

FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IDENTIFICAÇÃO DE *Neisseria meningitidis* EM PORTADORES
ASSINTOMÁTICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

ÍTALO EUSTÁQUIO FERREIRA

Salvador-Bahia
2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**IDENTIFICAÇÃO DE *Neisseria meningitidis* EM PORTADORES
ASSINTOMÁTICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL**

ÍTALO EUSTÁQUIO FERREIRA

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Co-orientadora: Dra. Leila Carvalho Campos

**Salvador - Bahia
2018**

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

F383i Ferreira, Ítalo Eustáquio
Identificação de *Neisseria meningitidis* em portadores assintomáticos através da
técnica de PCR em tempo real / Ítalo Eustáquio Ferreira. - 2018.
85 f.; 30 cm, il.

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis. Laboratório de Patologia e Biologia
Molecular.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.
3. Portador Sadio. I.Título.

CDU 616.981.23

IDENTIFICAÇÃO DE *Neisseria meningitidis* EM PORTADORES
ASSINTOMÁTICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

ÍTALO EUSTÁQUIO FERREIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

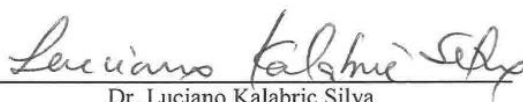
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Suzana Ramos Ferrer
Professor adjunta
EBMSP



Dra. Soraia Machado Cordeiro
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Luciano Kalabric Silva
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Ministério da Saúde – MS (TC335/2013)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB (SUS007/2014)

A

Todas as pessoas que participaram, diretamente ou indiretamente, da minha trajetória profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo de bom e pelos desafios que tem aparecido na minha trajetória.

Agradeço ao suporte familiar, no qual, sempre pude contar. Aos meus pais Eliana Ferreira e Eduardo Ferreira, a minha irmã Amanda Ferreira e a minha namorada Ítala Veras.

Ao meu orientador, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pelo acolhimento em seu laboratório e orientação deste trabalho.

A minha co-orientadora, Dra. Leila Campos, pela orientação e oportunidade de desenvolver este projeto e poder contribuir em outros projetos de pesquisa de seu grupo.

Ao colegiado do curso de pós-graduação em Biotecnologia em saúde e medicina investigativa, que tive o prazer de fazer parte, como representante dos alunos de mestrado.

A toda equipe do grupo de Pesquisa da Dra. Leila Campos: Ana Rafaela Silva Simões Moura; Amélia Nunes; Ellen Pimentel; Lara Macedo e principalmente a Viviane Ferreira, que foi de grande ajuda nas etapas finais deste trabalho. Nesta equipe puder formar laços profissionais e de amizade que levarei para o resto de minha vida.

A Dr. Xin Wang, do laboratório de meningites (CDC, Atlanta) que contribuiu com os primers e sonda para o gene alvo *sodC*.

A Dra. Clarissa Gurgel, que auxiliou no meu treinamento da técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Ao Dr. Luciano Kalabric, que fez contribuições para o desfecho do trabalho.

A Dra. Tamiris Dias, que me auxiliou no aprendizado das técnicas de extração de DNA e PCR convencional.

Aos Diretores das escolas e participantes da pesquisa que contribuíram com o estudo que deu origem a este.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular e seus estudantes nos quais convivi durante o período deste estudo.

Ao Instituto Gonçalo Moniz e a Fundação Osvaldo Cruz.

As fontes de financiamento deste trabalho, Ministério da saúde e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia.

E a todas as pessoas que fizeram parte desta pesquisa, direta ou indiretamente.

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é consequência...”

Albert Einstein

FERREIRA, Ítalo Eustáquio. Identificação de *Neisseria meningitidis* em portadores assintomáticos através da técnica de PCR em tempo real. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018

RESUMO

INTRODUÇÃO: A cultura é considerada a metodologia padrão ouro para a identificação de *N. meningitidis*. Entretanto, o emprego de técnicas moleculares, como a PCR em tempo real (qPCR) tem melhorado a capacidade de detecção do meningococo. Nos estudos em portadores, a qPCR empregando o gene *sodC* como alvo tem sido indicada. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como objetivo avaliar a técnica de qPCR (*sodC*) para a identificação de *N. meningitidis*, a partir de material de orofaringe mantido em meio de transporte STGG, coletado de portadores assintomáticos. **MATERIAL E MÉTODOS:** O ensaio da qPCR foi padronizado e validado com critérios locais e a metodologia comparada com os resultados obtidos previamente a partir da cultura. Foram utilizadas um total de 1200 amostras de material de orofaringe mantidas em meio de transporte STGG a -70°C . Os ensaios da qPCR foram realizados empregando o *cycle threshold* (Ct) padrão ($\text{Ct} \leq 35$) e o $\text{Ct} \leq 38$ validado neste estudo. **RESULTADOS:** Através da qPCR ($\text{Ct} \leq 35$) foram obtidas um total de 84 (7%) amostras positivas (Ct médio= $30,4 \pm 3,1$) em comparação com a cultura ($n=59$; 4,9%), enquanto a qPCR ($\text{Ct} \leq 38$) permitiu a identificação de 99 (8,3%) amostras positivas (Ct médio= $35,6 \pm 5,1$). Apenas uma amostra positiva na cultura não foi identificada através da qPCR ($\text{Ct} \leq 38$). A concentração de DNA na etapa prévia de extração melhorou a capacidade de detecção de amostras positivas na qPCR. A caracterização dos genogrupos de *N. meningitidis* através da qPCR mostrou a presença de amostras não-grupáveis. **CONCLUSÕES:** Os resultados obtidos neste estudo mostram que a qPCR ($\text{Ct} \leq 38$) é uma alternativa eficaz para a identificação e caracterização de *N. meningitidis* a partir do meio de transporte STGG, devendo ser empregada em associação à cultura nos estudos de portadores de *N. meningitidis*.

Palavras-Chave: *Neisseria meningitidis*, identificação, qPCR, portadores.

FERREIRA, Ítalo Eustáquio. Identification of *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers by Real Time PCR. Dissertation (Master) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018

ABSTRACT

INTRODUCTION: Culture is considered the gold standard methodology for the identification of *N. meningitidis*. However, the use of molecular techniques such as real-time PCR (qPCR) has improved the detection of meningococcus. In carrier studies, qPCR employing the target *sodC* gene has been indicated. **AIM:** The aim of our study was to assess the qPCR using *sodC* gene for detecting *N. meningitidis* in oropharyngeal secretions maintained in STGG transport medium obtained from asymptomatic carriers. **MATERIAL AND METHODS:** The qPCR assay was standardized and validated with local criteria and the methodology was compared with the results obtained previously by classical method (culture). A total of 1200 samples of oropharyngeal material maintained in STGG transport medium at -70°C were used. The qPCR assays were performed using the standard cycle threshold (Ct) (Ct≤35) and the Ct≤38 assay validated in this study. **RESULTS:** A total of 84 (7%) positive samples (mean Ct = 30.4 ± 3.1) were obtained through the standard qPCR (Ct≤35) assay in comparison with the culture (n=59; 4,9%), whereas qPCR (Ct≤38) assay allowed the identification of 99 (8.3%) positive samples (mean Ct = 35.6 ± 5.1). Only a culture-positive sample was not identified through qPCR (Ct≤38). The concentration of DNA in the previous extraction step improved the ability to detect positive samples. The characterization of *N. meningitidis* genogroups through qPCR showed the presence of non-groupable samples. **CONCLUSIONS:** The results obtained in this study show that qPCR (Ct≤38) assay is an effective alternative for the identification and characterization of *N. meningitidis* from the STGG transport medium and it should be used in association with culture in the studies of *N. meningitidis* carriers.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, identification, qPCR, carriers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de microscopia óptica demonstrando as características morfo-tintoriais da <i>Neisseria meningitidis</i>	22
Figura 2. Imagem ilustrativa dos componentes estruturais da membrana externa da <i>Neisseria meningitidis</i>	23
Figura 3. Distribuição da prevalência da colonização assintomática pela <i>N. meningitidis</i> , de acordo com a faixa etária.....	28
Figura 4. Representação da hibridação da sonda marcada (5'- <i>dye</i> e 3'- <i>quencher</i>).....	37
Figura 5. Representação da capacidade de determinação entre amostras positivas e negativas através da curva ROC.....	50
Figura 6. Resultados gerais obtidos através das metodologias utilizadas neste estudo.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. <i>Primers</i> e sondas utilizados para caracterização da espécie <i>Neisseria meningitidis</i>	43
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Ensaio de qPCR realizados nas 1200 amostras de STGG empregando os critérios de Dolan Thomas (2011)..... 48
- Tabela 2.** Resultados dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, obtidos através da curva ROC..... 52
- Tabela 3.** Ensaio de qPCR realizados nas 1200 amostras de STGG empregando os critérios validados neste estudo..... 53
- Tabela 4.** Relação entre a técnica convencional (cultura) e a qPCR (*sodC*) na identificação de *N. meningitidis* partir do meio de STGG, segundo o parâmetro de Dolan Thomas e colaboradores (2011)..... 55
- Tabela 5.** Relação entre a técnica convencional (cultura) e a qPCR (*sodC*) na identificação de *N. meningitidis* partir do meio de STGG, segundo o parâmetro validado neste estudo..... 57
- Tabela 6.** Determinação dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos resultados obtidos através da amplificação do qPCR, para o gene alvo *sodC*, de acordo com os parâmetros utilizados no estudo..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTA	<i>Cystine trypticase agar</i>
DM	Doença meningocócica
LOS	Lipooligossacarídeo
PCR	Reação da cadeia da polimerase
qPCR	Reação da cadeia Polimerase quantitativa
Curva ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
STGG	<i>Skim Milk-Tryptona-Glicose-Glicerina</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VCNT	Vancomicina, colistina, nistatina e trimetoprim
MALDI-TOF	Ionização e Dessorção a laser assistida por Matriz – Tempo de Voo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	21
2.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA (DM)	24
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	24
2.4 O ESTADO DE PORTADOR ASSINTOMÁTICO	27
2.5 MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE <i>Neisseria meningitidis</i>	28
2.5.1 Métodos Fenotípicos	28
2.5.1.1 Método de Cultura.....	29
2.5.1.2 Testes Bioquímicos.....	30
2.5.2 Métodos Automatizados de Identificação	31
2.5.3 Sorologia	32
2.5.4 Métodos Genotípicos	33
2.5.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
2.5.4.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	34
2.5.4.2.1 Princípio da Metodologia de qPCR e Hidrólise de Sonda.....	35
2.5.4.3 Sequenciamento do genoma completo (WGS).....	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS	39

4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 AMOSTRAS DO ESTUDO.....	40
4.1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO	40
4.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	41
4.3 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	41
4.3.1 Padronização e Validação das Reações de qPCR	44
4.3.2. Análise da Sensibilidade e Especificidade da Técnica de qPCR	44
4.4 MÉTODO DE ENRIQUECIMENTO PRÉVIO	45
7 RESULTADOS	47
7.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>Neisseria meningitidis</i> EM AMOSTRAS MANTIDAS EM MEIO DE TRANSPORTE STGG EMPREGANDO OS CRITÉRIOS DE DOLAN THOMAS (2011).....	47
7.2 CULTIVO DAS AMOSTRAS POSITIVAS NA CULTURA E NEGATIVAS NO qPCR EM MEIO TODD-HEWITT.....	49
7.4 IDENTIFICAÇÃO DE <i>N. meningitidis</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE qPCR EMPREGANDO OS CRITÉRIOS VALIDADOS NESTE ESTUDO (Ct ≤38).....	53
7.5 COMPARAÇÃO DO ENSAIO DE qPCR (Ct≤35) COM OS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>N. meningitidis</i> OBTIDOS PREVIAMENTE ATRAVÉS DA CULTURA (NUNES et al., 2016)	54
7.6 COMPARAÇÃO DO ENSAIO DE qPCR (Ct≤38) COM OS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>N. meningitidis</i> OBTIDOS PREVIAMENTE ATRAVÉS DA CULTURA (NUNES et al., 2016)	56
7.7 IDENTIFICAÇÃO DOS GENOGRUPOS DE <i>N. meningitidis</i> A PARTIR DO MEIO DE TRANSPORTE STGG	61
8 DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	78

1 INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis é uma bactéria diplococo Gram negativo, patogênica, restrita em humanos. Ela está presente na microbiota do trato respiratório superior de humanos sem causar doença, caracterizando o estado de portador e mantendo-se circulante na população. As cepas circulantes são transmitidas de pessoa para pessoa através de gotículas respiratórias ou pelo contato com secreções de portadores saudáveis ou doentes (ROSENSTEIN et al., 2001).

Cerca de 8% a 25% da população humana apresenta a colonização da *N. meningitidis* na nasofaringe, caracterizando o estado de portador assintomático (ROSENSTEIN et al., 2001; DE MORAES et al., 2015). Ocasionalmente, *N. meningitidis* pode se disseminar na corrente sanguínea causando meningite e/ou septicemia (VAN DE BEEK et al., 2016).

A doença meningocócica (DM) acomete pessoas de todas as faixas etárias, em todos os países, existindo grandes variações nos coeficientes de incidência e nos sorogrupos mais prevalentes, de acordo com época e região (ROSENSTEIN et al., 2001). No Brasil a DM é considerada endêmica, apresentando uma incidência que varia de 1,0-2,0 casos/100.000 habitantes por ano, fato este que torna a DM uma importante preocupação para a saúde pública (SAFADI et al., 2013).

A cultura é considerada o método padrão-ouro para confirmação laboratorial da DM. Entretanto, o diagnóstico é muitas vezes realizado por bacterioscopia ou critérios clínico-epidemiológicos, principalmente em casos de tratamento prévio, que dificulta o crescimento em cultura, prejudicando, assim, a confirmação laboratorial (ROSENSTEIN et al., 2001). Além disto, outros métodos utilizados, como os testes bioquímicos e a aglutinação em látex (VAN DER ENDE et al., 1995; MOTHERSHED et al., 2004), podem apresentar resultados subjetivos ou até mesmo não serem específicos o bastante, a

dependem do sorogrupo do meningococo (VAN DER ENDE et al., 2000; MOTHERSHED et al., 2004).

A utilização de novos recursos laboratoriais em pesquisa, que possam aumentar a capacidade de detecção e caracterização do patógeno, é fundamental para melhorar a vigilância epidemiológica, diagnosticar mudanças nos sorogrupos mais prevalentes e trazer subsídios valiosos para políticas de vacinação.

Entre os métodos atuais, encontra-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real ou RT-PCR) (HIGUCHI et al., 1993), que apresenta elevada sensibilidade e especificidade. Esta metodologia tem sido utilizada em estudos no Brasil, demonstrando ser de grande utilidade para o diagnóstico das DM que apresentam cultura de líquido negativa (SACCHI et al., 2011). Entretanto, estudos empregando esta técnica para a pesquisa de *N. meningitidis* em portadores ainda são escassos e necessitam de uma padronização e validação locais (DOLAN THOMAS et al., 2011; DE MORAES et al., 2015).

A utilização do qPCR para a identificação de cepas invasivas de *N. meningitidis* tem sido geralmente realizada empregando-se o gene alvo *ctrA*, que é responsável pela síntese e transporte da cápsula do meningococo (FROSCH et al., 1992; MOTHERSHED et al., 2004). Por outro lado, nos estudos de portadores, tem sido sugerida a utilização do gene alvo *sodC*, responsável pela síntese do co-fator superóxido dismutase, cobre e zinco ([Cu, Zn]), uma vez que a maioria das cepas isoladas de portadores são acapsuladas (DUNN et al., 2003; DOLAN THOMAS et al., 2011; WHO, 2011).

Em setembro de 2014, o nosso grupo de pesquisa realizou um estudo sobre a prevalência de portadores de *N. meningitidis* em escolares de 11 a 19 anos de idade, matriculados na rede pública de ensino da cidade de Salvador – Bahia. Para isto, foram coletadas 1.200 amostras provenientes de secreção da orofaringe de escolares, obtendo-se uma taxa de isolamento de 4,9% (59 isolados) (NUNES et al., 2016). Este isolamento foi realizado através de métodos

clássicos de cultura e caracterização fenotípica. Também foram caracterizados os genogrupos das cepas de *N. meningitidis* através da técnica de PCR convencional. Os *swabs* contendo a secreção de orofaringe foram mantidos em meio de transporte STGG (*Skim milk*-triptona-glicose-glicerina) a -70°C , para a pesquisa futura através de métodos moleculares.

No presente estudo, nós empregamos a técnica de qPCR para a identificação e caracterização de *N. meningitidis* a partir do material mantido em STGG, com o intuito de verificar se esta técnica molecular aumentaria a capacidade de detecção de *N. meningitidis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis (meningococo) é uma bactéria Gram negativa, pertencente à família Neisseriaceae. Apresenta-se agrupada em pares (diplococos) e com células em forma de grão de café. (Figura 1). É um microrganismo aeróbico, catalase-positivo, oxida glicose e maltose com a produção de ácido sem a formação de gás. Apresenta crescimento em ágar chocolate ou ágar sangue, à temperatura entre 35°C e 37°C, em atmosfera com 5% a 10% de dióxido de carbono (WHO, 2011).

É um patógeno fastidioso e humano restrito, podendo ser também encontrado colonizando o trato respiratório superior dos seres humanos. (WHO, 2011; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). O meningococo tem baixa sobrevivência no meio ambiente e sua transmissão ocorre de forma direta, de pessoa-a-pessoa, através de gotículas respiratórias ou contato com secreções de portadores saudáveis ou doentes (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004). Atualmente é classificado em 12 sorogrupos (HARRISON et al., 2013), de acordo com a composição da sua cápsula polissacarídica, sendo que seis deles (A, B, C, W, X e Y) são considerados os de maior associação com a doença meningocócica (DM) (STEPHENS et al., 2007; CAUGANT; MAIDEN, 2009; KOYFMAN; TAKAYESUB, 2011; WHO, 2011; KUHDARI et al., 2016; PICCINI et al., 2016).

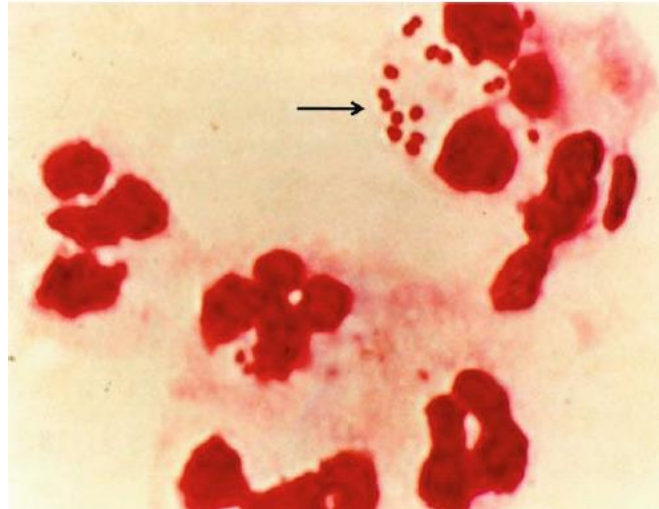


Figura 1. Imagem de microscopia óptica demonstrando as características morfo-tintoriais da *Neisseria meningitidis*, indicadas pela seta (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A superfície de meningoco apresenta uma estrutura típica das bactérias Gram-negativas. que é composta por uma membrana citoplasmática, camada de peptídeoglicano e membrana externa. A membrana externa é constituída de lipooligossacarídeo (LOS) e de uma dupla camada de fosfolípídeos, onde são encontradas diversas proteínas de membrana externa e o *pili* (Figura 2) (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

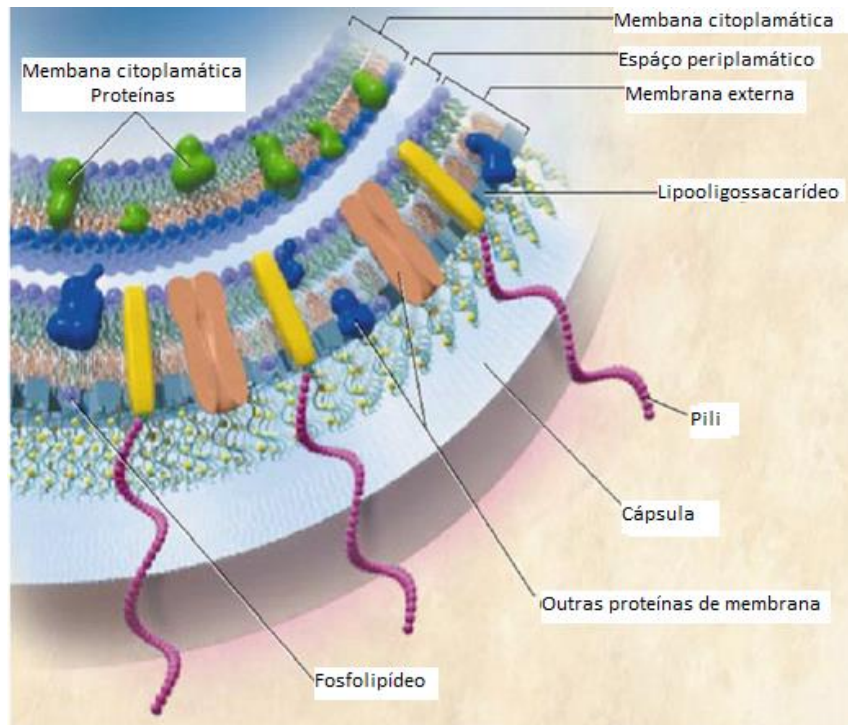


Figura 2. Imagem ilustrativa dos componentes estruturais da membrana externa da *Neisseria meningitidis* (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A virulência da bactéria está relacionada à presença de diversos fatores. Além do LOS, que é uma endotoxina responsável pelo choque tóxico, várias proteínas de membrana externa parecem participar na adesão e invasão da célula do hospedeiro, tais como, Opa (*opacity associated protein*), Opc (*opacity protein c*), App (*adhesion and penetration protein*), NadA (*Neisseria adhesin A*), etc. (PIZZA; RAPPUOLI, 2015). Contudo, a cápsula polissacarídica, envolvendo a membrana externa, é o principal fator de virulência do meningococo. Ela é essencial para a sobrevivência da bactéria, pois promove a resistência a anticorpos e inibe a fagocitose (URIA et al., 2008). A cápsula representa, também, um alvo para o desenvolvimento de vacinas conjugadas específicas (SNAPE; POLLARD, 2005).

2.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA (DM)

A primeira epidemia da doença foi descrita por Vieusseux, no ano de 1805, em Genebra, contabilizando 33 mortes. O agente etiológico da doença meningocócica (DM) foi identificado pela primeira vez por Weichselbaum em 1887 e posteriormente denominado *Neisseria meningitidis*, também conhecido como meningococo (STEPHENS et al., 2007; MOHAMMED et al., 2017).

A DM é caracterizada pela disseminação do meningococo através da corrente sanguínea levando a uma septicemia e/ou atingindo as meninges, causando meningite. Essa doença acomete pessoas de todas as faixas etárias, entretanto, os indivíduos mais atingidos são as crianças menores de 5 anos de idade e em casos de surtos, os adultos jovens (CAUGANT; MAIDEN, 2009; KOYFMAN; TAKAYESUB, 2011). Entretanto, a doença invasiva depende de alguns fatores, dentre eles, fatores microbiológicos que influenciam a virulência do microrganismo, fatores de risco/exposição e susceptibilidade do hospedeiro (SHARIP et al., 2006; PIZZA; RAPPUOLI, 2015).

Os sintomas clássicos da doença são: rigidez na nuca, febre alta, sensibilidade a luz, confusão mental, dor de cabeça e vômito em jato (KOYFMAN; TAKAYESUB, 2011; ATAEE et al., 2016). Nos casos de diagnóstico e tratamento adequado, apresenta uma porcentagem de 5% a 10% de mortalidade. Em países desenvolvidos, pode ocorrer entre 24 a 48 horas após a manifestação dos sintomas. Além disto, mesmo com o tratamento adequado, ainda pode apresentar sequelas em 10% a 20% dos casos (WHO, 2011).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

A DM é um problema de saúde global, ocorrendo de forma esporádica ou sob a forma de epidemias. Apresenta taxas de incidência que variam de 1 a 1000 casos

por 100.000 indivíduos em diferentes partes do mundo (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016). O número de casos pode variar amplamente ao longo do tempo e entre áreas geográficas, de acordo com a faixa etária e/ou sorogrupos. Com exceção de indivíduos com deficiência de complemento, que estão mais susceptíveis às infecções meningocócicas. (MAIDEN et al., 1998; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A epidemiologia da doença é dinâmica e sofre constantes mudanças de incidência, sendo também observado em relação aos sorogrupos (HALPERIN et al., 2012). A DM ocorre normalmente como casos esporádicos, podendo afetar indivíduos de qualquer idade, mas apresentam as taxas de incidência mais elevadas no grupo de crianças menores de 1 ano (HARRISON et al., 2011). Contudo, picos de incidência também são observados em adolescentes e na população idosa (KIMMEL, 2005). A doença epidêmica e pandêmica parece restrita aos países da África subsaariana, no chamado "cinturão da meningite", que se estende da Etiópia no Oriente ao Senegal no Oeste (WHO, 2011).

Com relação aos sorogrupos mais associados à DM, seis deles (A, B, C, W, X e Y) representam mais de 90% dos casos da doença invasiva ao redor do mundo, associados a doenças hiperendêmicas e epidêmicas (BOISIER et al., 2007; VOGEL, 2010; HARRISON et al., 2011; BORROW et al., 2017).

As epidemias no cinturão da meningite, composta pelo leste da Etiópia ao oeste do Senegal, estão mais associadas ao sorogrupo A, apesar de, atualmente apresentar um aumento da incidência dos sorogrupos C, W e X (SCHWARTZ et al., 1989; GREENWOOD, 1999; ABIO et al., 2013; KRISTIANSEN et al., 2015; BORROW et al., 2017).

O sorogrupo B, geralmente ausente na África subsaariana, consiste na principal preocupação nos países industrializados, ocorrendo em ondas hiperendêmicas (ROSENSTEIN et al., 2001; GABUTTI et al., 2015).

Os surtos da DM pelo sorogrupo C ocorrem em todo o mundo, especialmente em adolescentes e adultos jovens (SAFADI et al., 2012) e o sorogrupo Y emergiu

como uma causa importante de doença na América do Norte nos últimos 10 anos (STEPHENS et al., 2007). Por outro lado, os sorogrupos W e X tem sido responsáveis por epidemias na África subsaariana desde 2002 (GAGNEUX et al., 2002; CAUGANT; MAIDEN, 2009; VETTER et al., 2016).

Os sorogrupos atualmente associados a surtos em países industrializados são o sorogrupos B e C, que possuem maior incidência durante a infância (GABUTTI et al., 2015; STEFANELLI; REZZA, 2016; VETTER et al., 2016). A incidência da DM na América do Norte, Austrália e no continente europeu é baixa, e tem como sorogrupos mais associados, o sorogrupo B, C e Y (SAFADI et al., 2013; LADHANI et al., 2015; CAMPBELL et al., 2016; VETTER et al., 2016).

Na América Latina, a DM apresenta uma subnotificação dos casos, apesar de ser de notificação obrigatória, contendo os sorogrupos B e C como os mais associados à DM (SAFADI et al., 2015). Por outro lado, nos últimos anos, tem ocorrido um aumento do número de casos associados ao sorogrupo W, na Argentina, Chile, Uruguai e Brasil (SAFADI et al., 2013; SAFADI et al., 2015; GENTILE et al., 2017; CORDEIRO et al., 2018).

Particularmente no Brasil, a DM é considerada endêmica, responsável por cerca de 22% das meningites bacterianas, com taxas de incidência que variam de 1,0-2,0 casos/100.000 habitantes por ano (SAFADI et al., 2013). No país, a epidemiologia da DM mudou ao longo do tempo. Na década de 1970, a maioria dos casos de doença foi causada pelos sorogrupos A e C, com uma incidência crescente de sorogrupo B ocorrendo em 1980 e 1990 (DE MORAES; BARATA, 2005). Desde 2000, o sorogrupo C (MenC) do complexo clonal ST-103 tem sido responsável pela maioria dos casos relatados e associado a surtos em todo o país (DE MORAES; BARATA, 2005; DE LEMOS et al., 2007; SAFADI et al., 2015; CORDEIRO et al., 2018).

Entre 2007 e 2009, a taxa de incidência de DM aumentou substancialmente em diferentes regiões do país, particularmente no estado da Bahia (SAFADI et al., 2015). Como resposta, o governo estadual introduziu a vacina conjugada contra *N. meningitidis* sorogrupo C (MCC) para crianças < 5 anos de idade. Como a incidência

continuou elevada entre os adultos jovens, houve uma ampliação do programa de vacinação para a faixa etária de 10 a 24 anos de idade (CARDOSO et al., 2012). As campanhas revelaram-se altamente eficazes, reduzindo 50% da incidência de DM na população menor que 2 anos de idade no período de 2011 a 2012 (CARDOSO et al., 2012; SAFADI et al., 2014).

2.4 O ESTADO DE PORTADOR ASSINTOMÁTICO

Embora o estado de portador assintomático apresente-se mais frequentemente do que o estado de doença, pesquisas desenvolvidas sobre colonização de *N. meningitidis* ainda são escassas, principalmente no Brasil.

O estado de portador sadio varia, podendo durar poucos dias, semanas ou meses, ou ser intercalado entre períodos de colonização e não colonização a depender das características da cepa que o coloniza. Em casos raros, um mesmo indivíduo pode ser colonizado por diferentes cepas simultaneamente (BROOME, 1986).

O estado de portador é um fenômeno que depende da idade. De modo geral, a prevalência é menor em menores de 5 anos (4,5%), aumentando na adolescência e alcançando seu ápice no início da fase adulta, entre 20 a 24 anos; e diminuindo a valores inferiores a 10% em indivíduos acima de 50 anos (Figura 3) (CHRISTENSEN et al., 2010).

Em função da alta prevalência de portadores sadios do meningococo entre adolescentes e adultos jovens, estes têm um papel importante na epidemiologia da doença meningocócica. Ao contrário do que acontece em relação a outras bactérias causadoras de doença invasiva, tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo b, os adolescentes e adultos jovens são considerados os reservatórios e principais transmissores de *N. meningitidis* para outros grupos etários (VETTER et al., 2016).

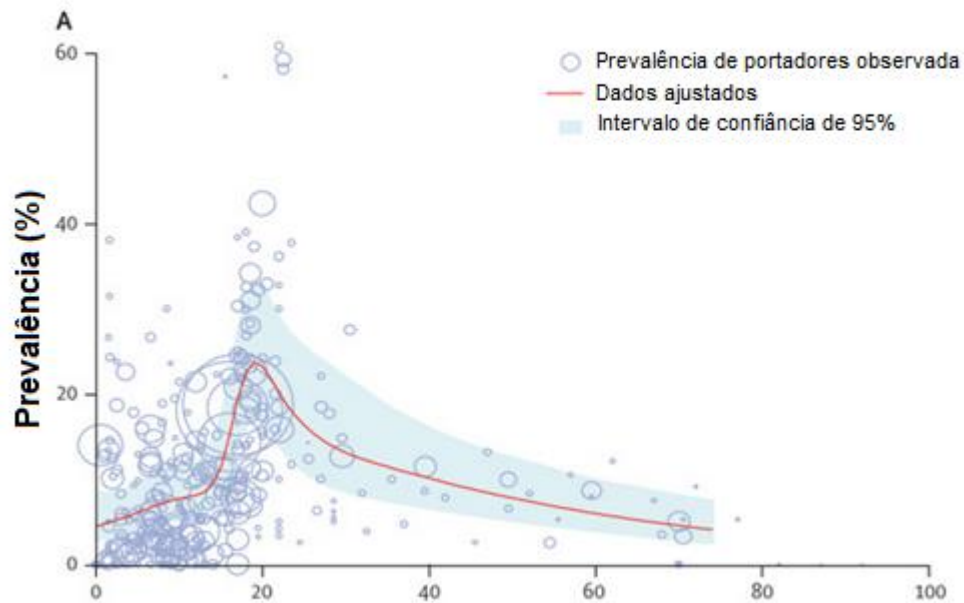


Figura 3. Distribuição da prevalência da colonização assintomática pela *N. meningitidis*, de acordo com a faixa etária (CHRISTENSEN et al., 2010).

2.5 MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *Neisseria meningitidis*

2.5.1 Métodos Fenotípicos

Na etapa inicial da identificação bacteriana, a microscopia de esfregaços corados pelo método de Gram, pode ser utilizada diretamente em amostras clínicas, principalmente no líquido cefalorraquidiano, para visualizar estruturas como diplococos Gram negativos intra ou extracelular, sugerindo infecção. Outra

metodologia associada à etapa inicial do diagnóstico laboratorial consiste na detecção direta de antígenos polissacarídicos capsulares do meningococo. Esse método tem como princípio a visualização da aglutinação em látex sensibilizado pelo anticorpo ou co-aglutinação, capazes de detectar os principais antígenos capsulares dos sorogrupos A, B, C, Y e W (WHO, 2011).

Para agilizar um diagnóstico precoce esses testes são de extrema importância. Por outro lado, quando se apresentam negativos, eles não afastam a possibilidade da doença. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os resultados da aglutinação em látex devem estar correlacionados com os resultados da microscopia (WHO, 2011).

2.5.1.1 Método de Cultura

Os meios de cultura padronizados para o isolamento de *N. meningitidis* em amostras de sítios estéreis, como o líquido cefalorraquidiano, são: o ágar chocolate e ágar sangue de carneiro a 5%. Já em amostras que possam conter outros microrganismos, como amostras de nasofaringe e orofaringe, são indicados os meios seletivos como: Thayer-Martin e ágar GC Lect (CAUGANT; MAIDEN, 2009; WHO, 2011).

Para promover o crescimento de *N. meningitidis* é necessária a incubação de 24 a 72 horas, em atmosfera de CO₂ a 5% e temperatura de 35±2°C. A ausência de crescimento só poderá ser relatada após o período de incubação completo. Para o subcultivo são utilizados o ágar sangue de carneiro a 5 % e o ágar chocolate, sendo que algumas cepas de *Neisseria meningitidis* apresentam hiper expressão da cápsula, podendo parecer mucoides, além da coloração acinzentada, apresentada pela maioria das cepas. Contudo, alguns microrganismos podem apresentar pigmentação amarelada discreta em suas colônias (WHO, 2011).

A cultura constitui o método padrão-ouro para o isolamento de *N. meningitidis*. Entretanto, em muitos países em desenvolvimento, a vigilância das meningites

bacterianas é dificultada em função da alta frequência de culturas negativas, além da realização limitada dessa cultura bacteriana (CORLESS et al., 2001). Do mesmo modo, a administração de antibióticos antes da punção lombar, a falta de recursos microbiológicos para a cultura bacteriana, bem como a qualidade dos serviços de microbiologia são fatores que podem influenciar a negatividade das culturas e a subnotificação do número de casos (SACCHI et al., 2011).

Nos estudos em portadores, a coleta com *swab* diretamente da nasofaringe ou da parede posterior da orofaringe, seguido de cultivo imediato em meio seletivo Thayer-Martin modificado com VCNT (vancomicina, colistina, nistatina e trimetoprim) é o procedimento recomendado para o isolamento da bactéria (CARTWRIGHT, 2001; ROBERTS et al., 2009). Ocorrendo o crescimento de colônias com características morfológicas do gênero *Neisseria*, as culturas são subcultivadas em ágar Columbia enriquecido com 5% de sangue carneiro ou ágar chocolate para a obtenção de culturas puras (WHO, 2011).

2.5.1.2 Testes Bioquímicos

Outra etapa complementar para a identificação inicial é o teste da oxidase, onde o derivado tetrametil do reagente oxidase (*N, N, N, N*-tetrametil-1,4-fenilenodiamina, solução aquosa a 1%) é utilizado. O procedimento é realizado em papel filtro, onde uma porção do crescimento bacteriano em placa é esfregado sobre o reagente. O aparecimento da cor púrpura escuro após dez segundos indica resultado positivo. Contudo esse resultado não é capaz de identificar as bactérias do gênero *Neisseria* a nível de espécie (WHO, 2011).

A identificação a nível de espécie necessita de provas bioquímicas mais específicas, como a utilização do meio CTA (Cistina-tríptica), que avalia o metabolismo oxidativo do meningococo, a partir de um meio de cultura a base de ágar semi-sólido, que contém em sua composição 1% de carboidrato, além do indicador de pH, vermelho-fenol. Usualmente este meio é utilizado junto a diferentes carboidratos: CTA-glicose; CTA-maltose; CTA-sacarose e CTA-lactose e um CTA

sem carboidrato. O resultado em conjunto de todos os carboidratos testados caracteriza a espécie da *Neisseria*. Para isto, a bactéria deve ser inoculada em cada tubo contendo um carboidrato diferente e incubada durante 24 a 72 horas a uma temperatura de 35°C, em estufa sem CO₂. *Neisseria meningitidis*, é diferenciada das outras espécies por oxidar a glicose e maltose (WHO, 2011).

Outro teste utilizado para a identificação de *N. meningitidis* é o sistema API-NH[®] (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France), capaz de identificar espécies de *Neisseria* e *Haemophilus*. O sistema é composto por 13 testes: 4 de fermentação (glicose, maltose, sacarose e lactose); 8 de reações enzimáticas (ornitina descarboxilase, urease, lipase, fosfatase alcalina, 3-galactosidase, proline arylamidase, γ -glutamyl transferase, produção de indol) e produção de penicilinase. Cada teste positivo é caracterizado pela mudança de cor, identificados pela ajuda da adição de um reagente. Uma suspensão bacteriana com turvação correspondente ao tubo 4 da escala de McFarland é inoculada nos microtubos contendo os testes, os quais são incubados a 35-37°C durante duas horas. A identificação é realizada a partir da leitura e comparação com o manual oferecido pelo fabricante (BARBE et al., 1994).

2.5.2 Métodos Automatizados de Identificação

Atualmente, tem-se se tornado comum a identificação de *N. meningitidis* e outros patógenos através de métodos automatizados baseados em provas bioquímicas convencionais, como por exemplo, Vitek-2 e MicroScan. Essas metodologias são baseadas no preparo de uma suspensão do microrganismo a ser testado, em salina, realizando uma turvação padronizada seguida da inoculação em cartões ou painéis específicos. A depender do organismo, o tempo de incubação tem duração aproximada de duas a quinze horas e a leitura ocorre através da atenuação de luz que é medida por um scanner óptico. Após o período de

incubação, as reações são automaticamente analisadas e impressas, chegando-se à identificação através de um bionúmero específico para cada microrganismo (JOYANES et al., 2001; WINSTANLEY; COURVALIN, 2011).

Entre os métodos recém-desenvolvidos para identificação de microrganismos, podemos citar o método de Ionização e Dessorção a laser assistida por Matriz – Tempo de Voo (MALDI-TOF), no qual são obtidos perfis proteicos de cada microrganismo. O princípio desse método baseia-se na espectrometria de massas, ou seja, na capacidade de detectar a relação atômica de um bioanalito. Cada microrganismo analisado possui seu perfil proteico específico, que será demonstrado através de um gráfico (espectro), que relaciona a razão massa/carga (m/z), com o tamanho em Dalton (Da) (CARBONNELLE et al., 2011). Em comparação a outros métodos automatizados, o MALDI-TOF é uma metodologia rápida e de fácil execução, apresentando baixo custo por análise. Este fato tem contribuído para um declínio da utilização de técnicas que tenham o princípio baseado em testes fenotípicos e bioquímicos (BIZZINI; GREUB, 2010).

2.5.3 Sorologia

Os testes de aglutinação em látex são baseados na detecção de antígenos bacterianos, os polissacarídeos capsulares do meningococo. Esse teste deve ser realizado seguindo orientações específicas dos kits oferecidos para a identificação dos sorogrupos (WHO, 2011).

Geralmente, quando este teste é realizado diretamente da amostra “fresca”, como o líquido cefalorraquidiano, que deve ser previamente aquecido a 100°C durante 3 minutos, para a inativação de possíveis bactérias. A etapa de aquecimento não é necessária quando o procedimento é realizado diretamente de uma colônia, sendo considerado positivo, quando é possível a visualização da aglutinação em látex do sorogrupo específico (WHO, 2011).

2.5.4 Métodos Genotípicos

A utilização da PCR para detectar a presença do meningococo diretamente de amostras clínicas (como o líquido), sem cultura prévia, é uma metodologia que vem sendo utilizada, principalmente para solucionar os casos onde existe falha no crescimento em cultura (KRISTIANSEN et al., 1991; NI et al., 1992; MCLAUGHLIN et al., 1993; RÅDSTRÖM et al., 1994; DAVISON et al., 1996; NEWCOMBE et al., 1996; BORROW et al., 1997). Esta metodologia tem demonstrado resultados melhores do que as técnicas convencionais que utilizam a cultura, solucionando em torno de 35% dos casos tratados somente pela suspeita clínica (GUIVER et al., 2000; TAHA, 2000).

2.5.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Considerada uma das mais importantes invenções metodológicas da biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida no ano de 1980 (SAIKI et al., 1985; MULLIS; FALOONA, 1987). Tem como objetivo a amplificação exponencial de uma sequência de DNA específica, que ocorre em três etapas principais: 1) desnaturação, transformando a fita dupla em simples; 2) anelamento dos *primers* (indicadores); 3) extensão dos primers na direção 5'- 3' através da DNA polimerase, produzindo cópias do DNA, que são duplicadas a cada ciclo gerando milhares de cópias novas. Este processo não necessita de uma célula viva ou intacta, o que facilita a detecção de bactérias mortas, por exemplo, em amostras clínicas mal armazenadas, ou também, quando existe uma antibioticoterapia prévia. A PCR convencional é capaz de detectar o produto da amplificação final (*amplicons*) do DNA, através da eletroforese em um gel de agarose (BOREL et al., 2006).

Essa técnica é utilizada para a identificação de *N. meningitidis*, através da detecção de genes específicos. Entre eles, citam-se: genes de porina (*porA* e *porB*) (CAUGANT et al., 1996; URWIN et al., 1998; MOLLING et al., 2002); *ctrA*, gene responsável pelo transporte e síntese da cápsula (KACZMARSKI et al., 1998; GUIVER et al., 2000; CORLESS et al., 2001; SMITH et al., 2004); e o gene *crgA*, que codifica um regulador transcricional (TAHA, 2000). A PCR convencional também é amplamente utilizada para a identificação de genogrupos, tais como: A; B; C; E; W; Y; X e Z (BORROW et al., 1997; KACZMARSKI et al., 1998; GUIVER et al., 2000; TAHA, 2000; CORLESS et al., 2001; PROBERT et al., 2002; DIGGLE et al., 2003; LEE et al., 2003; LEWIS; CLARKE, 2003; BENNETT et al., 2004).

2.5.4.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A técnica de PCR em tempo real melhorou o diagnóstico das meningites bacterianas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (CORLESS et al., 2001; SAHA et al., 2005; CHANTEAU et al., 2006). A introdução da técnica de multiplex qPCR para *N. meningitidis* nos hospitais em São Paulo, aumentou em 85% o diagnóstico da DM em comparação com a cultura (SACCHI et al., 2011). No Chile, entre 2013 e 2014, após a implementação do qPCR pelo Instituto de Saúde Pública, cerca de 15% dos casos reportados foram notificados por esta metodologia. (IBARZ-PAVON et al., 2012).

Estudos para identificação de *N. meningitidis* tem sido desenvolvidos e usualmente utilizam como alvos os genes *ctrA*, responsável pela síntese e transporte da cápsula (FROSCHE et al., 1991; MOTHERSHED et al., 2004), *porA*, responsável pela presença da porina A (VAN DER ENDE et al., 2000; JORDENS; HECKELS, 2005) e/ou *sodC*, gene responsável pelo co-fator superóxido dismutase, cobre e zinco ([Cu, Zn] -OD, que contribui para a proteção da *N. meningitidis* contra

a fagocitose por monócitos ou macrófagos humanos (DUNN et al., 2003; DOLAN THOMAS et al., 2011; WHO, 2011).

Em estudo realizado, demonstrou que o *ctrA* é 7,5% mais sensível do que o *sodC* para a detecção de cepas invasivas, sugerindo, no entanto, a utilização de ambos os genes na caracterização dessas cepas (HIGA et al., 2013). Por outro lado, nos estudos de portadores, como cerca de 16% das cepas identificadas não são capsuladas, a utilização do gene *ctrA* torna-se desvantajosa (CLAUS et al., 2002; DOLAN-LIVENGOOD et al., 2003). Para esses estudos, os *primers* para o gene *sodC* são mais indicados, apresentando a capacidade de detectar 98,9% de cepas de *N. meningitidis* isoladas de portadores ou que são *ctrA* negativas, (DOLAN THOMAS et al., 2011).

No trabalho de Dolan Thomas e colaboradores (2011), o ensaio de qPCR com o gene *sodC* apresentou uma especificidade de 100% na identificação de *N. meningitidis*, quando analisado frente a um painel de 244 cepas não-*N. meningitidis*, incluindo 107 cepas de outras espécies de *Neisseria*.

Acredita-se que o gene *sodC* tenha sido adquirido pela *N. meningitidis* por transferência horizontal do *Haemophilus influenzae* (KROLL et al., 1998), não havendo relatos na literatura sobre a perda do gene pelo meningococo. Esta evidência demonstra a importância do gene *sodC* na sobrevivência da bactéria, não sendo encontrado em outras espécies de *Neisseira* (WILKS et al., 1998; BENSON et al., 2006).

2.5.4.2.1 Princípio da Metodologia de qPCR e Hidrólise de Sonda

Assim como a PCR convencional, a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) é capaz de gerar cópias de um DNA molde de forma exponencial, que relaciona a quantidade de cópias inicial e a amplificação

durante todos os ciclos da reação. É uma metodologia que tem sido amplamente utilizada, em diversos estudos, como por exemplo, na expressão de RNA mensageiro, na quantificação de DNA, nos ensaios de discriminação alélica e de expressão gênica, etc. (ARYA et al., 2005).

Em 1991, autores demonstraram a atividade de uma enzima termostática *Thermus aquaticus* DNA polymerase (*Taq*) e sua atividade exonuclease 5'-3'. Esses autores demonstraram também a capacidade de clivagem de sondas, na extremidade 5', possibilitando a utilização para detectar a amplificação de alvos específicos, dando origem as sondas de hibridação com a sequência alvo (HOLLAND et al., 1991).

A utilização de hidrólise de sonda marcada foi descrita em 1993 (LEE et al., 1993). Atualmente as sondas, denominadas *TaqMan® Probe*, são marcadas na extremidade 5' por um sinalizador fluorescente (*Fluorescent dye*) e na extremidade 3' por um *quencher*, um fluorocromo “pacificador”, que quando intactos em uma sonda, emite uma transferência de energia (FRET) do *quencher* para o reportador, impedindo a detecção de fluorescência. No processo de amplificação, ocorre a emissão de fluorescência quando estes sinalizadores (*Fluorescent dye* e *quencher*) são clivados, liberando assim fluorescência (Figura 4) (CARDULLO et al., 1998).

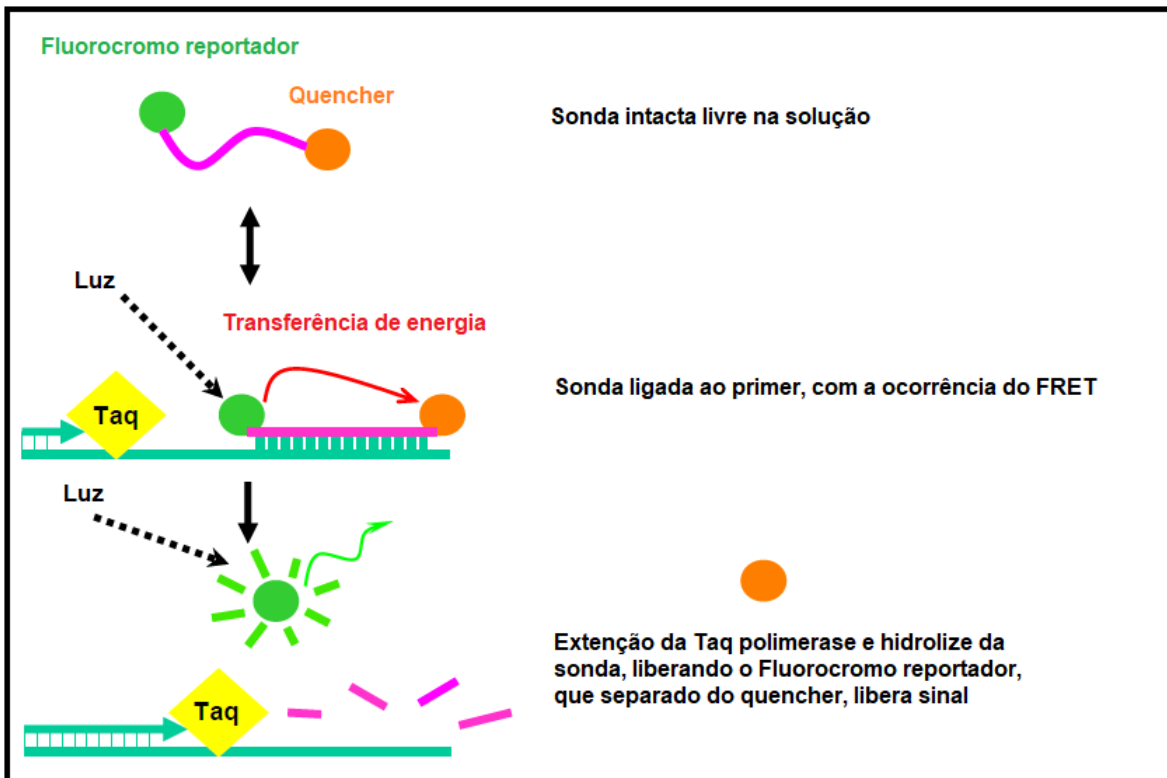


Figura 4. Representação da hibridação da sonda marcada (5'-*dye* e 3'-*quencher*). A medida que ocorre a clivagem, os marcadores são liberados e é produzida a fluorescência (adaptado de: WHO, 2011).

A análise da hidrólise dessas sondas que ocorre durante um experimento de PCR em tempo real é analisada considerando alguns fatores: 1) o *baseline*, que é definido de acordo com cada ciclo e a quantidade de fluorescência produzida (um limiar que caracteriza amplificações verdadeiras, definido como *Thershold*, tem por base o *baseline*); 2). ΔRn , que é a variação de fluorescência produzida necessária para definir a curva de amplificação e, 3) o *Ct*, que por sua vez, representa onde o aumento da fluorescência atingiu o limiar (*Thershold*), podendo classificar as amplificações que são relevantes (ARYA et al., 2005).

Existem alguns fatores limitantes conhecidos dessa metodologia que podem estar geralmente relacionados as falhas de amplificação, como a presença de inibidores de reação da PCR, ou o acúmulo de moléculas de pirofosfato. Esses

fatores podem interferir na amplificação, e assim, descaracterizar totalmente ou parcialmente a fase exponencial da geração de cópias de DNA (ARYA et al., 2005).

2.5.4.3 Sequenciamento do genoma completo (WGS)

O sequenciamento do genoma completo (WGS) é uma importante ferramenta para a vigilância em saúde pública e epidemiologia molecular das doenças infecciosas, auxiliando o monitoramento geográfico de microrganismos caracterizados a nível molecular (CHOKSHI et al., 2006; GARDY; LOMAN, 2018). A epidemiologia genômica tem como objetivo delinear o perfil de surtos e a variação genômica dos agentes infecciosos (VAN SOOLINGEN et al., 2016).

A metodologia WGS é essencial para o conhecimento da epidemiologia molecular da DM, proporcionando a caracterização de *N. meningitidis*, sendo capaz de oferecer subsídios para o desenvolvimento e implementação de vacinas, além da vigilância pós-vacinal (GARDY; LOMAN, 2018). Entretanto, a dificuldade da metodologia encontra-se na utilização de técnicas de bioinformática para a análise das sequências obtidas, com baixo custo, padronizadas, com alta reprodutibilidade mundial e de fácil acesso para os profissionais de saúde pública (EULABCAP, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar e caracterizar cepas de *Neisseria meningitidis* na orofaringe de portadores assintomáticos através da técnica de PCR em tempo real.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Padronizar a técnica de PCR em tempo real para a identificação de *Neisseria meningitidis* em portadores assintomáticos, a partir do meio de transporte STGG;
2. Validar os resultados obtidos pela PCR em tempo real com aqueles obtidos através da cultura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DO ESTUDO

Foram coletados 1200 *swabs* de secreção de orofaringe de estudantes na faixa etária de 11 a 19 anos de idade matriculados na rede pública de ensino de Salvador. Os foram semeados diretamente em meio de Thayer-Martin modificado com VCNT (NUNES et al., 2016). Após o plaqueamento os *swabs* foram introduzidos em meio de transporte STGG e mantidos a 4°C até a chegada ao IGM. No laboratório, os tubos de STGG (O'BRIEN et al., 2001) foram acondicionados a -70°C, e as placas incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO₂ para posterior isolamento e identificação através de metodologia clássica (WHO, 2011).

4.1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

O meio STGG, com o *swab* contendo a secreção de orofaringe, foi descongelado à temperatura ambiente, homogeneizado e uma alíquota de 200µL de cada amostra foi transferida para um tubo *Eppendorf* de 2mL. Em seguida, procedeu-se a extração e purificação do DNA através do *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, California), seguindo as recomendações do fabricante. As preparações de DNA obtidas foram congeladas a -20°C até a realização da técnica de qPCR.

As amostras que apresentaram resultados discordantes entre a cultura e o qPCR, após a comparação dos resultados, foram submetidas a uma nova extração de DNA a partir do STGG, alterando-se o volume do eluente de 100µl para 50µl na etapa final, para concentrar o material.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA obtido das amostras em meio STGG foi quantificado no equipamento de espectrometria *NanoDrop ND-1000 spectrophotometer* (Nanodrop Technologies, Wilmington Delaware), a partir de 1µL do material eluído da extração de DNA. O aparelho foi calibrado com água de PCR e eluente do kit de extração antes do processo de quantificação.

4.3 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

As reações de qPCR foram executadas de acordo com a metodologia descrita por Dolan Thomas e colaboradores (DOLAN THOMAS et al., 2011), utilizando o equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems e *TaqMan® Universal master Mix II, With UNG* (Applied Biosystems®).

Os *primers* e as sondas utilizadas para a identificação da espécie *N. meningitidis (sodC)* (DOLAN THOMAS et al., 2011) e para a detecção dos sorogrupos e seus respectivos alvos A (*sacB*), B (*siaD*), C (*siaD*), W (*synG*), X (*xcbB*) e Y (*synF*) (WHO, 2011) são apresentados no Quadro 1, com as respectivas concentrações empregadas.

Para o processo de amplificação foi utilizado o seguinte programa de temperatura para todas as reações: 1) 50°C por 2 minutos (1 ciclo); 2) 95°C por 10 minutos (1 ciclo); 3) 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (50 ciclos). Em cada reação com volume total de 25µL, foram incluídos os seguintes componentes: 12,5µL da *TaqMan® Universal master Mix II, With UNG* (Applied Biosystems®); 7,5µL de H₂O para PCR (ultrapura livre de DNA/RNA); 2µL de cada *primer* direto e reverso; 2µL da sonda e 2µL de DNA.

Os experimentos foram realizados como reações de quantificação absoluta, onde foram avaliados a positividade por ciclo de amplificação e características da curva de amplificação.

A análise de especificidade dos *primers* foi realizada através da ferramenta *online* Nucleotide BLAST (National Center for Biotechnology information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com o objetivo de produzir uma reação *in silico* dos *primers* e sonda.

Quadro 1. Primers e sondas utilizados para a identificação de *N. meningitidis*.

Alvo/Genogrupo	Sequência de Nucleotídeos (5' - 3')	Concentração final (nM)	
sodC	<i>Primer Direto</i>	GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT	300
	<i>Primer Reverso</i>	CCACCCGTGTGGATCATAATAGA	600
	<i>Sonda</i>	CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTTT 5' FAM; 3' BHQ1	100
A	<i>Primer Direto</i>	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA	300
	<i>Primer Reverso</i>	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG	900
	<i>Sonda</i>	CTAAAAG"T"AGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT 5' FAM; 3' SpC6; "T" BHQ1	100
B	<i>Primer Direto</i>	GCTACCCCATTTTCAGATGATTTGT	300
	<i>Primer Reverso</i>	ACCAGCCGAGGGTTTATTTCTAC	300
	<i>Sonda</i>	AAGAGATGGGYAACAAC"T" ATGTAATGTCTTTATTT 5' FAM, 3' SpC6, "T" BHQ1	100
C	<i>Primer Direto</i>	CCCTGAGTATGCGAAAAAATT	900
	<i>Primer Reverso</i>	TGCTAATCCCGCCTGAATG	300
	<i>Sonda</i>	TTTCAATGC"T"AATGAATACCACCGTTTTTTTGC 5' FAM; 3' SpC6; "T" BHQ1	100
W	<i>Primer Direto</i>	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG	100
	<i>Primer Reverso</i>	TTGCCATTCCAGAAATATCACC	900
	<i>Sonda</i>	AATATGGAGCGAA"T"GATTACAGTAACTATAATGAA 5' FAM, 3' SpC6, "T" BHQ1	200
X	<i>Primer Direto</i>	TGTCCCAACCGTTTATTGG	900
	<i>Primer Reverso</i>	TGCTGCTATCATAGCCGCC	900
	<i>Sonda</i>	TGTTTGCCACATGAATGGCGG 5' FAM; 3' BHQ	100
Y	<i>Primer Direto</i>	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC	900
	<i>Primer Reverso</i>	TTGCTAAAATCATTGCTCCATAT	600
	<i>Sonda</i>	TATGGTG"T"ACGATATCCCTATCCTTGCCTATAAT 5' FAM; 3' SpC6; "T" BHQ1	100

Todas as reações foram realizadas em duplicata, em placas ópticas de 96 orifícios. Como controles positivo e negativo foram utilizadas, respectivamente, cepas de referência de *N. meningitidis* gentilmente cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e uma amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922

As análises foram realizadas no programa 7500 Software v2.0.6, com os seguintes critérios: 1) positivas= reações que apresentaram $Ct \leq 35$; 2) indeterminadas: $Ct = 36-39$; 3) negativas= $Ct \geq 40$. Todas as reações consideradas indeterminadas foram repetidas em duplicata, após diluição a 1:4 e 1:10, para afastar a possibilidade da presença de inibidores de reação da PCR (DOLAN THOMAS et al., 2011). Os mesmos critérios de análise foram adotados para a caracterização dos genogrupos de *N. meningitidis* (WHO, 2011).

4.3.1 Padronização e Validação das Reações de qPCR

Para determinar a capacidade discriminatória ou ponto de corte (Ct) que melhor separava as amostras positivas das negativas foi realizada a análise estatística através da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) (HAJIAN-TILAKI, 2013), com o auxílio do *software* GraphPad Prism © 1995-2017, versão 7.04. Para isto, os valores dos Cts obtidos através do ensaio de qPCR foram analisados em comparação com os resultados da cultura (padrão ouro), O desempenho da curva ROC foi avaliado através do valor da área sob a curva e o valor de *p*.

4.3.2. Análise da Sensibilidade e Especificidade da Técnica de qPCR

Avaliou-se a acurácia da técnica de qPCR para a identificação de *N. meningitidis* a partir do meio STGG. A acurácia é a habilidade de um teste em

fornecer resultados corretos e esta medida é dada por dois componentes: a sensibilidade e a especificidade.

Desta forma, para avaliar as metodologias empregadas, foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade e dos valores preditivo positivo e negativo, tomando-se por base a cultura como padrão-ouro de identificação de *N. meningitidis*.

Sensibilidade definido pela fórmula: $S = \text{verdadeiros positivos} / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falso negativos})$.

Especificidade definido pela fórmula: $E = \text{verdadeiros negativos} / (\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})$.

Valor preditivo positivo (VPP), $\text{Valor positivo} / \text{Valor positivo} + \text{Falso positivo}$.

Valor preditivo negativo (VPN), $\text{Valor negativo} / \text{Valor negativo} + \text{Falso negativo}$.

4.4 MÉTODO DE ENRIQUECIMENTO PRÉVIO

Para as amostras que apresentaram resultado negativo na qPCR e positivo na cultura (método clássico), foi realizado um enriquecimento prévio do material contido no STGG, para favorecer o crescimento de *N. meningitidis* e melhorar a capacidade de detecção do método. Para isto, uma alíquota de 200 µL do STGG foi semeada em caldo Todd-Hewitt (Difco), adicionado dos antibióticos vancomicina, colistina, nistatina e trimetoprim, incubando-se a 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 18-24 horas. Em seguida, procedeu-se a extração de DNA conforme descrito no item 4.1 e a realização da técnica de qPCR nas mesmas condições (item 4.3).

Como controle, uma alíquota do material enriquecido em caldo Todd-Hewitt foi semeada em meio de Thayer-Martin, para possibilitar um novo isolamento em caso de cepas viáveis (MANIGART et al., 2016).

7 RESULTADOS

Os resultados foram avaliados através de dois tipos de parâmetros:1) utilizando-se os parâmetros descritos por Dolan-Thomas e colaboradores (2011) e 2) mediante validação do gene alvo *sodC* para obtenção de parâmetros locais.

7.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Neisseria meningitidis* EM AMOSTRAS MANTIDAS EM MEIO DE TRANSPORTE STGG EMPREGANDO OS CRITÉRIOS DE DOLAN THOMAS (2011)

Um total de 1200 amostras de STGG foram analisadas para a identificação de *N. meningitidis* pela técnica de qPCR, empregando-se os critérios para a definição do Ct descritos previamente por Dolan Thomas e colaboradores (2011).

Mediante desses critérios foi possível identificar 75 amostras positivas e 886 amostras negativas. Um total de 239 amostras apresentaram um resultado indeterminado, as quais foram submetidas a uma nova reação de qPCR após serem diluídas a 1:4 e 1:10, o que nos possibilitou identificar mais 5 amostras positivas, representando um total de 80 amostras positivas adicionalmente.

Como foi mencionado no item 4.1 o volume do eluente foi reduzido e nova reação de qPCR foi realizada para 12 amostras cultura positiva e qPCR negativo. Deste modo foi possível identificar quatro amostras positivas, resultando em um total geral de 84 positivas e 1116 negativas (Tabela 1).

Tabela 1. Ensaio de qPCR realizados nas 1200 amostras de STGG empregando os critérios de Dolan Thomas (2011).

Parâmetros do qPCR	N° de amostras (%)	Total^a (%)	Total Geral^b (%)
Ct ≤ 35 ^c (positivo)	75 (6,3)	80 (6,7)	84 (7,0)
Ct 36-39 (indeterminado)	239 (19,9)	-	-
Ct ≥ 40 (negativo)	886 (73,8)	1120 (93,3)	1116 (93,0)
Total	1200 (100,0)	1200 (100,0)	1200 (100,0)

Legenda: ^aapós diluição 1:4 e 1:10 das amostras indeterminadas e novo ensaio de qPCR; ^bapós concentração do eluente; ^c *cycle threshold*.

7.2 CULTIVO DAS AMOSTRAS POSITIVAS NA CULTURA E NEGATIVAS NO qPCR EM MEIO TODD-HEWITT

Um total de 12 amostras, que apresentaram resultado negativo na qPCR e positivo previamente na cultura (método clássico), foram submetidas ao crescimento prévio em caldo Todd-Hewitt com VCNT (MANIGART et al., 2016). Em seguida, foi realizado um novo ensaio de qPCR empregando os critérios de Dolan-Thomas e colaboradores 2011. No entanto, não houve mudança nos resultados obtidos em comparação com os resultados sem o crescimento em Todd-Hewitt com VCNT, ou seja, não foi encontrada nenhuma outra amostra positiva. Além disso, não foi possível a obtenção de nenhum crescimento bacteriano em placas de Thayer-Martin a partir do STGG enriquecido.

7.3 VALIDAÇÃO LOCAL DA TÉCNICA DE qPCR UTILIZANDO O GENE *sodC* COMO ALVO

Foi realizada uma validação através da análise da curva ROC, para os ensaios de qPCR empregando o gene alvo *sodC*.

A área sob a curva ROC foi de 0,92, mostrando que as amostras com cultura positiva apresentam um Ct mais baixo do que 92% das amostras cultura negativa ($P < 0,0001$). Esta análise demonstrou, portanto, que a qPCR foi capaz de discriminar as amostras cultura positiva e cultura negativa (Figura 5).

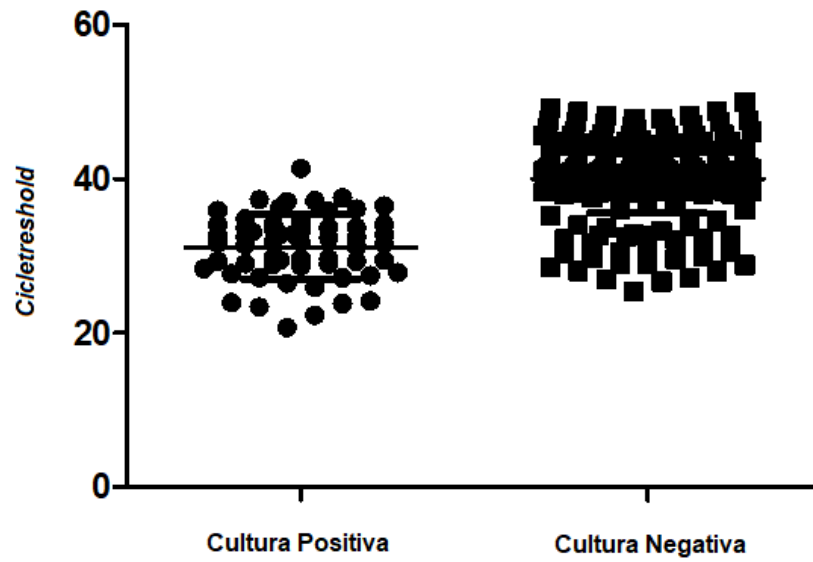


Figura 5. Distribuição dos Cts obtidos para as amostras cultura positiva e cultura negativas através da análise da curva ROC.

A curva ROC demonstrou maior sensibilidade e especificidade para o Ct 38 (98,3% e 85,6% respectivamente) (Tabela 2). Deste modo, estabeleceu-se um novo parâmetro de análise pela qPCR: (1) $Ct \leq 38$ (amostras positivas); (2) $Ct = 39$ (amostras indeterminadas) e (3) $Ct \geq 40$ (amostras negativas).

Tabela 2. Determinação dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, através da curva ROC por Ct.

	<i>cycle threshold</i>					
	35	36	37	38	39	40
Sensibilidade (%)	86,0	86,4	91,5	98,3	98,3	98,3
Especificidade (%)	97,0	97,0	96,7	96,4	91,6	87,7
VPP ^a (%)	60,7	60,0	58,7	58,6	37,7	29,3
VPN ^b (%)	99,2	99,3	99,5	99,9	99,9	99,9

Legenda: ^avalor preditivo positivo; ^bvalor preditivo negativo.

7.4 IDENTIFICAÇÃO DE *N. meningitidis* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE qPCR EMPREGANDO OS CRITÉRIOS VALIDADOS NESTE ESTUDO (Ct ≤38)

Utilizando os novos critérios de interpretação neste trabalho, foram identificadas 99 amostras positiva e 1001 negativas e 203 amostras indeterminadas. Estas amostras com o padrão indeterminado foram diluídas a 1:4 e 1:10 e submetidas a uma nova reação de qPCR. Entretanto, não foi observado no resultado final mantendo a identificação de 99 amostras positivas (Tabela 3).

Tabela 3. Ensaio de qPCR realizados nas 1200 amostras de STGG empregando os critérios validados neste estudo.

Parâmetros do qPCR	Nº de amostras (%)	Total Geral ^a (%)
Ct≤38 ^b (positivo)	99 (8,3)	99 (8,3)
Ct 39 (indeterminado)	100 (8,3)	-
Ct ≥40 (negativo)	1001 (83,4)	1001 (83,4)
Total	1200 (100,0)	1200 (100,0)

Legenda: ^aapós diluição 1:4 e 1:10 das amostras indeterminadas e novo ensaio de qPCR; ^bcycle threshold.

7.5 COMPARAÇÃO DO ENSAIO DE qPCR ($Ct \leq 35$) COM OS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *N. meningitidis* OBTIDOS PREVIAMENTE ATRAVÉS DA CULTURA (NUNES et al., 2016)

A identificação de *N. meningitidis* através da técnica de qPCR (sodC), empregando o $CT \leq 35$, mostrou uma positividade de 84 (7%) amostras, enquanto que na cultura foram obtidas 59 (4,9%) amostras positivas (Tabela 4). Um total de 33 (2,8%) amostras foram positivas no qPCR e negativas na cultura. Por outro lado, 12 (1%) amostras que haviam sido positivas na cultura, não apresentaram amplificação no qPCR (Tabela 4).

Tabela 4. Relação entre a técnica convencional (cultura) e a qPCR (*sodC*) na identificação de *N. meningitidis* partir do meio de STGG, segundo o parâmetro de Dolan Thomas e colaboradores (2011).

qPCR (<i>sodC</i>) Ct ≤35 ^a	Cultura (Nunes et al., 2016)		Total (%)
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Positivos	51 (4,3)	33 (2,7)	84 (7,0)
Negativos	8 (0,6)	1108 (92,3)	1116 (93,0)
Total	59 (4,9)	1141 (95,0)	1200 (100,0)

Legenda: ^a*cycle threshold*

7.6 COMPARAÇÃO DO ENSAIO DE qPCR ($Ct \leq 38$) COM OS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE *N. meningitidis* OBTIDOS PREVIAMENTE ATRAVÉS DA CULTURA (NUNES et al., 2016)

A identificação de *N. meningitidis* através da técnica de qPCR (*sodC*), empregando o $CT \leq 38$, mostrou uma positividade de 99 (8,3%) amostras, enquanto que na cultura foram obtidas 59 (4,9%) amostras positivas (Tabela 4). Um total de 41 (3,4%) amostras foram positivas no qPCR e negativas na cultura. Por outro lado, uma amostra (0,1%) que havia sido positiva na cultura, não apresentou amplificação no qPCR (Tabela 5).

Tabela 5. Relação entre a técnica convencional (cultura) e a qPCR (*sodC*) na identificação de *N. meningitidis* partir do meio de STGG, segundo o parâmetro validado neste estudo.

qPCR <i>sodC</i> Ct ≤38 ^a	Cultura (Nunes et al., 2016)		Total (%)
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Positivos	58 (4,8)	41 (3,4)	99 (8,2)
Negativos	1 (0,1)	1100 (91,6)	1101 (91,8)
Total	59 (4,9)	1141(95,1)	1200 (100,0)

Legenda: ^a*cycle threshold*

De modo geral, os ensaios de qPCR empregando os $Ct \leq 35$ e $Ct \leq 38$ apresentaram, respectivamente, uma sensibilidade de 86% e de 98%, respectivamente; e uma especificidade de 98% e 96%, respectivamente. Os dois métodos apresentaram um valor preditivo positivo de 60,7% ($Ct \leq 35$) e de 58,6% ($Ct \leq 38$) e valor preditivo negativo de 99,2% ($Ct \leq 35$) e de 99,9% ($Ct \leq 38$) (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos resultados obtidos através da amplificação do qPCR, para o gene alvo *sodC*, de acordo com os parâmetros utilizados no estudo.

Parâmetro	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP^a (%)	VPN^b (%)
Ct ≤ 35^c	86,0	97,0	60,7	99,2
Ct ≤ 38	98,3	96,4	58,6	99,9

Legenda: ^avalor preditivo positivo; ^bvalor preditivo negativo; ^ccicletreshold.

A Figura 6 ilustra os resultados gerais obtidos com os três métodos de identificação, de maneira isolada, ou em conjunto. De um total de 100 amostras de *N. meningitidis* identificadas, 51 foram positivas nas três metodologias empregadas. Trinta e três amostras apresentaram positividade nos ensaios de qPCR Ct \leq 35 e qPCR Ct \leq 38; oito amostras foram positivas apenas pelo qPCR Ct \leq 38; e sete amostras foram positivas apenas pelo qPCR Ct \leq 35 e cultura. Uma amostra foi positiva apenas pela cultura e qPCR Ct \leq 38. Uma amostra foi positiva apenas pela cultura.

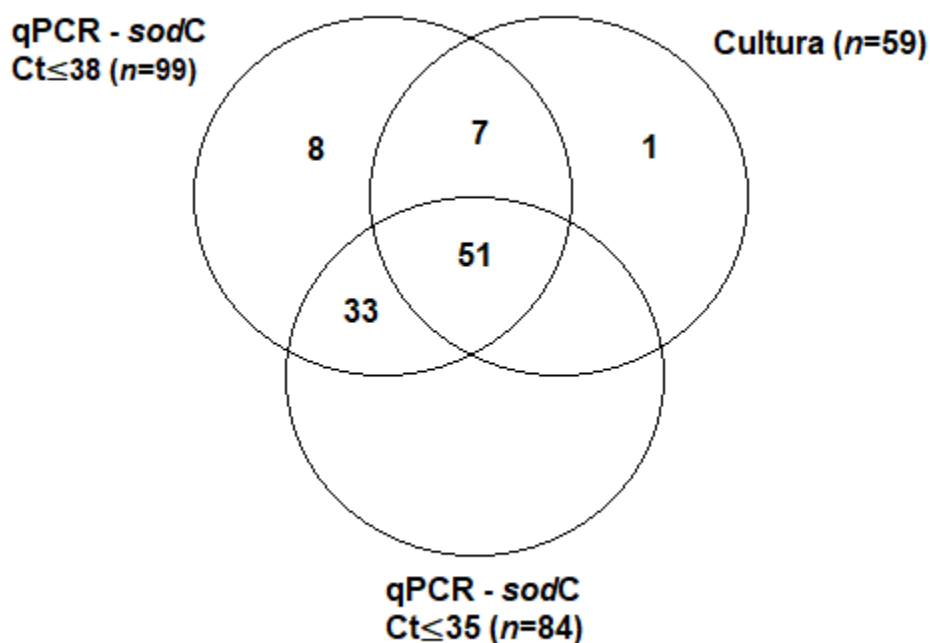


Figura 6. Número de amostras positivas obtidas através das metodologias empregadas para a identificação de *N. meningitidis*.

7.7 IDENTIFICAÇÃO DOS GENOGRUPOS DE *N. meningitidis* A PARTIR DO MEIO DE TRANSPORTE STGG

Um total de 41 ($n=41/100$, 41%) amostras de orofaringe que foram positivas somente pelo qPCR, e negativas através da cultura (NUNES et al., 2016), a partir do STGG foram submetidas a uma nova reação de qPCR, na tentativa de identificar o genogrupo das cepas de *N. meningitidis*. Todas as amostras apresentaram uma reação negativa para os genogrupos testados, sendo consideradas, portanto, não-grupáveis.

8 DISCUSSÃO

A cultura é considerada a metodologia padrão ouro para a identificação de *N. meningitidis* (JORDENS et al., 2002). Esta metodologia é também importante para o isolamento do patógeno e sua caracterização fenotípica e genotípica, principalmente em estudos epidemiológicos. Entretanto, o emprego de técnicas moleculares, como a PCR em tempo real (qPCR) tem melhorado a capacidade de detecção do meningococo (DOLAN THOMAS et al., 2011; MANIGART et al., 2016).

O presente estudo utilizou a técnica de qPCR para a identificação de *N. meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos, a partir de material de orofaringe mantido em meio de transporte STGG. Além disto, procuramos comparar os resultados desta técnica, com aqueles obtidos previamente a partir da cultura (NUNES et al., 2016).

Os nossos resultados mostraram que a utilização da técnica de qPCR descrita por DOLAN THOMAS et al., 2011, aumentou o isolamento de *N. meningitidis* em 2,1%, quando comparado com a cultura. Esse achado está de acordo com a literatura, mostrando que o emprego de técnica moleculares, como a qPCR, é um excelente adjuvante para a detecção de portadores de *N. meningitidis* (JORDENS et al., 2002; DOLAN THOMAS et al., 2011; SAFADI et al., 2014).

Neste estudo, foi possível observar um aumento do número de amostras positivas em comparação a cultura, sendo este resultado superior ao encontrado por DOLAN THOMAS e colaboradores, 2011 (4 amostras) e por FINN e colaboradores., 2016 (7 amostras); e inferior aqueles identificados por. MANIGART e colaboradores 2016, através do enriquecimento prévio e utilização do gene alvo *porA*,

Quando empregamos a técnica de qPCR padronizada com parâmetros locais, foi observada uma maior sensibilidade na detecção de *N. meningitidis*, sem alterar

significativamente a especificidade do método. Desta forma, o aumento do Ct para ≤ 38 permitiu a identificação de 11 amostras positivas que foram consideradas negativas pelo qPCR utilizando os critérios de DOLAN THOMAS e colaboradores (2011) e que haviam sido positivas previamente através da cultura. O emprego da cultura associada a qPCR (Ct ≤ 38) aumentou a detecção para 8,3% de portadores. Esses achados mostram que os parâmetros locais padronizados neste trabalho, associados a cultura, podem ser utilizados em estudos futuros de portadores de *N. meningitidis*.

Os ensaios de qPCR (Ct ≤ 35) e qPCR (Ct ≤ 38) não foram capazes de detectar oito e uma amostra que foram positivas na cultura, respectivamente. Esta evidência pode estar associada ao fato de termos utilizado apenas um *swab*, tanto para a cultura quanto para o PCR. A obtenção da secreção do material de orofaringe através da utilização de um *swab* de Rayon, que é pressionado e rolado sobre a mucosa da parte posterior da orofaringe (CARTWRIGHT, 2001), é uma técnica simples e rápida. Entretanto, ocasionalmente, algumas pessoas podem sentir um pouco de náusea no momento da coleta, o que pode dificultar a aceitação do voluntário para a utilização de dois *swabs*. Por outro lado, o uso de um único *swab* e o plaqueamento prévio em meio de cultura pode reduzir ou esgotar o número de microrganismos presentes no material (JORDENS et al., 2002), levando à obtenção de resultados falso-negativos.

Discrepâncias entre resultados da cultura e de ensaios de qPCR também já foram relatados por outros autores. SAFADI e colaboradores (2014) investigaram o efeito da vacinação com a vacina polissacarídica A/C no estado de portador de *N. meningitidis* entre trabalhadores de duas refinarias, após um surto de DM pelo sorogrupo C. Esses autores observaram que de 104 amostras positivas, 96 foram detectadas pela cultura e pelo qPCR; uma foi detectada apenas pela cultura e 8 foram detectadas apenas pelo qPCR. FINN e colaboradores (2016) encontraram uma discrepância em 23 amostras que foram cultura positiva e qPCR negativo, empregando o gene alvo *sodC*.

Um aspecto importante a ser mencionado consiste na metodologia de extração do DNA. Quando utilizamos o kit de extração da Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit), o protocolo do fabricante indica que o produto final deve ser eluído em 100µl de eluente. Neste estudo, quando nós reduzimos o eluente para 50µl e realizamos novo ensaio de qPCR para 12 amostras cultura positiva e qPCR negativo, foi possível a obtenção de mais quatro amostras positivas. Esses dados mostram que a extração de DNA empregando este kit pode ser modificada para melhorar a quantidade de DNA obtida na extração.

Um outro procedimento realizado para tentar aumentar a positividade dos resultados através do qPCR foi o enriquecimento do material contido no STGG em caldo Todd-Hewitt, associado a um posterior plaqueamento em placas de Thayer-Martin. O enriquecimento prévio em caldo Todd-Hewitt foi realizado por MANIGART e colaboradores (2016) em um estudo de portador com 999 adolescentes de 10 a 18 anos de idade em Gambia, África, mostrando ser mais de duas vezes sensível do que os métodos convencionais para detecção de *N. meningitidis*. No nosso trabalho, esta metodologia foi realizada para as 12 amostras que haviam sido previamente positivas na cultura mas que apresentaram um resultado negativo no ensaio de pPCR. Entretanto, não foi possível a obtenção de nenhuma amostra positiva, o que pode estar relacionado ao esgotamento do número de microrganismos presentes no material.

O fato de não termos conseguido identificar os genogrupos das amostras positivas, obtidas pela qPCR, pode estar associado a dois fatores: ou as amostras são verdadeiramente não grupáveis, ou esta técnica, realizada a partir de um meio de transporte, não é ideal para a identificação de genogrupos. Em geral, o qPCR para a identificação de genogrupos é realizada a partir de colônias isoladas, mostrando-se bastante sensível e específica (MOTHERSHED et al., 2004). A utilização do material em STGG para a extração de DNA genômico e subsequente análise das sequências obtidas poderia trazer maiores informações a respeito dessas amostras.

Os resultados deste trabalho trazem contribuições com relação à utilização da técnica de qPCR para a identificação de *N. meningitidis*, a partir do meio de transporte STGG. A técnica de qPCR preconizada por Dolan Thomas e colaboradores (2011), empregando o gene *sodC* como alvo, pode ser modificada através da utilização de um $Ct \leq 38$ para amostras positivas, mostrando-se bastante sensível e específica para a identificação de portadores de *N. meningitidis*.

9 CONCLUSÃO

- Os ensaios de qPCR, empregando o gene alvo *sodC* aumentaram a sensibilidade do estudo para a detecção de *N. meningitidis* em portadores assintomáticos em comparação com a cultura;
- O gene alvo *sodC* demonstrou um bom desempenho para identificação de cepas de *N. meningitidis* em portadores assintomáticos.
- A técnica de qPCR empregando o $Ct \leq 38$, padronizada e validada neste estudo, se mostrou mais eficaz do que o ensaio de qPCR padrão ($Ct \leq 35$), na detecção de *N. meningitidis* a partir do meio de transporte STGG;
- Esta técnica deve ser empregada em associação à cultura em estudos de portadores de *N. meningitidis*;
- Deve ser considerada a utilização de dois *swabs* para a obtenção do material de orofaringe.
- Este estudo demonstra a necessidade de uma padronização e validação local dos ensaios de qPCR, em estudo de portadores, para a determinação dos parâmetros de análise, que podem ser divergentes de outros protocolos já estabelecidos;
- A otimização do qPCR teve um impacto positivo na sensibilidade do método.

REFERÊNCIAS

ABIO, A.; NEAL, K. R.; BECK, C. R. An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years. **Pathog. Glob. Health**, v. 107, n. 7, p. 373-380, 2013.

ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Rev. Mol Diagn.**, v. 5, n. 2, p. 209-19, 2005.

ATAEE, R. A. et al. Carriage rates of *Neisseria meningitidis* serogroups: determination among freshmen conscripts before vaccination. **Iran J. Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 203-209, 2016.

BARBE, G. et al. Evaluation of API NH, a new 2-hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* in a routine clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol**, v. 32, n. 1, p. 187-9, 1994.

BENNETT, D. E.; MULHALL, R. M.; CAFFERKEY, M. T. PCR-based assay for detection of *Neisseria meningitidis* capsular serogroups 29E, X, and Z. **J. Clin. Microbiol**, v. 42, n. 4, p. 1764-5, 2004.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v. 1, n. 34, p. 16-20, 2006.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clin. Microbiol Infect**, v. 16, n. 11, p. 1614-1619, 2010.

BOISIER, P. et al. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 5, p. 657-663, 2007.

BOREL, T. et al. High sensitivity and specificity of the Pastorex latex agglutination test for *Neisseria meningitidis* serogroup A during a clinical trial in Niger. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 10, p. 964-969, 2006.

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

- BORROW, R. et al. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. **Epidemiol. Infect.**, v. 118, n. 2, p. 111-117, 1997.
- BROOME, C. V. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 18 Suppl A, p. 25-34, 1986.
- CAMPBELL, H. et al. Presentation with gastrointestinal symptoms and high case fatality associated with group W meningococcal disease (MenW) in teenagers, England, July 2015 to January 2016. **Euro. Surveill.**, v. 21, n. 12, 2016.
- CARBONNELLE, E. et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clin. Biochem.**, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2011.
- CARDOSO, C. W. et al. Impact of vaccination during an epidemic of serogroup C meningococcal disease in Salvador, Brazil. **Vaccine**, v. 30, n. 37, p. 5541-5546, 2012.
- CARDULLO, R. A. et al. Detection of nucleic acid hybridization by non-radiative fluorescence resonance energy transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 85, 1998.
- CARTWRIGHT, K. Epidemiology, surveillance, and population biology : carriage studies. **Methods Mol. Med.**, v. 67, p. 293-311, 2001.
- CAUGANT, D. A. et al. Polymerase chain reaction for case ascertainment of meningococcal meningitis: application to the cerebrospinal fluids collected in the course of the Norwegian meningococcal serogroup B protection trial. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 28, n. 2, p. 149-153, 1996.
- CAUGANT, D. A.; MAIDEN, M. C. Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution. **Vaccine**, v. 27 Suppl 2, p. B64-70, 2009.
- CHANTEAU, S. et al. Scaling up of PCR-based surveillance of bacterial meningitis in the African meningitis belt: indisputable benefits of multiplex PCR assay in Niger. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 7, p. 677-680, 2006.
- CHOKSHI, D. A.; PARKER, M.; KWIATKOWSKI, D. P. Data sharing and intellectual property in a genomic epidemiology network: policies for large-scale research collaboration. **Bull World Health Organ.**, v. 84, n. 5, p. 382-387, 2006.

CHRISTENSEN, H. et al. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis.**, v. 10, n. 12, p. 853-861, 2010.

CLAUS, H. et al. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 6, p. 1813-1819, 2002.

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

CORLESS, C. E. et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 1553-1558, 2001.

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

DAVISON, E. et al. The adaptation of the IS1106 PCR to a PCR ELISA format for the diagnosis of meningococcal infection. **Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease**, v. 8, n. 1, p. 51-56, 1996.

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

DE MORAES, J. C.; BARATA, R. B. [Meningococcal disease in Sao Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics]. **Cad. Saude Publica**, v. 21, n. 5, p. 1458-1471, 2005.

DE MORAES, J. C. et al. Prevalence, Risk Factors and Molecular Characteristics of Meningococcal Carriage Among Brazilian Adolescents. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 34, n. 11, p. 1197-1202, 2015.

DIGGLE, M. A. et al. Evaluation of a fluorescence-based PCR method for identification of serogroup a meningococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1766-1768, 2003.

DOLAN-LIVENGOOD, J. M. et al. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 10, p. 1616-1628, 2003.

DOLAN THOMAS, J. et al. sodC-based real-time PCR for detection of *Neisseria meningitidis*. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19361, 2011.

DUNN, K. L. et al. Bacterial [Cu,Zn]-cofactored superoxide dismutase protects opsonized, encapsulated *Neisseria meningitidis* from phagocytosis by human monocytes/macrophages. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1604-1607, 2003.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. EU Laboratory Capability Monitoring System (EULabCap). **Report on 2015 survey of EU/EEA country capabilities and capacities**. Stockholm: ECDC; 2017.

FINN, A. et al. Density distribution of pharyngeal carriage of meningococcus in healthy young adults: new approaches to studying the epidemiology of colonization and vaccine indirect effects. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 35, n. 10, p. 1080-1085, 2016.

FROSCH, M. et al. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 5, p. 1251-1263, 1991.

FROSCH, M. et al. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 3, p. 798-803, 1992.

GABUTTI, G.; STEFANATI, A.; KUHDARI, P. Epidemiology of *Neisseria meningitidis* infections: case distribution by age and relevance of carriage. **J. Prev. Med. Hyg.**, v. 56, n. 3, p. E116-120, 2015.

GAGNEUX, S. P. et al. Prospective study of a serogroup X *Neisseria meningitidis* outbreak in northern Ghana. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 5, p. 618-626, 2002.

GARDY, J. L.; LOMAN, N. J. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. **Nat. Rev. Genet.**, v. 19, n. 1, p. 9-20, 2018.

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

GREENWOOD, B. Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 4, p. 341-353, 1999.

GUIVER, M. et al. Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 28, n. 2, p. 173-179, 2000.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian J. Intern. Med.**, v. 4, n. 2, p. 627-635, 2013.

HALPERIN, S. A. et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 30 Suppl 2, p. B26-36, 2012.

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

HARRISON, O. B. et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 566-573, 2013.

HIGA, F. T. et al. Use of *sodC* versus *ctrA* for real-time polymerase chain reaction-based detection of *Neisseria meningitidis* in sterile body fluids. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 246-247, 2013.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991.

IBARZ-PAVON, A. B. et al. Laboratory-based surveillance of *Neisseria meningitidis* isolates from disease cases in Latin American and Caribbean countries, SIREVA II 2006-2010. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44102, 2012.

JORDENS, J. Z.; HECKELS, J. E. A novel *porA*-based real-time PCR for detection of meningococcal carriage. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, n. Pt 5, p. 463-466, 2005.

JORDENS, J. Z. et al. Detection of meningococcal carriage by culture and PCR of throat swabs and mouth gargles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 75-79, 2002.

JOYANES, P. et al. Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3247-3253, 2001.

KACZMARSKI, E. B. et al. Creating a national service for the diagnosis of meningococcal disease by polymerase chain reaction. **Commun. Dis. Public Health**, v. 1, n. 1, p. 54-56, 1998.

KIMMEL, S. R. Prevention of meningococcal disease. **Am. Fam. Physician**, v. 72, n. 10, p. 2049-2056, 2005.

KOYFMAN, A.; TAKAYESUB, J. K. Meningococcal disease. **African Journal of Emergency Medicine**, v. 1, n. 4, p. 174-178, 2011.

KRISTIANSEN, B. E. et al. Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polymerase chain reaction. **Lancet**, v. 337, n. 8757, p. 1568-1569, 1991.

KRISTIANSEN, P. A.; JORGENSEN, H. J.; CAUGANT, D. A. Serogroup A meningococcal conjugate vaccines in Africa. **Expert Rev. Vaccines**, v. 14, n. 11, p. 1441-1458, 2015.

KROLL, J. S. et al. Natural genetic exchange between Haemophilus and Neisseria: intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 13, p. 12381-12385, 1998.

KUHDARI, P. et al. Meningococcal B vaccination: real-world experience and future perspectives. **Pathog Glob. Health**, v. 110, n. 4-5, p. 148-156, 2016.

LADHANI, S. N. et al. Increase in endemic Neisseria meningitidis capsular group W sequence type 11 complex associated with severe invasive disease in England and Wales. **Clin. Infect. Dis.**, v. 60, n. 4, p. 578-585, 2015.

LEE, L. G.; CONNELL, C. R.; BLOCH, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 16, p. 3761-3766, 1993.

LEE, S. O. et al. Meningococcal disease in the republic of Korea army: incidence and serogroups determined by PCR. **J. Korean Med. Sci**, v. 18, n. 2, p. 163-166, 2003.

LEWIS, C.; CLARKE, S. C. Identification of *Neisseria meningitidis* serogroups Y and W135 by *siaD* nucleotide sequence analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 2697-2699, 2003.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MANIGART, O. et al. Alternative molecular methods for improved detection of meningococcal carriage and measurement of bacterial density. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54, n. 11, p. 2743-2748, 2016.

MCLAUGHLIN, G. L. et al. Amplification of rDNA loci to detect and type *Neisseria meningitidis* and other eubacteria. **Mol. Cell Probes**, v. 7, n. 1, p. 7-17, 1993.

MOHAMMED, I.; ILIYASU, G.; HABIB, A. G. Emergence and control of epidemic meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa. **Pathog Glob. Health**, v. 111, n. 1, p. 1-6, 2017.

MOLLING, P. et al. Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and *porA* amplification by LightCycler PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 12, p. 4531-5435, 2002.

MOTHERSHED, E. A. et al. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 320-328, 2004.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-50, 1987.

NEWCOMBE, J. et al. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 7, p. 1637-1640, 1996.

NI, H. et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. **Lancet**, v. 340, n. 8833, p. 1432-1434, 1992.

NUNES, A. M. et al. Meningococcal carriage among adolescents after mass meningococcal c conjugate vaccination campaigns in Salvador, Brazil. **PLoS One**, v. Nov 18, n. 11, 2016.

O'BRIEN, K. L. et al. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 1021-1024, 2001.

PICCINI, G. et al. Fighting *Neisseria meningitidis*: past and current vaccination strategies. **Expert Rev. Vaccines**, v. 15, n. 11, p. 1393-1407, 2016.

PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. *Neisseria meningitidis*: pathogenesis and immunity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 23, p. 68-72, 2015.

PROBERT, W. S. et al. 5' exonuclease assay for detection of serogroup Y *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 11, p. 4325-4328, 2002.

RÅDSTRÖM, P. et al. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 11, p. 2738–2744, 1994.

ROBERTS, J.; GREENWOOD, B.; STUART, J. Sampling methods to detect carriage of *Neisseria meningitidis*; literature review. **J. Infect.**, v. 58, n. 2, p. 103-107, 2009.

ROSENSTEIN, N. E. et al. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 18, p. 1378-1388, 2001.

ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. **Methods Mol. Biol.**, v. 799, p. 1-20, 2012.

SACCHI, C. T. et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 6, 2011.

SAFADI, M. A.; BEREZIN, E. N.; ARLANT, L. H. Meningococcal Disease: Epidemiology and Early Effects of Immunization Programs. **J. Pediatric Infect. Dis. Soc.**, v. 3, n. 2, p. 91-3, 2014.

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

SAFADI, M. A. et al. The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945-2010: an unpredictable and changing landscape. **Epidemiol Infect**, v. 141, n. 3, p. 447-458, 2013.

SAFADI, M. A. et al. The current situation of meningococcal disease in Latin America and updated Global Meningococcal Initiative (GMI) recommendations. **Vaccine**, v. 33, n. 48, p. 6529-6536, 2015.

SAHA, S. K. et al. Rapid diagnosis of pneumococcal meningitis: implications for treatment and measuring disease burden. **Pediatr. Infect Dis. J.**, v. 24, n. 12, p. 1093-1098, 2005.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SCHWARTZ, B.; MOORE, P. S.; BROOME, C. V. Global epidemiology of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2 Suppl, p. S118-124, 1989.

SHARIP, A. et al. Population-based analysis of meningococcal disease mortality in the United States: 1990-2002. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 3, p. 191-194, 2006.

SMITH, K.; DIGGLE, M. A.; CLARKE, S. C. Automation of a fluorescence-based multiplex PCR for the laboratory confirmation of common bacterial pathogens. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, n. Pt 2, p. 115-117, 2004.

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

STEFANELLI, P.; REZZA, G. Impact of vaccination on meningococcal epidemiology. **Hum. Vaccin Immunother**, v. 12, n. 4, p. 1051-1055, 2016.

STEPHENS, D. S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. **Lancet**, v. 369, n. 9580, p. 2196-2210, 2007.

TAHA, M. K. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 2, p. 855-857, 2000.

URWIN, R. et al. Amplification of the meningococcal porB gene for non-culture serotype characterization. **Epidemiol Infect.**, v. 120, n. 3, p. 257-262, 1998.

VAN DE BEEK, D. et al. Community-acquired bacterial meningitis. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 2, p. 16074, 2016.

VAN DER ENDE, A.; HOPMAN, C. T.; DANKERT, J. Multiple mechanisms of phase variation of PorA in *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 6685-6690, 2000.

VAN DER ENDE, A. et al. Comparison of commercial diagnostic tests for identification of serogroup antigens of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3326-3327, 1995.

VAN SOOLINGEN, D. et al. Whole genome sequencing as the ultimate tool to diagnose tuberculosis. **Int. J. Mycobacteriol**, v. 5, p. S60-S61, 2016.

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

VOGEL, U. Molecular epidemiology of meningococci: application of DNA sequence typing. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, n. 7, p. 415-420, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae***. 2. ed. Geneva: WHO, 2011.


WILKS, K. E. et al. Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 1, p. 213-217, 1998.

WINSTANLEY, T.; COURVALIN, P. Expert systems in clinical microbiology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 3, p. 515-556, 2011.

YAZDANKHAH, S. P.; CAUGANT, D. A. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, n. Pt 9, p. 821-832, 2004.

APÊNDICE

Anexo I – Procedimento Operacional Padrão-LPBM-PCR em Tempo Real

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 1/9
	Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

OBJETIVO

Fornecer protocolo de procedimento padrão para a realização do "real-time PCR" na detecção de *N.meningitidis* e caracterização dos sorogrupos

APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao LPBM e ao LEMB

DIVULGAÇÃO

Este POP é divulgado eletronicamente na pasta de rede do LPBM na rede IGM local onde deverão estar todos os demais POPs do LPBM. Sua consulta está disponível somente para o pessoal do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do IGM. Uma cópia em papel pode ser emitida pelo Responsável Documentação de acordo com as seguintes restrições:

- nome da pessoa ou entidade destinatária desta cópia deve constar do quadro de Usuários Principais com a menção "Cópia papel".;
- prévia autorização do responsável para a aprovação deste POP.


EMISSÃO, REVISÃO E APROVAÇÃO

Este POP foi:

- Emitido por : Ana Rafaela Moura (ARM)
- Revisado por : Leila Carvalho Campos (LCC)
- Aprovado por :

USUÁRIOS PRINCIPAIS

Acesso	Nome	Área
Cópia Original		
Cópia papel		
Via rede		

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 2/9
	Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

HISTÓRICO

VERSÃO	DATA	PÁGINA	NATUREZA MUDANÇA	DA	IDENTIFICAÇÃO
1	22/10/15	8	Criação do documento		ARM
			Revisão		LOC


DESCRIÇÃO

1. OBJETIVO

Demonstrar os componentes e os processos envolvidos na identificação da *Neisseria meningitidis* e os sorogrupos (A, B, C, W, Y e X) utilizando a técnica de real-time PCR.

2. PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Real time PCR também conhecido como qPCR, combina amplificação e detecção em apenas um passo por meio do uso de fluorocromos. Com o qPCR específico a ressonância da fluorescência da transferência de energia de sondas específicas para a região alvo marca a detecção do patógeno e das características genotípicas

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 39
	Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

específicas, uma vez que o sinal de fluorescência só será emitido se a sonda interagir com a região alvo específica e consequentemente sofrer hidrolização durante a amplificação. O valor da fluorescência é diretamente proporcional a quantidade do produto de amplificação do PCR.

Para a identificação da *Neisseria meningitidis* são utilizados como genes alvos *SodC*, *CtrA* e os genes relacionados aos sorogrupos (descritos em anexo)

3. CUIDADOS

- Usar jalecos e os EPIS recomendados
- Realizar a correta desinfecção das bancadas e matérias a serem utilizados, antes e após a realização do experimento

4. PROTOCOLO

4.1. EQUIPAMENTOS


PCR workstation
7500 Applied Biosystems®
Vortex
Centrífuga
Freezer -20°C
Geladeira 4°C

4.2. MATERIAIS

1,5ml de tubos para microcentrífuga (DNA/RNA free)
Ponteiras com filtro (10 µL, 200 µL, and 1000 µL)
Pipetas (2 µL, 10 µL, 200 µL, and 1000 µL)
Placa de 96 poços
Filme adesivo óptico ou tampas
Papel alumínio
EPI
Gaze
Papel toalha
Luva sem pó
Etanol (70%)
Peroxido de Hidrogénio

4.3. REAGENTES e SUPRIMENTOS

Espécime clínico ou DNA
Controle Positivo
Primers e sondas diluídos
Perfecta (Quanta Biosciences)
Água PCR
RNase way

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 4/9
	Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

4.4. PROCEDIMENTOS

4.4.1. Preparo da reação

Desenhar a template das amostras a serem analisadas (vide anexo)

- Ao fazer o cálculo para o mastemix sempre acrescer mais 2 ao total de amostras para minimizar os erros de pipetagem.
- Retirar o controle positivo e as amostras desconhecidas do freezer -20°C e deixá-los à temperatura ambiente

Reagentes	1 Rxn (25 µL)
Master Mix	12,5 µL
PCR H2O	7,5 µL
Forward primer	2 µL
Reverse primer	2 µL
Probe/sonda	2 µL
CSF/DNA	2 µL


- Preparar o mastemix de acordo com a tabela acima, sendo 53 reações por tubo
- Pipetar 23 µL do mastemix e distribuir na placa de 96 poços
- Adicionar 2 µL da água para PCR no NTC (controle negativo)
- Cobrir placa com o filme óptico ou papel alumínio
- Remover o adesivo
- Adicionar 2 µL do espécime clínico ou do DNA e do controle positivo, na bancada
- Centrifugar a placa para remoção de bolhas

4.4.2. Setup 7500 ABI

- Escolher modo "quantitative standart"
- Importar "template" criada no Excel (observar se os poços NTC e "unkown" estão corretamente assinalados)
- Escolher o gene alvo (SodC, Ctra e Sorogrupos)
- Escolher o "dye" FAM e ROX (referência)
- Estabelecer ciclo como:


Thermal Cycling Conditions	
95°C for 10 min	1 cycle
95°C for 13 sec	50 cycles
60°C for 1 min	

- Salvar ensaio
- Dá início à reação
- Ao fim da reação clicar em "analyze" e depois salvar os resultados em um CD virgem

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 59
Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01	
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

4.4.3. Análise dos Resultados

- a. São considerados positivos as amostras que apresentarem $CT \leq 35$, sendo que $< 35 \leq CT \leq 40$ devem ser diluídas em 1:4 e 1:10 em água para PCR para diluir potenciais inibidores
- b. Analisar cada curva individualmente, observando o formato sigmoide da curva

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 6/9 Versão n. 01
Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012		
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

5. FORMULÁRIOS ANEXO

Anexo I


TaqMan Template - *N. meningitidis*

Date: _____ PCR #: _____ File name: _____

Name: _____


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Run #1	run #1	run #1	run #1	run #1	run #1		
													ApB	act	actC					
A														53	53	0	0			
B													13.5	62.5	62.5	0	0			
C													4.5	238.5	238.5	0	0			
D													PrimerF	2	106	106	0	0		
E													PrimerR	2	106	106	0	0		
F													Probe	2	106	106	0	0		
G													Total run	23						
H													DNase	2						

Cycler conditions:
 95°C for 10 min | 1 cycle
 95°C for 15 sec | 50 cycles
 60°C for 1 min | 1 cycle

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 7/9
	Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				


Anexo II

Primers and probes for Brazil, March 2015								
Assay	Synthesis No.	Stock Concentration μ M	Primer name	Working stock conc. μ M	Vol. of stock to add μ L	Vol. of water to add μ L	Total vol. of working stock μ L	Final conc. of oligo in rxn nM
N. men (sodC)	6267	573,93	F351	3,75	3,3	496,7	500	300
	6268	479,57	R478	7,5	7,8	492,2	500	600
	05159	90,58	Pb387	1,25	6,9	493,1	500	100
N. men A	10200	364,85	F2531	3,75	5,1	494,9	500	300
	02456	629,92	R2624	11,25	8,9	491,1	500	900
	01919	61,52	Pb2591i	1,25	10,2	489,8	500	100
N. men B	7428	504,08	F737	3,75	3,7	496,3	500	300
	7429	451,32	R882	3,75	4,2	495,8	500	300
	7686	177,69	Pb839i	1,25	3,5	496,5	500	100
N. men C	01053	709,15	F478	11,25	7,9	492,1	500	900
	10199	436,70	R551	3,75	4,3	495,7	500	300
	01920	58,14	Pb495i	1,25	10,7	489,3	500	100
N. men W	10196	440,53	F857	1,25	1,4	498,6	500	100
	10203	504,08	R964	11,25	11,2	488,8	500	900
	7688	57,95	Pb907i	2,5	21,6	478,4	500	200
N. men X	02458	641,34	F173	11,25	8,8	491,2	500	900
	7435	431,70	R237	11,25	13,0	487,0	500	900
	7698	158,36	Pb196	1,25	3,9	496,1	500	100
N. men Y	5158	400,66	F787	11,25	14,0	486,0	500	900
	10201	527,40	R929	7,5	7,1	492,9	500	600
	10210	242,95	Pb1099i	1,25	2,6	497,4	500	100
RNAse P	10204	509,69	RNP-F	4	3,9	496,1	500	400
	10205	430,31	RNP-R	4	4,6	495,4	500	400
	01921	96,35	RNP-P	1	5,2	494,8	500	100

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 8/9
	Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

ANEXO III

	Ano	Seqüência de Nucleotídeos	Conc. Final (nM)
sodC	F351	GCACACTTAGGTGATTACCTGCAT	300
	R478	CCACCCGTGTGGATCATAATAGA	600
	Pb387	CATGATGGCACAGCAAAATCCTGTTT 3' FAM, 3' BHQ1	100
ctrA	F753	TGTGTTCCGCTATACGCCATT	300
	R846	GCCATATTCACACGATATACC	900
	Pb820i	AACCTTGAGCAA TTCCATTTATCCTGACGTTCT 3' FAM, BHQ1 on TT, 3' SpC6	100
sacB MenA	F2531	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA	300
	R2624	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG	900
	Pb2629ii	CTAAAAG TTAGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT 5' FAM; 3' SpC6; TT BHQ1	100
slaD (MenB)	F737	GCTACCCCATTTGAGATGATTTGT	300
	R882	ACCAGCCGAGGGTTTATTCTAC	300
	Pb839i	AAGAGATGGGYAACAACT ATGTAATGTCITTTATTT 5' FAM, 3' SpC6, TT BHQ1,	100
slaD (MenC)	F478	CCCTGAGTATGCGAAAAAATT	900
	R551	TGCTAATCCCGCCTGAATG	300
	Pb495i	TTTCAATGC TTAAATGAATACCACCGTTTTTTTGC 5' FAM; 3' SpC6; TT BHQ1	100
synG (MenW)	F857	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG	100
	R964	TTGCCATTCCAGAAATATCACC	900
	Pb907i	AATATGGAGCGAA TTGATTACAGTAACATAAATGAA 5' FAM, 3' SpC6, TT BHQ1	200
xcxB (MenX)	F173	TGCCCCAACCGTTTATTGG	900
	R237	TGCTGCTATCATAGCCGCG	900
	Pb196	TGTTTGCCACATGAATGGCGG 5' FAM; 3' BHQ	100
synF (MenY)	F787	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC	900
	R929	TTGCTAAAATCATTGCTCCATAT	600
	Pb1099i	TATGGTG TTACGATATCCCTATCCCTGCCTATAAT 5' FAM; 3' SpC6; TT BHQ1	100

	Instituto Gonçalo Moniz			Código IGM-POP-LPBM-00X
				Página 9/9
Data Emissão MAR/2012	Data de Vigência 01/03/2012	Próxima Revisão MAR/2012	Versão n. 01	
ÁREA EMITENTE: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR				
ASSUNTO: Real Time PCR				

REFERÊNCIAS

Castilo, D;Harcourt, B;Hatcher, C;Jackson, M;Katz, L;Mair, R;Mayer, L;Novak, R;Rahalison, L;Schimink, S; Theodore, MJ;Thomas, J;Vuong, J;Wang, ;Caugant, D; Chanteau, S;Cognat, S; Nicolas, P; Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. CDC, Atlanta, GA, World Health Organization, 2011

Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System, 2010