas da membrana externa e os lipooligossacarídeos. A bactéria é classificada de acordo com as características dos polissacarídeos da cápsula em sorogrupos, das proteínas da membrana externa em sorotipos e subtipos (soro-subtipos) e dos lipooligossacarídeos em imunotipos.

O esquema de tipagem de sorotipos e subtipos por métodos imunológicos apresenta uma série de limitações, incluindo: cobertura incompleta e dificuldades na produção e distribuição de reagentes (anticorpos monoclonais), o que resulta em um número crescente de isolados não tipáveis por esta abordagem. Há necessidade de a proteína alvo estar sendo expressa. Correspondência inconsistente com a relação genética dos isolados, em parte devido à transferência horizontal de genes combinada com um alto nível de seleção positiva sobre os antígenos subcapsulares (proteínas de membrana externa). Dificuldade de aplicar métodos imunológicos para o diagnóstico e a tipagem da bactéria direto de espécimes clínicos, algo de importância crescente em decorrência do tratamento precoce com antibióticos, o que resulta em mais espécimes clínicos com resultados de cultura negativos.

1.4.1.1 Sorogrupos

Os sorogrupos são baseados na especificidade imunológica dos polissacarídeos capsulares, que podem ser identificados pelas técnicas de soroaglutinação, co-aglutinação ou através de anticorpos monoclonais. São reconhecidos 12 sorogrupos de *N. meningitidis* designados por letras capitais: A,B,C,X,Y, Z,29E,W,H,I,K,L.⁴³ Contudo, os sorogrupos A, B, C, W e Y são os responsáveis pela quase totalidade dos casos de doença meningocócica em todo o mundo. Os demais sorogrupos excepcionalmente causam doença invasiva, porém o sorogrupo X emergiu na década de 2000 como causa de epidemia em alguns países da África: Niger, Uganda, Kenya, Togo e Burkina Faso.⁴⁴ O sorogrupo é uma característica

fenotípica que pode ser instável, devido à possibilidade de mudança de cápsula, de modo que o sorogrupo pode não ter correspondência com a relação genética dos isolados.⁴⁵

1.4.1.2 Sorotipos

Os sorotipos se baseiam na presença das proteínas de classe 2 ou 3 da membrana externa de *N. meningitidis*, os quais são detectadas pela técnica de *immunoblot* com anticorpos monoclonais. Essas proteínas são mutuamente excludentes, de maneira que um meningococo pode apresentar ou a proteína de classe 2 (PorB2) ou a de classe 3 (PorB3), mas não as duas simultaneamente. As PorB3 normalmente são expressas por bactérias do sorogrupo B, enquanto as PorB2 são expressas por bactérias do sorogrupo C. Essa proteína está invariavelmente presente nos isolados clínicos.⁴⁶

1.4.1.3 Subtipos

As proteínas de classe 1 (PorA) possuem valor como marcador microbiológico, por terem sua estrutura conservada na maioria das bactérias.⁴⁷ Assim como os sorotipos, os subtipos são determinados pela técnica de *immunoblot* com anticorpos monoclonais. As proteínas de classe 1 têm sido um componente importante na formulação de vacinas contra o sorogrupo B.

1.4.1.4 Imunotipos

A espécie pode ainda ser distinguida através de diferenças dos epítomos dos lipooligossacarídeos, localizados na parede celular.⁴⁸ Uma célula bacteriana pode apresentar um ou mais determinantes de imunotipos, ou ainda simplesmente não expressar nenhum, o que fez com que não lograsse como marcador epidemiológico.

1.4.2 Tipagem genotípicas

A ampla disponibilidade de técnicas moleculares aplicadas para identificação e caracterização do microrganismo de interesse têm sido de grande valor para melhorar o entendimento acerca da doença meningocócica, especialmente no monitoramento da disseminação de alguns clones e da investigação subjacente da biologia da infecção.⁴⁴

A necessidade da utilização de marcadores genéticos tornou-se imprescindível para a avaliação da epidemiologia da infecção por *N. meningitidis*, o que permite ainda a identificação e a caracterização da bactéria diretamente do espécime clínico de pacientes com cultura

negativa, o que facilita a ampliação da vigilância epidemiológica.¹⁹ De maneira notável, os trabalhos de epidemiologia molecular desempenharam um papel importante na concepção de vacinas especialmente desenvolvidas contra o sorogrupo B, os quais identificaram a diversidade e variabilidade dos antígenos de superfície.⁴⁹ A seleção de antígenos subcapsulares foi fundamental para o desenvolvimento de vacinas contra este sorogrupo.

A genotipagem de isolados clínicos de *N. meningitidis*, a partir dos trabalhos pioneiros com a técnica de eletroforese de multilocus enzimático (MLEE),⁵⁰ foi de grande valor para melhorar o nosso entendimento da doença meningocócica, especialmente no mapeamento global da propagação de alguns genótipos em particular, o que definiu que determinados clones são responsáveis por epidemias e a maioria dos casos de doença endêmica em uma região ou em diferentes áreas geográficas.¹² Assim ficou claro que a tipagem fenotípica, isoladamente, não permite identificar a diversidade e a correlação entre as bactérias, cujos clones podem expressar diferentes combinações antigênicas, regular a expressão de um antígeno, ou modificar seus antígenos de superfície, p.ex., a cápsula de polissacarídeos.^{18,50} A necessidade da utilização de marcadores genéticos tornou-se imprescindível para a avaliação da epidemiologia da infecção por *N. meningitidis*, o que permite ainda a identificação e a caracterização da bactéria diretamente do espécime clínico de pacientes com cultura negativa, o que facilita em muito a ampliação da vigilância epidemiológica.¹⁹ De maneira notável, os trabalhos de epidemiologia molecular desempenharam um papel importante na concepção de vacinas especialmente desenvolvidas contra o sorogrupo B, os quais identificaram a diversidade e variabilidade dos antígenos de superfície.⁴⁹ A seleção de antígenos subcapsulares foi fundamental para o desenvolvimento de vacinas contra este sorogrupo.

1.4.2.1 *Multi Locus Sequence Typing (MLST)*

Maiden et al⁵¹ desenvolveram um método de tipagem molecular utilizando DNA de *N. meningitidis* que conservou os conceitos utilizados por eletroforese de multilocus enzimático (MLEE),⁵² ao analisar genes constitutivos que não estão sob qualquer seleção imunológica conhecida. *Multilocus sequence typing (MLST)* define clones ou linhagens pelos seus perfis alélicos determinados a partir das sequências de nucleotídeos dos fragmentos internos de sete genes constitutivos (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdlb*, *pdh*, *pgm*), ao invés da alteração dos padrões de mobilidade electroforética das enzimas que codificam. Esta abordagem tem sido adaptada para a tipagem de diferentes bactérias, e agora é o método mais amplamente utilizado para tipagem molecular.

MLST apresenta as seguintes vantagens: determina de forma inequívoca as variações genéticas, através do sequenciamento dos alvos de interesse. É facilmente mensurável em escala e adaptável para um formato de alto desempenho. Os dados de sequenciamento são reproduzíveis e podem ser objetivamente comparados entre laboratórios. A análise das sequências pode ser realizada a distância e os resultados retornados através da Internet. As sequências obtidas podem ser enviadas para um banco de dados centralizado, o que as torna acessíveis a todos os cientistas através da internet, a fim de produzir uma ferramenta eficaz para a compreensão da epidemiologia global. As sequências podem ser obtidas a partir da amplificação pela PCR diretamente do espécime clínico.

Atualmente, recomenda-se que os sete *loci* de MLST sejam sequenciados e utilizados para a genotipagem de *N. meningitidis* isolados de doença invasiva ou portadores, pelo menos para uma seleção representativa de cada país ou para ampliar a vigilância regional.^{12,42} A cada alelo original é atribuído um número, em ordem de descoberta, e cada isolado pode ser caracterizado por MLST pelo seu genótipo ou perfil alélico, designado como tipo sequenciado (ST), o qual é a combinação dos seus alelos formados pelos sete loci de interesse. Os ST podem ainda ser agrupados em complexos clonais (cc), os quais são definidos na base de dados do MLST – *Neisseria* Sequence Typing Home Page (<http://pubmlst.org/neisseria/>) – como um grupo de ST que partilham, pelo menos, quatro dos sete *loci* em comum com o ST principal.

1.4.2.2 Genes *porA*, *porB*, *fetA*, *fHbp*

O emprego do MLST não é adequado para caracterizar eventuais diferenças de cepas relacionadas a um surto devido ao seu baixo poder para resolver pequenas diferenças evolutivas. Portanto, para fornecer capacidade adicional discriminatória na análise de *N. meningitidis*, os dados de MLST podem ser combinados com a sequência de outros *loci* variáveis sob pressão seletiva positiva, como *PorA*, *PorB*, *FetA* e *FHbp* (Figura 4). É essa variabilidade que torna estas proteínas excelentes marcadores para investigações epidemiológicas limitadas a um curto espaço de tempo. As sequências para estes marcadores também são importantes para avaliar a distribuição dos alelos de proteínas que são potenciais antígenos vacinais, o que pode ajudar na concepção racional de vacinas antimeningocócicas, em especial contra o sorogrupo B.⁴⁹

As regiões variáveis dos genes codificadores de antígenos *porA* e *fetA* é uma resolução adicional e necessária. O gene *porB* é importante para investigação rápida de surtos da doença e a distribuição de variantes antigênicas. Estes genes de interesse têm sido usados

extensivamente em laboratórios de referência em todo o mundo e protocolos validados foram publicados. Recomenda-se, ainda, que uma nova nomenclatura seja adotada na seguinte forma: sorogrupo: *porB*: P1.porA-VR1, VR2: FfetA-VR: ST (complexo clonal), expressa como p.ex, B:3-1: P1.19,15: F5-1: ST-33 (cc32).

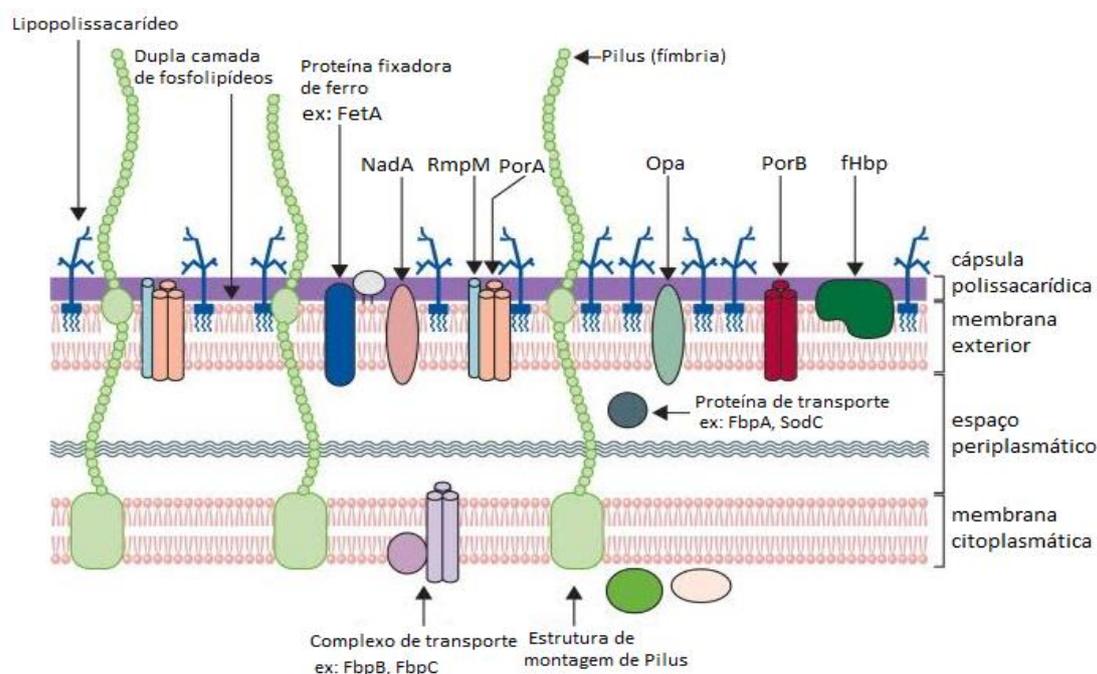


Figura 4. Estrutura de superfície de *Neisseria meningitidis*. Classificação sorológica de *N meningitidis* é baseada na cápsula (sorogrupo), nas proteínas da membrana externa – PorB (sorotipo) e PorA (subtipo) – e lipopolissacarídeos (imunotipo). Outras proteínas de importância da membrana externa são os novos componentes vacinais: FHbp e NadA (modificado de Sadarangani & Pollard²⁴).

1.4.2.2.1 *porA*

O gene *porA* codifica variantes antigênicas dos subtipos, i.e., as proteínas de classe 1 (PorA) da membrana externa, possuem peso molecular entre 43 e 47 kDa⁵³. Esse gene possui duas regiões variáveis principais, além de uma região secundária ou semi-variável (VR3), o que explica porque *N. meningitidis* pode expressar múltiplos subtipos. É recomendado o sequenciamento das duas principais regiões variáveis para a genotipagem: VR1 e VR2. Análise das sequências de nucleotídeos do gene *porA* demonstrou que a diversidade antigênica é muito mais ampla do que aquela definida por anticorpos monoclonais, além de definir o subtipo nos isolados com o gene desativado e identificar quando o gene está deletado.

1.4.2.2.2 *porB*

O gene *porB*, relacionado com a codificação destas proteínas (PorB), possui 4 regiões variáveis (VR1,VR2,VR3,VR4) as quais ampliam a diversidade antigênica, permitindo a modulação da variação de fase e, conseqüentemente, da expressão das proteínas como um mecanismo de evasão e adaptação ao meio ambiente. O peso molecular dessas proteínas de membrana externa é de 37 a 42 kDa⁵³.

1.4.2.2.3 *fetA*

O gene *fetA* codifica a proteína formalmente designada proteína reguladora de ferro (FrpB), a qual é uma proteína de membrana externa do meningocócico, possui peso molecular de 76 kDa⁵⁴. A sua importância foi reconhecida devido ao interesse como um candidato vacinal e como marcador microbiológico.

1.4.2.2.4 *fHbp*

A proteína fixadora de fator H (FHbp), anteriormente referida como antígeno de *Neisseria* 1870 derivado do genoma (GNA 1870) ou lipoproteína 2086 (Lp2086), com peso molecular de 27 kDa⁵⁵, é um antígeno exposto na superfície da membrana externa que está invariavelmente presente na espécie *N. meningitidis*⁵⁶. FHbp é componente crítico para a sobrevivência desta bactéria na corrente sanguínea do hospedeiro não imune, uma vez que é responsável pela interação primária com o fator H humano (fH), um importante membro do grupo de reguladores da ativação do sistema de complemento. A ligação da FHbp com o fH inibe a ativação do complemento, aumenta a resistência à atividade bactericida do soro e permite que a bactéria escape dos mecanismos de defesa da imunidade inata, o que facilita a sobrevivência da bactéria e, eventualmente, o desenvolvimento da doença invasiva no hospedeiro.⁵⁷ A exposição a este antígeno induz a atividade bactericida contra *N. meningitidis*, de modo que é um antígeno vacinal viável, e faz parte da formulação de vacinas aprovadas contra o sorogrupo B.^{58,59} Ademais, os dados obtidos até o momento indicam alguma correlação dos alelos de *fHbp* com determinados clones de MLST ou sorogrupos, o que o transformam em um bom marcador epidemiológico.^{9,56,60,31} O prosseguimento da determinação da diversidade das seqüências de *fHbp* fornecerá valiosas informações para avaliar a potencial eficácia e cobertura das vacinas, bem como caracterizar as populações de *N. meningitidis* circulantes.

1.5 Controle e quimioprofilaxia

O controle da doença meningocócica, uma doença de notificação compulsória no Brasil desde o início do século XX, é uma das principais atividades da vigilância epidemiológica, assim como outras patologias que exigem qualquer medida imediata seja para os casos, contatos íntimos ou grupos de risco.

A quimioprofilaxia é uma estratégia universalmente aceita para o controle da doença meningocócica, que é uma doença com alto potencial de evolução fatal. Embora as crianças pequenas sofram risco maior de adoecer, os contatos íntimos de qualquer idade estão potencialmente vulneráveis. O risco de doença entre contatos íntimos de um caso é cerca de mil vezes maior, comparado com pessoas da comunidade, e este risco persiste por vários meses. O uso profilático de antimicrobianos tem como propósito prevenir os casos secundários de doença meningocócica, os quais representam cerca de 1 a 3% do total registrado^{16,25}

A quimioprofilaxia, de acordo com a estratégia adotada em nosso país, visa eliminar o estado de portador de um indivíduo convivendo em contato íntimo com um caso detectado e, assim, diminuir a chance de exposição de um susceptível. A redução do número de casos secundários nesse contexto é consequência da interrupção da transmissão de *N. meningitidis* em um grupo definido como contatos íntimos⁶².

A emergência de *N. meningitidis* resistente à rifampicina aliada às complicações do seu uso pressionaram pela busca de uma droga alternativa^{63,64}. Azitromicina, ciprofloxacina e ceftriaxona são as alternativas disponíveis para a quimioprofilaxia⁶². Até o momento apenas a ceftriaxona e a azitromicina estão liberadas para o uso em gestantes e crianças. A ciprofloxacina ou a azitromicina são as melhores opções por serem bastante eficazes, de administração oral e em dose única, o que permite a medicação supervisionada. A ceftriaxona por ser de uso parenteral exclusivo limita o seu emprego como agente profilático de primeira linha, devido à aceitação pelos contatos.

A medicação deve ser oferecida aos contatos íntimos nas primeiras 24 horas após a internação do paciente, a fim de se alcançar a proteção máxima desejada. A ingestão da primeira dose do antibiótico precisa ser iniciada sem muita diferença de tempo pelos contatos^{25,62}. O médico assistente deveria ser o responsável pela quimioprofilaxia, pelo menos, dos contatos intradomiciliares.

1.6 Vacinas

A primeira geração de vacinas antimeningocócicas foi formulada com polissacarídeos purificados da cápsula bacteriana, os quais induzem imunidade grupo-específica (Quadro 1). No entanto, os polissacarídeos são antígenos linfócitos T independentes, os quais não podem ser apresentados às células T em conjunto com as moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (tradução do inglês de *major histocompatibility complex* - MHC). Tais vacinas não induzem proteção duradoura, por conseguinte, a resposta aos antígenos capsulares é de curta duração e incapaz de gerar uma resposta anamnésica quando o vacinado é mais tarde exposto ao mesmo antígeno. Essas vacinas não protegem contra a colonização da nasofaringe, o que poderia reduzir o número de infecções assintomáticas (estado de portador). Ademais, as vacinas polissacarídicas são pouco imunogênicas em crianças menores de 2 anos de idade, particularmente os lactentes, devido à incapacidade dos polissacarídeos estimularem os linfócitos B neste grupo etário, estes são os mais afetados pelas bactérias relacionadas à meningite comunitária aguda.^{21,65}

O polissacarídeo capsular conjugado a uma proteína carreadora, através de ligações covalentes, em muito melhora a imunogenicidade das vacinas antimeningocócicas em crianças pequenas (< 2 anos). Assim, o processo de conjugação torna o antígeno de interesse células T dependente, o que permite o desenvolvimento de células B de memória e, conseqüentemente, uma resposta anamnésica. A administração das vacinas conjugadas também afeta o estado de portador, um efeito particularmente importante para um patógeno como *N. meningitidis* cujo único hospedeiro é o homem^{66,67}.

As vacinas conjugadas trouxeram uma nova perspectiva de controle da doença (Quadro 1), devido à eficácia elevada, proteção prolongada, boa resposta em crianças menores de 2 anos e interferência no estado de portador.⁶⁸ Todos esses atributos juntos permitem o seu uso de rotina, o que pode levar ao controle da doença na comunidade e a proteção indireta daqueles que não foram imunizados, um resultado da redução do número de portadores assintomáticos e, conseqüentemente, da taxa de aquisição de novas infecções. Admite-se que a taxa de aquisição de novas infecções está ligada com o risco de doença. Portanto, a efetividade dessas vacinas é frequentemente maior do que a eficácia devido à redução do número de portadores na população, o que leva a uma menor exposição daqueles que não foram vacinados ao meningococo.⁶⁹ No Brasil, a primeira vacina conjugada introduzida no calendário de imunização infantil foi contra *H. influenzae* sorotipo b, em 1999, subsequentemente, em 2010, contra *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*, uma intervenção que exige avaliação ao longo dos próximos anos.⁷

Vacinas polissacarídeas (1969-1978)	
Menomune (Sanofi-Pasteur)	A, C, Y, W
ACWY Vax (GlaxoSmithKline)	A, C, Y, W
Mengiva A+C (Sanofi-Pasteur)	A, C
AC Vax (GlaxoSmithKline)	A, C
Trivalente ACW (GlaxoSmithKline)	A, C, W
Vacinas conjugadas (1999-2005)	
Meningitec (Wyeth)	C + CRM ₁₉₇ *
Menjugate (Novartis)	C + CRM ₁₉₇ *
NeisVac-C (Baxter)	C + toxoide tetânico
Menactra (Sanofi-Pasteur)	A, C, Y, W + toxoide diftérico
Nimenrix (GlaxoSmithKline)	A, C, Y, W + toxoide tetânico
Novas vacinas conjugadas (2000-2010)	
DTPw-HBV/Hib-MenAC-TT (GlaxoSmithKline)	A, C + toxoide tetânico
MenAfrivac (Serum Institute of India)	A + toxoide tetânico
Menveo (Novartis)	A, C, Y, W + CRM ₁₉₇
MenHibrix (GlaxoSmithKline)	C, Y + toxoide tetânico
Menitorix (GlaxoSmithKline)	C + toxoide tetânico
Vacinas subcapsulares (2000-2013)	
Trumenba, MenB-FHbp (Wyeth)	FHbp (subfamília A e B)
Bexsero, MenB-4C (Novartis)	FHbp, NadA, NHBA, PorA (P1.4)

Quadro 1. Vacinas antimeningocócicas licenciadas e comercializadas atualmente (Modificado das referências 10 e 32). *CRM₁₉₇ é uma proteína mutante não tóxica da toxina de *Corynebacterium diphtheriae*.

O progresso em direção a uma vacina contra *N. meningitidis* do sorogrupo B foi dificultado porque a sua cápsula divide estruturas homólogas com o tecido neural humano, cujo resultado é um polissacarídeo com baixa imunogenicidade e com a possibilidade, ainda que teórica, de induzir doença auto-imune.³² Novas vacinas com a capacidade de proteger contra o sorogrupo B (Quadro 1), com base em antígenos proteicos da membrana externa (antígenos subcapsulares), têm sido desenvolvidas.^{58,59} O desenvolvimento dessas e a sua recente introdução serão mais um componente que poderá modificar o padrão

epidemiológico, o que precisará ser monitorado com ferramentas adequadas.⁶² Neste contexto, um reforço da vigilância epidemiológica precisa ser cuidadosamente implantado após a introdução de tais vacinas, particularmente, devido a um dos mecanismos de evasão da bactéria do sistema imunológico do hospedeiro: mudança de cápsula.^{45,70}

Na última década ficou demonstrado o sucesso dos programas de imunização com a vacina sorogrupo C conjugada, com impressionante impacto na saúde pública. Espera-se que um impacto semelhante fique demonstrado com a disponibilização de uma vacina sorogrupo A conjugada para a África, em particular no cinturão da meningite localizado na região subsaariana. No entanto, desafios ainda persistem na busca do desenvolvimento e implantação de uma vacina com ampla proteção contra a doença pelo sorogrupo B.

2. JUSTIFICATIVA

O estudo da doença meningocócica no Amazonas, um grave problema de saúde pública, tem grande importância devido à falta de dados publicados sobre este tema naquele estado, o que faz com que medidas de controle sejam dimensionadas com base em dados e experiências de outras regiões. O estudo de casos clínicos de doença meningocócica constitui um ponto importante, pois permite estabelecer os padrões de doença e a sua análise. O maior desafio para a saúde pública na região amazônica é o controle da doença meningocócica em áreas remotas, uma doença infecciosa aguda com alto potencial fatal. A análise dos casos clínicos e do agente etiológico dessas áreas traz subsídios para melhorar o prognóstico das populações com difícil acesso aos serviços de saúde. A compreensão da epidemiologia da doença meningocócica naquela região, utilizando ferramentas de epidemiologia molecular, permite a implementação e a revisão das medidas de controle e o planejamento da introdução de uma nova geração de vacinas em desenvolvimento. Ademais, a utilização de métodos atualmente empregados para a vigilância molecular da doença meningocócica é necessária para o monitoramento das mudanças na população de *N. meningitidis*, o que não pode ser percebido pelos métodos tradicionais de tipagem fenotípica. Assim, esperamos que os resultados deste estudo contribuam para a revisão de estratégias para o tratamento e a vigilância da doença meningocócica em áreas urbana e rural do Amazonas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Descrever o perfil clínico e epidemiológico da doença meningocócica e a diversidade genética pela caracterização molecular do agente etiológico, no estado do Amazonas, entre os anos de 2000 e 2010.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever a distribuição temporal e geográfica da doença meningocócica.
- Descrever a epidemiologia e a clínica da doença meningocócica em áreas urbana e rural.
- Descrever a estrutura genética de *N. meningitidis* isolados de pacientes.
- Descrever o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *N. meningitidis*.
- Avaliar a circulação de cepas isogênicas que possuem variação genotípica no antígeno capsular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo do estudo

Para atingir os objetivos realizou-se um estudo retrospectivo, clínico e epidemiológico da investigação da doença meningocócica no Estado do Amazonas, no período de 2000 a 2010.

O projeto foi aprovado pelo CEP do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ nº 0029.0.009.000-10 (Anexo A).

4.2 Local e população do estudo

O estudo foi realizado no Amazonas, que possui uma população estimada em 2010 de 3.483.985 habitantes, com estimativa de 3.938.336 para o ano de 2015. O estado apresenta uma estrutura ecológica favorável à disseminação e a ocorrência da doença, principalmente, por suas condições de temperatura e umidade, características próprias da zona equatorial, assim como, um período intenso de chuvas na região norte que também se associa ao aumento do número de ocorrência da doença. A população do estudo consistiu de casos de doença meningocócica, confirmados ou suspeitos, notificados ao nível local.

4.3 Fonte de dados

O banco de dados de meningites da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SUSAM), do período de 2000 a 2010, foi utilizado como a fonte de dados secundários demográficos, clínicos, epidemiológicos e laboratoriais do estudo, o qual contém informações individualizadas de doença meningocócica, que foram digitadas a partir das fichas de notificação e investigação (Anexo B). Os casos de doença meningocócica e outras meningites foram revisados no sentido de que todos os casos que preenchessem os critérios de inclusão descritos abaixo pudessem ser incluídos:

- Critérios de inclusão
 - Caso confirmado: isolamento de *N. meningitidis* em cultura do LCE ou sangue; detecção de antígeno capsular de *N. meningitidis* em LCE ou soro pelo teste do látex ou contra imunoeletroforese; identificação de diplococos Gram negativos em raspado de lesão cutânea ou esfregaço de LCE corados pelo método de Gram; ou laudo de necrópsia.
 - Caso suspeito: quadro clínico sugestivo com febre de início abrupto seguido de

exantema hemorrágico, com exames bacteriológicos negativos ou indisponíveis.

- Critérios de exclusão
 - Casos de meningite bacteriana não especificada, ou por outras etiologias que não a meningocócica.

4.4 Descrição do aspecto clínico

Os pacientes foram classificados em três formas clínicas, sendo que os casos de septicemia seguiram a recomendação de Niklasson et al.²⁶:

- Meningite: caso confirmado sem púrpura.
- Meningite com septicemia: caso confirmado com púrpura ou caso suspeito com líquido cérebro-espinhal com >100 células/mm³.
- Septicemia: caso confirmado com púrpura ou suspeito com líquido cérebro-espinhal com ≤ 100 células/mm³ ou sem punção lombar.

4.5 Geoprocessamento

Os dados foram georreferenciados no Laboratório de Geoprocessamento (LabGeo) do Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (ICICT/Fiocruz), utilizando o programa Google Earth e ArcGIS 10. Para facilitar a análise dos dados e permitir comparações temporais, separaram-se os casos por ano de notificação, destacando-se a cidade de Manaus por ter uma quantidade de casos muito elevada e não permitir interpretações mais detalhadas deste local. Para inserir os casos dos sorogrupos B e C em ambiente de Sistema de Informações Geográficas (SIG), referenciaram-se os endereços dos casos utilizando o programa Google Earth. A partir desse processo obteve-se um par de coordenadas, dos quais foi possível estabelecer uma referência espacial a partir de pontos, que representassem a posição geográfica deste evento na superfície da terra, utilizando-se o programa ArcGIS 10.

Os mapas digitais utilizados do estado do Amazonas, foram obtidos no site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).⁷¹ Para facilitar a análise dos dados dividiu-se os mapas entre os sorogrupos B e C. Para cada sorogrupo há tipos sequenciados, nos quais foram gerados os pontos no mapa, distinguindo-se as quantidades localizadas nas cidades por tamanho, quanto mais casos do tipo sequenciado do sorogrupo naquele local, maior o tamanho de seu ponto no mapa.

4.6 Cálculo das taxas de incidência

As taxas de incidência foram calculadas utilizando as bases populacionais dos censos de 2000 e 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

4.7 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi realizado pelo programa Epi Info™ para o cálculo estatístico de dados categóricos, o que permite o emprego de estatísticas descritivas (médias) e alguns testes não paramétricos, dentre eles o qui-quadrado das diferenças entre proporções com correção de Yates na tabela 2x2. Para a razão dos produtos cruzados foi calculado limites exatos de confiança, para intervalos com 95% de confiança, os quais para valores próximos de 0% ou 100% não são exatos.

4.8 Análise das amostras de *Neisseria meningitidis*

4.9 Seleção e caracterização das amostras

As amostras de *N. meningitidis* neste estudo foram isoladas de pacientes residentes no estado do Amazonas entre 2002 e 2010, as quais foram encaminhadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (LACEN) ao Centro de Referência Nacional de Meningites (CRNM) do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, para caracterização fenotípica como sorogrupo, sorotipo e subtipo. Não há registro de amostras preservadas de *N. meningitidis* isoladas de pacientes do Amazonas em anos anteriores a 2002. As bactérias liofilizadas foram requisitadas pela Fundação de Vigilância em Saúde (FVS), as quais, posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório de Biodiversidade do Amazonas do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD).

4.10 Conservação das amostras

As amostras de *N. meningitidis* foram preservadas em criotubos contendo caldo TSB com 20% de glicerol em freezer -70°C.

4.10.1 Extração do DNA

O DNA genômico de cada uma das bactérias foi extraído do crescimento bacteriano em placa de ágar sangue, obtido a partir de uma única colônia, utilizando o protocolo para bactérias Gram negativas do QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), conforme orientações do fabricante.

4.10.2 Caracterização fenotípica

A sorogrupagem e a sorotipagem (sorotipo e subtipo) foram realizadas no CRNM, que passou a receber amostras de *N. meningitidis* do estado do Amazonas a partir de 2002, utilizando as técnicas de soroaaglutinação em lâmina, com anticorpos específicos para os 12 sorogrupos conhecidos, e de *imunoblotting* (Tabela 1), respectivamente.

Tabela 1. Especificidade, linhagem e origem dos anticorpos monoclonais (mabs) utilizados na sorotipagem de cepas de *Neisseria meningitidis*.

Mabs (Sorotipo)	Clone	Fonte	Mabs (Subtipo)	Clone	Fonte
1	MN3C6B	RIVM	P1.1	F10-5G6/1B11	IAL
2a	F12-7B7/1E10	IAL	P1.2	Od6-8	WRAIR
2b	F1-9H10/1B3	IAL	P1.3	12-1	WRAIR
2c	5-1-P2C	WRAIR	P1.4	F11-2A/1A	IAL
4	2303C5	FDA	P1,5	MN22A9.19	RIVM
5	9-1-P5	WRAIR	P1.7	MN14C11.6	RIVM
7	F22-8B5/1D10	IAL	P1.9	F24-5E11/2H9	IAL
9	F24-11F5/3B4	IAL	P1.10	MN20F4.17	RIVM
10	F11-6D12/1C5	IAL	P1.12	MN20A.10	RIVM
11	9-1-P11	WRAIR	P1.14	MN21G3.17	NIBSC
14	MN5C8C	RIVM	P1.14-6	F29-8H11/1E11	IAL
15	1951C8	FDA	P1.15	MN3C.5C B	RIVM
17	F4-3C1/1A6	IAL	P1.16	3-1-P1.16	WRAIR
19	10F1(17-1-P19)	WRAIR	P1.19	2-1-P1.19	WRAIR
21	-	WRAIR	P1.22-1	F4-1F1/1G11	IAL
22	IA5A12	NIPH			
23	F29-1G1/1B4	IAL			

4.10.3 Caracterização genotípica

Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Biodiversidade do ILMD/AM, para o cultivo e conservação das bactérias, extração do DNA genômico e testes de sensibilidade aos antibióticos. Nesse laboratório 55% das amostras foram genotipadas

pelo método de *multilocus sequence typing* (MLST) e pelo sequenciamento do gene *fHbp*. As demais amostras (45%) foram processadas na Universidade de Pittsburgh, EUA, para realização do MLST e sequenciamento dos genes *porB*, *porA* e *fetA*.

4.10.3.1 *Multilocus sequence typing* (MLST)

A técnica de MLST é realizada através da amplificação e do sequenciamento dos 7 genes constitutivos (*housekeeping genes*) de interesse: *abcZ* (transportador ABC), *adk* (adenilato quinase), *aroE* (chiquimato desidrogenase), *fumC* (fumarato hidratase), *gdh* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *pdhC* (piruvato desidrogenase) e *pgm* (fosfoglicomutase).

4.10.3.1.1 Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação dos genes do MLST foi realizada em volume de 50uL contendo: 0,2 µM de cada primer (Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs, tampão de PCR, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl do DNA alvo. A reação foi realizada em um termociclador (Applied Biosystems ProFlex) de acordo com os parâmetros contidos na Tabela 2. Os *Primers* utilizados para a amplificação dos genes do MLST para a *Neisseria meningitidis* estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2. Condições de ciclagem da PCR dos genes do MLST.

Ciclo	Temperatura	Tempo
1	94°C	2 minutos
2	94°C	1 minuto
3	55°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	2, 3, 4	34x
6	72°C	2 minutos
7	4°C	∞

Tabela 3. Primers de amplificação do MLST para *N. meningitidis*⁵¹

Gene locus	Nome Primer	Sequência	Tamanho (bp)
<i>abcZ</i>	abcZ – P1C	TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC	898
	abcZ – P2C	TCCCCGTCGTAAAAACAATC	
<i>adK</i>	adK – P1B	CCAAGCCGTGTAGAATCGTAA	708
	adK – P2B	TGCCCAATGCGCCCAATAC	
<i>aroE</i>	AroE – P1B	TTTGAAACAGGCGGTTGCGG	835
	AroE – P2B	CAGCGGTAATCCAGTGCGAC	
<i>fumC</i>	fumC – P1B	TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG	860
	fumC – P2B	GCCCCGTCAGCAAGCCCAA	
<i>gdh</i>	gdh – P1B	CTGCCCCGGGGTTTTCATCT	677
	gdh – P2B	TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG	
<i>pdhC</i>	pdhC – P1B	CCGGCCGTACGACGCTGAAC	818
	pdhC – P2B	GATGTCGGAATGGGGCAAACA	
<i>pgm</i>	pgm – P1	CTTCAAAGCCTACGACATCCG	1339
	pgm – P2	CGGATTGCTTTTCGATGACGGC	

4.10.3.1.2 Protocolo de eletroforese dos produtos de PCR

Para a visualização dos fragmentos amplificados foram utilizados 6 µL do produto da PCR adicionado de 1 µL de loading buffer, os quais foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, com voltagem de 100 volts, por 45 minutos a temperatura ambiente, em cuba de eletroforese horizontal contendo tampão TAE 1X. Os fragmentos de DNA foram visualizados sobre luz UV (254 nm).

4.10.3.1.3 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados por precipitação dos oligos e nucleotídeos não incorporados na reação utilizando polietilenoglicol 20% (PEG) de acordo com o procedimento descrito abaixo:

- Adicionou-se 50 µL de PEG 20% ao produto de PCR (p/v) e em seguida o mesmo foi homogeneizado.
- O produto de PCR com PEG 20% foram agitados em vórtex por 10 segundos e incubados a 37°C por 15 minutos.
- Após esse período o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 125 µL de etanol a 80% gelado.
- Centrifugou-se a 1500 RCF por 2 minutos, depois o sobrenadante foi descartado.
- Utilizando o termobloco, o resíduo de EtOH foi evaporado a 70°C durante 15 minutos.

- Adicionou-se água ao produto do PCR na mesma quantidade do volume inicial.
- O produto da PCR foi incubado em temperatura ambiente por 12 horas.
- Após esse período o mesmo foi agitado em vórtex e armazenado a -20°C .

4.10.3.1.4 Sequenciamento dos genes do MLST

O sequenciamento foi realizado seguindo metodologia padrão utilizando o sequenciador ABI 3130 4 capilares de 36cm (Plataforma ILMD/FIOCRUZ).

Para a reação de sequenciamento dos produtos da PCR dos genes do MLST utilizou-se o volume de 10 μL em placas de 96 poços contendo: 0,32 μM de *Primers*, 0,3 μL de Big Dye, 2 μL do tampão (5 X) e 60 ng do produto amplificado. A reação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems ProFlex) seguindo as condições mostradas na Tabela 4. Os *Primers* utilizados para o sequenciamento dos genes do MLST para a *Neisseria meningitidis* estão descritos na Tabela 5.

Tabela 4. Condições de ciclagem da reação de sequenciamento do MLST⁷²

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	96°C	1 minuto	
2	96°C	15 segundos	25 ciclos
3	60°C	10 segundos	
4	60°C	2 minutos	
5	60°C	15 segundos	15 ciclos
6	96°C	10 segundos	
7	60°C	3 minutos	
8	4°C	∞	

Tabela 5. *Primers* de sequenciamento do método MLST para *N. meningitidis*⁵¹

Gene locus	Nome Primer	Primer forward (5'-3') ¹	Nome primer	Primer reverse (5' - 3') ¹
abcZ	abcZ – S1A	AATCGT [*] TTATGTACCGCAGR	abcZ – S2	GAGAACGAGCCGGGATAGGA
adK	adK – S1A	AGGCWGGCACGCCCTTGG	adK – S2	CAATACTTCGGCTTTCACGG
aroE	AroE – S1A	TCGGTCAAYACGCTGRTK	AroE – S2	ATGATGTTGCCGTACACATA
fumC	fumC – S1	TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG	fumC – S2	TTGTAGGCCGGTTTTGGCGAC
Gdh	gdh – S3	CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC	gdh – S4C	RCGCACGGATTCA TRYGG
pdhC	pdhC – S1	TCTACTACATCACCTGATG	pdhC – S2	ATCGGCTT [*] TGATGCCGTATTT
pgm	pgm – S1	CGGCGATGCCGACCGCTTGG	pgm – S2A	GGTGATGATTTCCGGTYGCRCC

Denominações de nucleotídeos da IUPAC: R = A ou G; W = T ou G; Y = C ou T; N = A, T, G, ou C

4.10.3.1.5 Purificação da reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi purificada para remover ddNTPs, dNTPs, *Primers* e enzimas não incorporados na reação, de modo que não interfiram na leitura do sequenciador. Então, foi utilizado o seguinte protocolo:

- Foram adicionados 2 µL da solução de EDTA 125 mM e acetato de sódio 3M (pH5,2) em cada poço da placa de sequenciamento.
- Em seguida, adicionou-se 25 µl de EtOH a 100% gelado em cada poço da placa de sequenciamento.
- A placa foi vedada com adesivo e misturada por inversão quatro vezes.
- A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
- Em seguida, a placa foi centrifugada a 2000 RCF por 45 minutos.
- Após esse período foi desprezado o excesso do conteúdo da placa.
- A placa foi invertida sobre papel absorvente para garantir a retirada do etanol, em seguida centrifugada por 1 minuto a 180 RCF.
- Adicionou-se 35 µL de EtOH a 70% em cada um dos poços.
- Com a placa vedada, foi centrifugada por 15 minutos, à 4 °C, e 1650 RCF.
- Após a centrifugação foi desprezado o conteúdo da placa, para retirar o excesso de etanol.
- A placa foi invertida sobre papel absorvente para garantir a retirada do etanol, em seguida centrifugada por 1 minuto a 180 RCF.
- A placa foi incubada à 52°C por 15 minutos.
- Após esse período a placa foi vedada e congelada, ao abrigo da luz, até a realização do sequenciamento.

4.10.3.1.6 Análise das sequências obtidas no sequenciamento

As sequências obtidas foram transformadas em arquivo FASTA para serem analisadas utilizando o software Genious 6.0, ferramenta de bioinformática que permite alinhamento e montagem das sequencias, comparando as sequências entre si e agrupando de modo que se obtenha uma sequência consenso ou contig, com base na sobreposição de sequências.

4.10.3.1.7 Análise de dados do MLST

O consenso das sequências analisadas, foram submetidas ao banco de dados da plataforma do MLST para *N. meningitidis* (disponível em <http://pubmlst.org/neisseria/>) para ser atribuída uma identificação numérica, que pode ser conhecida ou não, como no caso de um alelo novo.

- A partir das combinações dos alelos identificados foi determinado um tipo sequenciado (*sequence type* – ST)
- Considerou-se um novo ST quando foi encontrado um alelo novo ou uma nova combinação de alelos;

Os dados gerados foram analisados contra todos os ST encontrados na plataforma do MLST, a fim de organizar a população em complexos clonais (cc).

Os complexos clonais foram definidos como um grupo de ST em uma população que compartilha de 4 a 7 alelos.

Os ST novos e os complexos clonais (cc) foram definidos pelo curador da plataforma do MLST.

4.10.3.2 Análise dos genes codificadores de proteínas da membrana externa: *porB*, *porA*, *fetA* e *fHbp*

4.10.3.2.1 Amplificação dos genes alvo

A amplificação das regiões variáveis dos genes codificadores de antígenos *porA*, *fetA*, *porB* e *fHbp* foram realizadas seguindo o seguinte protocolo: volume final de 50 µL do mix da PCR contendo: 0,4 µM de cada *Primers*, 200 mM de dNTPs, 5 µL de tampão de PCR, 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase e 1 µL do DNA alvo. Os parâmetros estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Condições de ciclagem para amplificação dos genes *fetA*, *porA*, *porB*, *fHbp* de *N. meningitidis*⁷²

Gene <i>porA</i>	Gene <i>porB</i>	Gene <i>fetA</i>	Gene <i>fHbp</i>
1x (95°C, 5 min)	1x (94°C, 5 min)	1x (95°C, 5 min)	1x (95°C, 5 min)
30x 95°C, 1 min; 60°C, 30 seg; 72°C, 2 min	35x 94°C, 1 min; 60°C, 30 seg; 72°C, 1 min	40x 95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2.5 min	35x 95°C, 50 seg; 56°C, 50 seg; 72°C, 50 seg
1x (72°C, 5 min)	1x (72°C, 5 min)	1x (72°C, 7 min)	1 x (72°C, 7 min)
4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

Os *Primers* utilizados para a reação de PCR dos genes *porB*, *porA*, *fetA*, *fHbp* estão relacionados na Tabela 7. Os fragmentos dos genes codificadores de proteínas da membrana externa foram submetidos à eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente.

Tabela 7. *Primers* para amplificação dos genes *fetA*, *porA*, *porB*, *fHbp* de *N. meningitidis*^{73,74,75}

Gene	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5' – 3')	Tamanho (bp)
<i>porA</i>	P14 GGGTGTTTGCCCGATGTTTTTAGG	P22 TTAGAATTGTGTGGCGCAAACCGAC	1236
<i>porB</i>	PB-A1 TAAATGCAAAGCTAAGCGGCTTG	PB-A2 TTTGTTGATACCAATCTTTTCAG	1755
<i>fetA</i>	S1 CGGCGCAAGCGTATTCGG	S8 CGCGCCCAATTCGTAACCGTG	1189
<i>fHbp</i>	Mur-F CTATTCTGCGTATGACTAGGAG	Mur-R GTCCGAACGGTAAATTATCGTG	899

4.10.3.2.2 Purificação dos produtos amplificados

Para executar o sequenciamento de nucleotídeos de DNA, os produtos de amplificação foram purificados utilizando o Kit Promega de acordo com o procedimento descrito abaixo:

- Adicionou-se 50 µL da solução de “Membrane binding” (MB) no produto de PCR.
- Foi adicionado a coluna em um tubo coletor para transferir a mistura produto de PCR + MB, em seguida incubado a temperatura ambiente por 1 minuto
- Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 1 minuto. Ao término da centrifugação, descartou-se o líquido do tubo coletor.
- Foi adicionado 500 µL de Membrana Wash Solution – MWS – (já com etanol 95%) e centrifugou-se a 14000 por 1 minuto. Ao término da centrifugação, descartou-se o líquido do tubo coletor.
- Esse processo foi repetido com 300 µL de MWS e centrifugado por 5 minutos. Ao término da centrifugação, descartou-se o líquido do tubo coletor.
- Para retirar o excesso do líquido, o tubo com MWS foi centrifugado por 1 minuto.

- A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL com o nome da amostra, onde foi adicionado 20 µL de água, realizando uma nova incubação por 1 minuto e centrifugação por 1 minuto.

4.10.3.2.3 Sequenciamento

As reações de sequenciamento dos genes foram realizadas em volume final de 20 µL contendo: 0,16 µM de primer, 4 µL de tampão 5 X, 1 µL de Big Dye e 3,0 µL do amplicon purificado. As condições de ciclagem conforme a Tabela 8. Os *Primers* utilizados para a reação de sequenciamento dos genes *porB*, *porA*, *fetA*, *fHbp* estão descritos na Tabela 9.

Tabela 8. Condições de ciclagem para o sequenciamento dos genes *fetA*, *porA*, *porB*, *fHbp* de *N. meningitidis*⁷²

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	96°C	10 segundos	
2	50°C	5 segundos	25 ciclos
3	60°C	2 minutos	
4	4°C	Infinito	

Tabela 9. *Primers* de sequenciamentos dos genes *fetA*, *porA*, *porB* de *N. meningitidis*^{73,74,75}

Gene	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5' – 3')
<i>porA</i> VR1	U86 GCCCTCGTATTGTCCGCACTG	R435 TTGCTGTCCCAAGGATCAATGGC
<i>porA</i> VR2	F435 GCCATTAATCCTTGGGACAGCAA	R773 GGCATAGTTCCCGGCAAACCGCCAT
<i>porB</i>	PB-S1 GCAGCCCTTCCTGTTGCAGC	PB-S2 TTGCAGATTAGAATTTTGTG
<i>porB</i>	8U TCCGTACGCTACGATTCTCC	8L GGAGAATCGTAGCGTACGGA
<i>porB</i>	244U CGCCCCGCGTTTCTTACG	244L CGTAAGAAACGCGGGGCG
<i>porB</i>		PB260 AGTGCCTTTGGAGAAGTCGT
<i>fetA</i>	S12 TTCAACTTCGACAGCCGCCTT	S15 TTGCAGCGCGTCR*TACAGGCG

A reação de sequenciamento foi purificada para remover ddNTPs, dNTPs, *Primers* e enzimas não incorporados na reação, de modo que não interfiram na leitura do sequenciador. Então, foi utilizado o seguinte protocolo:

- Foram adicionados 2 μ L da solução de EDTA 125 mM e acetato de sódio 3M (pH5,2) em cada poço da placa de sequenciamento.
 - Em seguida, adicionou-se 25 μ l de EtOH a 100% gelado em cada poço da placa de sequenciamento.
 - A placa foi vedada com adesivo e misturada por inversão quatro vezes.
 - A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
 - Em seguida, a placa foi centrifugada a 2000 RCF por 45 minutos.
 - Após esse período foi desprezado o excesso do conteúdo da placa.
 - A placa foi invertida sobre papel absorvente para garantir a retirada do etanol, em seguida centrifugada por 1 minuto a 180 RCF.
 - Adicionou-se 35 μ L de EtOH a 70% em cada um dos poços.
 - Com a placa vedada, foi centrifugada por 15 minutos, à 4°C, e 1650 RCF.
 - Após a centrifugação foi desprezado o conteúdo da placa, para retirar o excesso de etanol.
 - A placa foi invertida sobre papel absorvente para garantir a retirada do etanol, em seguida centrifugada por 1 minuto a 180 RCF.
 - A placa foi incubada à 52°C por 15 minutos.
- Após esse período a placa foi vedada e congelada, ao abrigo da luz, até a realização do sequenciamento.

4.10.3.2.4 Análise das sequências

As sequências obtidas foram transformadas em arquivo FASTA para serem analisadas utilizando o software Genious 6.0, ferramenta de bioinformática que permite alinhamento e montagem das sequencias, comparando entre si e agrupando de modo que se obtenha uma sequência consenso ou contig, com base na sobreposição das mesmas.

Após obtenção dos consensos, os mesmos foram submetidos à consulta no banco de dados da plataforma do MLST *N. meningitidis* (disponível em <http://pubmlst.org/neisseria/>), para obter uma identificação numérica.

4.11 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da penicilina, ampicilina, rifampicina e cloranfenicol foram determinadas pelo método de E-test[®] (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os testes foram realizados em placa com agar Müller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Cada placa (90 mm Ø) foi semeada por inundação com 2 ml de uma suspensão bacteriana preparada em salina fisiológica estéril e ajustada em espectrofotômetro a uma $A_{625nm} = 0,10$ (absorbância), o que equivale a 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/ml). Esta suspensão bacteriana corresponde ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Depois de retirado todo o excesso da suspensão e a superfície da placa ter secado são colocadas duas fitas em sentido inverso. As placas foram em seguida acomodadas em jarra com atmosfera de 5% de CO₂/95% de ar atmosférico obtida com vela, a qual foi incubada a 35°C em estufa bacteriológica por um período de 20 a 24 horas. Os critérios para interpretação das CIM para *N. meningitidis* publicados no documento M100-S20 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* foram seguidas (Tabela 10).⁷⁶ A cepa de referência *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 49619 foi incluída no controle de qualidade.

Tabela 10. Critérios de interpretação das CIM dos antimicrobianos testados⁷⁶

Categoria	Critérios (µg/ml)			
	Penicilina	Ampicilina	Rifampicina	Cloranfenicol
Sensível	≤0,06	≤0,12	≤0,5	≤2
Resistência intermediária	0,12 - 0,25	0,25 - 1	1	4
Resistente	≥0,5	≥2	≥2	≥8

5. RESULTADOS

5.1 Casos de doença meningocócica no Amazonas

A análise do banco de dados utilizado neste estudo, que cobre o período de 2000 a 2010, identificou 948 casos que preenchiam pelo menos um dos critérios de inclusão deste estudo: clínica (31%), cultura (40%), bacterioscopia (18%), detecção de antígeno (10%) ou necropsia (1%).

5.1.1 Variação na incidência da doença meningocócica

A média da taxa de incidência anual da doença meningocócica no Amazonas, entre 2000 e 2010, foi de 3 casos/100.000 habitantes, enquanto na capital foi de 4.8 casos/100.000. Além de concentrar o maior número de casos e apresentar as maiores taxas de incidência do estado, a doença meningocócica apresentou um comportamento hiperendêmico na capital entre 2000 e 2004, com taxas de incidência variando de 5,8 a 8,3 casos/100.000 habitantes (Figura 5).

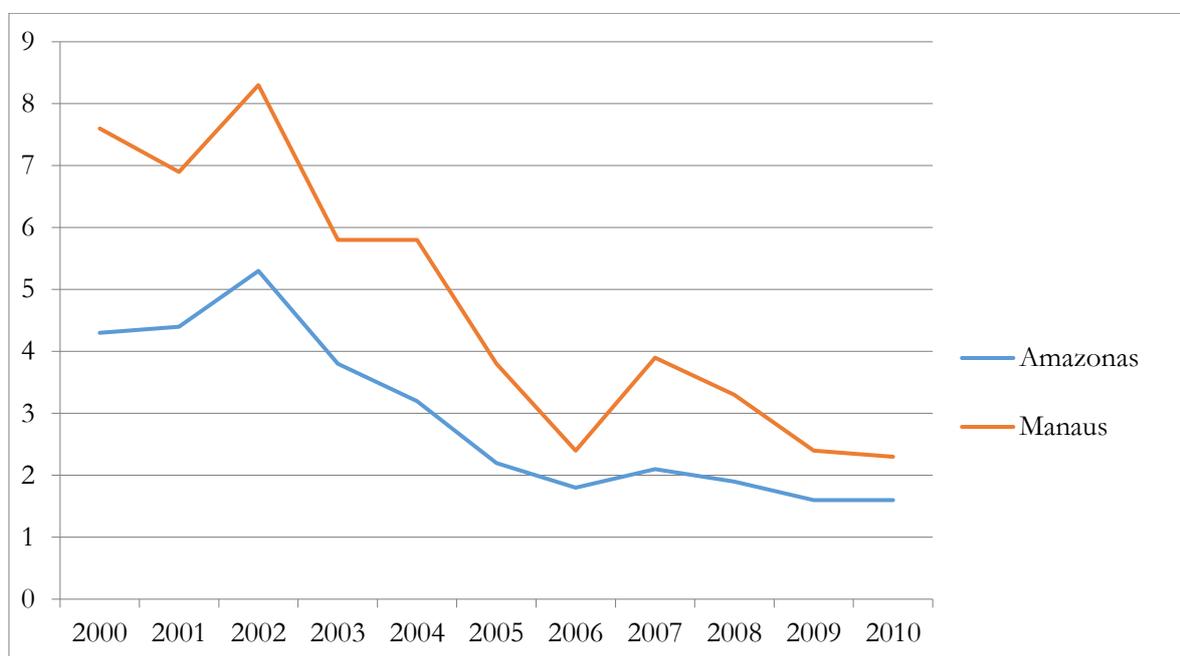


Figura 5 Taxa anual de incidência (casos/100.000 habitantes) da doença meningocócica no estado do Amazonas e na cidade de Manaus, 2000 - 2010.

5.1.2 Distribuição geográfica

Os casos de doença meningocócica estão distribuídos por 58 (94%) dos 62 municípios que compõem o estado do Amazonas (Figura 6); a capital Manaus concentra o maior número de casos (81%; 769/948). Os demais municípios foram agrupados na categoria interior, onde foram registrados 179 (19%) casos de doença meningocócica: 103 (58%) em área urbana, 72 (40%) em área rural e 4 (2%) em área indígena. Anote-se, porém, que possivelmente alguns casos da área rural sejam na verdade populações indígenas. Alternativamente, outros casos notificados como residentes em área urbana, na verdade, estejam em locais periurbanos ou com características de área rural.

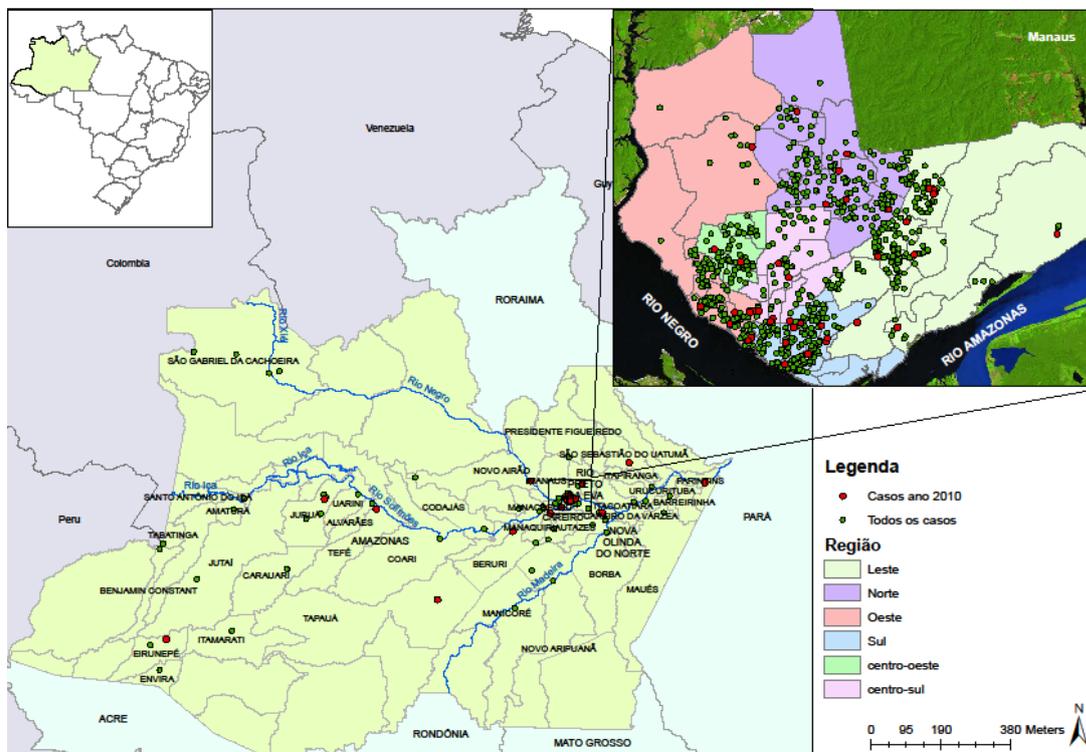


Figura 6. Distribuição da doença meningocócica no estado do Amazonas no período de 2000 a 2010.

A Figura 7 mostra a distribuição da doença meningocócica em todas as zonas da capital do Amazonas, onde podemos identificar a ocorrência da doença em todas elas. Há um menor registro de casos de doença na periferia das zonas norte, oeste e leste, onde a população é mais dispersa.

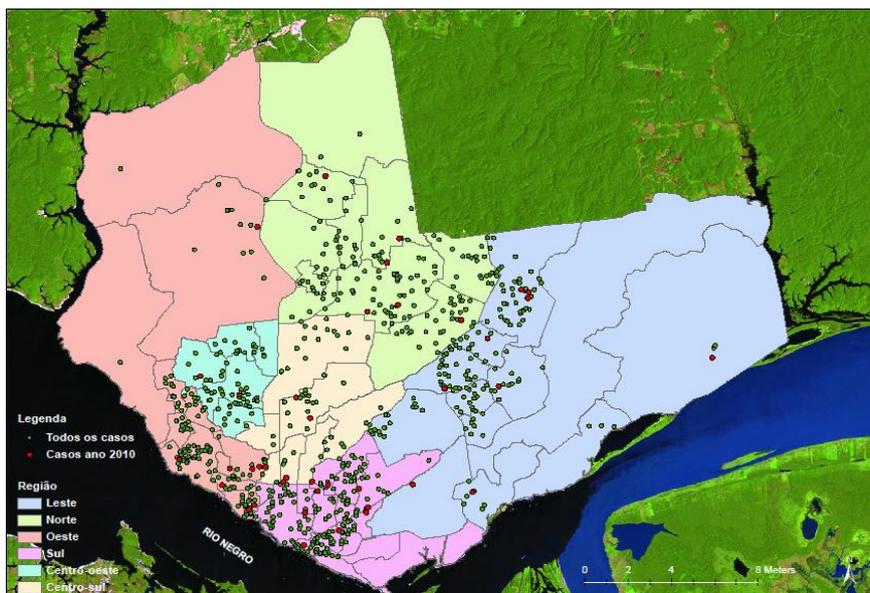


Figura 7. Distribuição da doença meningocócica no município de Manaus no período de 2000 a 2010.

As Figuras 8 e 9 apresentam ano a ano a localização da doença meningocócica, entre 2000 e 2010, respectivamente no estado do Amazonas e na capital, onde é possível observar um constante maior número de casos na capital. A dispersão dos casos de doença meningocócica mostrada nesses mapas confirma a tendência de persistência da ocorrência de casos novos em determinadas regiões, assim como a ocorrência de casos esporádicos em certas áreas isoladas. Fora da capital os casos se concentram nos municípios próximos de Manaus e, em menor proporção, ao longo dos rios Amazonas e Solimões, as principais vias fluviais de deslocamento da população.

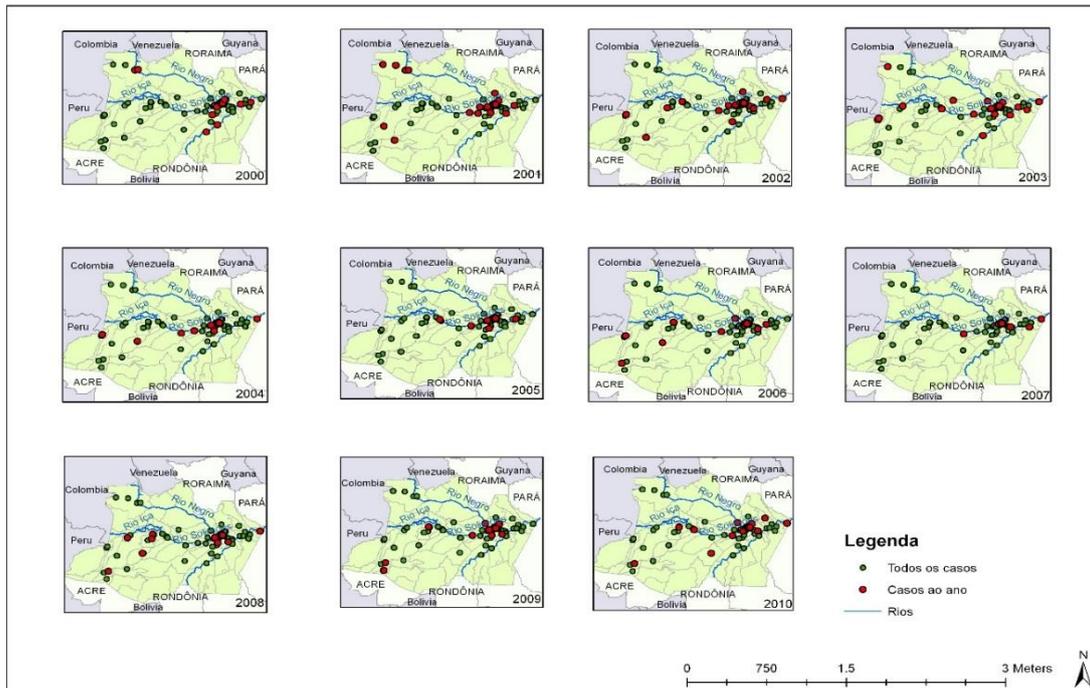


Figura 8. Distribuição anual dos casos novos de doença meningocócica no Amazonas, 2000 – 2010.

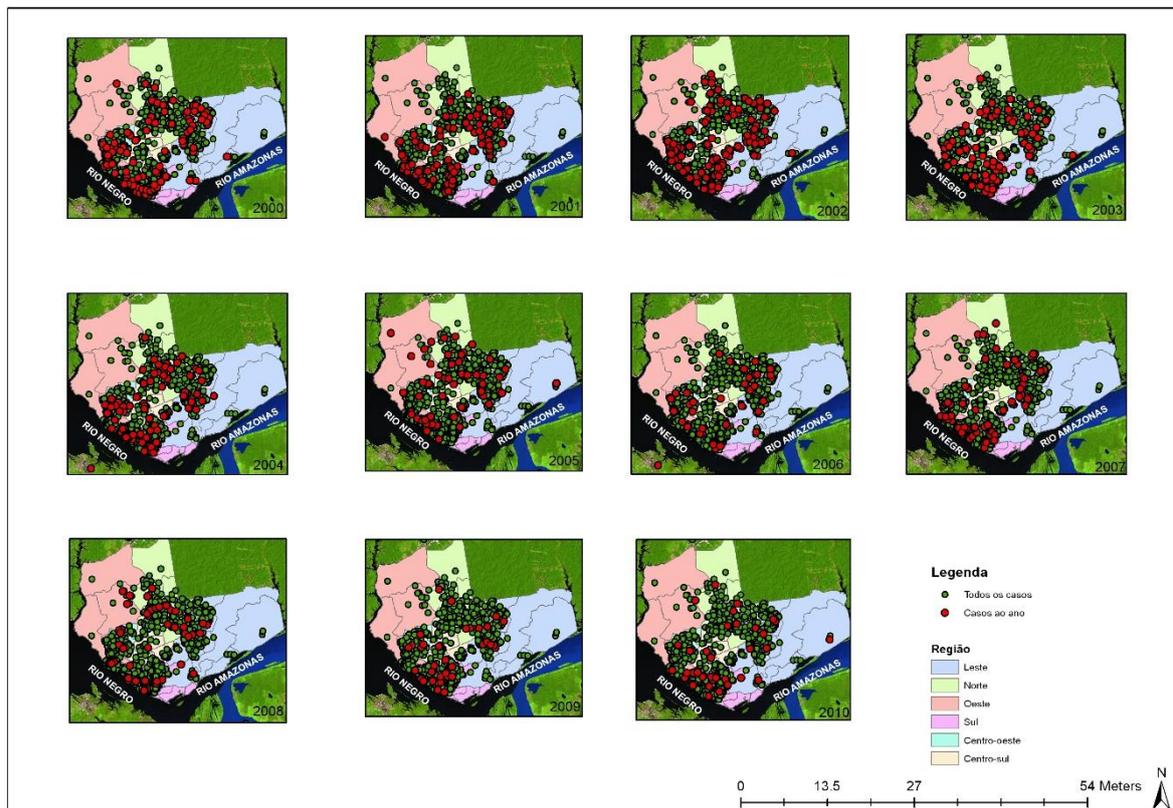


Figura 9. Distribuição anual dos casos novos de doença meningocócica em Manaus, 2000 - 2010.

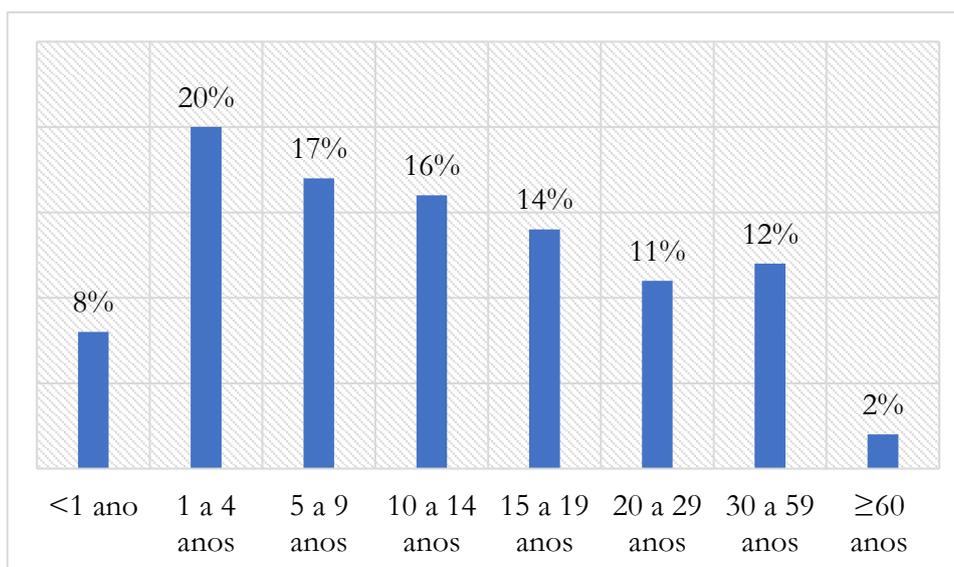


Figura 10. Distribuição da doença meningocócica de acordo com os grupos etários.

Quando os pacientes são estratificados pela faixa etária e o sorogrupo da bactéria há uma menor proporção de crianças (< 10 anos) infectadas pelo sorogrupo C (27%; 31/114) em comparação com o sorogrupo B (42%; 144/344) ($\chi^2 = 7$; $P < 0,01$); os dois casos de doença pelo sorogrupo A eram em crianças (2 e 10 anos). O mesmo é observado quando comparamos o total de casos do período de 2000 a 2006 (48%; 340/706), quando havia um predomínio do sorogrupo B, com aquele do período de 2007 a 2010 (36%; 86/242), quando houve um aumento dos casos provocados pelo sorogrupo C. ($\chi^2 = 11$; $P < 0,01$). Ademais, nota-se uma maior proporção de casos de doença meningocócica na faixa etária de 30 a 59 anos tanto dentre os infectados pelo sorogrupo C (23% x 12%; $p < 0,01$) quanto no período entre 2007 e 2010 (17% x 11%; $p < 0,01$).

Houve um predomínio da doença no sexo masculino (55%) em relação ao feminino (45%), assim como tem sido relatado na literatura médica; relação homem/mulher foi de 1,2 (523/425). Entretanto nas faixas etárias de 15 a 19 anos e maiores de 59 anos a doença foi mais frequente nas mulheres do que nos homens: 16% x 12% (68/425 x 62/523; $\chi^2 = 3$; $P = 0,04$) e 2% x 0,8% (10/425 x 4/523; $\chi^2 = 3$; $P = 0,04$), respectivamente. O predomínio da doença no sexo feminino no grupo de adolescentes foi observado nos dois períodos do estudo (16% x 12%; 17% x 12%), enquanto nos maiores de 59 anos apenas no primeiro período (2% x 0,3%; 3% x 2%).

5.3.1 Taxa de letalidade da doença meningocócica

A média da taxa de letalidade no período do estudo foi calculada em 18% (171/930; 18 [2%] casos sem informação), a qual foi igual àquela calculada para Manaus (18%; 140/757) e o interior (18%; 31/173). Entretanto a taxa de letalidade apresentou variação significativa entre os dois períodos do estudo, com uma taxa de 16% (114/701) entre 2000 a 2006 e de 25% (57/229) entre 2007 a 2010 ($\chi^2 = 7,9$; $p < 0,01$). Um aumento da chance de falecer no segundo período também foi observado para a cidade de Manaus (16% x 25%; $\chi^2 = 5,6$; $p < 0,01$) e o interior (15% x 26%; $\chi^2 = 1,8$; $p = 0,08$).

No conjunto de municípios do interior, a taxa de letalidade foi de 23% (23/102) para os residentes em áreas urbanas, 9% (6/66) para os de área rural e 50% em área indígena (2/4). Anote-se, porém que 63% (113/179) dos pacientes do interior foram transferidos para a capital, e destes 10% (11/109; 4 sem informação) faleceram, enquanto 31% (20/64; 2 sem informação) que foram hospitalizados no município de residência evoluíram para um desfecho fatal ($\chi^2 = 10$; $p < 0,01$).

A taxa de letalidade variou de acordo com os grupos etários definidos neste estudo, sendo que as maiores letalidades foram registradas nas crianças pequenas e nos idosos (Tabela 11). Um aumento das taxas de letalidade foi observado em todas as faixas etárias, exceto nos idosos, a partir de 2007.

Tabela 11. Taxas de letalidade de acordo com os grupos etários.

Grupo etário (anos)	Letalidade (2000-2006)	Letalidade (2007-2010)	Letalidade (2000-2010)
< 1	29%	36%	32%
1 - 4	25%	41%	28%
5 - 9	11%	25%	14%
10 - 14	5%	13%	7%
15 - 19	8%	14%	10%
20 - 29	16%	28%	19%
30 - 59	20%	29%	23%
≥ 60	75%	50%	64%

A taxa de letalidade de acordo com a forma clínica foi de 4% (8/227) para a meningite, 8% (27/344) para a meningite com septicemia e 38% (136/359) para a septicemia. Apesar de ter havido no segundo período do estudo uma redução das formas clínicas com

púrpura, as quais são associadas a um pior prognóstico, a chance de falecer aumentou (Tabela 12). A mesma tendência foi observada na capital e no interior.

Tabela 12. Taxas de letalidade de acordo com as formas clínicas.

	2000 - 2006	2007 - 2010		
Forma clínica	Letalidade	Letalidade	χ^2	Valor de p
Meningite	3% (5/162)	5% (3/65)	0,02	0,4
Meningite/Septicemia	6% (17/272)	14% (10/72)	3,5	0,02
Septicemia	34% (92/267)	48% (44/92)	4,6	0,01

O desenlace da doença apresentou diferença quando comparado os casos confirmados por exame laboratorial com aqueles não confirmados. A taxa de letalidade estimada para os casos confirmados por exame laboratorial foi de 11% (73/642), enquanto para os casos não confirmados foi de 34% (98/288) ($\chi^2 = 66$; $p < 0,01$), um fato relacionado a um maior número de formas purpúricas, em particular as formas septicêmicas (20% [133/656] x 79% [228/292], respectivamente; $\chi^2 = 284$; $p < 0,01$);

A infecção pelo sorogrupo C também foi associada a uma maior chance de falecer (12%; 13/109) em comparação com aquela provocada pelo sorogrupo B (9%; 29/341), porém a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0.1$).

5.4 Quadro clínico da doença meningocócica

A frequência dos sinais e sintomas é apresentada na Figura 11. Os sintomas com frequência menor que 10% não constam na ficha de notificação (Anexo B), os quais são anotados um a um no espaço “outros sintomas”, o que pode influenciar a na frequência. Todos esses sintomas são inespecíficos e surgem em uma fase precoce do desenvolvimento da doença invasiva, o que pode retardar o diagnóstico por serem normalmente associados a outras doenças mais comuns. No entanto, história prévia de febre súbita acompanhada de dor de garganta, artralgia ou mialgia deveriam sugerir o diagnóstico de doença meningocócica. Dor nas costas e no abdômen também são queixas frequentes num contexto de quadro febril de início súbito.⁴⁰ Ademais em algumas faixas etárias tais sintomas aparecem com uma frequência significativa, o que deveria levar a uma revisão da ficha epidemiológica e os alertas sobre o diagnóstico precoce da doença meningocócica (Tabela 13).

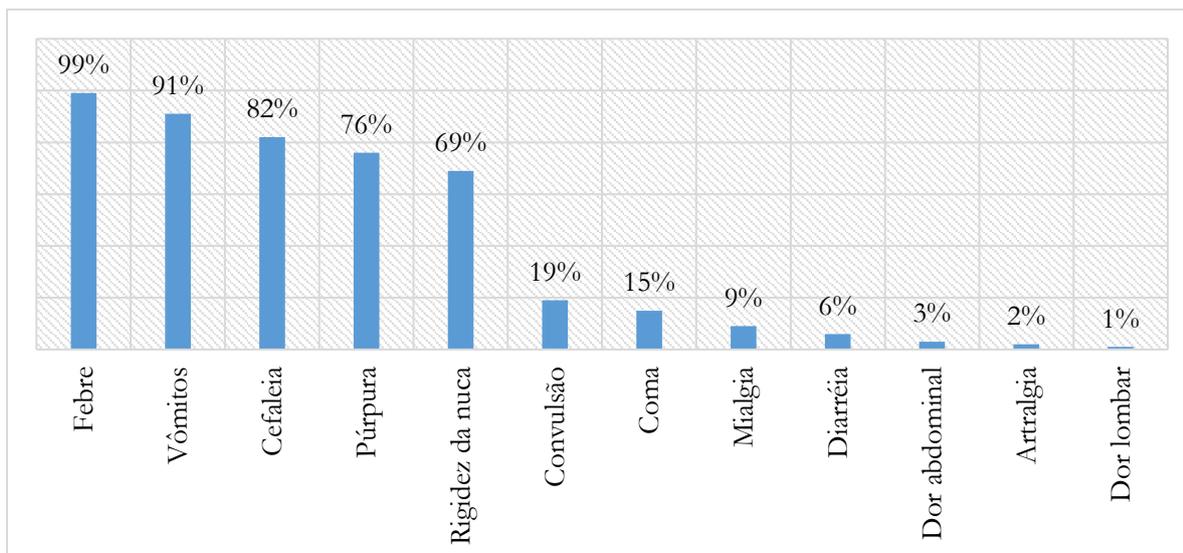


Figura 11. Frequência dos sinais e sintomas da doença meningocócica.

Tabela 13. Frequência dos sinais e sintomas da doença meningocócica de acordo com o grupo etário.

GR	Febre	Vômitos	Cefaleia	Púrpura	RN	Convulsão	Coma	Mialgia	Diarréia	DA	Artralgia	DL
< 1	100%	79%	n/a	71%	47%	16%	11%	n/a	9%	n/a	n/a	n/a
1 - 4	99%	87%	66%	87%	54%	26%	9%	3%	4%	2%	0,5%	1%
5 - 9	99%	93%	89%	80%	70%	22%	9%	7%	5%	4%	3%	0%
10 - 14	99%	99%	96%	68%	82%	19%	8%	8%	6%	2%	2%	2%
15 - 19	99%	96%	98%	76%	77%	13%	14%	17%	8%	4%	4%	0%
20 - 29	99%	91%	97%	75%	76%	13%	7%	14%	8%	4%	4%	3%
30 - 59	97%	87%	93%	66%	76%	20%	16%	15%	9%	4%	5%	0%
≥ 60	100%	86%	79%	79%	50%	7%	21%	7%	7%	7%	0%	0%

GR = grupo etário (anos); RN = rigidez de nuca; DA = dor abdominal; DL = dor lombar

5.5 Caracterização fenotípica de *N. meningitidis*

5.5.1 Variação na frequência dos sorogrupos

Dentre os casos confirmados (69%; 656/948), 70% (460/656) continham a identificação do sorogrupo. Do total de casos confirmados com a identificação do sorogrupo (n = 460), entre 2000 e 2010, 344 foram causados pelo sorogrupo B (74,8%) e 114 pelo sorogrupo C (24,8%); dois casos foram atribuídos ao sorogrupo A (0,4%). Entretanto, houve uma mudança da prevalência dos sorogrupos ao longo do tempo (Figura 12). A partir de 2007 há um aumento gradual e sustentado do sorogrupo C, o que resultou em 68% (66/97) dos pacientes infectados pelo sorogrupo C entre 2007 e 2010, enquanto no período anterior a proporção foi de 13% (48/363) ($\chi^2 = 120$; $P < 0,01$). Esta tendência se manteve inalterada

até o final de 2015 (Figura 12). Assim, o estudo foi subdividido em dois períodos: 2000 a 2006, quando havia predomínio da doença pelo sorogrupo B, e 2007 a 2010, quando ocorreu a inversão para o predomínio da doença pelo sorogrupo C.

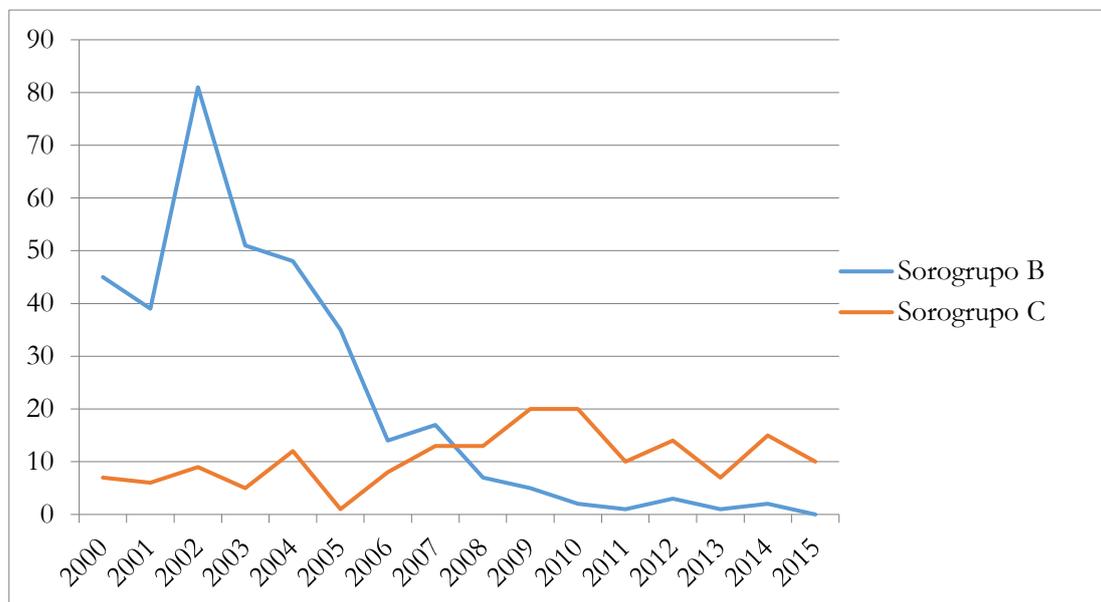


Figura 12. Distribuição anual dos casos confirmados de acordo com o sorogrupo B e C no período de 2000 a 2015.

5.5.2 Variação na frequência dos sorotipos e subtipos

De 2002 até 2010, foram enviadas 254 amostras ao CRNM, sendo que 192 foram caracterizadas como sorogrupo B e 62 como sorogrupo C; média de 28 isolados por ano. Do total de amostras depositadas na coleção de cultura, 196 (77%; 196/254) estavam viáveis e foram incluídas neste estudo: 144 (75%; 144/192) do sorogrupo B e 52 (84%; 52/62) do sorogrupo C.

Os perfis de sorotipos e subtipos do total de amostras depositadas no CRNM são apresentados nas Figuras 13 e 14. Dentre os isolados do sorogrupo C, 6 (10%; 6/62) foram caracterizados como 4,7:P1.19,15 e incluídos no estudo. Este perfil de proteínas da membrana externa, tipicamente relacionada ao sorogrupo B, é um indicativo de mudança de cápsula de B para C.

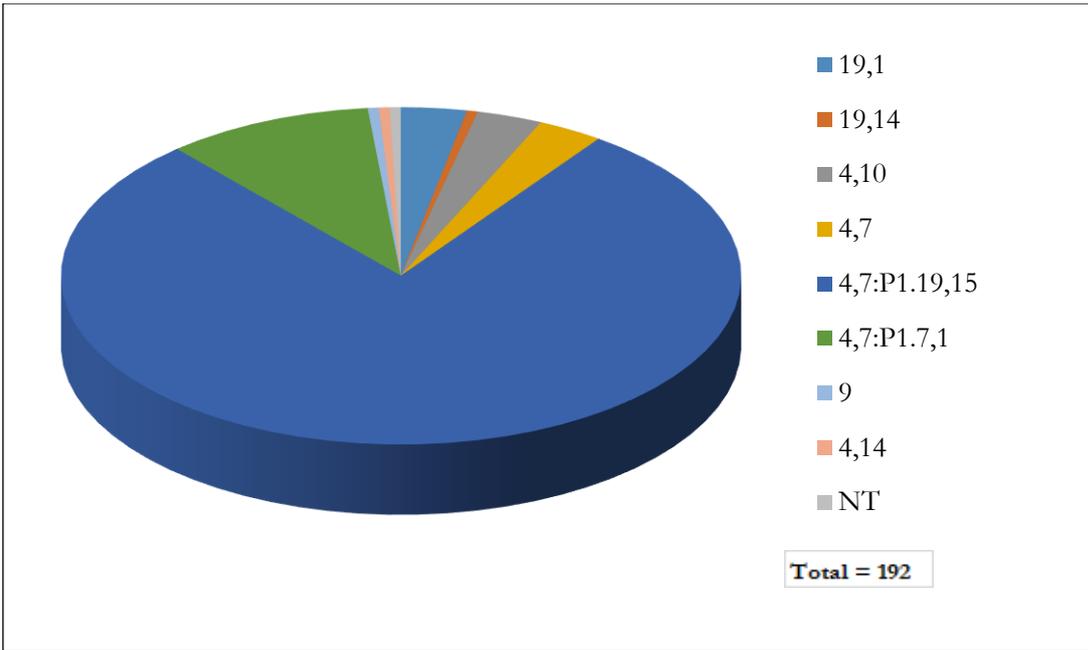


Figura 13. Perfil de soro-subtipos de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B isolados de pacientes no estado do Amazonas no período de 2002 a 2010.

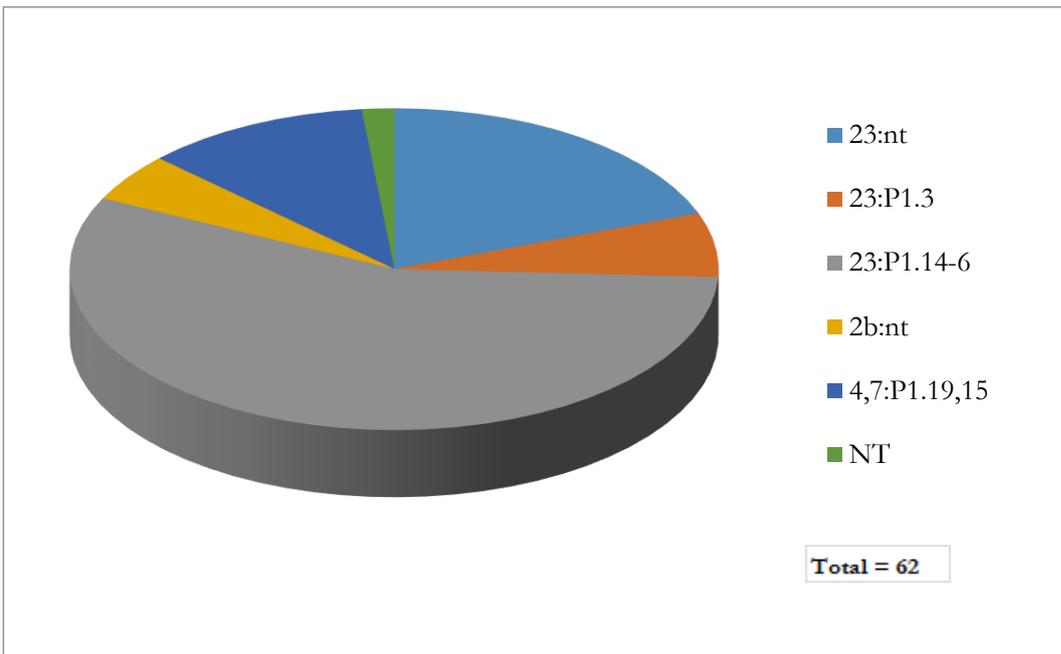


Figura 14. Perfil de soro-subtipos de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C isolados de pacientes no estado do Amazonas no período de 2002 a 2010.

5.6 Diversidade genética de *Neisseria meningitidis*

A genotipagem por MLST associada ao sequenciamento quatro genes codificadores de proteínas da membrana externa determinou as linhagens genéticas de 196 *N. meningitidis* dos sorogrupos B ou C (Tabela 14). Ficou demonstrada uma população bastante diversa associada com doença invasiva, com alguns clones predominando em cada complexo clonal, sendo que alguns desses clones já eram conhecidos enquanto outros até então não haviam sido descritos.

O complexo clonal (cc) 32 foi preponderante dentre as amostras do sorogrupo B, enquanto o cc103 foi para o sorogrupo C. Em ambos complexos clonais foram identificados vários novos STs, os quais até então não haviam sido descritos. Dentre as bactérias do sorogrupo B do cc32 houve o predomínio do ST-5996 (43%), seguido pelos ST-639 (17%) e ST-33 (13%), os quais já haviam sido descritos anteriormente. As bactérias do sorogrupo C do cc103 na sua maioria foram identificadas como ST-11401 (61%), um novo ST identificado neste estudo, seguido pelo ST-3779 (22%), o qual já foi descrito anteriormente. Duas bactérias do ST-3779 e uma do ST-11401 foram identificadas com deleção do gene *porA* (P1.Δ,Δ). Todos os isolados do sorogrupo B apresentaram PorB3, normalmente 3-1 ou 3-79. Alternativamente, os isolados do sorogrupo C apresentaram PorB2, 2-23 ou 2-30, com a exceção de 6 bactérias que apresentaram PorB3, 3-1 ou 3-587.

Tabela 14. Genotipagem de 196 cepas de *Neisseria meningitidis* associados com doença invasiva no Amazonas, 2002 – 2010.

Sorogrupo	Genótipo (número de amostras)
B	Complex clonal ST-32 (n = 135)
2002	3-1:P1.19,15:F5-1:ST-33 (1)
2001-2005	3-1:P1.19,15:F3-4:ST-33 (15)
2004-2006	3-1:P1.19,15:F2-1:ST-33 (2)
2010	3-593:P1.19,15:F3-4:ST-33 (1)
2006-2009	3-1:P1.19,15:F5-1:ST-34 (6)
2002	3-1:P1.19,15:F3-4:ST-639 (1)
2002-2007	3-1:P1.19,15:F5-1:ST-639 (7)
2001-2008	3-79:P1.7-1,1:F5-1:ST-639 (15)
2010	3-589:P1.19,15:F5-1:ST-639 (1)
2002-2008	3-35:P1.7-2,16:F1-50:ST-2503 (4)
2004	3-1:P1.19,15:F3-4:ST-2763 (1)
2003	3-79:P1.7-1,1:F5-1:ST-3764 (2)
2004	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-3765 (1)
2003-2007	3-1:P1.19,15:F5-1:ST-5707 (5)
2002-2006	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-5996 (44)
2002-2005	3-1:P1.19,15:F1-37:ST-5996 (2)
2004	3-1:P1.19,15:F2-1:ST-5996 (1)
2004	3-1:P1.19,15:F5-1:ST-5996 (1)
2004	3-1:P1.19,15:F6-2:ST-5996 (2)
2005	3-1:P1.19,15:F3-15:ST-5996 (1)
2002-2004	3-272:P1.19,15:F5-13:ST-5996 (9)
2002	3-591:P1.19,15:F5-13:ST-5996 (1)
2005	3-592:P1.19,15:F5-13:ST-5996 (1)
2004	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-8025 (1)
2002	3-586:P1.19,15:F5-1:ST-11402 (3)
2008	3-79:P1.7-1,1:F5-1:ST-11403 (1)
2002	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-11600 (1)
2002	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-11608 (1)
2002	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-11610 (1)
2003	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-11612 (1)
2002	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-11921 (1)

2010	3-1:P1.19,15:F5-1:ST-11913 (1)
C	Complexo clonal ST-32 (n = 6)
2004-2007	3-1:P1.19,15:F5-1:ST-639 (2)
2004	3-587:P1.19,15:F5-1:ST-639 (2)
2002-2004	3-1:P1.19,15:F5-13:ST-5996 (2)
Sorogrupo	Genótipo (número de amostras)
B	Complexo clonal ST-41/44 (n = 7)
2004	3-588:P1.18-7,9:F4-38:ST-303 (1)
2003-2004	3-1:P1.5-2,10-11:F5-2:ST-1788 (2)
2003	3-66:P1.18-1,3:F1-76:ST-7042 (1)
2005	3-71:P1.7-1,1:F5-2:ST-11404 (1)
2009	3-1:P1.7-2,13-1:F5-2:ST-11613 (1)
2003	3-590:P1.18-7,9:F1-10:ST-11615 (1)
C	Complexo ST-8 (n = 4)
2003	2-30:P1.7-2,13:F5-2:ST-153 (4)
C	Complexo ST-103 (n = 41)
2002-2009	2-23:P1.18-1,3:F3-9:ST-3779 (6)
2008	2-23:P1.22,14-6:F3-9:ST-3779 (1)
2004-2005	2-23:P1.Δ,Δ:F3-9:ST-3779 (2)
2010	2-23:P1.22,14-6:F3-9:ST-3780 (2)
2004-2010	2-23:P1.22,14-6:F3-9:ST-11401 (23)
2008	2-23:P1.22,14-6:F1-84:ST-11401 (1)
2009	2-23:P1.Δ,Δ:F5-1:ST-11401 (1)
2010	2-23:P1.19,15:F3-9:ST-11405 (1)
2010	2-23:P1.22,14-6:F3-9:ST-11599 (2)
2003	2-23:P1.18-1,3:F3-9:ST-11614 (1)
2002	2-23:P1.18-1,3:F3-9:ST-11616 (1)
B	Complexo clonal ainda não atribuído (n = 2)
2003	3-16:P1.22-1,14:F5-5:ST-11406 (1)
2002	3-79:P1.7-1,1:F5-1:ST-11609 (1)
C	Complexo clonal ainda não atribuído (n = 1)
2006	2-23:P1.22,14-6:F3-9:ST-11522 (1)

5.6.1 Cepas isogênicas com diferenças na cápsula

As seis bactérias do sorogrupo C, com fenótipo C:4,7:P1.19,15, que apresentaram PorB3 (3-1 ou 3-587) foram genotipadas como ST-639 ou ST-5996, os dois principais STs do cc32 (Tabela 14), com perfis de proteínas da membrana externa idênticos àqueles identificados como do cc32 (Tabela 14). O perfil descrito é idêntico àqueles encontrados em isolados do sorogrupo B do cc32, um indicativo de mudança de cápsula de B para o C (Tabela 15).

Tabela 15. Mudança de cápsula entre *Neisseria meningitidis* com perfis antigênicos idênticos do complexo clonal ST-32 (cc32) isolados de doença invasiva no Amazonas.

Ano	Sorogrupo, Perfil antigênico e ST (número de isolados)
2002-2007	B:3-1:P1.19,15:F5-1:ST-639 (7)
2004-2007	C:3-1:P1.19,15:F5-1:ST-639 (2)
2004	C:3-587:P1.19,15:F5-1:ST-639 (2)
2002-2006	B:3-1:P1.19,15:F5-13:ST-5996 (43)
2002-2004	C:3-1:P1.19,15:F5-13:ST-5996 (2)

5.6.2 Correlação dos STs com FHbp

Houve uma melhor correlação de FHbp com os principais ST do que aquela estabelecida pela tipagem de FetA, o que indica a sua utilidade como marcador epidemiológico (Tabela 16). Os FHbp-25 e -160 são da subfamília A, enquanto os FHbp-1 e -679 são da subfamília B.

Tabela 16. Correlação dos principais STs com FHbp-P (identidade peptídeo)

cc32	
ST-33	FHbp-160
ST-34	FHbp-1 ou FHbp-160
ST-5996	FHbp-1
cc103	
ST-3779	FHbp-25
ST-11401	FHbp-679

5.7 Perfil de susceptibilidade aos antibióticos

As amostras foram invariavelmente sensíveis ao cloranfenicol (CIM: 0,125 – 0,75 µg/ml). A maioria das amostras foram sensíveis à penicilina (97%; 190/196), com CIM variando de 0,004 a 0,064 µg/ml. No entanto, seis amostras (3%; 6/196) apresentaram resistência relativa à penicilina (CIM = 0,125 – 0,19 µg/ml) e à ampicilina (CIM = 0,25 µg/ml)⁷⁷. Apenas uma (0,5%) apresentou resistência à rifampicina (CIM > 32 µg/ml).

6. DISCUSSÃO

A epidemiologia da doença meningocócica tem sido pouco documentada no estado do Amazonas, onde a caracterização molecular e o perfil de sensibilidade aos antibióticos de *N. meningitidis* ainda não haviam sido realizados. Essa relativa negligência pode servir para subestimar as necessidades de saúde daquela população em relação a uma doença com alto potencial para uma evolução fatal. Em nossa revisão da literatura encontramos uma única tese sobre a ocorrência da doença meningocócica naquela região, porém com dados secundários apenas da cidade de Manaus, i.e., local de residência, idade, sexo, forma clínica, evolução, sazonalidade e critério diagnóstico, coletados entre 1998 e 2002, um período em que a caracterização do agente etiológico ficava restrita ao sorogrupo, mesmo assim em um baixo percentual (20-30%) do total de casos notificados.⁷⁸

A doença meningocócica representa um fardo desproporcional para determinadas populações, de modo que mais pesquisas são necessárias para identificar medidas eficazes para resolver as desigualdades encontradas. O mapeamento das taxas de incidência e dos índices de privação, i.e., a falta de benefícios materiais considerados como necessidades básicas de uma sociedade, por áreas definidas por microrregiões melhora os dados da vigilância epidemiológica, além de enfatizar a natureza focal da doença meningocócica e a sua relação com áreas de maior privação de condições básicas de subsistência. Além disso, dados de incidência são tipicamente analisados em escala nacional ou estadual, apesar das grandes diferenças geográficas de condições sócio-demográficas e da distribuição da população dentro dos limites da divisão político-administrativa.

Estudos recentes têm apresentado resultados que dão suporte à teoria de que a doença meningocócica está associada com baixo nível socioeconômico,^{79,80} o que costumava ser relatado no início do século passado.⁸¹ Em um estudo na Inglaterra na área urbana, um aumento do índice de privação foi fortemente associado com o aumento da incidência da doença meningocócica.³⁰ Alternativamente, um outro estudo inglês, apontou que frequentar bares ou casas noturnas, beijo íntimo e tabagismo são variáveis independentes e fortemente associadas a um maior risco de infecção assintomática por *N. meningitidis*. O tabagismo passivo também foi associado ao estado de portador, porém idade, sexo, e condição social, aglomeração doméstica ou características da escola tiveram pouco ou nenhum efeito. O comportamento social, em vez de idade ou sexo, pode explicar a maior frequência de portadores de meningococos entre os adolescentes.⁸²

Diferentes aglomerados sociais propiciam a transmissão de *N. meningitidis*: escolas, creches, grupos de brincadeira, bailes, transporte de massa, ambiente de trabalho, encontros

religiosos, festas familiares. Esses contextos estão entre as situações cotidianas que podem permitir a aquisição da infecção meningocócica. Os locais ou os eventos com concentração de adolescentes têm sido associados com a transmissão da bactéria seguida pela ocorrência de surtos. Igualmente, tem sido demonstrada a transmissão da bactéria entre alunos de escolas e, posteriormente, a disseminação para os contatos intradomiciliares, com a ocorrência de casos clínicos em ambos os ambientes.^{19,83,84}

A dispersão dos casos de doença meningocócica demonstrada neste estudo confirma a tendência de ocorrência de casos novos em determinadas regiões (ilhas de doença), tanto na capital como no interior do estado do Amazonas, assim como, a ocorrência de casos esporádicos em certas regiões isoladas. No entanto, isto não significa que a doença meningocócica não ocorra em outras áreas onde não foi diagnosticada. A ausência da doença em áreas remotas pode refletir a dificuldade de diagnóstico ou a impossibilidade de notificação. Assim, é importante salientar a necessidade de se pesquisar nas áreas mais afetadas os possíveis fatores relacionados a uma maior incidência, além de intensificar a vigilância em áreas do interior do estado.

A doença meningocócica apresentou uma taxa de incidência média compatível com padrão endêmico – i.e., taxas de incidência entre 1 e 5 casos/ 100.000 habitantes – durante o período do estudo, com exceção de 2000 a 2004 quando foram registradas taxas de incidência acima de 5 casos por 100.000 habitantes, o que caracteriza um padrão hiperendêmico. Apesar da doença ter ampla distribuição geográfica, a maioria dos casos está concentrada em Manaus, a capital do estado. Neste caso, porém, deve se considerar que a menor concentração de casos no interior tem, dentre outros fatores, relação com a percepção dos médicos sobre a doença meningocócica, a perda dos casos mais graves em áreas rurais, as limitações para a confirmação da doença e a dificuldade para notificação do agravo.

Outra questão importante para a vigilância da doença meningocócica no Amazonas é a existência de outras doenças mais frequentes que podem apresentar um curso semelhante, inclusive com manifestações hemorrágicas ou comprometimento do sistema nervoso central, o que torna necessário o suporte de métodos laboratoriais e um alto grau de suspeição do médico assistente.³¹

A proporção de casos confirmados se mostrou satisfatória, com cerca de 70% apresentando algum resultado de método diagnóstico positivo, e metade destes com a confirmação do sorogrupo. E, como era esperado em Manaus o número de casos confirmados foi mais expressivo.

Houve ainda uma associação dos casos em crianças (< 10 anos) com uma maior chance de não serem confirmados, um grupo etário com maior exposição ao uso prévio de antibiótico e uma maior dificuldade para a coleta de material para exame laboratorial. Isto demonstra a necessidade da introdução de métodos moleculares para a identificação do agente etiológico e a sua caracterização diretamente do espécime clínico, os quais não sofrem interferência do uso prévio de antibióticos e do tempo entre a coleta e a realização do exame.^{35,85,86}

A doença meningocócica foi mais frequentemente diagnosticada em pacientes do sexo masculino, como acontece com diversas outras doenças infecciosas. Entretanto, no grupo de idosos ela passa a ser mais comum em mulheres.²¹ O predomínio da doença em mulheres entre 15 e 17 anos já havia sido relatado, porém em associação com doença por uma cepa do sorogrupo B, a qual causou epidemias na Europa nas décadas de 1980 e 1990, a qual foi caracterizada por eletroforese de multilocus enzimático (MLEE) como do complexo ET-5,⁸⁷ hoje reconhecido por MLST como complexo clonal ST-32.^{13,51} Porém, no Amazonas observamos uma maior proporção de doença entre adolescentes (15-19 anos) do sexo feminino tanto durante o período de predomínio da doença pelo sorogrupo B quanto naquele período que predominou o sorogrupo C.

A taxa de letalidade da doença meningocócica no Amazonas foi semelhante ao que tem sido descrito em outras regiões do Brasil. Na capital a taxa de letalidade foi igual àquela calculada para os pacientes do interior, considerando que uma grande parte dos pacientes do interior foi transferida e tratada em Manaus, provavelmente as formas menos graves. Quando calculamos em separado a taxa de letalidade dos casos do interior que foram tratados no município de residência esta foi mais elevada. Uma maior letalidade também foi registrada dentre os casos suspeitos. Isso ocorre principalmente por um maior número de pacientes com púrpura e, conseqüentemente, septicemia, os quais evoluem de forma dramática e com maior rapidez para um desfecho fatal sem ter um espécime clínico coletado a tempo.²¹ A realização de punção lombar em pacientes com meningococemia, durante a admissão hospitalar, pode colocar em risco a vida dos pacientes, além de ser de pouco valor diagnóstico, visto que, nessa situação, não há invasão do sistema nervoso central.⁸⁸

Uma maior chance de falecer foi relacionada ao período de 2007 a 2010, embora nesse período tenha ocorrido uma redução da forma púrpura, as quais apresentam as maiores taxas de letalidade. Esta situação é preocupante e precisa ser avaliada cuidadosamente, pois pode estar havendo falha no diagnóstico precoce, dificuldade de acesso ao atendimento hospitalar ou conduta inadequada do tratamento.⁸⁹

Os principais sinais e sintomas registrados para os pacientes do Amazonas estão de acordo com o que tem sido relatado em outros estudos,³² porém vale ressaltar que alguns deles podem ser relacionados com outras doenças e influenciar a condução do caso, como diarreia, dor abdominal e dor lombar,^{16,21,90} geralmente antecedem um quadro de septicemia bacteriana associado a um pior prognóstico.^{88,91} Apesar da frequência com que são registrados, esses sintomas, não aparecem como variáveis na ficha de notificação e investigação, o que leva a supor que estejam subestimados.

Nesse contexto, há necessidade de enfatizar o reconhecimento precoce das manifestações de septicemia, as quais costumam preceder o aparecimento dos sinais e sintomas clássicos da doença meningocócica.⁹¹ A divulgação atualizada do quadro clínico da doença, assim como, o alerta para os sinais de gravidade e mau prognóstico é de fundamental importância para o reconhecimento precoce e o sucesso do tratamento que não depende apenas do diagnóstico médico, mas também dos pais reconhecerem a urgência de procurar pela atenção médica para os filhos.

Durante os anos 1990 houve um aumento acentuado do número de casos de doença pelo sorogrupo C em diferentes países. Este aumento estimulou a introdução da vacina conjugada contra o sorogrupo C, a qual tinha acabado de ser desenvolvida.

Um aumento dos casos de pacientes que desenvolvem meningococemia também tem sido associado à doença pelo sorogrupo C, particularmente em crianças e adolescentes.^{21,92,93,94} Durante o período do estudo houve uma variação marcante na prevalência dos sorogrupos associados com doença invasiva. A partir de 2007, ocorreu um aumento do número de casos de doença meningocócica pelo sorogrupo C e uma redução significativa dos casos pelo sorogrupo B. Essa variação na frequência dos sorogrupos teve relação com uma modificação do padrão epidemiológico.

A estratificação dos pacientes por grupos etários mostrou as crianças como as mais afetadas pela doença invasiva por *N. meningitidis*, com alguma variação após o aumento do número de casos pelo sorogrupo C. A partir de 2007 há uma diminuição significativa no número de casos abaixo de 10 anos de idade, além de um aumento da doença entre adultos, uma mudança importante no padrão epidemiológico com reflexos na rede de transmissão da bactéria e na eficácia do protocolo de imunização. Uma modificação semelhante do padrão epidemiológico ocorreu no Rio de Janeiro entre 1993 e 1995, quando o sorogrupo C emergiu como causa de doença epidêmica.²¹ Posteriormente o mesmo padrão epidemiológico foi observado nos anos 2000, quando um aumento dos casos de doença meningocócica pelo

sorogrupo C ocorreu em várias outras regiões do Brasil como causa de doença esporádica e surtos localizados.^{19,62,95,96}

Desde o ano 2000, se observa a nível nacional um aumento do número de casos de doença meningocócica pelo sorogrupo C, acompanhado por surtos nos estados de Santa Catarina, Rio de Janeiro, Bahia e São Paulo.^{19,62,95,96} Ademais, a vacina conjugada contra o sorogrupo C foi introduzida em 2010 no programa Nacional de Imunização (PNI) para crianças menores de 2 anos. Portanto, a importância do desenvolvimento de estudos regionais, a fim de descrever a epidemiologia nas diferentes regiões de um país com dimensões continentais. Interessante notar que apesar da introdução desta vacina conjugada a doença pelo sorogrupo C continua a predominar, o que pode ser uma consequência da única faixa etária alvo escolhida.

A doença pelo sorogrupo C, além das crianças, afeta de forma particular os adolescentes e adultos jovens. A vacinação desses grupos etários ficou demonstrada como importante para a redução da incidência da doença pelo sorogrupo C. Ademais ficou demonstrado que a dramática redução dos casos de doença estava associada ao desenvolvimento de imunidade de rebanho pela redução da infecção assintomática nestes grupos por *N. meningitidis* do sorogrupo C, o que protegeria a transmissão para as crianças.^{97,98}

Na Inglaterra, primeiro país a introduzir a vacina conjugada C, inicialmente o esquema de imunização visava às crianças de 2, 3 e 4 meses. Porém, a ocorrência de surtos da doença em escolas e universidades levou a uma campanha com uma única dose para alcançar todas as pessoas com menos de 19 anos, as quais receberam a vacina no local de estudo. Esta campanha foi mais tarde estendida para todas as pessoas com até 24 anos de idade, mas a cobertura foi menor pela impossibilidade de oferecer a vacinação através das escolas. No entanto, esta estratégia revelou-se essencial, por que subsequentemente ficou claro que aqueles imunizados aos 2, 3 e 4 meses não estavam protegidos após o primeiro ano de vida.⁹⁹ Além disso, um número significativo de falhas vacinais seria provavelmente prevenido somente pela imunidade de rebanho ou imunidade comunitária, a qual é gerada pela imunização de adolescentes, entre os quais a transmissão da bactéria por uma cadeia de infecções assintomáticas ocorre com maior frequência.^{82,100} Subsequentemente, combinado com a experiência inglesa, o sistema de vigilância da Holanda e do Canadá confirmaram que o esquema que inclui uma dose após 1 ano de vida (entre 12 e 14 meses) e outra dose de reforço na adolescência é altamente eficaz.¹⁰⁰ Mais de uma década após a introdução da vacina C conjugada, os esquemas de vacinação ainda estão sendo modificados em função dos conhecimentos obtidos a partir da análise de dados fidedignos da vigilância epidemiológica,

de estudo imunológicos e, principalmente, de estudos de prevalência de portadores assintomáticos.¹⁰¹

Interessante apontar que nos países com dados fidedignos de vigilância epidemiológica tem-se observado uma tendência de decréscimo da incidência da doença pelo sorogrupo B, mesmo quando a proporção de doença meningocócica provocada pelo sorogrupo B aumentou. De modo que há necessidade de ampliação da vigilância epidemiológica antes que estratégias de imunização sejam traçadas.¹⁷

Todas as amostras foram invariavelmente sensíveis ao cloranfenicol, uma droga agora em desuso para o tratamento das meningites bacterianas agudas. Segundo nossos dados a resistência à penicilina e à rifampicina – antibióticos utilizados para o tratamento e a quimioprofilaxia, respectivamente – é um fenômeno detectado com baixa frequência entre os isolados de *N. meningitidis* do Amazonas. Igualmente, a prevalência de resistência à penicilina parece ser baixa em outras regiões do Brasil.^{21,102} Apesar disto, o conhecimento do perfil de sensibilidade de *N. meningitidis* aos antibióticos é valioso para aquela região, uma vez que não era conhecido. Ademais, esta informação tem implicações para a terapia inicial de um caso suspeito, quando a bactéria não foi identificada ou o teste de sensibilidade não foi realizado. Um fator independente crítico que influencia o prognóstico de um paciente com doença meningocócica é o lapso de tempo após o início da doença.^{8,91,103} Um elevado grau de suspeição do médico assistente e a administração imediata de um regime empírico de antibiótico bem ponderado são de suma importância para a sobrevivência do paciente. Assim, o uso de ceftriaxona é a melhor opção atualmente para o tratamento da doença meningocócica.¹⁰

O perfil de sorotipos e subtipos relacionado aos sorogrupos B e C é semelhante ao de outros estados brasileiros (fonte: Centro de Referência Nacional de Meningites). *N. meningitidis* com o perfil 4,7:P1.19,15, o principal dentre os isolados do sorogrupo B, tem sido relacionado ao complexo clonal ST-32, o qual foi introduzido na década de 1980 no Brasil, e desde então permanece como importante causa de doença invasiva.^{21,104} Já o fenótipo 23:P1.14-6 prevalente do sorogrupo C tem sido relacionado ao complexo clonal ST-103, hoje presente em várias regiões do nosso país associado com casos esporádicos e surtos.^{19,96} Porém, este esquema de tipagem fenotípica é falho, o que ficou demonstrado também com os resultados desta tese devido a possibilidade de não detectar o antígeno, por não permitir a correlação com um clone, a descrição da diversidade antigênica, a possibilidade de identificar a deleção do gene. Nós detectamos a deleção do gene *porA* em três amostras do sorogrupo C (cc103), fenotipicamente caracterizadas como 23:nt. Alternativamente,

caracterizamos o perfil antigênico do *porA* através do sequenciamento de várias outras amostras igualmente caracterizadas por anticorpos monoclonais como não tipáveis (nt), o que demonstra a fragilidade deste esquema de tipagem fenotípica.

A caracterização por MLST, refinada pelo sequenciamento de genes codificadores de antígenos, foi realizada para determinar as linhagens genéticas de *N. meningitidis* isoladas de pacientes do estado do Amazonas. A população bacteriana se mostrou bastante diversa, com o predomínio de alguns clones dentre outros de um complexo clonal. Observou-se ainda um número significativo de novos ST, que emergiram em diferentes momentos do período estudado, o que denota uma população em constante evolução. Vale destacar que alguns isolados bem-sucedidos do cc32, como o ST-5996 e, em menor extensão, ST-33 e ST-639, fortemente associados ao FHbp 1, foram prevalentes dentre os casos de doença invasiva pelo sorogrupo B. Interessante notar a expansão do ST-11401, um ST até então não descrito do cc103, o qual inclui ST, e.g., ST-3780 ou ST-3779,¹⁸ responsáveis por surtos recentes em diferentes partes do país. O ST-11401 expressa o FHbp 679, o qual pode vir a ser um marcador epidemiológico conveniente para rastrear este clone. Em cada complexo clonal a variação do perfil antigênico das proteínas de membrana externa ficou restrita a alguns perfis, como pode ser observado na Tabela 14.

Os nossos resultados de genotipagem reforçam a necessidade de estudos regionais com o maior número de isolados possíveis, a fim de descrever com maior precisão a diversidade genética e as linhagens associadas com doença invasiva. Podemos demonstrar a fragilidade de estudos de abrangência nacional com estes objetivos, nos quais um número pequeno de isolados das várias regiões do país é selecionado, normalmente por uma amostra de conveniência. Em um recente estudo sobre a epidemiologia molecular de *N. meningitidis* sorogrupo B no Brasil,¹⁰⁴ o ST-5996 apareceu como a cepa prevalente dentre os isolados incluídos (54%, 7/13) da “região norte”, sem especificar a distribuição das cepas por estado. Não obstante, outros ST relacionados ao sorogrupo B não foram identificados, p.ex., ST-639, o qual tem presença significativa no Amazonas e em outras regiões do Brasil, além de ter sido associado com mudança de cápsula de B para C.⁴⁵ O ST-33, também de importância para o Amazonas, aparece naquele estudo como prevalente na região nordeste.

Através da mudança de cápsula, definida como a presença de diferentes fenótipos capsulares (sorogrupos) dentro do mesmo complexo clonal, *N. meningitidis* de linhagens virulentas podem eventualmente se evadir da imunidade induzida por vacina. A identificação de um clone de *N. meningitidis* do cc32 com cápsula do sorogrupo C é um indicativo de mudança de cápsula de B para C, o que ocorre por transferência horizontal de genes.¹⁰⁵ Tal

fenômeno de escape do sistema imune do hospedeiro já havia sido descrito anteriormente no estado do Rio de Janeiro, onde a vacina Va-Mengoc-BC[®] foi usada em campanhas de imunização em massa na década de 1990.⁴³ Esta vacina é composta de uma proteína de membrana externa de alto peso molecular (65-95 kD) e uma proteína sorotipo específica da cepa epidêmica cubana B:4:P1.15, adicionadas ao polissacarídeo C e combinadas com hidróxido de alumínio.¹⁰⁶ Entretanto, este evento é comum na ausência de vacinação e tem implicações para vacinas meningocócicas que não cobrem todos os sorogrupos.^{92,105}

O mesmo fenômeno descrito acima foi registrado no Amazonas durante o período do estudo. Os resultados da genotipagem de proteínas da membrana externa demonstrou a mudança de cápsula de B para C em 3 clones específicos: ST-5996 (3-1:P1.19,15:F5-13), ST-639 (3-1:P1.19,15:F5-1) e ST-639 (3-587:P1.19,15:F5-1). Com a exceção do clone 3-587:P1.19,15:F5-1:ST-639, os clones ST-639 e ST-5996 apresentam correlação temporal e o mesmo perfil antigênico com aqueles do sorogrupo B do mesmo complexo clonal (Tabela 15). No Rio de Janeiro, 2 clones do ST-639 foram identificados com mudança de cápsula de B para C, porém com um perfil de antígenos de superfície diferentes.⁴⁵

Apesar dos grandes avanços que têm sido feitos pelas ciências biomédicas nas últimas décadas, o desenvolvimento e a implementação de novas vacinas continua a ser um empreendimento altamente pragmático e incerto. Embora o conceito de vacinação tenha mais de 200 anos, o qual foi formalizado por Pasteur 100 anos atrás, o progresso no desenvolvimento de vacinas continua a ser relativamente lento e não tem acelerado da mesma forma como visto em praticamente todas as outras áreas tecnológicas. As muitas razões para isso incluem problemas de segurança decorrentes da administração de vacinas a pessoas saudáveis, muitas vezes, lactentes ou crianças pequenas, e a nossa incapacidade de prever com segurança o comportamento de uma nova vacina para humanos ao nível da população a partir de dados obtidos em experimentos de laboratório, ou mesmo durante a fase I ou II de ensaios com seres humanos. Embora ensaios de fase III, duplo-cego, controlado por placebo, possam fornecer informações úteis em ambos os aspectos, estes são muito caros, de forma proibitiva se a doença é rara, além da chance de não ter poder suficiente para detectar efeitos na população.¹⁰⁷

O desafio para o desenvolvimento de uma vacina com ampla proteção contra a doença pelo sorogrupo B tem sido significativo devido à baixa imunogenicidade do polissacarídeo capsular do sorogrupo B e a variabilidade antigênica das proteínas da membrana externa, os antígenos subcapsulares. A vacina Bexsero está atualmente licenciada em mais de 35 países ao redor do mundo, para vários grupos etários, incluindo na América

Latina Brasil, Chile e Uruguai. As recomendações para o uso desta vacina atingem os grupos de alto risco, o controle de surtos e a imunização de rotina de lactentes.¹⁰⁸ A composição de tal vacina inclui as FHbp das subfamílias A e B, as quais foram identificadas nas amostras do sorogrupo B estudadas, e talvez possa induzir proteção contra algumas cepas do sorogrupo.^{58,59}

Novas vacinas com ampla proteção contra o sorogrupo B, pela primeira vez, estão se tornando disponíveis, embora pouco se saiba sobre a persistência da imunidade ou a interferência na infecção da nasofaringe. A ampliação da vigilância em seguida a introdução de qualquer vacina contra o sorogrupo B precisa ser cuidadosamente implementada. Apesar de esta vacina ter sido licenciada para a prevenção da doença pelo sorogrupo B, os alelos de alguns ou todos os antígenos vacinais são também encontrados entre meningococos de outros sorogrupos. Em um estudo recente ficou demonstrado que o soro de crianças vacinadas apresentava anticorpos com atividade bactericida contra *N. meningitidis* do sorogrupo W.¹⁰⁹ O futuro agora nos reserva uma possibilidade clara, a nível mundial, para uma drástica redução da doença meningocócica independente do sorogrupo.

O desenvolvimento dessas vacinas e a sua recente introdução serão mais um componente que poderá modificar o padrão epidemiológico, o que precisará ser monitorado com ferramentas adequadas.⁶¹ A partir de 2013, duas vacinas desenvolvidas para prevenir a doença pelo sorogrupo B foram aprovadas para introdução na rotina de imunização da população em vários países, incluindo o Brasil.^{32,110} A vacina MenB-4C foi desenvolvida com base no sequenciamento do genoma de uma cepa de *N. meningitidis* do sorogrupo B e na avaliação da capacidade de antígenos de superfície em induzir resposta imunogênica. Na sua composição foram incluídos três antígenos identificados: FHbp (fator-H binding protein), NadA (*Neisseria* adhesion A) e NHBA (*Neisseria* heparin binding antigen), combinados com a proteína de membrana externa PorA subtipo P1.4. A segunda vacina, MenB-FHbp, consiste de 2 antígenos recombinantes purificados da proteína FHbp, um de cada subfamília (A e B) desta proteína. O licenciamento dessas vacinas abre a oportunidade, pela primeira vez, de prevenção dos cinco sorogrupos – i.e., A, B, C, W e Y – que causam a maioria dos casos de doença meningocócica em todo o mundo. Entretanto, estudos adicionais se fazem necessário para o entendimento de como melhor conduzir a introdução das vacinas com antígenos subcapsulares.

O desenvolvimento de protocolos para o tratamento da doença meningocócica na Amazônia, devido às características demográficas, é um desafio que se torna impossível para determinadas populações que vivem isoladas e com dificuldades extremas de deslocamento

para a sede do município. Uma situação comum no interior do Amazonas, onde o acesso aos serviços de saúde é restrito, a locomoção é realizada exclusivamente ou em parte por via fluvial e os moradores estão dispersos em vastas áreas territoriais, o que é uma característica dos municípios do Amazonas. Isto obriga os pacientes a se locomoverem por longas distâncias a procura de atenção médica. No caso da doença meningocócica esta realidade impede o acesso ao sistema de saúde para o tratamento da maioria dos casos graves, cuja evolução para um desfecho fatal pode acontecer dentro de 6 a 12 horas após o início dos primeiros sintomas. Portanto, espera-se que uma parte dos casos sequer seja identificada e, provavelmente, outros tantos diagnosticados não chegam a ser notificados. Um contexto em que a prevenção através de vacinas parece à única medida possível de controle da doença, assim como afirmou Lapeyssonnie.¹¹¹ A cerca, da situação existente no cinturão da meningite no continente Africano décadas atrás.

Esperamos que os dados deste estudo contribuam para uma melhor compreensão da doença meningocócica no Amazonas, sirvam de parâmetro para futuras avaliações e, principalmente, conduza a debates sobre estratégias de controle para melhorar o prognóstico dos pacientes daquela vasta área territorial.

7. PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desta tese permitiu a formação de um grupo com experiência em tipagem molecular, incluindo amplificação e sequenciamento de genes de interesse, análise das regiões sequenciadas. Assim, havendo possibilidade de estabelecer um núcleo para tipagem de microrganismos de interesse para a saúde pública, a fim de melhorar a vigilância epidemiológica, investigar surtos e realizar estudos de epidemiologia molecular na região, permitindo a geração de dados epidemiológicos, que subsidiará desenhos estratégicos de imunização para medidas de controle da doença na região Amazônica, com perspectiva de relevância amplamente reconhecida no mundo acadêmico através de publicações em periódicos indexados, propiciando a troca de informações e debates sobre as principais questões desse tema na região.

8. CONCLUSÕES

- O estudo da distribuição temporal e geográfica mostrou a dispersão dos casos da doença no período de 2000 a 2010 no Amazonas, além da persistência da ocorrência de novos casos na capital e no interior, formando verdadeiras ilhas de doença.
- A taxa de incidência no período de 2000 a 2004 alcançou níveis considerados compatíveis com padrão hiperendêmico.
- Houve uma mudança significativa no perfil epidemiológico da doença meningocócica no estado do Amazonas com a substituição gradual do sorogrupo B pelo sorogrupo C a partir de 2007, com consequências para o programa de imunização com a vacina conjugada C.
- Um aumento da chance de falecer, estimado pelo cálculo das taxas de letalidade, ocorreu durante o aumento dos casos de doença pelo sorogrupo C.
- A genotipagem revelou uma população de *N. meningitidis* bastante diversa associada com doença invasiva, com vários novos ST surgindo e alguns se expandindo.
- A resistência aos principais antibióticos de importância clínica para meningite meningocócica foi um evento raro entre as bactérias identificadas neste estudo.
- O fenômeno de mudança de cápsula (B→C) foi identificado dentre as cepas de *N. meningitidis* isoladas de doença invasiva de pacientes do Amazonas, algo que deve ser mais frequente do que se supõem no Brasil.
- O estudo identificou o maior número de casos da doença na capital e ocorrência de doença esporádica no interior, o que pode estar relacionado às dificuldades no diagnóstico.
- Os sintomas prodrômicos descritos indicam a necessidade de uma atualização das variáveis da ficha de investigação epidemiológica, para uma melhor compreensão do quadro clínico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feil EJ, Enright MC & Spratt BG, 2000. Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 151: 465-469.
2. Meyer TF 1999. Pathogenic *Neisseria*: complexity of pathogen-host cell interplay. *Clin Infect Dis* 28: 433-441.
3. Requejo, H.I.Z. Doença meningocócica: estudo epidemiológico comparativo em nível mundial – Período 1887 a 1997. São Paulo: [s.n.], 1999. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia), Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, 1999.
4. Koneman, E.W. Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. 5.ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.503-50, cap.10.
5. Moraes, J. C & BARATA, R,B, A doença meningocócica em são paulo, brasil, no século XX: características epidemiológicas, cad. Saúde pública v.21 n.5 rio de janeiro set./out. 2005.
6. Iversson, L.B, Aspectos epidemiológicos da meningite meningocócica no município de São Paulo (Brasil), no período de 1968 a 1974, Rev. Saúde Pública vol.10 no.1 São Paulo Mar. 1976
7. Ministério da Saúde do Brasil <disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br>> Acesso em: 16 de Março de 2016.
8. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P 2007. Epidemic meningitis, meningococemia and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 369: 2196–2210.
9. Mustapha MM, Marsh JW, Krauland MG, Fernandez JO, de Lemos AP, Dunning Hotopp JC, Wang X, Mayer LW, Lawrence JG, Hiller NL, Harrison LH 2015. Genomic Epidemiology of Hypervirulent Serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis*. *EBioMedicine* 2: 1447-1455.
10. Stephens DS 2007. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev* 31: 3-14.
11. Wikiwand < <http://www.wikiwand.com/pt/Meningite>> Acesso em: 08 de Janeiro de 2015.
12. Read RC 2014. *Neisseria meningitidis*; clones, carriage, and disease. *Clin Microbiol Infect* 20: 391-395.
13. Caugant DA 1998. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 106: 505-525.

14. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2009. The global burden of disease 2004 update. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004_update_full.pdf.
15. Darmstadt GL, 1998. Acute infectious purpura fulminans: pathogenesis and medical management. *Ped Dermatol* 15:169-183.
16. Greenwood BM 1991. Meningococcal disease and acute bacterial meningitis. In: Strickland GT., Hunter's Tropical Medicine. 7^{ed}. Philadelphia, WB Saunders, p.385-399.
17. Sridhar S, Greenwood B, Head C, Plotkin SA, Sáfadi MA, Saha S, Taha MK, Tomori O, Gessner BD 2015. Global incidence of serogroup B invasive meningococcal disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 15: 1334-1346.
18. Harrison LH, Jolley KA, Shutt KA, Marsh JW, O'Leary M, Sanza LT, Maiden MC; Maryland Emerging Infections Program 2006. Antigenic shift and increased incidence of meningococcal disease. *J Infect Dis* 193: 1266-1274.
19. Barroso DE, Castiñeiras TMPP, Freitas F, Marsh JW, Krauland MG, Tulenko MM, Fonseca EL, Vicente ACP, Rebelo MC, Cerqueira EO, Xavier AC, Cardozo AP, Silva SE, Harrison LH 2013. Three Outbreak-causing *Neisseria meningitidis* Serogroup C Clones, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 19: 1847-1850.
20. Harrison LH, Pass MA, Mendelsohn AB, Egri M, Rosenstein NE, Bustamante A, Razeq J, Roche JC 2001. Invasive meningococcal disease in adolescents and young adults. *JAMA* 286: 694-699.
21. Barroso DE, Carvalho DM, Casagrande ST, Rebelo MC, Soares V, Zahner V, Solari CA, Nogueira AS 2010. Microbiological epidemiological history of meningococcal disease in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 4: 238-247.
22. Scheld, W. M. 1990. Meningococcal disease, In: Warren, K. S.; Mahmoud, A. A. F. *Tropical and Geographical Medicine*. New York: McGraw-Hill. P. 798-814.
23. Hart, C. A.; Rogers, T. R. F. 1993. Meningococcal disease. *Journal of medical Microbiology*, 39:3-25.
24. Ramet, J.; Najafiu, N.; Benatar, 2003. A. An update of childhood meningococcal Sepsis. J.-L. Vincent (ed.), *Intensive Care Medicine*. 76-77.
25. Barroso, D. E. 1998. Aspectos epidemiológicos e biológicos da infecção invasiva por *Neisseria meningitidis* na cidade do Rio de Janeiro: 1989 a 1995 [Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
26. Niklasson PM, Lundbergh P, Strandell T 1971. Prognostic Factors in Meningococcal Disease. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* v.3, p.17-25.

27. Pedro, LGF. Diagnóstico de casos suspeitos de doença meningocócica por meio da reação da polimerase em cadeia. Rio de Janeiro: [s.n], 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina – doenças infecciosas e parasitárias), Faculdade de Medicina, 2008.
28. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ, 2004. Practice Guidelines for the Management of Bacterial Meningitis. *Clin Infect Dis* 39: 1267-1284.
29. Owusu-Ofori A, Agbenyega T, Ansong D, Scheld WM 2004. Routine lumbar puncture in children with febrile seizures in Ghana: should it continue? *Int J Infect Dis* 8: 353-361.
30. Nathan N, Borel T, Djibo A, Evans D, Djibo S, Corty JF, Guillermin M, Alberti KP, Pinoges L, Guerin PJ, Legros D 2005. Ceftriaxone as effective as long-acting chloramphenicol in short-course treatment of meningococcal meningitis during epidemics: a randomised non-inferiority study. *Lancet*. 2005 Jul 23-29;366(9482):308-13.
31. Barroso DE, Silva LA 2007. *Neisseria meningitidis*: a neglected cause of infectious haemorrhagic fever in the amazon rainforest. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11: 598-602.
32. Green Book - Immunisation against infectious disease 2014. Meningococcal: the green book, chapter 22, <https://www.gov.uk/government/collections/immunisation-against-infectious-disease-the-green-book>.
33. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, & Winn WC, 1997. *Neisseria* species and *Moraxella catarrhalis*. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. p.491-537.
34. Finne J, Leinonen M, Mäkelä PH 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 322: 355-357. (originalmente publicado como Volume 2, Número 8346).
35. Pedro LG, Boente RF, Madureira DJ, Matos JA, Rebelo CM, Igreja RP, Barroso DE 2007. Diagnosis of meningococcal meningitis in Brazil by use of PCR. *Scand J Infect Dis* 39: 28–32.
36. Sidikou F, Djibo S, Taha MK *et al.* 2003. Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas, Niger. *Emerging Infectious Diseases* 9, 1486–1488.
37. Guiver M, Borrow R, Marsh J *et al.* 2000. Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 28, 173–179.
38. Bastien, R., Lewis, T. B.; Hawkes, J. E; Quackenbush, J. F.; Robbins, T. C; Palazzo, J.; Perou, C. M.; Bernard, P. S. 2008. High-throughput amplicon scanning of the TP53 gene in

breast cancer using high-resolution fluorescent melting curve analyses and automatic mutation calling. *Hum. Mutat.* 29, 757-764.

39. Stackebrandt E, Murray RG, Truper HG 1988. Proteobacteria classis nov. a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *Int J Syst Bacteriol* 38: 321-325.

40. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, & Winn WC, 1997. *Neisseria* species and *Moraxella catarrhalis*. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. p.491-537.

41. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM 2001. Meningococcal disease. *New England Journal of Medicine*; v. 344, p.1378-1388.

42. Jolley KA, Brehony C, Maiden MCJ 2007. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev* 31: 89-96.

43. Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, Corton C, Care R, Poolman JT, Zollinger WD, Frasch CE, Stephens DS, Feavers I, Frosch M, Parkhill J, Vogel U, Quail MA, Bentley SD, Maiden MCJ 2013. Description and Nomenclature of *Neisseria meningitidis* Capsule Locus. *Emerging Infectious Diseases* 19: 566-573.

44. Maiden MCJ, Begg NT 2001. Overview: epidemiology, surveillance, and population biology. In: Pollard A & Maiden M, Meningococcal Disease: Methods and Protocols. New Jersey, Humana Press, p.121-144

45. Castiñeiras TMPP, Barroso DE, Marsh JW, Tulenko MM, Krauland MG, Rebelo MC, Harrison LH 2012. Capsular Switching in Invasive *Neisseria meningitidis*, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 18: 1336-1338.

46. Frasch CE, Zollinger WD & Poolman JT 1985. Serotype antigens of *N. meningitidis* and proposed scheme for designation of serotype. *Rev Infect Dis* 7: 504-510

47. Frasch CE, Mocca LF, Karpas AB 1987. Appearance of new strains associated with group B meningococcal disease and their use for rapid vaccine development. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol* 53: 395-402.

48. Verheul AFM, Snippe H, Poolman JT 1993. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Ver* 57: 34-49.

49. Sadarangani M, Pollard AJ 2010. Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story. *Lancet Infect Dis* 10: 112-124.

50. Caugant DA, Froholm LO, Bovre K, Hulten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander RK 1987. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol* 53: 389-394.

51. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140-3145.
52. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 873-884.
53. Pollard, A. J.; Frasch, C. 2001. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. v. 19, p.1327-1346.
54. Carson, S. D. B.; Klebba, P. E.; Newton, S. M. C. 2009. Ferric Enterobactin Binding and Utilization by *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, vol. 181, p. 2895–2901.
55. Cantini, F.; Veggi, D.; Dragonetti, S.; Savino, S.; Scarselli, M.; Romagnoli, G; Pizza, M.; Banci, L.; Rappuoli, R. 2009. Solution Structure of the Factor H-binding Protein, a Survival Factor and Protective Antigen of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, n. 14.
56. Masignani V, Comanducci M, Giuliani MM, Bambini S, Adu-Bobie J, Arico B, Brunelli B, Pieri A, Santini L, Savino S, Serruto D, Litt D, Kroll S, Welsch JA, Granoff DM, Rappuoli R, Pizza M 2003. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J Exp Med* 197: 789-799.
57. Beernink PT, Granoff DM 2009. The modular architecture of meningococcal factor H-binding protein. *Microbiology* 155: 2873-2883.
58. Christensen H, Hickman M, Edmunds WJ, Trotter CL 2013. Introducing vaccination against serogroup B meningococcal disease: an economic and mathematical modelling study of potential impact. *Vaccine* 31: 2638-2646.
59. O’Ryan M, Stoddard J, Toneatto D, Wassil J, Dull PM 2014. A Multi-Component Meningococcal Serogroup B Vaccine (4CMenB): The Clinical Development Program. *Drugs* 74: 15-30
60. Araya P, Fernández J, Del Canto F, Seoane M, Ibarz-Pavón AB, Barra G, Pidal P, Díaz J, Hormazábal JC, Valenzuela MT 2015. *Neisseria meningitidis* ST-11 clonal complex, Chile 2012. *Emerg Infect Dis* 21: 339-341.
61. Lucidarme J, Hill DM, Bratcher HB, Gray SJ, du Plessis M, Tsang RS, Vázquez JA, Taha MK, Ceyhan M, Efron AM, Gorla MC, Findlow J, Jolley KA, Maiden MC, Borrow R 2015. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. *J Infect* 15: 1420-1428.
62. Puricelli RCB, Kupek E, Bertoncini RCC 2004. Control of a community outbreak of group C meningococcal meningitides in Corupá, Santa Catarina State, Brazil, based on a

rapid and effective epidemiological surveillance and immunization. *Caderno Saúde Pública* 20: 959–967.

63. Cooper, E. R.; Ellison, R. T.; Smith, G. S.; Blaser, M. J.; Reller, L. B.; Paisley, J. W. 1986. Rifampin-resistant meningococcal disease in a contact patient given prophylactic rifampin. *Journal of Pediatrics*, 108:93-96.

64. Stefanelli, P.; Fazio, C.; Rosa, Giuseppina L; Marianelli, C.; Muscillo M.; Mastrantonio, P. 2001. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease: detection of point mutations in the *rpoB* gene and molecular characterization of the strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47, 219-222.

65. Dworzack, D. L.; Sanders, C. C.; Horowitz, E. A.; Allais, J. M.; Sookpranee, M.; Sanders, W. E. Jr; Ferraro, F. M. 1988. Evaluation of single-dose ciprofloxacin in the eradication of *Neisseria meningitidis* from nasopharyngeal carriers. *Antimicrob Agents Chemother*. Nov; 32(11): 1740–1741.

66. Barroso, D. E. 1994. Epidemiologia e controle da infecção por *Neisseria meningitidis* em famílias de pacientes com doença meningocócica internados no Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião. Tese de Mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

67. Girgis, N.; Sultan Y.; Frenck, R. W. Jr.; et al. 1998. Azithromycin compared with rifampin for eradication of nasopharyngeal colonization by *Neisseria meningitidis*. *Pediatr Infect Dis J*. 17:816.

68. Olowokure B, Onions H, Patel D, Hooson J, O'Neill P 2006. Geographic and socioeconomic variation in meningococcal disease: a rural/urban comparison. *J Infect* 52: 61-66.

69. McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, van de Beek D 2012. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet* 380: 1703-1711.

70. Borrow R 2012. Advances with vaccination against *Neisseria meningitidis*. *Tropical Medicine and International Health* 17: 1478–1491.

71. IBGE 2013 < <http://mapas.ibge.gov.br/interativos/arquivos/downloads.html>> Acesso em: 15 de Março 2016.

72. WHO – World Health Organization. Chapter 12: Characterization of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* by Molecular Typing Methods. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. 2 ed. CDC. P. 205 – 258.

73. Feavers, IM; Gray, SJ; Urwin, R; Russell, JE; Bygraves, JA; Kaczmarek, EB; Maiden, MC. 1999. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol*, v.37(12), p.3883-3887.

74. Thompson, EAL; Feavers, IM; Maiden, MCJ. 2003. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology*, v.149, p.1849–1858.
75. Murphy, E; Andrew, I; Lee, KL; Dilts, DA; Nunez, L; Fink, PS; Ambrose, K; Borrow, R; Findlow, J. et al. 2009. Sequence Diversity of the Factor H Binding Protein Vaccine Candidate in Epidemiologically Relevant Strains of Serogroup B *Neisseria meningitidis*. *The Journal of Infectious Diseases*; v.200, p.379–389.
76. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: CLSI.
77. Taha, M. K.; Vazquez, J. A.; Hong, E. 2007. Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2784-2792.
78. Santos ML. Caracterização epidemiológica da doença meningocócica no município de Manaus/AM, 1998-2002. Tese de Mestrado, Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2003.
79. Heyderman RS, Ben-Shlomo Y, Brennan CA, Somerset M 2004. The incidence and mortality for meningococcal disease associated with area deprivation: an ecological study of hospital episode statistics. *Arch Dis Child* 89:1064–1068.
80. Williams CJ, Willocks LJ, Lake IR, Hunter PR 2004. Geographic correlation between deprivation and risk of meningococcal disease: an ecological study. *BMC Public Health* 4: 30.
81. Vieira JM. Contribuição ao estudo clínico da meningite de Weichselbaum. Rio de Janeiro, 1916. [Tese - Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro].
82. MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Roberts R, Evans MR, Cann K, Baxter DN, Maiden MC, Stuart JM; United Kingdom Meningococcal Carriage Group 2006. Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. *Emerging Infectious Diseases* 12: 950-957.
83. Hudson PJ, Richard LV, Heun EM, Brondum J, Coffin RR, Plikaytis BD, Olan G 1986. Evidence for school transmission of *Neisseria meningitidis* during a Vermont outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 5: 213-227.
84. Morrow HW, Slaten DD, Reingold AL, Werner BS, Fenstersheib MD 1990. Risk factors associated with a school-related outbreak of serogroup C meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 9: 394-398.
85. Rebelo MC, Boente RF, Matos JA, Hofer CB, Barroso DE 2006. Assessment of a two-step nucleic acid amplification assay for detection of *Neisseria meningitidis* followed by capsular genotyping. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 809-813.

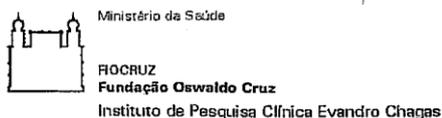
86. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, Ribeiro AF, Kemp B, Gorla MC, Albernaz RK, Marques EG, Cruciano A, Waldman EA, Brandileone MC, Harrison LH; São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team 2011. Incorporation of real time PCR into routine public surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS ONE* 6: e20675.
87. Jones DM, Mallard RH 1993. Age incidence of meningococcal infection England and Wales, 1984-1991. *J Infect* 27: 83-88.
88. Werneck GL, de Carvalho DM, Barroso DE, Cook EF, Walker AM 1990. Classification trees and logistic regression applied to prognostic studies: a comparison using meningococcal disease as an example. *J Trop Pediatr* 45: 248-251.
89. Thomson APJ, Riordan FAI 2000. The management of meningococcal disease. *Curr Paediatr* 10: 104-109.
90. Bell WE 1992. Bacterial meningitis in children. Selected aspects. *Pediatr Clin North Am* 39: 651-68.
91. Thompson MJ, Ninis N, Perera R, Mayon-White R, Phillips C, Bailey L, Harnden A, Mant D, Levin M 2006. Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents. *Lancet* 367: 397-403.
92. Harrison LH, Shutt KA, Schmink SE, Marsh JW, Harcourt BH, Wang X, Whitney AM, Stephens DS, Cohn AA, Messonnier NE, Mayer LW 2010. Population structure and capsular switching of invasive *Neisseria meningitidis* isolates in the pre-meningococcal conjugate vaccine era – United States, 2000–2005. *J Infect Dis* 201: 1208-1224.
93. Riordan FA, Marzouk O, Thomson AP, Sills JA, Hart CA 1995. The changing presentations of meningococcal disease. *Eur J Pediatr* 154: 472-474.
94. Ramsay M, Kaczmarek E, Rush M, Mallard R, Farrington P, White J 1997. Changing patterns of case ascertainment and trends in meningococcal disease in England and Wales. *Commun Dis Rep CDR Rev* 7: R49-54.
95. Gorla MC, de Lemos AP, Quaresma M, Vilasboas R, Marques O, de Sá MU, Ogassavara CT, Brandileone MC, Harrison LH, Dias J 2012. Phenotypic and molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* associated with an outbreak in Bahia, Brazil. *Enfermedes Infecciosas Microbiología Clínica* 30:56-59.
96. Liphaut BL, Cappelletti-Gonçalves-Okai MI, Silva-Delemos AP, Gorla MC, Rodriguez-Fernandes M, Pacola MR, Fernandez-Collucci MÂ, Matsumoto-Shinkai IA, Takenori-Higa F, Ferreira-Catani C, Gonçalves-Lemes-Marques E, Marques-Pinto-Carvalhanas TR 2013. Outbreak of *Neisseria meningitidis* C in a Brazilian oil refinery involving an adjacent community. *Enfermedes Infecciosas Microbiología Clínica* 31: 88-92.
97. Maiden MC, Ibarz-Pavón AB, Urwin R, Gray SJ, Andrews NJ, Clarke SC, Walker AM,

- Evans MR, Kroll JS, Neal KR, Ala'aldeen DA, Crook DW, Cann K, Harrison S, Cunningham R, Baxter D, Kaczmarski E, MacLennan J, Cameron JC, Stuart JM 2008. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J Infect Dis* 197: 737-743.
98. Bijlsma MW, Brouwer MC, Spanjaard L, van de Beek D, van der Ende A 2014. A decade of herd protection after introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccination. *Clin Infect Dis* 59: 1216-1221.
99. Maiden MCJ, MacLennan JM 2014. Fifteen years of protection by meningococcal C conjugate vaccines: lessons from disease surveillance. *Clin Infect Dis* 59: 1222-1224.
100. de Greeff SC, de Melker HE, Spanjaard L, Schouls LM, van Derende A 2006. Protection from routine vaccination at the age of 14 months with meningococcal serogroup C conjugate vaccine in the Netherlands. *Pediatr Infect Dis J* 25:79-80.
101. de Whalley PC, Snape MD, Plested E, Thompson B, Nuthall E, Omar O, Borrow R, Pollard AJ 2013. Long-term seroprotection after an adolescent booster meningococcal serogroup C vaccination. *Arch Dis Child* 98: 686-691.
102. Ibarz-Pavón AB, Lemos AP, Gorla MC, Regueira M; SIREVA Working Group II, Gabastou JM 2012. Laboratory-based surveillance of *Neisseria meningitidis* isolates from disease cases in Latin American and Caribbean countries, SIREVA II 2006-2010. *PLoS One* 7: e44102.
103. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM 2001. Meningococcal disease. *New England Journal of Medicine*; v. 344, p.1378-1388.
104. de Filippis I, de Lemos AP, Hostetler JB, Wollenberg K, Sacchi CT, Dunning Hotopp JC, Harrison LH, Bash MC, Prevots DR 2012. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup B in Brazil. *PLoS One* 7: e33016.
105. Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS 1997. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 271-276.
106. Barroso DE, Carvalho DM, Netto MA, Santos OH, Nascimento FA, Werneck GL, 2002. The effect of subcapsular meningococcal B + C vaccine on the prognosis of patients with meningococcal disease. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 34: 417-420.
107. Koff WC, Burton DR, Johnson PR, Walker BD, King CR, Nabel GJ, Ahmed R, Bhan MK, Plotkin SA 2013. Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science* 340:1232910.
108. Watson PS, Turner DPJ 2016. Clinical experience with the meningococcal B vaccine, Bexsero®: Prospects for reducing the burden of meningococcal serogroup B disease. *Vaccine* 34: 875-880.

109. Ladhani SN, Giuliani MM, Biolchi A, Pizza M, Beebeejaun K, Lucidarme J, Findlow J, Ramsay ME, Borrow R 2016. Effectiveness of meningococcal B vaccine against endemic hypervirulent *Neisseria meningitidis* W strain, England. *Emerg Infect Dis* 22: 309-311.
110. Folaranmi T, Rubin L, Martin SW, Patel M, MacNeil JR 2015. Use of Serogroup B Meningococcal Vaccines in Persons Aged ≥ 10 Years at Increased Risk for Serogroup B Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. *MMWR* 64: 608- 612.
111. Lapeyssonnie L 1987. Milestones in meningococcal disease. In: Vedros NA. Evolution of meningococcal disease. p.1-4.

10. ANEXOS

ANEXO A – ASPECTOS ÉTICOS



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 045/2010

Protocolo 0029.0.009.000-10

1. Identificação:

Título do Projeto: "Doença meningocócica e diversidade genética de *Neisseria meningitidis* no Amazonas, 2000 a 2009".

Pesquisador Responsável: David Eduardo Barroso.

Instituição Responsável: Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz.

Data de Apresentação ao CEP: 28/06/2010.

2. Sumário:

Visa a analisar o padrão da doença meningocócica durante a década de 2000 no Estado do Amazonas; determinar a estrutura genética e o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos de *N. meningitidis*, isolados de casos clínicos de 2000 a 2009; examinar cepas isogênicas dos sorogrupos B e C, exceto pelo antígeno capsular; comparar a diversidade genética de isolados clínicos de *N. meningitidis* de áreas remotas e urbanas. O estudo será realizado com dados epidemiológicos, clínicos e bacteriológicos da doença meningocócica no Estado do Amazonas, referentes ao período de 2000 a 2009, em associação com Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SUSAM), que é o órgão responsável pela vigilância epidemiológica da doença no estado, portanto não oferece riscos ao sujeito de pesquisa; A população do estudo consistirá de casos de doença meningocócica, confirmados e suspeitos, notificados ao nível local (SUSAM). A coleta e a análise dos dados epidemiológicos serão realizadas no Instituto de Pesquisa Leônidas & Deane/FIOCRUZ, Manaus – AM; As características conhecidas de *N. meningitidis* isolados dos pacientes serão pesquisadas com base nos dados da SUSAM. Aquelas bactérias que foram sorotipadas e liofilizadas serão requisitadas pela SUSAM ao CRNM, para estudos adicionais de biologia molecular e de sensibilidade aos antibióticos.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Em substituição ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado um Termo de Compromisso, onde o pesquisador responsável compromete-se a manter a confidencialidade, assim como a privacidade dos participantes do projeto. O projeto contará com recursos do POM (Tesouro) da Instituição.

4. Diligências:

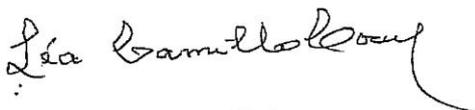
Sim. Foram satisfeitas.

"Doença meningocócica e diversidade genética de *Neisseria meningitidis* no Amazonas, 2000 a 2009".

5. Parecer: APROVADO.

Data: 20 de setembro de 2010.

Assinatura do Coordenador:



Dr.^a Léa Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

Andamento do projeto - CAAE - 0029.0.009.000-10					
Título do Projeto de Pesquisa					
Doença meningocócica e diversidade genética de <i>Neisseria meningitidis</i> no Amazonas, 2000 a 2009					
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP	
Aprovado no CEP	28/06/2010 09:50:16	03/01/2011 09:53:01			
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem	
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	28/06/2010 09:50:16	Folha de Rosto	0029.0.009.000-10	CEP	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	31/05/2010 15:43:10	Folha de Rosto	FR344995	Pesquisador	
3 - Protocolo Aprovado no CEP	03/01/2011 09:53:01	Folha de Rosto	045/2010	CEP	

Voltar

ANEXO B – FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE DOENÇA

MENINGOCÓCICA E MENINGITES



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA SAÚDE
ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



SINAN
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE INVESTIGAÇÃO
MENINGITE

Nº

CASO SUSPEITO: Criança acima de nove meses e/ou adulto com febre, cefaléia, vômitos, rigidez de nuca, outros sinais de irritação meníngea (Kernig e Brudzinski), convulsão, sufusões hemorrágicas (petéquias) e torpor. Crianças abaixo de nove meses observar também irritabilidade (choro persistente) ou abaulamento de fontanela.

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2 - Individual		
	2 Agravado/doença MENINGITE	1 - DOENÇA MENINGOCÓCICA <input type="checkbox"/> Código (CID10) G 03.9 2 - OUTRAS MENINGITES	
	4 UF <input type="text"/>	3 Data da Notificação <input type="text"/>	
Notificação Individual	5 Município de Notificação Código (IBGE) <input type="text"/>		
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notifi cadora) <input type="text"/>	7 Data dos Primeiros Sintomas <input type="text"/>	
	8 Nome do Paciente <input type="text"/>	9 Data de Nascimento <input type="text"/>	
Dados de Residência	10 (ou) Idade <input type="text"/> <small>1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano</small>	11 Sexo <input type="checkbox"/> M - Masculino <input type="checkbox"/> F - Feminino <input type="checkbox"/> I - Ignorado	
	12 Gestante <input type="checkbox"/> <small>1-1ºTrimestre 2-2ºTrimestre 3-3ºTrimestre 4- Idade gestacional Ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9-Ignorado</small>		
	13 Raça/Cor <input type="checkbox"/> <small>1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado</small>		
14 Escolaridade <input type="checkbox"/> <small>0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª à 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica</small>			
15 Número do Cartão SUS <input type="text"/>	16 Nome da mãe <input type="text"/>		
Dados Complementares do Caso	17 UF <input type="text"/>	18 Município de Residência <input type="text"/>	
	Código (IBGE) <input type="text"/>		
	19 Distrito <input type="text"/>	Código <input type="text"/>	
	20 Bairro <input type="text"/>	21 Logradouro (rua, avenida,...) <input type="text"/>	
	22 Número <input type="text"/>	23 Complemento (apto., casa, ...) <input type="text"/>	
	24 Geo campo 1 <input type="text"/>	25 Geo campo 2 <input type="text"/>	
	26 Ponto de Referência <input type="text"/>	27 CEP <input type="text"/>	
28 (DDD) Telefone <input type="text"/>	29 Zona <input type="checkbox"/> 1 - Urbana <input type="checkbox"/> 2 - Rural <input type="checkbox"/> <small>3 - Periurbana 9 - Ignorado</small>	30 País (se residente fora do Brasil) <input type="text"/>	
Antecedentes Epidemiológicos	31 Data da Investigação <input type="text"/>		
	32 Ocupação <input type="text"/>		
	33 Vacinação		
	1 - Sim <input type="checkbox"/>	2 - Não <input type="checkbox"/>	9 - Ignorado <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> Polissacarídica A/C	<input type="checkbox"/> Polissacarídica B/C	<input type="checkbox"/> Conjugada meningoc C
	<input type="checkbox"/> BCG	<input type="checkbox"/> Triíplice Viral Hemófilo (Tetavalente ou Hib)	<input type="checkbox"/> Pneumococo
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outra <input type="text"/>
	34 Doenças Pré-existentes <input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado		
<input type="checkbox"/> AIDS/HIV +	<input type="checkbox"/> Outras Doenças Imunodepressoras	<input type="checkbox"/> IRA	
<input type="checkbox"/> Traumatismo	<input type="checkbox"/> Infecção Hospitalar	<input type="checkbox"/> Outro <input type="text"/>	
35 Contato com Caso Suspeito ou Confirmado de Meningite (até 15 dias antes do início dos sintomas)			
1 - Domicílio	2 - Vizinhança	3 - Trabalho	
4 - Creche/Escola	5 - Posto de Saúde/Hospital	6 - Outro Estado/Município	
7 - Sem História de Contato	8 - Outro país	9 - Ignorado	
36 Nome do Contato <input type="text"/>	37 (DDD) Telefone <input type="text"/>		
38 Endereço do contato (Rua, Av., Apto., Bairro, Localidade, etc) <input type="text"/>		39 Caso Secundário <input type="checkbox"/>	
		<small>1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado</small>	
Dados Clínicos	40 Sinais e Sintomas		
	<input type="checkbox"/> Cefaléia	<input type="checkbox"/> Vômitos	
<input type="checkbox"/> Rigidez de Nuca	<input type="checkbox"/> Abaulamento de Fontanela	<input type="checkbox"/> Petequias/Sufusões Hemorrágicas	
<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Convulsões	
<input type="checkbox"/> Kernig/Brudzinski	<input type="checkbox"/> Coma	<input type="checkbox"/> Outras <input type="text"/>	

Atendimento	41 Ocorreu Hospitalização <input type="checkbox"/>	42 Data da Internação	43 UF	44 Município do Hospital	Código (IBGE)
	1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado				
	45 Nome do Hospital	Código			

Dados do Laboratório	46 Punção Lombar <input type="checkbox"/>	47 Data da Punção	48 Aspecto do Líquor
	1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		1 - Límpido 2 - Purulento 3 - Hemorrágico 4 - Turvo 5 - Xantocrômico 6 - Outro 9 - Ignorado

Dados do Laboratório	49 Resultados Laboratoriais		
	Cultura	CIE	PCR
	Líquor <input type="text"/>	Líquor <input type="text"/>	Líquor <input type="text"/>
	Lesão Petequial <input type="text"/>	Sangue/Soro <input type="text"/>	Lesão Petequial <input type="text"/>
	Aglutinação pelo Látex		
Sangue/Soro <input type="text"/>	Líquor <input type="text"/>	Sangue/Soro <input type="text"/>	
Escarro <input type="text"/>	Sangue/Soro <input type="text"/>	Escarro <input type="text"/>	
	Isolamento Viral		
Bacterioscopia	Líquor <input type="text"/>		
Líquor <input type="text"/>	Fezes <input type="text"/>		
Lesão Petequial <input type="text"/>			
Sangue/Soro <input type="text"/>			
Escarro <input type="text"/>			

Classificação do Caso / Etiologia	50 Classificação do Caso <input type="checkbox"/>	51 Se Confirmado, Especifique
	1 - Confirmado 2 - Descartado	1 - Meningococemia 2 - Meningite Meningocócica 3 - Meningite Meningocócica com Meningococemia 4 - Meningite Tuberculosa 5 - Meningite por outras bactérias _____ 6 - Meningite não especificada 7 - Meningite Asséptica _____ 8 - Meningite de outra etiologia _____ 9 - Meningite por Hemófilo 10 - Meningite por Pneumococos

Classificação do Caso / Etiologia	52 Critério de Confirmação	53 Se N. meningitidis especificar sorogrupo
	1 - Cultura 2 - CIE 3 - Ag. Látex 4 - Clínico 5 - Bacterioscopia 6 - Quimiocitológico do Líquor 7 - Clínico-epidemiológico 8 - Isolamento viral 9 - PCR 10 - Outros	

Medidas de Controle	54 Número de Comunicantes	55 Realizada Quimioprofilaxia dos Comunicantes? <input type="checkbox"/>	56 Se sim, Data	57 Doença Relacionada ao Trabalho
		1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado

Conclusão	58 Evolução do Caso <input type="checkbox"/>	59 Data da Evolução	60 Data do Encerramento
	1 - Alta 2 - Óbito por meningite 3 - Óbito por outra causa 9 - Ignorado		

Informações complementares e observações

Exame Quimiocitológico		
Hemácias <input type="text"/> mm ³	Leucócitos <input type="text"/> mm ³	Monócitos <input type="text"/> %
Neutrófilos <input type="text"/> %	Eosinófilos <input type="text"/> %	Linfócitos <input type="text"/> %
Glicose <input type="text"/> mg	Proteínas <input type="text"/> mg	Cloreto <input type="text"/> mg

Observações Adicionais

Investigador	Município/Unidade de Saúde	Cód. da Unid. de Saúde
	Nome	Função
		Assinatura