



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IMPACTO DA VACINAÇÃO CONTRA A MENINGITE MENINGOCÓCICA C NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SALVADOR NO PERÍODO PÓS-VACINAL**

**NABILA MONALISA MENDES DANTAS SALES**

**Salvador**

**2018**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**IMPACTO DA VACINAÇÃO CONTRA A MENINGITE MENINGOCÓCICA C NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SALVADOR NO PERÍODO PÓS-VACINAL**

**NABILA MONALISA MENDES DANTAS SALES**

Orientadora: Prof. Dra. Joice Neves Reis Pedreira  
Coorientador: Dr. Jailton de Azevedo Silva Júnior

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador**

**2018**

" IMPACTO DA VACINAÇÃO CONTRA A MENINGITE MENINGOCÓCICA C NA REGIÃO METROPOLITANA DE SALVADOR NO PERÍODO PÓS-VACINAL."

**NABILA MONALISA MENDES DANTAS SALES**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de outubro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Cristiane Wanderley Cardoso  
Coordenadora do CIEVS  
SMS



---

Dr. Edson Duarte Moreira Júnior  
Pesquisador Titular  
FIOCRUZ



---

Dra. Soraia Machado Cordeiro  
Professora Adjunta  
UFBA

#### **FONTE DE FINANCIAMENTO**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, TC 283/2013.

## AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de dar graças por mais esta vitória em minha vida.

Ao meu bom Deus, toda honra e toda glória! Exalto a Fé que me anima e não me deixa desistir jamais.

Ao meu marido Alexandre por ser meu entusiasta, conselheiro e confidente. Obrigada por compreender meus momentos de ausência e por me dar todo o amor e suporte que precisei.

À minha orientadora Prof. Dra. Joice Neves Reis Pedreira, pela confiança, disponibilidade e cordialidade de sempre. Obrigada por transmitir tantos conhecimentos e por me iniciar na Biologia Molecular. A senhora é inspiração.

Aos meus pais Anatólia e Jorge que fizeram da minha (e do meu irmão) educação prioridade. Até aqui vocês foram minha motivação. Esse título é de vocês.

Ao meu irmão Jorginho por sempre “estar lá”, torcendo por mim. Você me dá a certeza que nunca estarei sozinha.

Aos colegas e amigos com quem compartilhei a jornada. Em especial Helena Leal e Mariana Rabelo por tantas e tantas dúvidas sanadas.

Ao meu coorientador Dr. Jailton Azevedo pelas valiosas contribuições.

Ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PgBSMI), Laboratório de Patologia e Biologia Molecular e a todos os funcionários do Instituto Gonçalo Moniz.

A todos os professores do PgBSMI por enriquecerem a minha formação.

À Faculdade de Farmácia, Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia.

Ao Hospital Couto Maia pela parceria.

A todos os meus amigos e familiares que se alegram com a minha felicidade.

*"Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa."*

João Guimarães Rosa

SALES, Nabila Monalisa Mendes Dantas. Impacto da vacinação contra a meningite meningocócica C na Região Metropolitana de Salvador no período pós-vacinal. 82 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O termo doença meningocócica (DM) designa as diferentes apresentações clínicas de infecções causadas por *Neisseria meningitidis*, sendo a meningite a principal delas. A DM está associada a elevada morbimortalidade e é considerada um grave problema de Saúde Pública em todo o mundo. No Brasil, a Vacina Meningocócica C Conjugada (MenC) foi incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI), em 2010, para imunoprevenção da DM pelo meningococo do sorogrupo C (DMC). Estudos de vigilância epidemiológica vêm sendo desenvolvidos para avaliação das estratégias vacinais adotadas. **OBJETIVOS:** Avaliar o impacto a longo prazo da MenC na incidência da DM na Região Metropolitana de Salvador (RMS). **METODOLOGIA:** Estudo de vigilância de base hospitalar, do tipo corte transversal, observacional e descritivo. Os critérios de inclusão foram: casos de DM confirmados através de técnicas microbiológicas clássicas (cultura, bacterioscopia, aglutinação em látex) ou de PCR em Tempo Real (PCR-TR); atendidos no hospital de referência para doenças infectocontagiosas no estado da Bahia, (Hospital Couto Maia) ou notificados pela Secretaria Municipal de Saúde de Salvador, entre janeiro de 2005 e dezembro de 2016. As taxas de incidência e letalidade foram calculadas; o perfil clínico-epidemiológico dos casos foi determinado; e a ocorrência dos tipos capsulares foi analisada. **RESULTADOS:** 897 casos de DM foram confirmados no período. A taxa de incidência de DMC no grupo vacinal (0-4 anos) reduziu de 2,82 no período pré-vacinal (2005-2009) para 1,14 casos/100.000 hab. no período pós-vacinal (2011-2016), representando uma redução de 59,6%. O índice de letalidade geral foi de 15,1%. O emprego da PCR-TR, a partir do LCR, identificou 189/897 (21,1%) casos adicionais. O tipo capsular C 507/897 foi o mais prevalente (56,5%) seguido pelos tipos capsulares B 104/897 (11,6%), W 19/897 (2,1%), Y 11/897 (1,2%) e A 7/897 (0,8%). Os tipos capsulares não foram determinados ou não testados para 27,8% (249/897) das amostras. **CONCLUSÕES:** A introdução da MenC teve influência positiva no controle da DMC entre os indivíduos do grupo vacinal. A PCR-TR conseguiu ampliar a capacidade diagnóstica da DM, portanto, a disseminação desta técnica pode reduzir o percentual de casos de etiologia não confirmada e de tipo capsular não determinado. O perfil microbiológico da doença é dinâmico e interfere diretamente na epidemiologia desse agravo; por esse motivo, estudos de vigilância são indispensáveis para subsidiar e avaliar continuamente as estratégias vacinais implementadas.

**Palavras-chave:** Epidemiologia. Doença Meningocócica. Vacina Meningocócica C Conjugada. PCR em Tempo Real.

SALES, Nabila Monalisa Mendes Dantas. Impact of vaccination against meningococcal meningitis C in the Metropolitan Region of Salvador in the post-vaccination period. 82 f. il. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2018.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The term meningococcal disease (MD) refers to the different clinical manifestations of infections caused by *Neisseria meningitidis*, meningitis is the main one. MD is associated with high morbidity and mortality and is a serious public health problem worldwide. In Brazil, Meningococcal Serogroup C Conjugate Vaccine (MenC) was included in the National Immunization Program (NIP) in 2010 for the immunoprevention of MD by serogroup C meningococcus (MDC). Epidemiological surveillance studies have been designed to evaluate the vaccine strategies adopted. **OBJECTIVES:** To evaluate the long-term impact of MenC on the incidence of MD in the Metropolitan Region of Salvador (MRS). **Methodology:** Cross-sectional, observational and descriptive study of hospital-based surveillance. Inclusion criteria were: MD cases confirmed by classical microbiological techniques (culture, bacterioscopy, latex agglutination) or Real-Time PCR (RT-PCR); attended at the reference hospital for infectious diseases in the state of Bahia (Couto Maia Hospital) or notified by the Municipal Health Department of Salvador between January 2005 and December 2016. Incidence and fatality rates were calculated; the clinical-epidemiological profile of the cases was determined; and the occurrence of capsular types was analyzed. **RESULTS:** 897 MD cases were confirmed in the period. The incidence rate of MDC among vaccine group (0-4 years) decreased from 2.82 in the pre-vaccine period (20005-2009) to 1.14 cases/100,000 hab. in the post-vaccination period (2011-2016), a reduction of 59.6%. The overall lethality rate was 15.1%. The use of RT-PCR from the CSF found out 189/897 (21.1%) extra cases. Capsular type C 507/897 was the most prevalent (56.5%), followed by capsular types B 104/897 (11.6%), W 19/897 (2.1%), Y 11/897 (1, 2%) and A 7/897 (0.8%); the capsular types were not determined or not tested for 27.8% (249/897) of the samples. **CONCLUSIONS:** The introduction of MenC had a positive impact on the control of MDC among individuals in the vaccine group. The PCR-RT increased the diagnostic capacity of DM, thus, the dissemination of this technique may reduce the percentage of cases of unconfirmed etiology and non-determined capsular type. The microbiological profile of the disease is dynamic and directly interferes with the epidemiology; for this reason, surveillance studies are essential for subsidize and continuously evaluate the implemented vaccine strategies.

**Keywords:** Epidemiology. Meningococcal Disease. Meningococcal Serogroup C Conjugate Vaccine. Real-time PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Corte transversal da membrana celular do meningococo.....	16
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática da hidrólise da sonda.....	22
<b>Figura 3</b>	Gráfico de amplificação.....	23
<b>Figura 4</b>	Mapa genético do locus <i>cps</i> de <i>N. meningitidis</i> .....	24
<b>Figura 5</b>	Impacto da Vacina Meningocócica C Conjugada no Reino Unido.....	30
<b>Figura 6</b>	Casos confirmados de DM do HCM/SMS de jan/2005 a dez/ 2016 .....	41
<b>Gráfico 1</b>	Número de casos confirmados e incidência de DM na RMS por ano do estudo ( $n=711$ ).....	42
<b>Gráfico 2</b>	Tipos capsulares de <i>N. meningitidis</i> identificados durante o estudo.....	47
<b>Gráfico 3</b>	Ocorrência dos tipos capsulares de <i>N. meningitidis</i> por ano do estudo.....	48
<b>Gráfico 4</b>	Incidência de DM na RMS estratificada por ano e sorogrupo.....	48
<b>Figura 7</b>	Resultados da PCR-TR espécie-específica.....	49
<b>Figura 8</b>	Resultados da PCR-TR sorogrupo-específica.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Incidência de DM no Brasil de 2010 a 2016.....	28
<b>Tabela 2</b>	<i>Primers</i> e sondas utilizados para detecção e genogrupagem de <i>N. meningitidis</i> .....	37
<b>Tabela 3</b>	Cepas de referência utilizadas como controles positivos nas reações de PCR-TR.....	38
<b>Tabela 4</b>	Incidência e percentual de redução da incidência de DMC na RMS no período pós-vacinal, por ano e faixa etária.....	43
<b>Tabela 5</b>	Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com DM no HCM de jan/2005 a dez/2016 ( <i>n</i> =775).....	45
<b>Tabela 6</b>	Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com DM no HCM, no período pré-vacinal (2005-2009), de transição (2010) e pós-vacinal (2011-2016) ( <i>n</i> =775) .....	46
<b>Tabela 7</b>	Resultados de bacterioscopia, cultura, aglutinação em látex e PCR-TR de amostras de LCR de pacientes atendidos no HCM de jan/2010 a dez/2016 ( <i>n</i> =1.007).....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BHI	Broth Infusion Heart
CC	Complexo Clonal
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
CID 10	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde
CIE	Contraímuneletroforese Cruzada
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CRIES	Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais
CRM 197	Variante não Tóxica da Toxina Diftérica
Ct	Cycle Threshold
DM	Doença Meningocócica
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynucleotides
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Hab.	Habitantes
HCM	Hospital Couto Maia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LOS	Lipo-oligossacarídeo
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
MB	Meningite Bacteriana
MenC	Vacina Meningocócica C Conjugada
MLST	Multilocus Sequence Typing

MM	Meningite Meningocócica
MS	Ministério da Saúde
OMV	Outer Membrane Vesicles
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-TR	PCR em tempo real
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PNI	Programa Nacional de Imunizações
RMS	Região Metropolitana de Salvador
RR	Risco relativo
SBIIm	Sociedade Brasileira de Imunizações
SESAB	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
ST	Sequence Type
SVE	Sistema de Vigilância Epidemiológica
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TT	Toxóide Tetânico
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1	MENINGOCOCO	15
2.1.1	<b>Morfofisiologia</b>	15
2.1.2	<b>Classificação fenotípica e genotípica</b>	17
2.2	DOENÇA MENINGOCÓCICA	18
2.2.1	<b>Fisiopatologia e quadro clínico</b>	18
2.2.2	<b>Transmissão e estado de portador</b>	19
2.2.3	<b>Fatores de risco</b>	20
2.2.4	<b>Diagnóstico</b>	20
2.2.5	<b>Diagnóstico por PCR em Tempo Real</b>	21
2.2.5.1	Alvos genéticos	24
2.2.5.2	Estratégia diagnóstica	25
2.2.6	<b>Tratamento</b>	26
2.2.7	<b>Profilaxia</b>	26
2.3	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA	26
2.3.1	<b>Doença meningocócica no mundo</b>	27
2.3.2	<b>Doença meningocócica no Brasil</b>	28
2.4	VACINAS MENINGOCÓCICAS	29
2.4.1	<b>Histórico</b>	29
2.4.2	<b>Vacinas meningocócicas no Brasil</b>	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
4.1	TIPO, LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	34
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	34
4.3	COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	34
4.4	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA	34
4.4.1	<b>Isolamento primário</b>	35
4.4.2	<b>Conservação dos isolados</b>	35

4.4.3	<b>Determinação dos tipos capsulares</b>	35
4.4.4	<b>PCR em Tempo Real</b>	36
4.4.4.1	Extração de DNA	36
4.4.4.2	Ensaio	36
4.5	<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	39
<b>5</b>	<b>PROPOSTA DE ANÁLISE</b>	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
6.1	RESULTADOS DA PCR-TR	48
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	51
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	58
	<b>REFERÊNCIAS</b>	59
	<b>ANEXOS</b>	66

## 1 INTRODUÇÃO

O termo “doença meningocócica” (DM) é adotado internacionalmente para se referir às diferentes apresentações clínicas de infecções causadas por *Neisseria meningitidis* (SÁFADI; BEREZIN; OSELKA, 2012). A meningite meningocócica (MM) é a principal e mais frequente forma clínica da DM, seguida de infecção de corrente sanguínea (meningococemia). Estas manifestações clínicas estão associadas a elevadas taxas de morbimortalidade a despeito de diagnóstico e tratamento adequados. Por esse prognóstico e potenciais complicações, a DM é considerada um grave problema de Saúde Pública em todo o mundo, sua carga afeta especialmente países em desenvolvimento (BACCARINI et al., 2013; WHO, 2017).

A DM é considerada endêmica no Brasil, ocorrendo surtos periódicos em diferentes regiões do país. Os sorogrupos mais frequentes são B, C, W e Y; sendo o sorogrupo C o mais prevalente na Bahia e no Brasil (BAHIA, 2018a; BRASIL, 2017). A Vacina Meningocócica C Conjugada (MenC) foi incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI) em outubro de 2010 como estratégia de imunoprevenção da DM causada pelo meningococo do sorogrupo C (BRASIL, 2013). Na Bahia, a introdução desse imunobiológico foi antecipada para fevereiro do mesmo ano em resposta à epidemia de DM pelo sorogrupo C ocorrida em 2010 (CARDOSO et al., 2015).

A redução da incidência da DM tem sido descrita na maioria dos países que incluíram a MenC em seus programas nacionais de imunização e o “efeito rebanho” tem sido um componente importante associado ao uso desta vacina (BALMER; BORROW; MILLER, 2002; CHANG; TZENG; STEPHENS, 2012; TAUIL et al., 2014). No Brasil observa-se a mesma tendência, com uma queda sustentada na incidência desse agravo: 1,57 casos/100.000 habitantes em 2010 e 0,57 caso/100.000 habitantes em 2016 (BRASIL, 2017).

Estudos de vigilância epidemiológica e monitoramento microbiológico vêm sendo conduzidos em todo o mundo para avaliação das estratégias vacinais adotadas em diferentes cenários (THOMAS et al., 2011). Somente a partir da vigilância continuada e ampliada pode-se avaliar os resultados das intervenções e antecipar a adequação das vacinas meningocócicas implementadas de acordo com a prevalência dos tipos capsulares circulantes (GASPARINI et al., 2012; SÁFADI; CINTRA, 2010). Diversos trabalhos (CAVRINI et al., 2010; SALGADO et al., 2013, TAHA et al., 2005) vêm demonstrando a importância do diagnóstico laboratorial adequado para que se acompanhe mudanças na epidemiologia da doença no período pós-vacinal; e para que seja possível mensurar o real impacto e efetividade da vacinação.

Com a larga experiência que a Bahia possui na condução de estudos populacionais e acompanhamento do impacto de vacinas (CARDOSO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2007) e com os dados compilados em 20 anos de vigilância ativa para a DM na cidade de Salvador e Região Metropolitana (CARDOSO et al., 2012; CORDEIRO et al., 2007), uma avaliação em longo prazo do impacto da MenC na epidemiologia local da DM além de viável é altamente relevante e oportuno.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 MENINGOCOCO**

Meningococo, como é conhecida a bactéria *Neisseria meningitidis*, pertence à família Neisseriaceae, é um diplococo riniforme Gram-negativo com 0,6-1,0µm de diâmetro. Em termos metabólicos, é uma bactéria aeróbica, oxidase e catalase positiva. É um organismo fastidioso o que dificulta seu cultivo. Tem crescimento ótimo a 35–37°C em atmosfera de 5–10% de CO<sub>2</sub> e 50% de umidade (WHO, 2011). Cresce em diferentes tipos de meios enriquecidos com 5% de sangue de ovino desfibrinado (ágar sangue e ágar chocolate). Em ágar sangue as colônias são cinzentas, não hemolíticas, redondas, convexas, brilhantes e com bordas bem definidas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

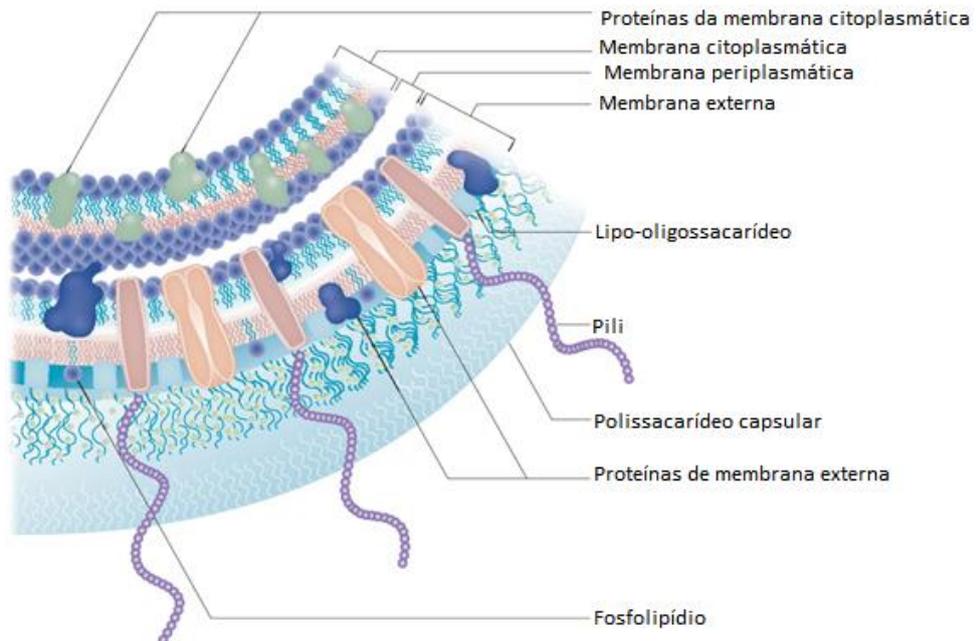
A plasticidade do seu genoma é uma característica marcante (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Possui um cromossomo circular com aproximadamente 2,2 Mb e 2000 sequências codificadoras; conteúdo médio de G+C de 52%. Cerca de 20% do seu material genético constituem-se de sequências repetitivas - sequências de captação de DNA, elementos de mosaico intergênico neisserial e sequências de inserção (SCHOEN et al., 2009).

#### **2.1.1 Morfofisiologia**

*N. meningitidis* é a única espécie dentro do gênero *Neisseria* que expressa uma cápsula polissacarídica (CLAUS et al., 2005). Contudo, o meningococo pode ser encapsulado ou não encapsulado. As cepas causadoras de doença invasiva são, no geral, encapsuladas; já os meningococos que colonizam a nasofaringe são na maioria não encapsulados (DOLAN-LIVENGOOD et al., 2003).

A cápsula é formada por polissacarídeos e atua como um sistema de defesa bacteriano contra a opsonização, fagocitose e a lise celular (Figura 1). Os antígenos polissacarídicos são a base das vacinas meningocócicas (exceto do sorogrupo B) e da classificação do meningococo em sorogrupos (GASPARINI et al., 2012).

A expressão da cápsula pode variar *in vivo*, fenômeno conhecido como *capsule switching* (TSANG, 2007). Esse fenômeno pode decorrer da transferência horizontal de material genético (em casos de co-colonização nasofaríngea por meningococos de sorogrupos diferentes, por exemplo) ou da recombinação de genes de biossíntese capsular (CASTIÑEIRAS et al., 2012; RISHISHWAR et al., 2012). A capacidade de modificar o fenótipo da cápsula proporciona uma vantagem seletiva ao meningococo na medida em que o torna capaz de escapar de anticorpos anticapsulares específicos (SWARTLEY et al., 1997).



**Figura 1** – Corte transversal da membrana celular do meningococo. Fonte: Adaptado de Stephens, Greenwood e Brandtzaeg (2007) conforme autorização (Anexo I).

A membrana externa do meningococo é composta principalmente por lipo-oligosacarídeos (LOS) que desempenham um papel importante na adesão da bactéria e inativação do sistema imune inato (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). Essa espécie tem a capacidade de liberar espontaneamente vesículas de membrana externa (OMV, do inglês *Outer Membrane Vesicles*) contendo LOS e proteínas de superfície, cuja função é se ligar a anticorpos bactericidas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Existem algumas estruturas denominadas adesinas que facilitam a adesão do microrganismo às células do hospedeiro. As principais são os *pili* (filamentos protéicos que se estendem a partir da cápsula), proteínas de opacidade (Opa e Opc), NadA, NhhA, App e MspA. Outras moléculas importantes expressas pelo meningococo são as porinas (PorA e PorB) e as proteínas ligantes de ferro (fator essencial para o seu crescimento e metabolismo) (GASPARINI et al., 2012; HILL et al., 2010).

### 2.1.2 Classificação fenotípica e genotípica

Meningococo é tradicionalmente classificado por sorogrupos com base na especificidade imunológica dos polissacarídeos capsulares. A técnica mais frequentemente utilizada para este fim é a soroaglutinação (soroagrupagem) a partir do isolado (SASG, do inglês *Slide Agglutination Serogrouping*), que utiliza anticorpos monoclonais (HARRISON et al., 2013).

Alguns isolados são classificados como não agrupáveis (NA) quando submetidos à SASG. Essa classificação abrange três situações distintas: isolados poliaglutinantes, auto-aglutinantes ou não aglutinantes (RISHISHWAR et al., 2012). Os casos de isolados não aglutinantes podem representar cepas não encapsuladas ou cepas de sorogrupos que não são rotineiramente pesquisados (HARRISON et al., 2013).

Atualmente estão descritos 12 sorogrupos de *N. meningitidis*: A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y, e Z. Destes, seis (A, B, C, W, X e Y) têm relevância clínica por estarem implicados nos casos de doença invasiva (HARRISON et al., 2013). Os sorogrupos B e C expressam cápsulas compostas de homopolímeros de ácido siálico; os sorogrupos W e Y expressam cápsulas de ácido siálico ligado a galactose e glicose respectivamente. Já a cápsula do sorogrupo A é composta de N-acetilmanosamina-1-fosfato (FROSCH et al., 1992).

A subclassificação em sorotipos, sorosubtipos e imunotipos é feita com base nas propriedades antigênicas de proteínas de membrana externa (subcapsulares): PorB (classes 2 e 3), PorA (classe 1) e LOS (L1-L12) respectivamente. A tipagem também é realizada com o emprego de anticorpos monoclonais (VOGEL, 2010).

Estabelecido por Maiden e colaboradores (1998), a técnica de sequenciamento de múltiplos locus (MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) é atualmente o método de genotipagem de referência para *N. meningitidis* e classifica as cepas em diferentes ST (do inglês, *Sequence Type*) de acordo com seu perfil alélico. Os ST, por sua vez, são agrupados em complexos clonais (CC) de acordo com a relação genética entre si. Até o final de 2018

havia sido descritos 14,846 ST para *N. meningitidis*. Os CC ST-11, ST-32, ST-41/44 e ST-103 são classificados como linhagens hiperinvasivas (CAUGANT, 2008), sendo que este último circula em Salvador desde 1996.

## 2.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA

As infecções provocadas pelo meningococo são geralmente invasivas e de amplo espectro clínico. Incluem três formas clínicas principais (em ordem de prevalência): infecção das meninges e da medula espinhal (meningite), infecção da corrente sanguínea (meningococemia) ou meningite com meningococemia. Formas clínicas menos comuns incluem pneumonia, endocardite, pericardite, endoftalmite, uretrite, osteomielite, celulite, sinusite, conjuntivite e otite média (CDC, 2017).

### 2.2.1 Fisiopatologia e quadro clínico

Os sinais e sintomas da DM têm início súbito e desenvolvem-se entre dois a dez dias após a aquisição do agente patogênico. Os processos fisiopatológicos diferem na meningite (CID 10: A39.0) e na meningococemia (CID 10: A39.2).

A meningite meningocócica (MM) representa mais de 60% do total de casos de DM. Após vencer a barreira de muco do trato respiratório superior, o meningococo adere às células epiteliais, penetra a camada mucosa, cai na corrente sanguínea, alcança as células endoteliais dos vasos cerebrais e cruza a barreira hematoencefálica levando à infecção das meninges (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). Desenvolve-se uma resposta inflamatória no espaço subaracnóideo com a proliferação de bactérias no LCR (ØVSTEBØ et al., 2004).

O quadro clínico na MM inclui febre abrupta ou hipotermia, cefaléia intensa, náuseas, vômitos, fotofobia, estado mental alterado, anorexia, alterações ao exame do fundo de olho e sinais de irritação meníngea (rigidez de nuca, sinais de Kernig e Brudzinsk). É comum a clássica tríade febre, cefaléia e rigidez de nuca. Em recém-nascidos e lactentes os achados clínicos podem ser inespecíficos, mas devem chamar a atenção o abaulamento de fontanelas, convulsões e irritabilidade (BRASIL, 2014a).

A taxa de letalidade da MM oscila entre 10-15%; 10-20% dos sobreviventes adquirem sequelas neurológicas permanentes como perda auditiva/visual, déficit cognitivo e déficit motor (CDC, 2017; DRETTLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

Na meningococemia (MCC) ocorre proliferação da bactéria no plasma sanguíneo com alta produção de endotoxinas. A resposta inflamatória é sistêmica e acompanhada de choque séptico grave (ØVSTEBØ et al., 2004). As lesões capilares decorrentes levam ao *rash* cutâneo hemorrágico característico, evoluindo para o surgimento de máculas, petéquias ou equimoses (TZENG; STEPHENS, 2000).

As complicações desta forma clínica podem incluir falência renal e pulmonar, coagulação intravascular disseminada (CIVD), lesões trombóticas (necrose de extremidades ou membros) e Síndrome de Waterhouse-Friderichsen (hemorragia das supra-renais com falência total das glândulas) (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). A taxa de letalidade alcança 40% dos casos a despeito de tratamento (BRASIL, 2014a; CHANG; TZENG; STEPHENS, 2012).

### 2.2.2 Transmissão e estado de portador

Com frequência o meningococo coloniza a mucosa da nasofaringe de indivíduos saudáveis sem causar doença, fenômeno conhecido como “estado de portador” ou “portador assintomático”. Essa condição pode se estender por períodos variáveis (dias a meses) e na grande maioria dos indivíduos confere imunidade à bactéria (BACCARINI et al., 2013).

A transmissão se dá por meio de gotículas respiratórias ou saliva de portadores assintomáticos ou indivíduos com doença invasiva. O potencial de transmissão persiste enquanto há colonização nasofaríngea e geralmente cessa após 24 horas de antibioticoterapia adequada (BRASIL, 2014a).

A literatura traz números muito variáveis em relação à prevalência de portadores assintomáticos. Estima-se 10-20% de portadores assintomáticos na população mundial (WHO, 2015). Sabe-se que a prevalência é maior entre adolescentes e adultos jovens e em populações fechadas (alojamentos militares e estudantis, grupos de peregrinos, asilos, creches, etc) (CDC, 2017).

De Moraes e colaboradores (2015) descreveram uma prevalência de 9,9% de portadores assintomáticos entre estudantes de 11-19 anos na cidade de Campinas. Trabalho de Nunes e colaboradores (2016) realizado em Salvador com estudantes da mesma faixa etária, encontrou uma prevalência menor, de 4,9%.

### 2.2.3 Fatores de risco

Alguns fatores de risco estão relacionados com a DM: ser contactante de casos, faixas etárias específicas (lactentes, adolescentes e adultos jovens), ambientes compartilhados (dormitórios, alojamento militar/estudantil, creches, escolas, asilos, etc), viagens para regiões endêmicas/epidêmicas, coinfeções respiratórias, tabagismo ativo/passivo e baixo nível socioeconômico (CHANG; TZENG; STEPHENS, 2012; GASPARINI et al., 2012). Para os profissionais ou pesquisadores que manipulam o meningococo em laboratório a imunização é recomendada (WHO, 2011).

Dentre as comorbidades associadas estão a asplenia funcional ou anatômica, AIDS, síndrome nefrótica, deficiências genéticas na via comum do complemento e deficiências de anticorpos (BRASIL, 2014a; CDC, 2013). Contudo, a ausência de anticorpos específicos contra o sorogrupo infectante é considerada o principal fator de susceptibilidade do hospedeiro (GOLDSCHNEIDER; GOTSCHLICH; ARTENSTEIN, 1969).

### 2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da DM baseia-se nos achados clínicos e laboratoriais. A cultura do LCR/sangue/raspado de lesões petequiais é considerada o padrão ouro pelo alto grau de especificidade. Os outros recursos diagnósticos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) incluem: exame quimiocitológico do LCR, bacterioscopia direta a partir do LCR/fluidos corpóreos normalmente estéreis/raspado de lesões petequiais, teste de aglutinação em látex, contraimeletoforese cruzada (CIE), e reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Para fins de vigilância, a confirmação também pode ser feita com base no critério clínico-epidemiológico (BRASIL, 2014a).

Idealmente, os espécimes clínicos para pesquisa diagnóstica devem ser coletados antes do início da antibioticoterapia. A sensibilidade da cultura é de aproximadamente 50% e é bastante afetada pelo uso prévio de antibiótico. Além disso, condições não ideais de coleta, armazenamento e transporte também podem comprometer o desempenho do método (WHO, 2011).

O exame quimiocitológico do LCR avalia características físicas (cor, turbidez), leucorraquia (contagem de leucócitos  $>10\text{cél}/\text{mm}^3$  com predomínio de polimorfonucleares), glicorraquia (queda na concentração de glicose  $<45\text{mg}/\text{dL}$ ) e proteinorraquia (aumento na concentração de proteínas  $>45\text{mg}/\text{dL}$ ) (WHO, 2011). Essa ferramenta orienta a suspeita

clínica mas não é recomendada para conclusão diagnóstica pela baixa especificidade (BRASIL, 2014a).

A bacterioscopia (coloração de Gram) é uma ferramenta amplamente disponível, rápida e de baixo custo. Sua sensibilidade varia com a contagem de bactérias no espécime clínico, entre 60-90% (WU et al., 2013).

O teste de aglutinação em látex utiliza partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos. A sensibilidade da técnica (80% para *N. meningitidis*) é reduzida quando a contagem de bactérias no espécime clínico é baixa (WHO, 2011).

A CIE é uma técnica diagnóstica indireta, com alta especificidade (89%) mas baixa sensibilidade (63%). Alguns autores não a recomendam como teste diagnóstico único (SALGADO et al., 2013).

O emprego de ferramentas de biologia molecular para diagnóstico da DM aumenta sensivelmente as taxas de identificação e caracterização do microrganismo. O grande diferencial das técnicas baseadas em PCR é o fato de prescindirem de microrganismos viáveis, o que permite a detecção de bactérias mortas ou lisadas (FOX; TAHA; VOGEL, 2007). A PCR em tempo real (PCR-TR) a partir do LCR possui alta sensibilidade e especificidade; e um tempo de execução muito menor que a cultura (WHO, 2011; SACCHI et al., 2011; SALGADO et al., 2013).

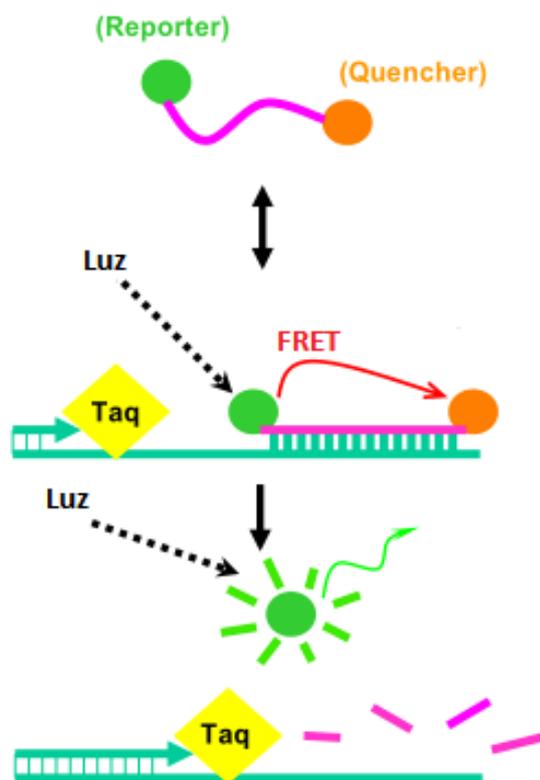
### 2.2.5 Diagnóstico por PCR em Tempo Real

Na PCR convencional a detecção e quantificação dos produtos amplificados são realizadas ao final da reação, envolvendo eletroforese e análise de imagem; na PCR-TR o produto amplificado é quantificado a cada ciclo, simultaneamente à reação. Para isso a técnica emprega, além de *primers*, sondas marcadas com fluoróforos cujo sinal emitido é diretamente proporcional ao número de *amplicons* gerados (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016b).

A PCR-TR explora a atividade nuclease 5' da DNA polimerase para clivar uma sonda marcada com fluoróforo durante a reação. A sonda é um oligonucleotídeo (17-35pb) marcado com um fluoróforo sinalizador de curto comprimento de onda (*reporter*) em sua extremidade 5' e um fluoróforo silenciador de longo comprimento de onda (*quencher*) em sua extremidade 3' (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). Quando a sonda está intacta, a proximidade entre o *reporter* e o *quencher* resulta na supressão da fluorescência do primeiro. Isso se deve ao fenômeno de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET, do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016a).

Durante a amplificação a sonda hibridiza com uma sequência complementar do DNA alvo. Quando a extensão do *primer* alcança a região onde a sonda se ligou a atividade nucleasa 5' da DNA polimerase cliva a sonda separando o *reporter* do *quencher*. Isto, por sua vez, resulta em emissão de fluorescência pelo *reporter* (Figura 2) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016a). Como a DNA polimerase cliva exclusivamente sondas que estão hibridizadas com o alvo, o acúmulo de *amplicons* pode ser diretamente mensurado pela variação da fluorescência emitida (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Como nas demais técnicas baseadas em PCR, três etapas principais se repetem a cada ciclo na PCR-TR: desnaturação, anelamento e extensão. As reações geralmente são executadas por 40 a 50 ciclos. O equipamento utilizado combina termociclagem e um *software* que analisa a variação da fluorescência ao longo da corrida, gerando um gráfico de amplificação (*amplification plot*) (Figura 3). Essa ferramenta permite calcular ainda a quantidade inicial de DNA alvo na amostra - por isso a técnica também é conhecida como PCR quantitativo (q-PCR) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016b).

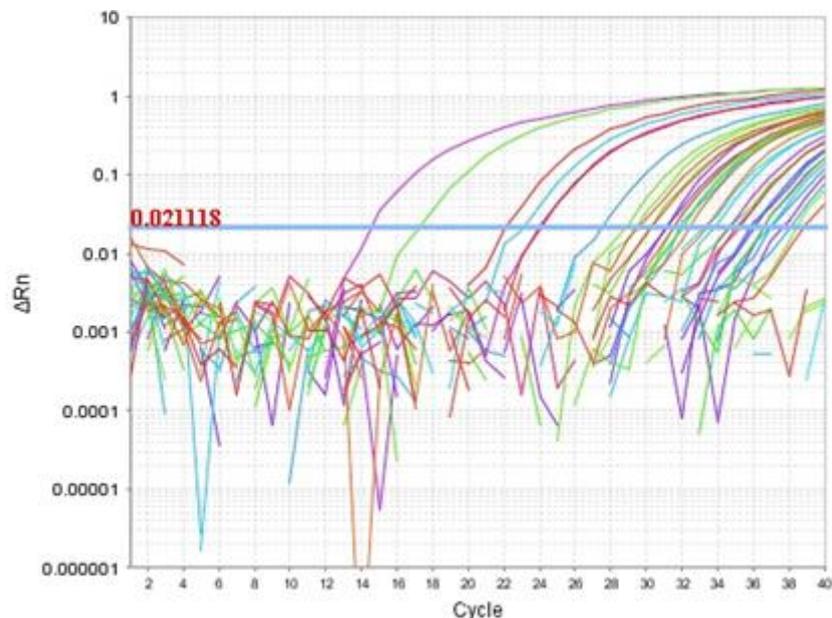


**Figura 2** – Representação esquemática da hidrólise da sonda. Fonte: Adaptado de WHO (2011) conforme autorização (Anexo II).

O valor do *cycle threshold* (Ct) é o número do ciclo da reação no qual o sinal fluorescente emitido excede o nível de fluorescência basal automaticamente calculado pelo *software* (*auto-treshold*), indicando a amplificação da sequência alvo (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). Se nenhuma variação na fluorescência for observada até final da reação, ou se a variação não ultrapassar o *auto-treshold*, a amostra é considerada negativa para o alvo pesquisado (CORLESS et al., 2001).

A quantidade inicial de DNA alvo para adequada detecção através da PCR-TR varia de 10 a 1.000 cópias, o que equivale a aproximadamente 100pg-1µg de DNA genômico (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016b).

As vantagens da PCR-TR sobre a técnica convencional incluem: amplificação e detecção em um sistema fechado, reduzindo as chances de contaminação; capacidade de quantificar o número de *amplicons* a cada ciclo; dispensa etapas posteriores para análise de produtos; menor tempo de execução (cerca 2,5 horas a partir de DNA já extraído); processamento de grande número de amostras simultaneamente (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016b; CORLESS et al., 2001).



**Figura 3** - Gráfico de amplificação. Fonte: A autora.

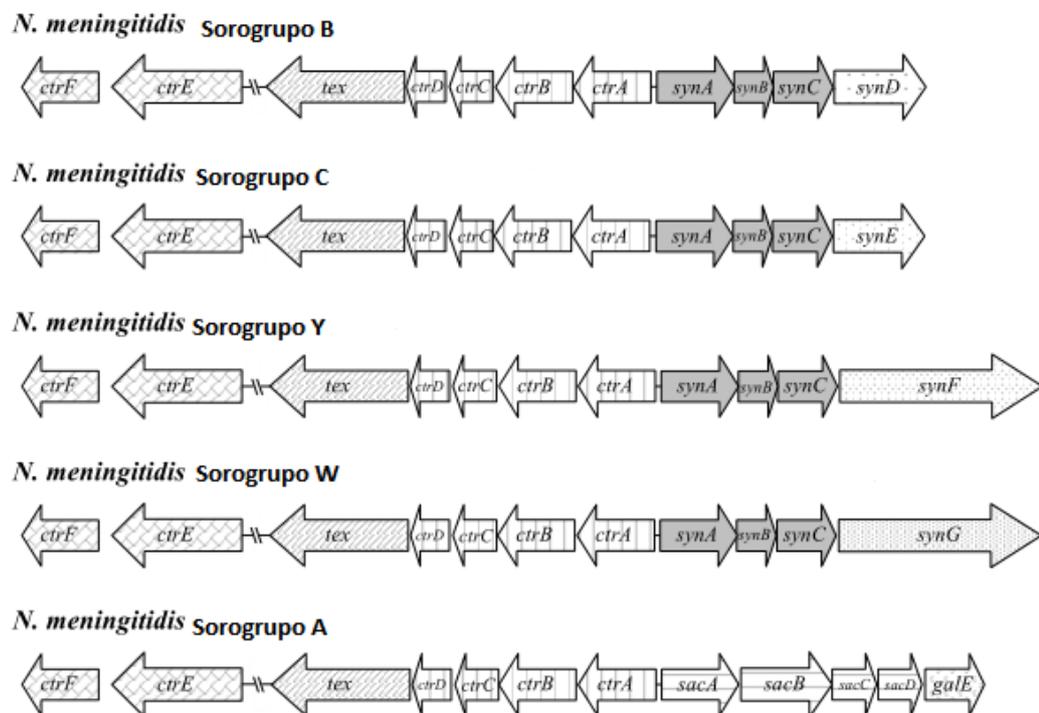
Diante dos diversos trabalhos validando a técnica (CORLESS et al., 2001; HIGA et al., 2013; MOTHERSHED et al., 2004; WHO, 2011; THOMAS et al., 2011) e das vantagens descritas, em 2013 a Coordenadoria Geral de Laboratórios/MS decidiu recomendar a PCR-TR

para o diagnóstico das meningites bacterianas em todos os estados brasileiros (SALGADO et al., 2013).

### 2.2.5.1 Alvos genéticos

O locus de síntese capsular do meningococo (*cps*) consiste em seis regiões: D-A-C-E-D'-B (HARRISON et al., 2013). As regiões A, B e C contêm os genes necessários para a síntese, modificação e transporte da cápsula polissacarídica; só estão presentes em meningococos encapsulados. Supõe-se que as cepas encapsuladas de *N. meningitidis* tenham evoluído a partir de um ancestral não encapsulado através da aquisição horizontal de material genético de outras bactérias (SCHOEN et al., 2009).

A região C do locus *cps* é formada por um operon (*ctr*) de quatro genes (*ctrA*, *ctrB*, *ctrC* e *ctrD*) que estão implicados na translocação dos polissacarídeos capsulares do citoplasma para a superfície celular (Figura 4) (HARRISON et al., 2013; SCHOEN et al., 2009).



**Figura 4** – Mapa genético do locus *cps* de *N. meningitidis*. Fonte: Adaptado de WHO (2011) conforme autorização (Anexo II).

O *ctrA* codifica uma lipoproteína de membrana externa de mesmo nome, exclusiva de *N. meningitidis*. Ele está geralmente conservado nos meningococos encapsulados

independentemente do tipo capsular; por isso é o alvo mais comumente utilizado para a pesquisa de *N. meningitidis* a partir do LCR (CLAUS et al., 2005). No entanto, Claus e colaboradores (2002) em clássico estudo de colonização, demonstraram que cerca de 16% dos meningococos isolados da nasofaringe de portadores assintomáticos sofreram rearranjos do locus *cps* e perderam o gene *ctrA*.

A partir dessa problemática foi validado um ensaio alternativo para detecção de *N. meningitidis* utilizando como alvo genético o *sodC*. Esse gene codifica uma enzima periplasmática, a superóxido dismutase, que também é exclusiva da espécie. Até o momento não há relato de cepas meningocócicas que tenham perdido esse gene (THOMAS et al., 2011).

Voltando ao locus *cps*, região A é um operon que contém genes codificadores de enzimas para a biossíntese da cápsula. Esses genes são específicos para cada tipo capsular (CLAUS et al., 2005). Mothershed e colaboradores (2004) validaram a PCR-TR para determinação do tipo capsular de *N. meningitidis* (SGS-PCR, do inglês *Serogroup-Specific PCR*).

Nas cepas que sintetizam a cápsula de ácido siálico, a região A é formada por um operon (*syn*) com quatro genes: os três primeiros (*synA-synB-synC*) codificam as enzimas que sintetizam o ácido siálico. O quarto gene do operon varia conforme o tipo capsular e codifica a polimerase que catalisa a ligação dos homopolímeros de ácido siálico (*synD*-sorogrupoB e *synE*-sorogrupoC) ou a ligação de ácido siálico com outros açúcares (*synF*-sorogrupoY e *synG*-sorogrupoW).

Nas cepas do sorogrupo A, que sintetizam a cápsula de N-acetilmanosamina, a região A é formada por um operon (*sac*) com quatro genes específicos (*sacA-sacB-sacC-sacD*). As cepas dos demais tipos capsulares possuem outras variações específicas na região A do locus *cps* (DOLAN-LIVENGOOD et al., 2003).

#### 2.2.5.2 Estratégia diagnóstica

A WHO (2011) preconiza que o diagnóstico da DM através da PCR-TR utilize duas abordagens: primeiro ensaio espécie-específico para detecção e subsequente ensaio sorogrupo-específico para caracterização da bactéria. A fim de otimizar tempo e recursos, os ensaios SGS-PCR devem seguir algoritmos de acordo com a epidemiologia local e perfil microbiológico conhecido.

### 2.2.6 Tratamento

A antibioticoterapia precoce (preferencialmente após a coleta de espécimes clínicos para testes diagnósticos) é o foco do tratamento. O MS preconiza o tratamento de adultos com Cefalosporinas de terceira geração (Ceftriaxone intravenoso por sete dias) (BRASIL, 2014a). Para crianças, as opções são Ampicilina, Penicilina ou Ceftriaxone intravenoso (BRASIL, 2014a). A administração de antibiótico intramuscular no pré-hospitalar é uma prática em situações epidêmicas em países em desenvolvimento (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

O relato de cepas resistentes às Sulfonamidas vem aumentando e também há relatos de susceptibilidade reduzida à Penicilina, Rifampicina e Ciprofloxacino (WHO, 2011). Ribeiro (2015) descreveu uma taxa de resistência à Penicilina de 13% em cepas provenientes de pacientes atendidos no Hospital Couto Maia entre 2010 e 2013.

### 2.2.7 Profilaxia

A prevenção da DM é feita através da quimioprofilaxia de contactantes e das vacinas meningocócicas (de rotina ou bloqueio). A quimioprofilaxia é uma medida eficaz na prevenção de casos secundários e controle de pequenos surtos; está indicada para todos os contatos íntimos do caso índice e deve ser administrada até 48 horas após exposição. As opções de quimioprofilático são Rifampicina, Ceftriaxone ou Ciprofloxacino (BRASIL, 2014a).

As vacinas meningocócicas são o pilar da profilaxia e controle da DM (DRETTLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018) e serão discutidas em seção subsequente.

## 2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA

A DM acomete indivíduos de todas as idades, mas as maiores incidências ocorrem entre crianças abaixo de cinco anos. Essa ocorrência pode ser justificada pela queda nos títulos de anticorpos maternos e pela imaturidade do sistema imunológico dos lactentes (ROSENSTEIN et al., 2001). Na Europa e Estados Unidos ocorre um segundo pico de incidência entre adolescentes e adultos jovens, o que não é verificado no Brasil (ANDRADE et al., 2017) nem na maioria dos países da América Latina, exceto durante as epidemias (SÁFADI; CINTRA, 2010).

É relatada uma prevalência discretamente maior no sexo masculino (SÁFADI; BARROS, 2006). Em relação à sazonalidade, o número de casos de DM aumenta nos meses de inverno (ROSENSTEIN et al., 2001).

Define-se um surto comunitário de DM quando ocorrem três ou mais casos primários, do mesmo sorogrupo, confirmados por critério laboratorial específico (cultura e/ou PCR) em período inferior ou igual a três meses, em residentes da mesma área geográfica, que não sejam comunicantes entre si, resultando em uma taxa de ataque primária  $\geq 10$  casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2014a).

### 2.3.1 Doença meningocócica no mundo

A DM é uma agravo que ocorre de forma universal. Roupael e Stephens (2012) estimam cerca de 1,2 milhões de casos de DM por ano no mundo, resultando em aproximadamente 135.000 mortes. As epidemias causadas pelo sorogrupo A são mais graves e geram altas taxas de incidência em períodos relativamente curtos; já as decorrentes dos sorogrupos B e C atingem menor incidência e são mais prolongadas (NUNES; BARRETO; SACRAMENTO, 2013).

Nos países desenvolvidos a DM ocorre principalmente de forma endêmica. Nos EUA as taxas de incidência vêm declinando desde os anos 90 e em 2015 foi de 0,12 casos/100.000 hab., sendo o sorogrupo B o mais prevalente (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). Na Europa, Austrália, Canadá e Japão também predomina este sorogrupo. Especificamente no Reino Unido, após a campanha de imunização contra o meningococo do sorogrupo C, cerca de 90% dos casos de DM tem como agente etiológico o meningococo B (GASPARINI et al., 2015).

Na Ásia os grandes surtos de DM pelo sorogrupo A têm sido substituídos pelos sorogrupos B e C (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). No início dos anos 2000 o sorogrupo W emergiu no continente, causando epidemias associadas ao Hajj na Arábia Saudita (ABAD et al., 2014; LINGAPPA et al., 2003).

A epidemiologia da DM na América Latina expõe diferenças marcantes entre os países (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). A incidência anual da doença varia de 0,1 caso/100.000 habitantes (México, Peru, Paraguai) a 2,0 casos/100.000 habitantes (Chile). Os sorogrupos mais prevalentes são B e C. Recentemente vêm emergindo os sorogrupos W e Y em alguns países como Chile, Colômbia e Venezuela (ABAD et al., 2014).

A DM persiste como grave problema de Saúde Pública no continente africano, na região conhecida como “cinturão africano da meningite”. Essa é uma área hiper-endêmica que engloba 26 países e uma população total de 400 milhões de pessoas (WHO, 2015). Ocorrem repetidos surtos de meningite pelo sorogrupo A com taxas de incidência que chegam a 1.000 casos/100.000 habitantes (WHO, 2011). Além disso, em 2002 o continente vivenciou um grande surto de DM pelo sorogrupo W em Burkina Faso (ABAD et al., 2014).

### 2.3.2 Doença meningocócica no Brasil

A maior epidemia brasileira de DM ocorreu no início dos anos 70, no estado de São Paulo, ocasionada pelos sorogrupos A e C, e alcançou um pico de incidência de 179 casos/100.000 habitantes (SÁFADI; BARROS, 2006). Em 1975 foi criado o Sistema de Vigilância Epidemiológica das Meningites (SVE/Meningites) que compreende todas as atividades e setores envolvidos na identificação, manejo, prevenção e controle da doença (BRASIL, 2009).

Na década de 80 o sorogrupo C perdeu o protagonismo para o B e só voltou a aumentar a partir dos anos 2000, quando se tornou o mais prevalente do país. Pequenos surtos causados pelo meningococo C foram registrados entre 2004-2008 na região Sudeste (SÁFADI; CINTRA, 2010) e em 2010 a capital baiana viveu uma epidemia causada por este sorogrupo (CARDOSO et al., 2012).

Atualmente a DM é considerada endêmica no país, com ocorrência esporádica de surtos geralmente limitados a um único município e as taxas nacionais de incidência têm diminuído desde 2010 (Tabela 1) (BRASIL, 2016a; 2017). A DM é um agravo de notificação compulsória imediata (BRASIL, 2016a).

**Tabela 1** - Incidência de DM no Brasil de 2010 a 2016.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<b>Todos os sorogrupos</b>	1,57	1,48	1,33	1,09	0,83	0,67	0,57
<b>Sorogrupo C</b>	0,64	0,60	0,53	0,38	0,28	0,18	0,16

**Fonte:** Brasil (2017).  
Incidências por 100.000 habitantes.

O boletim epidemiológico das meningites no Brasil 2007-2013 relata a ocorrência dos sorogrupos A, B, C, E, W e Y (BRASIL, 2016b). Nos dados oficiais do SINAM (BRASIL, 2018b) há registro adicional dos sorogrupos X e Z entre 2008 e 2017.

Por ordem de prevalência, os principais sorogrupos circulantes no Brasil são C, B, W e Y, sendo o meningococo C o mais frequente também a nível estadual (BAHIA, 2018a; BRASIL, 2017).

## 2.4 VACINAS MENINGOCÓCICAS

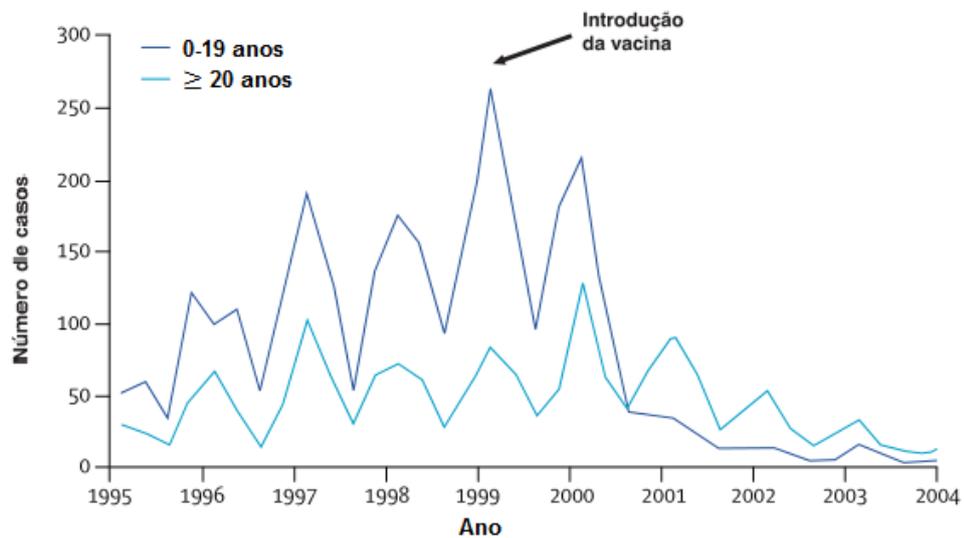
### 2.4.1 Histórico

A proteção contra o meningococo é mediada por anticorpos contra os polissacarídeos capsulares sorogrupo-específicos (GOLDSCHNEIDER; GOTSCHLICH; ARTENSTEIN, 1969). As primeiras vacinas meningocócicas polissacarídicas foram desenvolvidas nos anos 70, mas possuíam algumas limitações como fraca imunogenicidade em crianças abaixo de dois anos, não induziam memória imunológica e tinham baixo impacto sobre a colonização nasofaríngea (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

Na década de 80 foram produzidas as primeiras vacinas meningocócicas contendo polissacarídeos do sorogrupo C conjugados a proteínas carreadoras: toxina diftérica (CRM<sub>197</sub>) ou toxóide tetânico (TT). As vacinas polissacarídicas conjugadas têm elevada eficácia entre os menores de dois anos e induzem memória imunológica duradoura, além de minimizar a colonização nasofaríngea (CDC, 2013; DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

As vacinas meningocócicas conjugadas reduzem a prevalência de portadores assintomáticos entre os vacinados e minimizam a circulação do patógeno na população geral. Isso faz com que a incidência da doença também diminua na população não vacinada, resultado da imunidade de grupo, conhecido como “efeito rebanho” (MAIDEN; STUART, 2002; MAIDEN et al., 2008; RAMSAY et al., 2003).

Em 1999 o Reino Unido foi o primeiro país a incluir a MenC em seu calendário nacional de imunização, vacinando todos os indivíduos de até 18 anos (Figura 6) (TROTTER et al., 2004). Houve redução de 86,7% na incidência de DM pelo sorogrupo C no período pós-vacinal (1999-2001) e a efetividade da vacina ficou entre 89,3% e 91,5% (BALMER; BORROW; MILLER, 2002). O sucesso da experiência britânica levou à adoção da MenC por outros países da Europa, EUA, Canadá e Austrália (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).



**Figura 5** – Impacto da Vacina Meningocócica C Conjugada no Reino Unido. Fonte: Adaptado de Trotter e colaboradores (2004) conforme autorização (Anexo III).

Houve receio de que a imunização com a MenC pudesse resultar na substituição do sorogrupo vacinal, fenômeno que não tem se confirmado até então pelos estudos conduzidos em vários países (ABAD et al., 2014; CAMPBELL et al., 2010).

Em 2005 foi licenciada nos EUA a primeira vacina meningocócica quadrivalente contendo polissacárides dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados a proteína do toxóide diftérico (DRETHER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). Em 2009 uma vacina meningocócica A conjugada de baixo custo foi desenvolvida com o apoio da WHO para tentar controlar a DM no cinturão africano da meningite (DAUGLA et al., 2014; WHO, 2015).

A vacina meningocócica B, diferentemente das anteriormente descritas, não se baseia em antígenos capsulares - o polissacáride do sorogrupo B é fracamente imunogênico devido a sua semelhança estrutural com moléculas do tecido neuronal humano (GASPARINI et al., 2015). A vacina meningocócica B recombinante foi obtida em 2013 com auxílio da vacinologia reversa e possui quatro antígenos subcapsulares protéicos (NHBA, NadA, fHbp, PorA). O perfil de expressão dessas proteínas pode variar temporal e geograficamente, o que limita sua efetividade (SBIIm, 2015).

#### 2.4.2 Vacinas meningocócicas no Brasil

Atualmente estão licenciados no Brasil os seguintes imunobiológicos para prevenção da DM (SBIIm, 2015; 2018):

- Vacina meningocócica C conjugada - polissacáride do sorogrupo C conjugado ao toxóide diftérico (Menjugate<sup>®</sup>) ou tetânico (Neisvac<sup>®</sup>);
- Vacina meningocócica conjugada quadrivalente - polissacárides dos sorogrupos A, C, W e Y conjugados ao toxóide diftérico (Menactra<sup>®</sup>/Menveo<sup>®</sup>) ou tetânico (Nimenrix<sup>®</sup>);
- Vacina meningocócica B recombinante - antígenos subcapsulares do sorogrupo B (Bexsero<sup>®</sup>).

Os esquemas vacinais variam conforme o imunobiológico de escolha e a idade do indivíduo.

A vacina meningocócica C conjugada (FUNED/GSK/Novartis) é disponibilizada gratuitamente pelo PNI - as demais só estão disponíveis na rede particular. Está indicada para a prevenção da doença sistêmica causada por *N. meningitidis* do sorogrupo C. Uma dose (0,5mL da vacina reconstituída) contém oligossacarídeo meningocócico C conjugado a proteína CRM<sub>197</sub> de *Corynebacterium diphtheriae* mais excipientes. Estão mantidas as contraindicações gerais para vacinas bacterianas e não é indicada para menores de dois meses de idade. As reações adversas mais comuns são eritema e edema local (BRASIL, 2014b; 2018a).

Desde 2003 a MenC já era oferecida para grupos de risco nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIES) (BRASIL, 2013).

Devido ao aumento da incidência de DM pelo sorogrupo C entre 2007 e 2009, em fevereiro de 2010 o estado da Bahia introduziu a MenC no calendário de vacinação infantil para menores de dois anos. Além disso, realizou-se uma campanha *catch-up* para a faixa etária de 0-4 anos (CARDOSO et al., 2012).

Contudo, em Salvador, o número de casos entre adolescentes e adultos jovens continuou aumentando. Como medida para conter a epidemia no município, foi conduzida uma campanha *catch-up* entre maio e agosto de 2010, direcionada a indivíduos de 10-24 anos. As coberturas vacinais estimadas foram 92%, 80%, 67% e 41% nas faixas etárias de 0-4, 10-14, 15-19 e 20-24 anos respectivamente (CARDOSO et al., 2012; 2015). Importante destacar a situação especial de Salvador, único município no Brasil que vacinou adolescentes e adultos

jovens, o que parece ter impactado positivamente no controle local da DM (MACEDO et al., 2018).

Em outubro de 2010 o MS incluiu a MenC no calendário nacional de vacinação da criança (BRASIL, 2013). O esquema do PNI corresponde a duas doses, administradas aos três e cinco meses de idade e reforço aos 12 meses. Para as crianças de 1-4 anos sem comprovação vacinal ou com esquema incompleto, administra-se dose única. Desde 2017 a estratégia vacinal passou a contemplar adolescentes e o calendário vacinal de 2018 inclui a população de 11-14 anos de idade, considerando segundo reforço ou dose única conforme situação vacinal (BRASIL, 2016c, 2018d, 2018e).

Considerando a estratégia instituída em 2010 para controle da DM, que foi a imunização sorogrupo específica de faixas etárias alvo, torna-se essencial avaliar o impacto dessa intervenção, a longo prazo, na trajetória da doença no nosso cenário.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da Vacina Meningocócica C Conjugada (MenC) na incidência da doença meningocócica na Região Metropolitana de Salvador (RMS), seis anos após sua introdução no Programa de Imunizações.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar incidência e letalidade da DM na RMS nos períodos de pré-vacinal (2005-2009) e pós-vacinal (2011-2016);
2. Descrever o perfil clínico-laboratorial dos casos de DM atendidos no Hospital Couto Maia;
3. Ampliar os índices de confirmação laboratorial da DM através do emprego da técnica de PCR-TR;
4. Descrever a frequência e distribuição dos tipos capsulares de *N. meningitidis*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 TIPO, LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO**

Este foi um estudo de vigilância de base hospitalar, do tipo corte transversal, observacional e descritivo. Foram incluídos todos os pacientes atendidos no Hospital Couto Maia (referência estadual para doenças infectocontagiosas) com diagnóstico confirmado de DM no período referente à janeiro de 2005 a dezembro de 2016. Em virtude de uma colaboração com a Secretaria Municipal de Saúde de Salvador (SMS), também foram incluídos nos cálculos de incidências casos confirmados de DM notificados por outras instituições de saúde (públicas e privadas) do município no mesmo período.

### **4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico confirmado de DM através de técnicas microbiológicas clássicas (cultura de LCR/sangue, bacterioscopia, aglutinação em látex) ou através da técnica de PCR-TR a partir do LCR; atendidos no HCM ou notificados pela SMS, no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2016.

### **4.3 COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Os dados epidemiológicos foram extraídos a partir do banco de dados do estudo de Meningites Bacterianas da FIOCRUZ/BA.

Os dados referentes aos casos de outras instituições de saúde do município foram compartilhados anonimamente pela SMS. Esses casos foram incluídos nos cálculos de incidência a fim de melhorar o poder do estudo.

### **4.4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

De acordo com o protocolo do HCM, todos os pacientes com suspeita clínica de meningite infecciosa são submetidos à coleta de LCR; a rotina inclui análise quimiocitológica, bacterioscopia direta (coloração de Gram), aglutinação em látex e cultura, conforme protocolos institucionais. Amostras de sangue para hemocultura são coletadas de alguns casos suspeitos de acordo com indicação médica.

O estudo do LCR foi realizado no laboratório de análises clínicas do hospital. Após os testes de rotina, quando houve excedente, as amostras de LCR (0,5-1,0mL) foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) no Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA para armazenamento a -70°C e posteriores testes moleculares (PCR-TR).

#### 4.4.1 Isolamento primário

Essa etapa foi realizada no setor de Microbiologia do laboratório de análises clínicas do HCM. A cultura do LCR foi realizada em placas de ágar sangue preparadas com base *Trypticase Soy Agar* (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, incubadas a 35°C a 5% CO<sub>2</sub> por 24-48 horas. Após o isolamento, a identificação foi realizada através da coloração de Gram (presença de diplococos Gram-negativos) e aglutinação utilizando anti-soro específico para *N. meningitidis* (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA).

#### 4.4.2 Conservação dos isolados

Os isolados identificados como *N. meningitidis* foram enviados ao LPBM. Após novo repique em ágar sangue acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado as amostras foram incubadas a 35°C a 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o crescimento realizou-se nova coloração de Gram para afastar contaminação e as amostras foram estocadas a -70°C sob a forma de suspensão em caldo BHI (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) contendo 10% de glicerol.

#### 4.4.3 Determinação dos tipos capsulares

A determinação dos sorogrupos foi realizada através de soroaglutinação (SASG) para os casos de cultura positiva. Além disso, a PCR-TR foi utilizada para genogrupagem das amostras que foram positivas para *N. meningitidis* pelo método molecular.

#### 4.4.4 PCR em Tempo Real

Essa etapa foi executada no Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

##### 4.4.4.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir das amostras de LCR que estavam congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  no LPBM ( $n=1.010$ ). Foi utilizado o kit comercial Mini KitQIAamp<sup>®</sup>DNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA).

A princípio foram adicionados 200 $\mu\text{L}$  de LCR a 100 $\mu\text{L}$  de Tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8,0) contendo 0,04g/mL de Lisozima e 75U de Mutanolisina (Sigma, St. Louis, MO); a mistura foi incubada durante uma hora em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram adicionados 20 $\mu\text{L}$  de Proteinase K e 200 $\mu\text{L}$  de Tampão AL e a mistura foi incubada a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 260 $\mu\text{L}$  de Etanol (99%), a mistura foi vortexada por 15 segundos e pipetada (700 $\mu\text{L}$ ) para a coluna de separação *QIAamp Spin* anexada a um tubo de coleta. Essa coluna foi centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. Na etapa seguinte a coluna foi transferida para outro tubo de coleta e colocada em contato com Tampão AW1 (500 $\mu\text{L}$ ), centrifugada a 8.000 rpm por um minuto; depois disso foi transferida para novo tubo de coleta, colocada em contato com Tampão AW2 (500 $\mu\text{L}$ ) e centrifugada a 14.000 rpm por três minutos. Ao final, a coluna de separação foi transferida para um tubo de microcentrífuga de capacidade 1,5mL; 100 $\mu\text{L}$  de Tampão AE foi adicionado para eluição e incubada por cinco minutos em temperatura ambiente. A coluna foi novamente centrifugada a 8.000 rpm por dois minutos, finalizando com a captação do DNA no tubo de microcentrífuga. O DNA foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

Como controle negativo da extração foi utilizada água ultrapura.

##### 4.4.4.2 Ensaaios

As reações empregaram o sistema TaqMan<sup>®</sup> e utilizaram a plataforma 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems). Foram utilizadas sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB contendo um *reporter* (fluoróforo FAM<sup>™</sup>) em sua extremidade 5' e um NFQ (do inglês, *Nonfluorescent Quencher*) na extremidade 3' (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Foram utilizados os *primers* e as sondas referenciados pela WHO (2011) que estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2** – *Primers* e sondas utilizados para detecção e genogrupagem de *N. meningitidis*.

Gene alvo	Nome	Sequência 5' - 3'	Concentração final (nM)
<i>ctrA</i>	F753	TGTGTTCCGCTATACGCCATT	300
	R846	GCCATATTCACACGATATAACC	900
	Pb820i	AACCTTGAGCAATCCATTTATCCTGACGTTCT	100
<i>sodC</i>	F351	GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT	300
	R478	CCACCCGTGTGGATCATAATAGA	600
	Pb387i	CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTTT	100
<i>sacB</i>	F2531	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA	300
	R2624	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG	900
NmA	Pb259i	CTAAAAGTAGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT	100
<i>synD</i>	F737	GCTACCCCATTTTCAGATGATTTGT	300
	R882	ACCAGCCGAGGGTTTATTTCTAC	300
NmB	Pb839i	AAGAGATGGGYAACAACACTATGTAATGTCTTTATTT	100
<i>synE</i>	F478	CCCTGAGTATGCGAAAAAAATT	900
	R551	TGCTAATCCCGCCTGAATG	300
NmC	Pb495i	TTTCAATGCTAATGAATACCACCGTTTTTTTTGC	100
<i>synF</i>	F787	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC	900
	R929	TTGCTAAAATCATTCGCTCCATAT	600
NmY	Pb109i	TATGGTGTACGATATCCCTATCCTTGCCTATAAT	100
<i>synG</i>	F857	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG	100
	R964	TTGCCATTCCAGAAATATCACC	900
NmW	Pb907i	AAATATGGAGCGAATGATTACAGTAACTATAATGA	200

**Fonte:** WHO (2011).

**Legenda:** F - *primer forward*; R - *primer reverse*; Pb – sonda; Nm – *Neisseria meningitidis*; nM – nanomolar.

Foi utilizado o Master Mix PCR Universal TaqMan® 2X que contém: DNA Polimerase AmpliTaqGold® Ultra Pura, N-uracilglicosilase, dNTPs, fluoróforo de referência passiva ROX™ e componentes tampão (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (colunas alternadas, 48 reações por placa). Para cada reação foi utilizado um volume total de 25µL, sendo 23µL da mistura

(12,5µL de Master Mix + 4,5µL de H<sub>2</sub>O de PCR + 2µL de *primer forward* + 2µL de *primer reverse* + 2µL de sonda) e 2µL de DNA (WHO, 2011).

Foram utilizados os seguintes parâmetros de ciclagem, adaptado de Wu e colaboradores (2013):

- 50°C por 2 minutos;
- 95°C por 10 minutos;
- 40 ciclos de 95°C por 15 segundos + 60°C por 1 minuto.

Os valores de *cut-off* adotados foram os seguintes (WHO, 2011):

- Amostras com Ct ≤ 35 foram consideradas positivas;
- Amostras com Ct 36-40 foram consideradas indeterminadas;
- Amostras com Ct > 40 foram consideradas negativas.

As amostras cujo resultado foi indeterminado (Ct 36-40) foram diluídas DNA:H<sub>2</sub>O para PCR 1:1, na tentativa de diluir possíveis inibidores da reação. As diluições foram retestadas para o mesmo gene alvo, mantidos os mesmos parâmetros da primeira reação. Se o Ct da amostra diluída foi ≤ 35, a amostra passou a ser considerada positiva; se o Ct permaneceu na faixa de 36-40, a amostra manteve-se como indeterminada (WHO, 2011; THOMAS et al., 2011). As amostras com resultado indeterminado foram consideradas negativas em todas as análises (WU et al., 2013).

Todas as reações incluíram um controle negativo - contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA, substituído por H<sub>2</sub>O para PCR. Todas as reações também incluíram um controle positivo (Tabela 3); a extração de DNA desses isolados foi realizada utilizando o Mini KitQIAamp<sup>®</sup>DNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA) seguindo instruções do fabricante.

**Tabela 3** - Cepas de referência utilizadas como controles positivos nas reações de PCR-TR.

<b>Cepa</b>	<b>Tipo capsular</b>
ATCC 13077	A
Nm Ref 2726	A
ATCC 13090	B
ATCC 13102	C
GNC 671	Y
GNC 688	Y
GNC 702	W
Nm Ref 7034	W

**Fonte:** A autora.

#### 4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo é parte do projeto intitulado “Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador, Bahia”, sua execução foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) envolvendo seres humanos, sob o parecer nº 044/2013 (Anexo V). Todos os participantes entrevistados e/ou seus responsáveis legais concordaram em participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo VI).

## 5 PROPOSTA DE ANÁLISE

O programa Epi-Info v.3.5.1 (CDC/USA) foi utilizado para armazenamento e análise dos dados no Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB) do IGM/FIOCRUZ-BA. A dupla digitação dos questionários foi realizada por estudantes de iniciação científica devidamente treinados. Após essa etapa, o banco de dados foi submetido ao processo de validação através do pacote *Data Compare* disponível no programa supracitado.

Para os cálculos de incidência, foi utilizado como denominador a população total e estratificada por faixa etária da Região Metropolitana de Salvador (RMS). A RMS é composta por 13 municípios (Camaçari, Candeias, Dias D'Ávila, Itaparica, Lauro de Freitas, Madre de Deus, Mata de São João, Pojuca, Salvador, São Francisco do Conde, São Sebastião do Passé, Simões Filho e Vera Cruz). Os dados foram extraídos do censo populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística considerando as projeções anuais do período (IBGE, 2018). As taxas de letalidade foram calculadas a partir da razão entre o número de óbitos e o número de casos.

Com base no ano de implementação da MenC (2010) os dados foram estratificados em dois períodos para análises comparativas: pré-vacinal (2005-2009) e pós-vacinal (2011-2016). O ano de 2010 foi excluído das análises comparativas por se tratar de ano epidêmico, o que poderia superestimar o impacto da vacina.

Na construção de tabelas, para as variáveis categóricas (sexo, admissão em UCI, uso prévio de antibiótico, desfecho e resultados de testes diagnósticos) foram determinadas frequências absolutas e relativas. Para as variáveis não categóricas (idade, dias de internação, dias na UCI) foi calculada a mediana e intervalos interquartílicos.

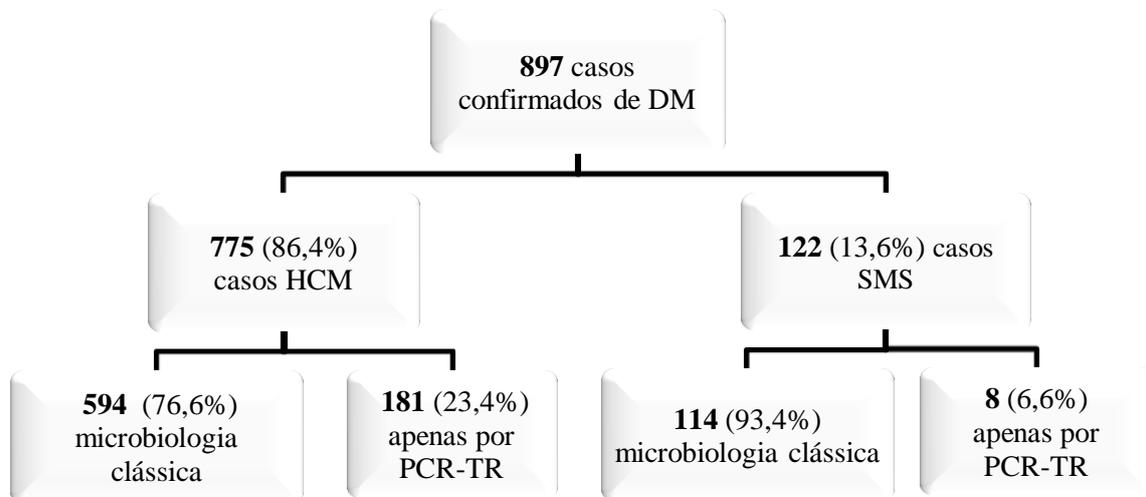
Testes de probabilidade estatística foram utilizados para avaliar a significância estatística entre as associações. O qui-quadrado de Mantel-Haenszel foi utilizado para comparação entre as variáveis categóricas; os testes de Mann-Whitney, exato de Fisher ou Kruskal-Wallis foram utilizados para a comparação entre as variáveis contínuas. Para análises univariadas os achados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $p$  foi  $<0,05$ . A medida de associação Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados para comparar os desfechos nos períodos pré e pós-vacinal.

A análise multivariada foi realizada através do modelo de regressão logística. As variáveis introduzidas no modelo incluíram aquelas para as quais foi verificado valor de  $p < 0,05$  nas análises univariadas (uso prévio de antibiótico, resultados de aglutinação em látex, bacterioscopia, cultura, PCR-TR e hemocultura).

## 6 RESULTADOS

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2016, foram registrados 897 casos de DM no HCM e outras instituições de saúde de Salvador (casos da SMS). Para a confirmação diagnóstica dos casos foi considerado o resultados dos testes de microbiologia clássica (cultura, bacterioscopia, aglutinação em látex) e/ou PCR-TR a partir do LCR.

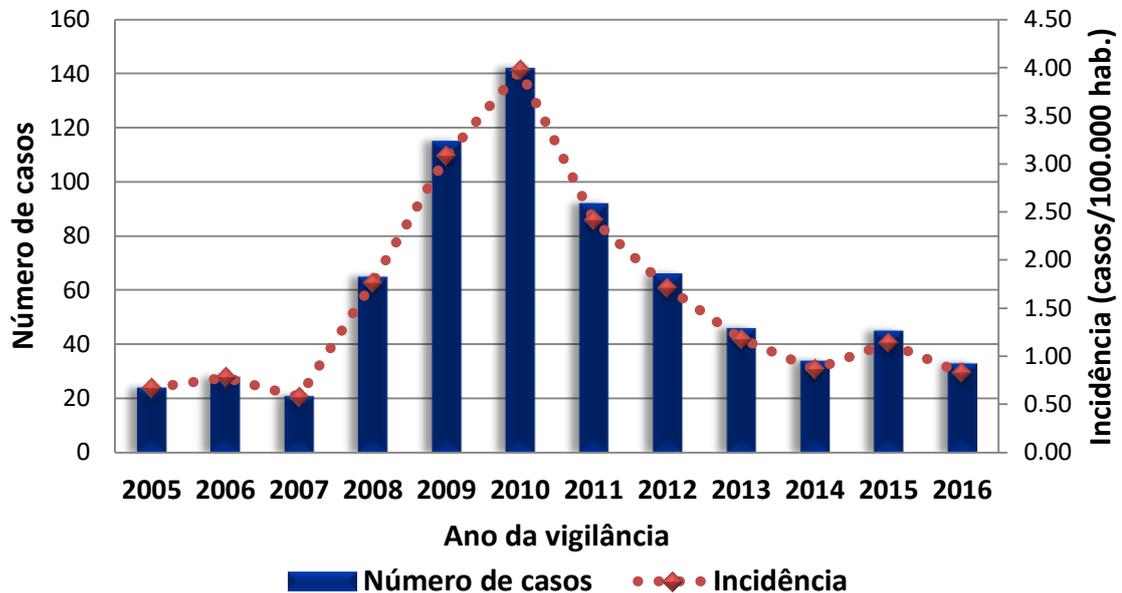
A grande maioria dos casos (86,4% [775/897]) foi proveniente do HCM. Nesta unidade hospitalar, 76,6% (594/897) dos casos foram confirmados através de técnicas de microbiologia clássica; em 23,4% (181/775) dos casos o diagnóstico tardio só foi possível com o emprego da técnica de biologia molecular. Dos casos da SMS (13,6% [122/897]), 6,6% (8/122) só foram diagnosticados através da PCR-TR (as amostras de LCR desses pacientes foram encaminhadas ao LACEN-BA onde foram analisadas). No geral, o emprego da PCR-TR permitiu identificar 189/897 casos adicionais, o que corresponde a 21,1% do total (Figura 6).



**Figura 6** – Casos confirmados de DM do HCM/SMS de jan/2005 a dez/2016. Fonte: A autora.

O Gráfico 1 representa o número de casos e a incidência de DM na RMS. A incidência anual média no período estudado foi de 1,58 casos/100.000 hab.. Essa taxa sofreu uma discreta redução após a implementação da MenC: de 1,37 (2005-2009) para 1,35 casos/100.000 hab (2011-2016) .

**Gráfico 1** – Número de casos confirmados e incidência de DM na RMS por ano do estudo (n=711).



**Fonte:** A autora.

A Tabela 4 traz as incidências de DM causada especificamente pelo meningococo C (DMC). São apresentadas duas informações complementares: as incidências anuais estratificadas por faixa etária e o percentual de redução das mesmas comparando-se com a média do período pré-vacinal (2005-2009). A taxa média de incidência na população vacinal (0-4 anos) caiu de 2,82 (2005-2009) para 1,14 casos/100.000 hab. (2011-2016), o que representa uma redução de 59,6% RR 0,47 IC95% (0,12-1,81).

A Tabela 5 traz o perfil clínico-epidemiológico dos 775 pacientes atendidos no HCM. Houve predomínio do sexo masculino (73,6%) e a mediana da idade foi de 16 anos. O tempo de internação dos pacientes apresentou uma mediana de 11 dias e 16,4% deles foram encaminhados para a Unidade de Cuidados Intensivos (UCI). 35,9% dos pacientes fez uso prévio de antibiótico. Essa variável englobou os pacientes que durante a entrevista referiram o uso de qualquer antibiótico nos últimos 30 dias; e os pacientes que foram admitidos no HCM em uso de antibioticoterapia para tratamento de DM instituída em outro serviço de saúde. A taxa de letalidade para os casos atendidos no HCM foi de 10,4%.

**Tabela 4** – Incidência e percentual de redução da incidência de DMC na RMS no período pós-vacinal, por ano e faixa etária.

Incidências por faixa etária	Pré-vacinal						Transição	Pós-vacinal						
	2005	2006	2007	2008	2009	Média		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<b>0-4</b>	1,57	1,97	1,55	2,30	6,70	2,82	2,11	1,61 (42,8)	0,84 (70,2)	1,25 (55,6)	1,28 (54,7)	0,91 (67,8)	0,93 (66,9)	1,14 (59,6)
<b>5-9</b>	0,34	1,02	2,71	0,71	2,44	1,44	6,32	3,12 (-116,6)	1,49 (-3,0)	0,76 (47,2)	0,38 (73,4)	0,76 (47,2)	0,78 (45,7)	1,22 (15,3)
<b>10-14</b>	0,63	0,63	1,59	2,23	4,07	1,83	6,81	2,95 (61,2)	1,91 (-4,2)	0,64 (65,3)	1,02(44,0)	0,35(80,7)	0,00(100)	1,14 (37,8)
<b>15-24</b>	0,00	0,42	0,99	1,27	1,64	0,86	4,87	1,90 (-119,3)	0,95 (-9,5)	1,59 (-84,0)	0,31 (64,2)	0,78 (9,8)	0,87 (-0,9)	1,07 (-24,4)
<b>≥25</b>	0,05	0,10	0,19	0,52	0,95	0,36	2,18	1,45 (-301,2)	1,08 (-199,5)	0,78 (-114,6)	0,20 (44,6)	0,20 (45,9)	0,15 (57,7)	0,64 (-77,8)
<b>Total</b>	0,22	0,42	0,77	0,95	1,82	0,84	3,33	1,78 (-113,1)	1,14 (-36,4)	0,92 (-10,6)	0,36 (57,4)	0,38 (54,7)	0,30 (64,4)	0,81 (3,6)

**Fonte:** A autora.

Incidências por 100.000 habitantes. O percentual de redução da incidência, que aparece entre parênteses, foi calculado comparando a incidência de cada faixa etária em cada ano pós-vacinal com a taxa média correspondente no período pré-vacinal.

Dentre os testes microbiológicos clássicos realizados a partir do LCR, o que obteve maior índice de positividade para *N. meningitidis* foi a aglutinação em látex (77,0%), seguida da bacterioscopia (68,8%), e por último, a cultura (40,7%). A PCR-TR foi realizada para 520 amostras de LCR e foi positiva em 81,3% destas. A hemocultura foi realizada para 510 pacientes e foi positiva em 19,8% deles.

**Tabela 5** – Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com DM no HCM de jan/2005 a dez/2016 ( $n=775$ ).

<b>Características</b>	<b>Casos (%)</b>
<b>Sexo</b> <sup>1</sup> ( $n=740$ )	
Masculino	445 (73,6)
<b>Idade</b> <sup>2</sup> ( $n=727$ )	16 (7-29) <sup>3</sup>
<b>Evolução clínica</b>	
Dias de internação ( $n=661$ )	11 (8-16) <sup>3</sup>
Admissão em UCI ( $n=618$ )	102 (16,4)
Dias na UCI ( $n=102$ )	7,5 (3-13) <sup>3</sup>
<b>Uso prévio de antibiótico</b> ( $n=463$ )	166 (35,9)
<b>Desfecho</b> ( $n=681$ )	
Óbito	71 (10,4)
<b>Análise líquórica</b>	
Agglutinação em Látex <sup>4</sup> ( $n=557$ )	429 (77,0)
Bacterioscopia <sup>4</sup> ( $n=756$ )	520 (68,8)
Cultura <sup>4</sup> ( $n=723$ )	294 (40,7)
PCR-TR <sup>4</sup> ( $n=520$ )	423 (81,3)
<b>Hemocultura</b> <sup>4</sup> ( $n=510$ )	101 (19,8)

**Fonte:** A autora.

<sup>1</sup> Informação de sexo não obtida de RNs; <sup>2</sup> Em anos; <sup>3</sup> Mediana (IQ 25-75%); <sup>4</sup> positiva para *N. meningitidis*.

Comparando as características clínico-epidemiológicas dos pacientes nos períodos pré (2005-2009) e pós-vacinal (2011-2016) (Tabela 6), percebe-se que o percentual de pacientes que fez uso prévio de antibiótico aumentou (de 28,2% para 45,1%), OR 2,1 IC 95% (1,3-3,3). Na análise multivariada o uso prévio de antibiótico permaneceu estatisticamente significativo quando comparado os dois períodos. A taxa de letalidade caiu de 10,2% para 9,6%, mas não de forma estatisticamente significativa.

Os percentuais de bacterioscopia, aglutinação em látex, cultura e hemocultura positivos para *N. meningitidis* foram menores no período pós-vacinal; inversamente, o percentual que foi positivo na PCR-TR aumentou de forma estatisticamente significativa.

**Tabela 6** – Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com DM no HCM, no período pré-vacinal (2005-2009), de transição (2010) e pós-vacinal (2011-2016) ( $n=775$ )

<b>Características</b>	<b>Período pré-vacinal <math>n=263</math> (%)</b>	<b>Período de transição <math>n=122</math> (%)</b>	<b>Período pós-vacinal <math>n=390</math> (%)</b>	<b><math>p</math> valor<sup>1</sup></b>	<b>Odds Ratio (IC 95%)</b>
<b>Sexo</b> ( $n=740$ ) <sup>2</sup>					
Masculino	154/263 (58,6)	81/122 (66,4)	210/355 (59,2)	0,88	1,0 (0,7-1,4)
<b>Idade</b> <sup>3</sup> ( $n=727$ )	11,5 (4-22) <sup>4</sup>	17,5 (10-28) <sup>4</sup>	19 (8-33) <sup>4</sup>	<b>&lt;0,05</b>	NC <sup>5</sup>
<b>Evolução clínica</b>					
Dias de internação ( $n=661$ )	11 (8-15) <sup>4</sup>	11 (9-14) <sup>4</sup>	11 (8-17) <sup>4</sup>	0,45	NC <sup>5</sup>
Admissão em UCI ( $n=618$ )	34/220 (15,5)	26/114 (22,8)	42/284 (14,8)	0,84	0,95 (0,6-1,6)
Dias na UCI ( $n=102$ )	5 (3-12) <sup>4</sup>	5 (3-10) <sup>4</sup>	8,5 (5-14) <sup>4</sup>	<b>&lt;0,05</b>	NC <sup>5</sup>
<b>Uso prévio de antibiótico</b> ( $n=463$ )	35/124 (28,2)	8/66 (12,1)	123/273 (45,1)	<b>&lt;0,05</b>	2,1 (1,3-3,3)
<b>Desfecho</b> ( $n=681$ )					
Óbito	25/246 (10,2)	16/121 (13,2)	30/314 (9,6)	0,81	0,9 (0,5-1,6)
<b>Análise líquórica</b>					
Aglutinação em Látex <sup>6</sup> ( $n=557$ )	161/191 (84,3)	99/114 (86,8)	169/252 (66,8)	<b>&lt;0,05</b>	0,38 (0,2-0,6)
Bacterioscopia <sup>6</sup> ( $n=756$ )	215/261 (82,4)	107/121 (88,4)	198/374 (52,9)	<b>&lt;0,05</b>	0,2 (0,2-0,4)
Cultura <sup>6</sup> ( $n=723$ )	171/258 (66,3)	58/118 (49,2)	65/347 (18,7)	<b>&lt;0,05</b>	0,1 (0,1-0,2)
PCR-TR <sup>6</sup> ( $n=520$ )	86/169 (50,9)	34/38 (89,5)	303/313 (96,8)	<b>&lt;0,05</b>	29,2 (14,5-58,8)
<b>Hemocultura</b> <sup>6</sup> ( $n=510$ )	53/158 (33,5)	23/104 (22,1)	25/248 (10,1)	<b>&lt;0,05</b>	0,2 (0,1-0,4)

**Fonte:** A autora.

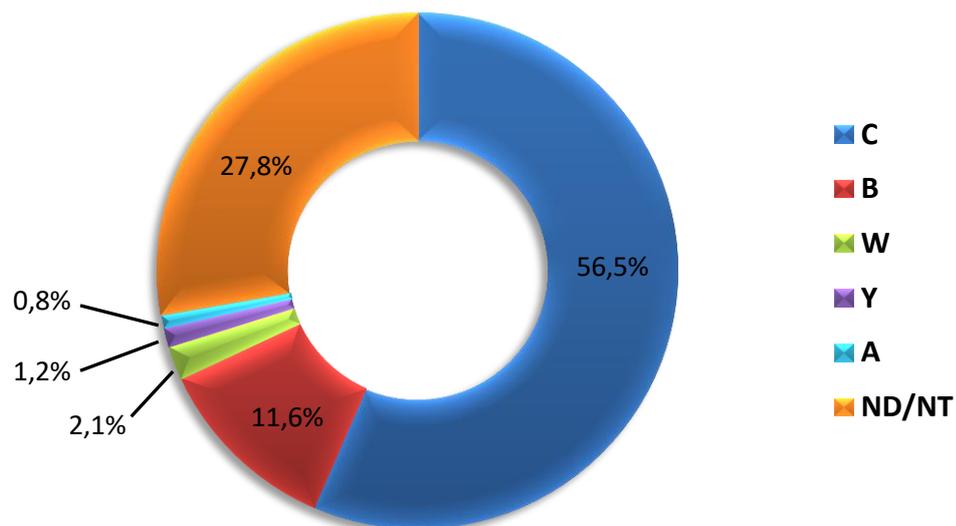
<sup>1</sup>As análises univariadas foram calculadas comparando o período pós-vacinal (2011-2016) com o pré-vacinal (2005-2009). <sup>2</sup>Informação de sexo não obtida de RNs; <sup>3</sup>Em anos; <sup>4</sup>Mediana (IQ 25-75%); <sup>5</sup>Não calculado; <sup>6</sup>positiva para *N. meningitidis*.

Os tipos capsulares dos casos de DM foram identificados por SASG e/ou SGS-PCR e estão representados no Gráfico 2. Ressalta-se que foi investigada a ocorrência de cinco tipos capsulares: A, B, C, W e Y.

Houve predomínio do sorogrupo C com 507/897 casos (56,5%), seguido pelos sorogrupos B com 104/897 casos (11,6%), W com 19/897 casos (2,1%), Y com 11/897 casos (1,2%) e A com 7/897 casos (0,8%).

Importante destacar que 94/897 amostras (10,5%) foram de tipo capsular não determinado (ND): ou foram classificadas como não agrupáveis na SASG ou foram negativas em todas as reações de SGS-PCR. Para 155/897 casos (17,3%) o tipo capsular não foi pesquisado, sendo classificadas como não testadas (NT). Em suma, o percentual de casos de DM cujo tipo capsular do meningococo foi ND ou NT correspondeu a 27,8%.

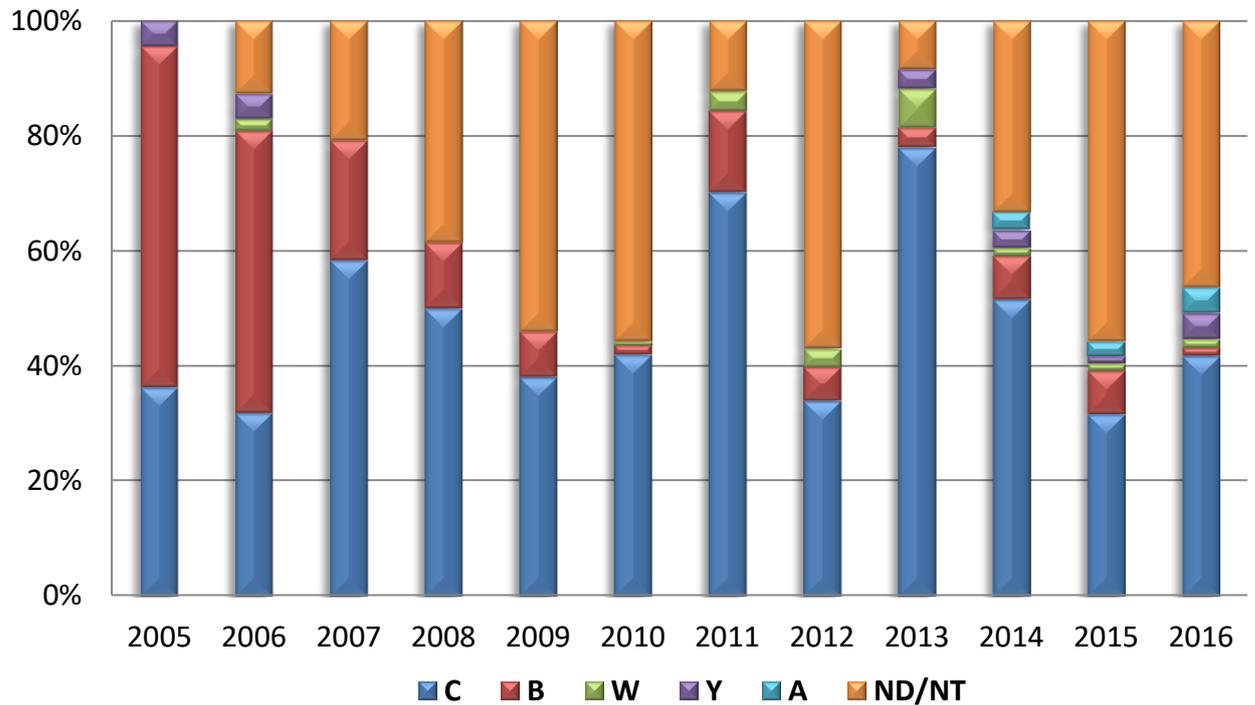
**Gráfico 2** – Tipos capsulares de *N. meningitidis* identificados durante o estudo.



**Fonte:** A autora.

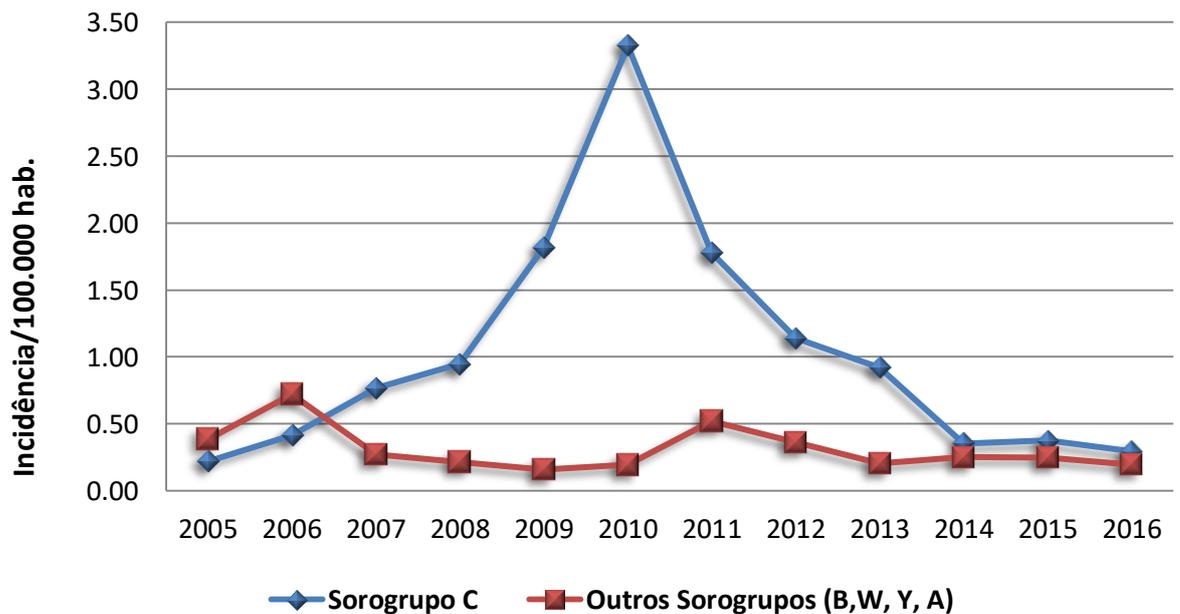
Considerando apenas os casos de tipo capsular conhecido (648/897), as taxas de prevalência foram as seguintes: 78,2% (507/648) C, 16,1% (104/648) B, 2,9% (19/648) W, 1,7% (11/648) Y e 1,1% (7/648) A.

Estratificando a prevalência dos tipos capsulares por ano de estudo, percebe-se que em 2007 houve uma inversão de predominância entre os sorogrupos B e C (Gráfico 3); estes dois sorogrupos foram detectados em todos os anos da pesquisa. Os tipos capsulares W e Y tiveram uma participação mais tímida e estiveram ausentes em alguns dos anos em questão. O tipo capsular A foi observado apenas nos anos 2014, 2015 e 2016.

**Gráfico 3** – Ocorrência dos tipos capsulares de *N. meningitidis* por ano do estudo.

Fonte: A autora.

As taxas de incidência de DM por outros tipos capsulares (B, W, Y e A) vêm se mantendo estáveis desde 2013: 0,21, 0,25, 0,25 e 0,20 casos/100.000 hab., respectivamente (Gráfico 4).

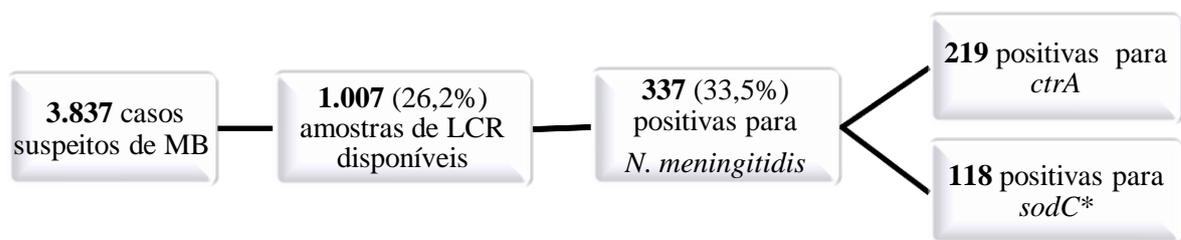
**Gráfico 4** – Incidência de DM na RMS estratificada por ano e sorogrupo.

Fonte: A autora

## 6.1 RESULTADOS DA PCR-TR

A técnica de PCR-TR foi empregada para identificação e genogrupagem de *N. meningitidis*, a partir de amostras de LCR provenientes de pacientes atendidos no HCM entre janeiro de 2010 e dezembro de 2016. Do total de 3.837 casos suspeitos de MB no período, obtivemos 1.007 (26,2%) amostras de LCR, que foram submetidas à análise molecular (Figura 7).

Na primeira abordagem espécie-específica, todas as amostras foram testadas para o gene *ctrA*. As que foram indeterminadas ou negativas para este gene foram então testadas para o *sodC*. Somando as amostras que foram positivas para um dos dois genes, totalizou-se 337/1.007 (33,5%) amostras positivas para *N. meningitidis*.

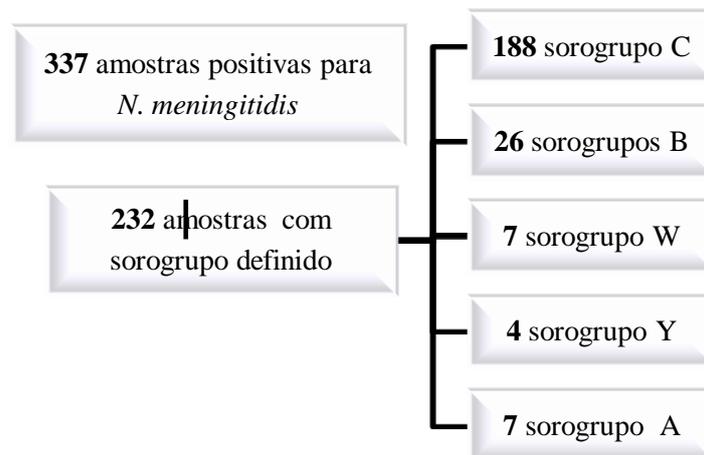


**Figura 7** – Resultados da PCR-TR espécie-específica. Fonte: A autora

\* Foram testadas para *sodC* as amostras que foram indeterminadas ou negativas para *ctrA*.

A partir das amostras que foram positivas para *N. meningitidis* realizaram-se os ensaios sorogrupo-específicos. Seguindo a recomendação da WHO (2011) de pesquisar os sorogrupos por ordem de prevalência local, as amostras foram testadas em sequência para os genogrupos C-B-W-Y-A (genes *synE*, *synD*, *synG*, *synF* e *sacB* respectivamente). Foi possível identificar o tipo capsular de 232/337 (68,8%) amostras: 188/337 (55,8%) sorogrupo C, 26/337 sorogrupo B (7,7%), 7/337 sorogrupo W (2,1%), 4/337 sorogrupo Y (1,2%) e 7/337 (2,1%) sorogrupo A (Figura 8). As 105/337 (31,2%) amostras restantes foram negativas em todas as reações de SGS-PCR, sendo classificadas como de tipo capsular não determinado (ND).

Como a identificação do genogrupo A foi um resultado inesperado (Ct 29,30-34,48), para confirmá-lo, as amostras positivas para *sac-B* foram diluídas (DNA:H<sub>2</sub>O para PCR 1:1) e retestadas, mantidas as condições do primeiro ensaio. Novamente, as amostras obtiveram resultado positivo para este gene (Ct após diluição 32,31-34,61).



**Figura 8** – Resultados da PCR-TR sorogrupo-específica Fonte: A autora.

Ainda na tentativa de confirmar a ocorrência deste tipo capsular, foi realizado o SASG a partir de cinco amostras de LCR, utilizando anti-soro específico para *N. meningitidis* sorogrupo A (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Três das cinco amostras submetidas a esse teste foram positivas para o sorogrupo A (+2/4).

A Tabela 9 apresenta uma comparação entre os resultados da PCR-TR e as técnicas rotineiramente empregadas no HCM para diagnóstico de DM. A maioria (65,4% [659/1.007]) das amostras de LCR foi negativa para *N. meningitidis* em todos os métodos empregados.

348 amostras foram positivas para *N. meningitidis* em pelo menos uma das técnicas listadas: 35/1.007 (3,5%) foram positivas em todos os testes; 48/1.007 (4,8%) foram cultura positiva; 172/1.007 (17,1%) foram detectadas apenas pela PCR-TR.

A técnica molecular não conseguiu identificar 11 casos: quatro que foram positivos na aglutinação em látex; quatro que foram positivos na bacterioscopia; dois que foram positivos na bacterioscopia e na reação de látex; e um caso que foi positivo nos três métodos clássicos.

**Tabela 7** – Resultados de bacterioscopia, cultura, aglutinação em látex e PCR-TR de amostras de LCR de pacientes atendidos no HCM de jan/2010 a dez/2016 ( $n=1.007$ ).

<b>Bacterioscopia<sup>1</sup></b>	<b>Cultura<sup>2</sup></b>	<b>Agglutinação em látex<sup>2</sup></b>	<b>PCR-TR<sup>2</sup></b>	<b>Total</b>
-	-	-	-	659
-	-	-	+	172
-	-	+	+	9
+	-	-	+	28
+	-	+	+	81
+	+	-	+	2
+	+	+	+	35
-	-	+	-	4
+	-	+	-	2
-	+	+	+	10
+	+	+	-	1
+	-	-	-	4
<b>Total</b>				<b>1.007</b>

**Fonte:** A autora.

<sup>1</sup>Considerada positiva quando identificados diplococos gram-negativos; <sup>2</sup>Positivo ou negativo para *N. meningitidis*.

## 7 DISCUSSÃO

Algumas características da DM – como rápida evolução, elevada morbimortalidade e potencial epidêmico - a tornam um grande problema de Saúde Pública em todo o mundo e justificam os esforços para preveni-la por meio da imunização (SÁFADI; BEREZIN; OSELKA, 2012; STEPHENS, 2007). Apesar dos esforços empreendidos com as campanhas de vacinação da poluição alvo, meningococo continua sendo a principal causa de meningite bacteriana no Brasil (BRASIL, 2017).

Analisando a procedência dos casos verificou-se que o HCM ainda é o principal serviço de referência para doenças infectocontagiosas no estado da Bahia (BAHIA, 2018b), atendendo 86,4% dos casos incluídos neste estudo. Por esse motivo, o grupo de pesquisa “Epidemiologia Molecular das Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal da Bahia” em parceria com a FIOCRUZ/BA mantém vigilância ativa para as MB nesta instituição desde a década de 90.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o impacto da MenC na epidemiologia da DM na RMS. A vacina foi implementada no estado da Bahia em fevereiro de 2010. As taxas de cobertura vacinal na RMS foram de 95,2% no período de transição (2010) e 91,4% no período pós-vacinal (2011-2016) (BRASIL, 2018c). A eficácia geral da vacina foi estimada em 98,0% (CARDOSO et al., 2015).

Houve queda sustentada na incidência de DM na RMS nos quatro primeiros anos após implementação da vacina (2011, 2012, 2013 e 2014); em 2015 houve uma ligeira elevação da taxa, que não ultrapassou a média do período, e em 2016 ela voltou a cair. Comparando os períodos pré-vacinal (2005-2009) e pós (2011-2016) a redução de foi de 1,5% (de 1,37 para 1,35%).

A Tabela 4 analisa a doença causada especificamente pelo meningococo do tipo capsular C (DMC). Pela MenC se tratar de uma vacina monovalente, esse tipo de análise sorogrupo-específica consegue acessar melhor tanto a real carga da doença pelo meningococo C quanto o impacto da vacina em questão. A taxa de incidência na população geral caiu de 0,84 (2005-2009) para 0,81 casos/100.000 hab. (2011-2016), redução de 3,6%.

Houve redução da DMC nas faixas etárias de 0-4 (59,6%), 5-9 (15,3%) e 10-14 (37,8%) anos. Nos grupos etários de 15-24 e  $\geq 25$  anos, a média dos anos pós-vacinais (1,07 e 0,64 casos/100.000 hab. respectivamente) foi maior que a dos pré-vacinais (0,86 e 0,36 casos/100.000 hab. respectivamente).

Investigou-se a ocorrência de casos de DMC não preveníveis pela vacina. No período pós-vacinal foram 21 casos na faixa de 0-4 anos; destes, seis acometeram crianças menores de três meses, portanto, não elegíveis para imunização com a MenC. Excluindo esses seis casos, a incidência média de DMC no grupo de 0-4 anos no pós-vacinal cai de 1,14 para 0,70 casos/100.000 hab. e o percentual de redução da doença sobe para 75,2%.

O percentual de redução corrigido se aproxima do calculado por Andrade e colaboradores (2017), que foi de 64-92% no grupo vacinal quatro anos após a introdução da MenC no Brasil. Tauil e colaboradores (2014) apontaram uma redução de 85% na incidência de DMC nos menores de quatro anos, comparando os períodos pré (2009) e pós-vacinal (2011) no Distrito Federal.

Reconhecendo que reduzir o número de adolescentes e adultos jovens colonizados é parte fundamental na promoção da imunidade de grupo (MAIDEN; STUART, 2002; MAIDEN et al., 2008), e também com o intuito de proteger diretamente estes indivíduos contra a doença invasiva, o MS ampliou a faixa etária vacinal e desde 2017 vem vacinando indivíduos de 11-14 anos de idade (BRASIL, 2018e).

Vários países adotaram a estratégia de imunizar adolescentes e adultos jovens e o sucesso de seus programas de vacinação foi atribuído à eficácia combinada da vacina contra a doença e a colonização (BRASIL, 2018e; SÁFADI; BEREZIN; ARLANT, 2014). Exemplo clássico é o Reino Unido (primeiro país a adotar a MenC em seu programa nacional de imunização) que vacinou todos os indivíduos menores de 18 anos e alcançou uma redução de aproximadamente 90% na incidência de DMC (BALMER; BORROW; MILLER, 2002). Outros países que também optaram por vacinar grupos mais velhos foram Canadá e Austrália; na Holanda a incidência de DMC caiu 99% entre os vacinados e 93% entre os não vacinados (BIJLSMA et al., 2014).

Foi pesquisada a ocorrência de DMC entre indivíduos imunizados. Dentre os casos confirmados, três pacientes referiram em entrevista ter recebido a MenC. Contudo, durante a revisão dos questionários e prontuários ficou claro que eles não apresentaram cartão de vacinação para comprovação das informações fornecidas. Considerando que esse tipo de relato pode sofrer algum viés de informação, a capacidade de apontar possíveis falhas vacinais ficou comprometida. Estudo de Cardoso e colaboradores (2012) não identificou nenhum caso de falha vacinal em Salvador um ano após introdução da MenC.

No período do estudo a taxa de letalidade geral foi de 15,1% (118/781). Essa taxa foi menor que a registrada no Brasil entre 2007 e 2013, que foi de 22,2% (BRASIL, 2016b). Esse

índice foi maior no período pós-vacinal: subiu de 10,2% (2005-2009) para 15,4% (2011-2016).

As taxas de letalidade foram bem díspares em função da forma clínica: 8,1% para os casos de MM e 48,5% para os casos de MCC (taxa quase seis vezes maior). Outra informação interessante é a grande diferença entre as taxas de letalidade dos pacientes atendidos no HCM (10,4%) e dos pacientes atendidos em outras unidades de saúde de Salvador (38,5%). De Deus (2014) já havia relatado diferenças nas taxas de letalidade dos pacientes atendidos no HCM (14,0%) e dos atendidos em outros hospitais do estado da Bahia (>25,0%).

Analisando o perfil clínico-epidemiológico dos casos atendidos no HCM ( $n=775$ ), observou-se que a doença acometeu mais o sexo masculino (73,6%), em consonância com o que está descrito na literatura (ROSENSTEIN et al., 2001; SÁFADI; BARROS, 2006).

Um dado importante é que 35,9% dos pacientes fez uso prévio de antibiótico, o que afeta a performance dos testes diagnósticos empregados na prática clínica. Essa variável englobou os pacientes que durante a entrevista referiram o uso de qualquer antibiótico nos últimos 30 dias; e os pacientes que chegaram ao HCM em uso de antibioticoterapia instituída para tratamento da DM em outro serviço de saúde. A última situação é particularmente importante nesta casuística e representa na prática, a administração de antibiótico venoso antes da coleta de LCR e/ou sangue.

O uso prévio de antibiótico teve um aumento estatisticamente significativo no período pós-vacinal (OR 2,1 IC 95% [1,3-3,3]) e isso pode ser um desdobramento do remodelamento do fluxo de atendimento no HCM. Em 2010 o hospital teve o serviço de Pronto Atendimento suspenso passando a receber somente pacientes regulados pela SESAB (provenientes de outros serviços de saúde da capital e interior do estado). Os pacientes regulados com suspeita clínica de DM, na grande maioria das vezes, são admitidos já em uso de antibioticoterapia.

No período pós-vacinal os percentuais de positividade de todos os testes microbiológicos clássicos (aglutinação em látex, bacterioscopia e cultura) caíram de forma estatisticamente significativa. Acredita-se que esta ocorrência esteja relacionada à questão discutida anteriormente do aumento do uso prévio de antibiótico.

Sabe-se que o principal fator de risco para cultura negativa é a presença de antibiótico no LCR, pois o método depende da presença de microrganismos viáveis no espécime clínico (SACCHI et al., 2011; WU et al., 2013). Além disso, condições não ideais de coleta, transporte ou cultivo também podem comprometer os resultados da técnica – o que não é apontado como um problema relevante no HCM que conta com um *staff* laboratorial experiente e bem treinado.

Dentre os casos confirmados do HCM a PCR-TR foi o método diagnóstico com maior taxa de positividade (81,3%). Ao contrário do que aconteceu com os métodos clássicos, essa taxa teve um aumento estatisticamente significativo no período pós-vacinal (OR 29,2 IC95% [14,5-58,8]). A sensibilidade da PCR-TR é menos afetada pela presença de antibiótico no LCR (WU et al., 2013) e essa condição foi particularmente importante no HCM, onde os pacientes frequentemente iniciam a antibioticoterapia antes da coleta do espécime clínico.

Dentro dos programas de vigilância para DM, a determinação do tipo capsular do meningococo é etapa fundamental para subsidiar as estratégias de imunização, determinar ações para contenção de surtos e acompanhar o perfil dinâmico das cepas circulantes (SACCHI et al., 2011; SÁFADI; BEREZIN; ARLANT, 2014).

No cenário e período do estudo, dentre as amostras com tipo capsular conhecido, ficou evidente o predomínio do sorogrupo C (56,5%), seguido pelos sorogrupos B (11,6%), W (2,1%), Y (1,2%) e A (0,8%).

Macedo e colaboradores (2018) utilizaram dados secundários para descrever os sorogrupos circulantes na Bahia entre 2007 e 2015, e encontraram um perfil semelhante: sorogrupos C 87,5%, B 8,3% e W 4,2%.

Estratificando a distribuição dos tipos capsulares por ano de estudo, reitera-se o caráter dinâmico das cepas circulantes. O sorogrupo C foi o mais prevalente desde 2007, quando ocorreu uma inversão na prevalência dos sorogrupos de *N. Meningitidis* (de B para C); fenômeno que também foi observado a nível nacional (SÁFADI; CINTRA, 2010).

Houve uma flutuação na ocorrência do sorogrupo B, que esteve presente em todos os anos. Os tipos W, Y e A tiveram frequência muito menor, ocorrendo de forma descontinuada ao longo dos anos.

Segundo o boletim epidemiológico das meningites no Brasil 2007-2013, foi registrada a ocorrência dos sorogrupos A, B, C, E, W e Y. O sorogrupo C foi responsável por 60% do total de casos nesse período e foi o mais prevalente nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Norte e Sudeste. O sorogrupo B foi o segundo mais prevalente no país, mas foi o mais frequente na região Sul (BRASIL, 2016b). Na base de dados do DATASUS constam ainda casos de meningite meningocócica pelos sorogrupos X e Z entre 2008 e 2017 (BRASIL, 2018b).

Os estudos pós-licenciamento estão atentos para o comportamento dos sorogrupos não contemplados pelas vacinas meningocócicas adotadas e até o momento não há evidência de substituição de sorogrupo nos países que implementaram a MenC (ABAD et al., 2014). As taxas de incidência de DM por outros tipos capsulares (B, W, Y e A) na RMS vêm se mantendo estáveis desde 2013.

É importante reconhecer a emergência de um tipo capsular como potencial causador de surtos ou epidemias, especialmente os sorogrupos B e W. Vale lembrar que o sorogrupo B foi o mais frequentemente isolado de portadores assintomáticos no município de Salvador (NUNES et al., 2016) e é o principal causador de DM nos EUA e em vários países da Europa (GASPARINI et al., 2015).

A emergência do sorogrupo W pôde ser observada em todo o mundo depois da epidemia do ano 2000 relacionada ao Hajj na Arábia Saudita. Este sorogrupo se tornou endêmico na Argentina, Paraguai, Uruguai e região Sul do Brasil. No Chile, o aumento da incidência e da mortalidade levou à implementação de um programa de imunização com a vacina tetravalente ACWY em 2012 (ABAD et al., 2014).

Apesar de ser uma importante causa de DM nos EUA, a ocorrência do sorogrupo Y ainda é bem discreta no Brasil (0,01 casos/100.000 hab. entre 2010 e 2016) (BRASIL, 2017).

Como a identificação do sorogrupo A foi um resultado inesperado, mesmo após o reteste da PCR-TR e o SASG, será realizado o sequenciamento genético para confirmá-lo. Os casos ocorreram nos anos de 2014, 2015 e 2016. Dos sete casos do sorogrupo A, tínhamos a informação de sexo de quatro, sendo todos homens. Quanto à idade dos pacientes, foram três RN (dois nascidos na mesma maternidade), um com sete anos, um com 12 anos e dois com idade desconhecida. Todos os sete casos foram de MM. Cinco casos foram externos (LCR encaminhado ao HCM para estudo, sem internamente do paciente na instituição). Todos os casos foram negativos para cultura, bacterioscopia e aglutinação em látex – identificados e genogrupoados pela PCR-TR.

O sorogrupo A está marcadamente associado ao cinturão africano da meningite (WHO, 2015). Após a epidemia dos anos 70, os relatos desse sorogrupo praticamente desapareceram no Brasil. Pesquisas recentes que utilizaram dados secundários não descreveram esse sorogrupo na Bahia (DE DEUS, 2014; MACEDO et al., 2018); e estudos de vigilância ativa e base laboratorial também não identificaram esse sorogrupo no HCM (CORDEIRO et al., 2007; RIBEIRO, 2015).

Entretanto, na base de dados do DATASUS constam 47 casos de meningite meningocócica pelo sorogrupo A ocorridos entre 2007 e 2017. Estão reportados três casos na RMS nos anos de 2009, 2012 e 2013, que atingiram indivíduos de 10-39 anos (BRASIL, 2018b).

Um dado relevante é o percentual (10,5%) de amostras classificadas como de tipo capsular não determinado ND. Essas amostras foram não agrupáveis à SASG e/ou negativa em todos os ensaios SGS-PCR. Supondo que ambas as técnicas tivessem uma sensibilidade de

100%, esse percentual corresponderia a cepas não encapsuladas. Contudo, a ocorrência de cepas não encapsuladas causadoras de doença invasiva é extremamente rara (DOLAN-LIVENGOOD et al., 2003; DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

Seria mais plausível inferir que esse quantitativo de cepas de tipo capsular ND é resultado de limitações das técnicas empregadas; ou ainda, que essas cepas sejam de tipos capsulares outros além dos cinco pesquisados neste trabalho.

Os casos de tipo capsular não testado (NT) (17,3%) se referem, no geral, a casos que foram cultura negativa (o que inviabiliza a realização da SASG já que o teste é realizado a partir do isolado) e que não tinham amostra de LCR congelada para realização da PCR-TR.

O alto índice (27,8%) de casos de DM causada por meningococo de tipo capsular desconhecido (ND/NT) é considerado um problema porque pode confundir as análises sobre a real carga do meningococo C e o custo-efetividade da MenC (SÁFADI; BEREZIN; OSELKA, 2012).

Amplos esforços vêm sendo empreendidos no sentido de melhorar essa questão e a disseminação da PCR-TR pelos laboratórios centrais estaduais é um deles (SALGADO et al., 2013; SACCHI et al., 2011). A incidência de DM por sorogrupo “ignorado” vem diminuindo no Brasil (de 0,78 casos/100.000hab. em 2010 para 0,32 casos/100.000hab. em 2016), o que sugere melhoras nos serviços de vigilância e apoio diagnóstico (BRASIL, 2017).

Os métodos de microbiologia clássica são as principais ferramentas para o diagnóstico da DM na prática clínica; a técnica molecular ainda está restrita aos laboratórios centrais e para fins de pesquisa (diagnóstico tardio).

O emprego da PCR-TR neste estudo - técnica validada por diversos autores (CORLESS et al., 2001; HIGA et al., 2013; MOTHERSHED et al., 2004; THOMAS et al., 2011) e recomendada pelo MS (SACCHI et al., 2011; SALGADO et al., 2013) - conseguiu melhorar os índices de confirmação laboratorial da DM e caracterização microbiológica do patógeno. Foram 189/897 (21,1%) casos adicionais diagnosticados exclusivamente pela PCR-TR.

A estratégia de testar para *sodC* as amostras que foram indeterminadas ou negativas para o *ctrA*, baseou-se nos achados de Ribeiro (2015) que demonstrou que o *sodC* foi mais sensível para detecção de *N. meningitis* a partir do LCR.

Uma enorme vantagem do método molecular é a possibilidade de determinar o tipo capsular do meningococo mesmo nos casos de cultura negativa (DOLAN-LIVENGOOD et al., 2003). Foi possível genogrupar 68,8% das amostras positivas para *N. meningitidis*.

Os ensaios SGS-PCR não alcançaram a mesma sensibilidade dos ensaios espécie-específicos, algo já relatado na literatura (CORLESS et al., 2001; TAHA et al., 2005). Além disso, as reações de SGS-PCR sofrem algumas variações em função do gene alvo - reações para identificação dos tipos capsulares B, W e Y têm menor sensibilidade (WANG et al., 2012).

A presença de inibidores da PCR, a degradação e/ou número reduzido de cópias de DNA também podem ter afetado os ensaios sorogrupo-específicos. Outra possibilidade é que as amostras que não puderam ser genogrupadas através da PCR-TR pertençam a tipos capsulares não pesquisados até aqui. Na próxima etapa da pesquisa as amostras de tipo capsular ND serão testadas para o genogrupo X através de PCR-TR (gene *xcb-B*). Para os casos em que o tipo capsular não puder ser identificado através desta técnica será empregado o sequenciamento genético.

Ocorreram 11 casos em que a amostra foi positiva em pelo menos um dos métodos microbiológicos clássico mas foi negativa na PCR-TR. Essas divergências podem decorrer de reações cruzadas com outras espécies bacterianas com similaridade antigênica e da subjetividade na interpretação dos resultados de aglutinação em látex e bacterioscopia. No caso em que a cultura (padrão-ouro) foi positiva e a PCR-TR foi negativa, a presença de inibidores da PCR e/ou a degradação do DNA podem ter gerado um resultado falso-negativo (CORLESS et al., 2001; SACCHI et al., 2011).

É relevante pontuar algumas limitações desta pesquisa. Uma vez que o desenho do estudo não teve o objetivo de avaliar a efetividade da MenC, não se pode descartar a possibilidade de que outros fatores (além da vacinação, como variações cíclicas da doença) possam ter contribuído para redução verificada nas incidências da DM. O percentual de doença causada por meningococo de tipo capsular ND/NT pode prejudicar o conhecimento sobre a real carga da DMC e o custo-efetividade da MenC. A comparação dos resultados entre os vários estudos de vigilância conduzidos no Brasil e no exterior é dificultada por uma série de fatores: distintas abordagens metodológicas, diferentes períodos de tempo avaliados antes e depois da vacinação, diversas estratégias vacinais adotadas (inclusive o imunobiológico de escolha).

## 8 CONCLUSÕES

Este estudo avaliou o impacto da MenC na epidemiologia da DM na RMS no período pós-vacinal. A taxa de incidência de DMC na população alvo da vacina (0-4 anos) reduziu de 2,82 casos/100.000 hab. no período pré-vacinal (2005-2009) para 1,14 casos/100.000 hab. no período pós-vacinal (2011-2016), representando uma redução de 59,6%.

A taxa de letalidade geral foi de 15,1%. Esse índice subiu de 10,2% para 15,4% no período pós-vacinal. Houve ainda diferenças importantes nas taxas de letalidade por forma clínica (a MCC foi mais letal) e por serviço de saúde (pacientes atendidos no HCM tiveram taxa de letalidade cerca de quatro vezes menor).

O emprego da PCR-TR conseguiu melhorar os índices de confirmação laboratorial da DM, identificando 189/897 (21,1%) casos adicionais, sugerindo que a disseminação desta técnica pode reduzir o percentual de casos suspeitos de MB de etiologia não determinada e de tipo capsular não determinado.

O tipo capsular mais frequente entre os casos foi o C 507/897 (56,5%), seguido pelo B 104/897 (11,6%), W 19/897 (2,1%), Y 11/897 (1,2%) e A 7/897 casos (0,8%); os de tipo capsular não determinado ou não testado representaram 27,8% (249/897).

Diante do protagonismo do meningococo C como causador de doença invasiva no cenário e período de estudo, pode-se dizer que a MenC (vacina monovalente), nas atuais circunstâncias, atende ao objetivo de proteger a população contra a DM.

Importante recomendar a continuidade dos estudos de vigilância a fim de manter o acompanhamento da estratégia vacinal a longo prazo (adequação do imunobiológico de escolha e esquema de doses) e detectar mudanças no comportamento da doença (surto e epidemias, grupos etários mais suscetíveis, tipos capsulares circulantes e causadores de doença).

## REFERÊNCIAS

ABAD, R. et al. Serogroup W meningococcal disease: global spread and current affect on the Southern Cone in Latin America. **Epidemiology & Infection**, v. 142, p. 2461–2470, 2014.

ANDRADE, A. L. et al. Impact of meningococcal C conjugate vaccination four years after introduction of routine childhood immunization in Brazil. **Vaccine**, v. 35, p. 2025–2033, 2017.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-time PCR Handbook**. Thermo Fisher Scientific, 2016a. Disponível em: <http://find.thermofisher.com/Global/FileLib/qPCR/2016-Real-Time-qPCR-Handbook-branding.pdf>. Acesso em: 21 out. 2017.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-time PCR: understanding C<sub>t</sub>**. Thermo Fisher Scientific, 2016b. Disponível em: <http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>. Acesso em: 21 out. 2017.

BACCARINI, C. et al. The changing epidemiology of meningococcal disease in North America 1945–2010. **Human Vaccines e Immunotherapeutics**, v. 9, n. 1, p. 162–171, 2013.

BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado. **Hospital Couto Maia**. Salvador, 2018b. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/hospital/hospital-couto-maia/>. Acesso em: 22 fev. 2018.

BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico das meningites na Bahia 2017**. Salvador, 2018a.

BALMER, P.; BORROW, R.; MILLER, E. Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 717-722, 2002.

BIJLSMA, M. W. et al. A decade of herd protection after introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccination. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 9, p. 1216–1221, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vacina adsorvida meningocócica C (conjugada) – Bula do profissional de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Informações de Saúde: epidemiológicas e morbidade**. Brasília, 2018b. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892234&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinanet/cnv/menin>. Acesso em: 05 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Imunizações**. Brasília, 2018c. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?pni/cnv/cpniBA.def>. Acesso em: 05 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1.498 de 19 de julho de 2013**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: situação epidemiológica da doença meningocócica, Brasil, 2007-2013**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016b, v. 47 n. 29.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Calendário Nacional de Vacinação 2018**. Brasília, 2018d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Meningites: situação epidemiológica – dados**. Brasília, 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/meningites/11340-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 23 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014a. 41 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Informe técnico da ampliação da oferta das vacinas papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante) – vacina HPV quadrivalente e meningocócica C (conjugada)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014b. 96 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota informativa nº 311 de 2016/ CGPNI/DVIT/SVS/MS. Informa as mudanças no Calendário Nacional de Vacinação para o ano de 2017**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016c.

CAMPBELL, H. et al. Updated postlicensure surveillance of the meningococcal C conjugate vaccine in England and Wales: effectiveness, validation of serological correlates of protection and modeling predictions of the duration of herd immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 5, p. 840–847, 2010.

CARDOSO, C. W. et al. Effectiveness of Meningococcal C Conjugate Vaccine in Salvador, Brazil: a case-control study. **PLoS One**, v.10, n.4, abr., 2015.

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

CASTIÑEIRAS, T. M. P. P. et al. Capsular switching in invasive *Neisseria meningitidis*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. 1336-1338, 2012.

CAUGANT, D. A. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: importance for the epidemiology of meningococcal disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v.8, p.558–565, 2008.

CAVRINI, F. et al. Multiple nucleotide substitutions in the *Neisseria meningitidis* serogroup C *ctrA* gene cause false-negative detection by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.8, p. 3016–3018, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Meningococcal disease**. Atlanta, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/meningococcal/index.html>. Acesso em: 21 dez. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Prevention and Control of Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)**. Atlanta, 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6202a1.htm>. Acesso em: 01 nov. 2016.

CHANG, Q.; TZENG, Y.; STEPHENS, D. S. Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention. **Clinical Epidemiology**, v. 4, p.237–245, 2012.

CLAUS, H. et al. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. **Journal of Infectious Disease**, v.191, n.8, p. 1263-1271, 2005.

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

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

CORDEIRO, S. M. et al. Hospital-based surveillance of meningococcal meningitis in Salvador. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n.11, p. 1147–1153, 2007.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1553–1558, 2001.

DAUGLA, D. M. et al. Effect of a serogroup A meningococcal conjugate vaccine (PsA–TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in Chad: a community study. **The Lancet**, v.383, p.40–47, 2014.

DE DEUS, A. A. F. **Impacto epidemiológico da vacina meningocócica C conjugada no estado da Bahia**. 2014. 32 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

DE MORAES, J. C. et al. Prevalence, risk factors and molecular characteristics of meningococcal carriage among brazilian adolescents. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 11, p.1197–1202, 2015.

DOLAN-LIVENGOOD, et al. Genetic Basis for Nongroupable *Neisseria meningitidis*. **Journal of Infectious Disease**, v. 187, p. 1616-1628, 2003.

DRETHER, A. W.; ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for

- future vaccine development. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1146–1160, 2018.
- FOX, A. J.; TAHA, M.; VOGEL, U. Standardized nonculture techniques recommended for european reference laboratories. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31 p. 84–88, 2007.
- FROSCH, M. et al. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. **Infection and Immunity**, v.60, n.3, p. 798-803, 1992.
- GASPARINI, R. et al. Meningococcal B vaccination strategies and their practical application in Italy. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 3, p. 133-139, 2015.
- GASPARINI, R. et al. *Neisseria meningitidis*: pathogenetic mechanisms to overcome the human immune defences. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 50-55, 2012.
- GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E. C.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus: development of natural immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 129, n. 6, p. 1327-1348, 1969.
- HARRISON, O. B. et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. **Emerging Infectious Diseases**, 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n.2, p. 246-247, 2013.
- HILL, D. J. et al. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. **Clinical Science**, v. 118, p. 547–564, 2010.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Resultado do censo populacional de Salvador e cidades na área metropolitana, Bahia**. Brasília, 2018.
- LIFE TECHNOLOGIES. **TaqMan® Universal PCR Master Mix User Guide**, 2014. Disponível em: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4304449\\_TaqManPCRMM\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4304449_TaqManPCRMM_UG.pdf). Acesso em: 21 out. 2017.
- LINGAPPA, J. R. et al. Serogroup W-135 meningococcal disease during the Hajj, 2000. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, p. 665–671, 2003.
- MACEDO, L. E. et al. Impact of meningococcal C conjugate vaccination programs with and without catch-up campaigns in adolescents: lessons learned from Bahia, Brazil. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1131-1137, 2018.
- MAIDEN, M. C. J. et al. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 5, p. 737-743, 2008.
- MAIDEN, M. C. J. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140–3145, 1998.

MAIDEN, M. C. J.; STUART, J. M. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. **The Lancet**, v. 359, p. 1829-1830, 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.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NUNES, A. M. P. B. et al. Meningococcal carriage among adolescents after mass meningococcal C conjugate vaccination campaigns in Salvador, Brazil. **PLoS One**, v. 11, p. 1-11, 2016.

NUNES, C. L. X., BARRETO, F. M. G., SACRAMENTO, J. R. Impacto da vacinação contra o meningococo C na ocorrência de doença meningocócica em hospital especializado. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.37, n.1, p.108-121, 2013.

ØVSTEBØ, R. et al. Use of robotized DNA isolation and real-time PCR to quantify and identify close correlation between levels of *Neisseria meningitidis* DNA and lipopolysaccharides in plasma and cerebrospinal fluid from patients with systemic meningococcal disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2980–2987, 2004.

PUBMLST. **Clonal complex designation**. Oxford, 2017. Disponível em: <https://pubmlst.org/neisseria/info/complexes.shtml>. Acesso em: 06 dez. 2017.

QUIAGEN. **Manual do Mini Kit DSP DNA de sangue QIAamp®**. p 1-27, 2004.

RAMSAY, M. E. et al. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. **BMJ**, v. 326, p. 365-366, 2003.

RIBEIRO, G. S. et al. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**, v. 25, p. 4420-4428, 2007.

RIBEIRO, L. E. V. S. **Contribuição da técnica de PCR em tempo real para diagnóstico de meningite meningocócica**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RISHISHWAR, L. et al. Genomic basis of a polyagglutinating isolate of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 20, p. 5649–5656, 2012.

ROSENSTEIN, N. E. et al. Meningococcal disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 18, p. 1378-1388, 2001.

ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. **Methods Molecular Biology**, 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, p. 1-8, 2011.

SÁFADI, M. A. P.; BARROS, A. P. Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.3, p.35-44, 2006.

SÁFADI, M. A.; BEREZIN, E. N.; ARLANT, L. H. F. Meningococcal disease: epidemiology and early effects of immunization programs. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 2, p. 91–93, 2014.

SÁFADI, M. A. P.; BEREZIN, E. N.; OSELKA, G. W. Análise crítica das recomendações do uso das vacinas meningocócicas conjugadas. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 3, p.195-202, 2012.

SÁFADI, M. A. P.; CINTRA, O. A. L. Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention. **Neurological Research**, v.32, n. 3, p. 263-271, 2010.

SALGADO, M. M. et al. Evolution of bacterial meningitis diagnosis in São Paulo State-Brazil and future challenges. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 71, n. 9-B, p. 672-676, 2013.

SCHOEN, C. et al. Genome flexibility in *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 27, n. 2, p. 103–111, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES. Comissão Técnica de Revisão de Calendários e Consensos – SBIm. **Informe técnico 25/05/2015 – Vacina meningocócica B**. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES. Departamento Científico de Imunizações. **Vacinas meningocócicas conjugadas no Brasil em 2018: intercambialidade e diferentes esquemas de doses**. 2018.

STEPHENS, D. S. Conquering the Meningococcus. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 3–14, 2007.

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

SWARTLEY, J. S. et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n.1, p. 271-276, 1997.

SWARTLEY, J. S. et al. Characterization of the gene cassette required for biosynthesis of the ( $\alpha$ 1→6)-linked *n*-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A *Neisseria meningitidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n.6, p. 1533-1539, 1998.

TAHA, M. et al. Interlaboratory Comparison of PCR-Based Identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 144–149, 2005.

TAUIL, M. C. et al. Meningococcal disease before and after the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccine, Federal District, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n.4, p. 379–386, 2014.

THOMAS, G. D. et al. *sodC* -based Real-Time PCR for detection of *Neisseria Meningitidis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1-8, 2011.

TROTTER, C.L. et al. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. **The Lancet**, v. 364, p. 365-367, 2004.

TSANG, R. Capsule switching and capsule replacement in vaccine-preventable bacterial diseases. **Lancet Infect Diseases**, v. 7, n. 9, p. 569-570, 2007.

TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 6, p. 687-700, 2000.

VOGEL, U. Molecular epidemiology of meningococci: application of DNA sequence typing. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, n.7, p.415-420, 2010.

WANG, X. et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 702–708, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemic meningitis control**. Geneva, 2015. Disponível em: [http://www.who.int/csr/disease/OP\\_meningitis\\_FINAL.pdf?ua](http://www.who.int/csr/disease/OP_meningitis_FINAL.pdf?ua). Acesso em: 07 jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae***. 2. ed. Geneva, 2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/full-manual.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Meningococcal disease**. Geneva, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/diseases/meningitis/en/>. Acesso em: 07 jul. 2017.

WU, H. M. et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n.26, p. 1-10, 2013.

**ANEXOS**

## ANEXO I – Autorização para utilização de ilustrações referenciadas.

03/09/2018

Email – NabilaDantas@hotmail.com

### RE: Articles

Stephens, David S <dstep01@emory.edu>

seg 13/08/2018 00:32

Para: Nabila Dantas <NabilaDantas@hotmail.com>;

Nabila,

Thank you. From my perspective using these two figures in your masters dissertation is fine. The publisher owns the copyright for the figures. Of note there is a 2017 update to the second figure published in Hum Vaccin Immunother. 2018 May 4;14(5):1146-1160.

Best regards,

David S Stephens MD  
Emory University

---

**From:** Nabila Dantas <NabilaDantas@hotmail.com>  
**Sent:** Sunday, August 12, 2018 3:26 PM  
**To:** Stephens, David S <dstep01@emory.edu>  
**Subject:** Articles

Dear Prof. David S Stephens,

My name is Nabila Dantas Sales, I am a graduated student at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-BA). My research is about the Impact of Meningococcal C Conjugated Vaccine in the Epidemiology of Meningococcal Disease in Salvador, Brazil.

I come through this email to request your permission to use two figures from your articles to illustrate my masters dissertation.

Your articles will be duly cited below the figure.

Article: Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. Lancet 2007; 369: 2196-210.  
**Figure 3 Cross-sectional view of the meningococcus.**

Article: Conquering theMeningococcus. FEMS Microbiology Reviews 2007; 31: 3–14.  
**Figure 1 Global serogroup distribution of invasive meningococcal disease.**

Thank you in advance for your kindness attention.  
Best regards,

## ANEXO II – Autorização para utilização de ilustrações referenciadas.

---

03/09/2018

Email – Nabiladantas@hotmail.com

Priority Medium; Mode WebForm; Topic WHO manual: Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae.; CRM:0007068

CDCInfo <cdcinfo@cdcinquiry.onmicrosoft.com>

sex 10/08/2018 12:51

Para:nabiladantas@hotmail.com <nabiladantas@hotmail.com>;

Thank you for contacting CDC-INFO.

We hope you find the following information about requesting permission to reproduce or use images from the CDC website helpful.

### **General Use of Government Content**

Information and images developed by CDC and presented on the CDC website are works of the U.S. Government. This content may include:

- general text information,
- publications for download, or
- graphs.

CDC-generated works (including photographs, graphics, images, videos, PSAs) located on this site are in the public domain. This means that they are meant for public use and are not subject to copyright law protections. Permission is NOT required for use of public domain items. But, CDC does ask that you credit the agency and contributor whenever the item is used in any publicly distributed media.

You are free to adapt and revise these materials, as long as you distribute the revised materials free of charge. But, **if you make changes or revisions, including translation to languages other than English, you must remove the CDC name and logo from the materials.**

**ANEXO III** – Autorização para utilização de ilustração referenciada.

03/08/2018

Email – NabilaDantas@hotmail.com

RE: Article: Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction.

Mary Ramsay <Mary.Ramsay@phe.gov.uk>

seg 13/08/2018 07:44

Para:Nabila Dantas <NabilaDantas@hotmail.com>;

Yes, Nabila, that's fine – good luck with your dissertation.

Mary

Dr Mary Ramsay  
**Consultant Epidemiologist and Head**  
Immunisation and Countermeasures  
*National Infection Service*  
Public Health England  
[mary.ramsay@phe.gov.uk](mailto:mary.ramsay@phe.gov.uk)

PA: Alpa Shah [alpa.shah@phe.gov.uk](mailto:alpa.shah@phe.gov.uk)  
Tel: 020 8327 7084/5  
Fax: 020 8327 7404

---

**From:** Nabila Dantas [mailto:NabilaDantas@hotmail.com]  
**Sent:** 12 August 2018 20:29  
**To:** Mary Ramsay  
**Subject:** Article: Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction.

Dear Dr. Mary Ramsay,

My name is Nabila Dantas Sales, I am a graduated student at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-BA). My research is about the Impact of Meningococcal C Conjugated Vaccine in the Epidemiology of Meningococcal Disease in Salvador, Brazil.

I come through this email to request your permission to use a figure from your article to illustrate my masters dissertation.

Your article will be duly cited below the figure.

Article: Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. Lancet2004; 364: 365–67.

**Figure: Cases of laboratory-confirmed meningococcal serogroup C disease by age group and quarter, 1995–2004.**

Thank you in advance for your kindness attention.  
Best regards,

Nabila Dantas Sales









7.3	Paciente evoluiu com sinais neurológicos focais: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	ESNF <input type="checkbox"/>																				
	Qual? (QESNF) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
7.4	Paciente apresentou déficit neurológico na alta: <table border="0"> <tr> <td>Não tem</td> <td><input type="checkbox"/> 0</td> <td>Perda auditiva</td> <td><input type="checkbox"/> 1</td> </tr> <tr> <td>Déficit motor</td> <td><input type="checkbox"/> 2</td> <td>Alterações nervos cranianos</td> <td><input type="checkbox"/> 3</td> </tr> <tr> <td>Ataxia</td> <td><input type="checkbox"/> 4</td> <td>Alteração estado mental</td> <td><input type="checkbox"/> 5</td> </tr> <tr> <td>Outros ou não especificado</td> <td><input type="checkbox"/> 6</td> <td>Não se aplica</td> <td><input type="checkbox"/> 8</td> </tr> <tr> <td>Não sabe</td> <td><input type="checkbox"/> 9</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Não tem	<input type="checkbox"/> 0	Perda auditiva	<input type="checkbox"/> 1	Déficit motor	<input type="checkbox"/> 2	Alterações nervos cranianos	<input type="checkbox"/> 3	Ataxia	<input type="checkbox"/> 4	Alteração estado mental	<input type="checkbox"/> 5	Outros ou não especificado	<input type="checkbox"/> 6	Não se aplica	<input type="checkbox"/> 8	Não sabe	<input type="checkbox"/> 9			DEFCN <input type="checkbox"/>
Não tem	<input type="checkbox"/> 0	Perda auditiva	<input type="checkbox"/> 1																			
Déficit motor	<input type="checkbox"/> 2	Alterações nervos cranianos	<input type="checkbox"/> 3																			
Ataxia	<input type="checkbox"/> 4	Alteração estado mental	<input type="checkbox"/> 5																			
Outros ou não especificado	<input type="checkbox"/> 6	Não se aplica	<input type="checkbox"/> 8																			
Não sabe	<input type="checkbox"/> 9																					
7.5	Sorogruppo da amostra do HCMaia	SOROG <input type="checkbox"/>																				
<b>VIII. INFORMAÇÕES SOBRE VACINAS:</b>																						
8.1	Fez uso da vacina meningocócica C: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	MeniC <input type="checkbox"/>																				
8.2	Data em que fez uso da vacina?	DVAC ___/___/___																				
8.3	Fez uso da 1ª dose: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Com que idade em meses:	ANT1 <input type="checkbox"/> ANT1I <input type="checkbox"/>																				
8.4	Fez uso da 2ª dose: Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9 Com que idade em meses:	ANT2 <input type="checkbox"/> ANT2I <input type="checkbox"/>																				
8.5	Fez uso da Vacina em que local: Posto de saúde <input type="checkbox"/> 1 Clínica Privada <input type="checkbox"/> 2 Não se aplica <input type="checkbox"/> 8 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	LVAC <input type="checkbox"/>																				





## ANEXO V - Parecer CONEP

**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE  
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER.CONEP 044/2013

Registro CONEP 16732 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Folha de Rosto – 420661

Processo nº 25000.228426/2012-07

Projeto de Pesquisa: *"Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador, Bahia"*.

Pesquisador Responsável: Joice Neves Reis Pedreira

Instituição: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA (1º CENTRO)

CEP de origem: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Área Temática Especial: Pesquisa com Cooperação Estrangeira

Patrocinador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº. 034/2013, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 27 de Maio de 2013



Anibal Gil Lopes  
Coordenador Adjunto da COONEP/CNS/MS

CENTRO DE PESQUISAS  
GONÇALO MONIZ -  
FIOCRUZ/BA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador, Bahia

**Pesquisador:** Joice Neves Reis Pedreira

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 54319916.7.0000.0040

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.667.451

#### Recomendações:

Não há.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Em cumprimento da Res. 466/2012 e Norma Complementar vigente, enviar relatórios semestrais a partir desta data, e relatório final em até um mês após o término da vigência do projeto conforme cronograma aprovado neste protocolo. Caso haja inclusão de outra fonte de financiamento após esta aprovação, informar ao CEP como emenda ao protocolo incluindo o Termo de Outorga ou documento equivalente e realizando as alterações pertinentes na Folha de Rosto para indicar modificação do patrocinador principal.

The present study has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ (IORG0002090/OMB No. 0990-0279 valid until 03/16/2018). The protocol and procedures presented in the project are in full accordance with the Brazilian legislation regarding the ethical standards in conducting research involving human beings (Res. CNS 466/2012), as well as with the ethical principles for medical research involving human

**ANEXO VI – Termo de consentimento livre e esclarecido****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** Impacto dos programas de vacinação na meningite bacteriana em Salvador, Bahia.

**Pesquisador Responsável:** Dra. Joice Neves Reis Pedreira

**Telefone:** (071) 3176 2302

**Paciente:** \_\_\_\_\_ **No. de estudo:** \_\_\_\_\_

**Para ser lido a todos os pacientes adultos (com 18 anos completos):** As informações que se seguem descrevem o estudo e o seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo de pesquisa. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está sendo fornecida.

Objetivo do Estudo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo que estamos realizando no Hospital Couto Maia sobre meningites bacterianas. Nós convidamos você a participar deste estudo porque os seus sintomas e os seus resultados de exames laboratoriais indicam que você tem esta doença. A meningite é uma infecção dos tecidos e do fluido que cercam o cérebro. Para identificar o agente causador da doença, uma pequena quantidade do líquido (líquor) da coluna vertebral será testado para um novo método de diagnóstico. Nenhuma amostra será coletada só para o estudo, as amostras serão coletadas somente se o médico solicitar e o estudo não vai interferir no seu tratamento. O objetivo de nosso estudo é conhecer mais esta doença na nossa população, estudando a forma como elas são transmitidas; quais são os fatores que fazem com que algumas pessoas apresentem um quadro mais grave que outras, quais as melhores formas de tratamento, e os testes de diagnóstico. Obtendo estas informações teremos condições, no futuro, de implantar medidas para diminuir o número de pessoas com meningite.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar desta pesquisa após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas relacionadas ao local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica. Irá ainda ler seu prontuário médico para obter os resultados de seus exames e seu tratamento no hospital. Além disto, você estará autorizando que as amostras bacterianas que porventura sejam isoladas neste estudo possam ser utilizadas em estudos futuros.

Sigilo:

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

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo de pesquisas é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar em qualquer momento do estudo se você quiser. Além disto, você tem o direito de se recusar a responder a qualquer pergunta durante a entrevista ou avaliação diária. Sua recusa em participar do estudo ou em parte do mesmo, ou sua decisão de interromper sua participação, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações com o Hospital Couto Maia no presente ou no futuro. Você receberá uma via deste termo de consentimento. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo, nem receberá compensação financeira.

Riscos:

Este estudo possui os riscos que são inerentes da entrevista e coleta de dados. Entretanto, todos os procedimentos para assegurar sigilo das informações obtidas e seus direitos como participantes do projeto serão adotados para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Proteção contra riscos:

Os participantes do estudo que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no TCLE e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, têm direito à indenização. Não será exigido do responsável e/ou participante da pesquisa, sob qualquer argumento, renúncia ao direito à indenização por dano.

Benefícios:

Não haverá de imediato benefício para você. Mas, indiretamente, os participantes desta pesquisa estarão contribuindo com informações muito importantes no estudo das meningites que poderão melhorar o controle da doença e aumentar o conhecimento científico.

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo, ou sobre seus direitos como participante desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Comissão de ética do Hospital Couto Maia, pelo telefone: (071) 3316-3084 ou diretamente no Hospital Couto Maia cujo endereço é Rua São Francisco, s/n, Monte Serrat, no. 40, CEP 40.425-001, Salvador, Bahia ou o Comitê de Ética do Centro de pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor, entre em contato com a Dra. Joice Pedreira, Pesquisadora responsável por este estudo no Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, telefone (71) 3176-2302.

**Autorização para Banco de Amostras Biológicas:** Eu autorizo que o sangue e/ou liquor que sobrar, após a realização dos exames para este projeto de pesquisa, seja armazenado em um banco de

amostras biológicas na FIOCRUZ-BA. Os soros e amostras de liquor guardados na Fiocruz poderão ser utilizados, no futuro, em outros projetos de pesquisa que ajudarão a compreender melhor a meningite bacteriana ou no desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas. Nenhum soro ou liquor será utilizado sem a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz e a sua identidade será mantida em sigilo.

( ) Eu autorizo que o sangue/soro/liquor que sobrar deste estudo seja incluído no banco de amostras biológicas da FIOCRUZ-BA.

( ) Eu não autorizo, o sangue/soro/liquor que sobrar deste estudo deverá ser desprezado.

**Consentimento:**

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos.

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

Hora



Impressão datiloscopia do paciente