



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA MENINGITE
MENINGOCÓCICA EM SALVADOR-BA**

SORAIA MACHADO CORDEIRO

**Salvador - Bahia - Brasil
2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA MENINGITE MENINGOCÓCICA
EM SALVADOR-BA**

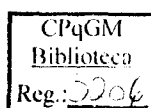
SORAIA MACHADO CORDEIRO

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Co-orientadora: Dra. Joice Neves Reis

Tese apresentada para obtenção do
grau de Doutor em Patologia
Humana.

Salvador - Bahia - Brasil
2007



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S794e Cordeiro, Soraia Machado
Epidemiologia Molecular da Meningite Meningocócica em Salvador-Ba
[manuscrito] / Soraia Machado Cordeiro. - 2007.
000 f. 90: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo
Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2007.

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

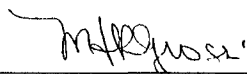
1. Meningite Meningocócica. 2. Epidemiologia Molecular. 3. Bahia. I. Título.

CDU 616.981.23:614.4 (813.8)

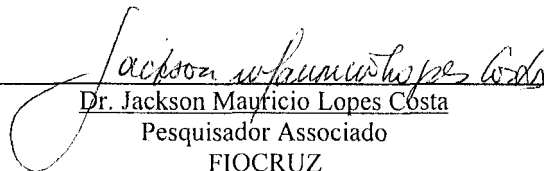
SORAIA MACHADO CORDEIRO

FOLHA DE APROVAÇÃO

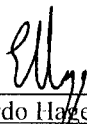
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi
Professora Adjunta
FIOCRUZ



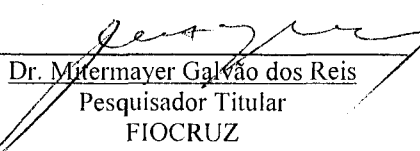
Dr. Jackson Maurício Lopes Costa
Pesquisador Associado
FIOCRUZ



Dr. Eduardo Hage Carmo
Pesquisador
ICS - UFBA



Dr. Carlos Roberto Brites Alves
Professor Adjunto
FAMED - UFBA



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
FIOCRUZ

"Competência para servir à humanidade deveria ser, sem
dúvida, o grande objetivo de todos os estudos".

Benjamin Franklin (1706-1790)

A Deus, pelo dom da vida.

A meus pais, Moisés e Ana, pelo amor e pela dedicação de uma vida de esforços na minha criação e educação.

A meus irmãos, Simone e Mario, pelo companheirismo.

A meu marido Luciano, pelo incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus filhos Lucas e Leonardo, meus corações fora de mim.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me colocar sempre como um servo de seus desejos.
- Aos orientadores Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e Albert Ko e Dra. Joice Neves Reis pela oportunidade de trabalhar em pesquisa e constante orientação.
- Um agradecimento especial às professoras Dra. Hygia Maria Nunes Guerreiro e Dra. Tânia Fraga Barros, responsáveis pelo meu ingresso na pesquisa. Muito obrigada pelo reconhecimento e amizade.
- Aos coordenadores do Mestrado e Doutorado em Patologia FIOCRUZ-UFBA, pela presteza e competência com que têm conduzido este curso.
- Aos demais professores, colegas do doutorado que ingressaram comigo e, especialmente, à ex-secretária do curso, Senhora Rosália Oliveira, pela dedicação e competência e a secretária Rosângela Paixão.
- Aos pesquisadores do Lab. de Pat. e Biol. Molecular, Dra. Marilda Gonçalves e Theomira Carmo pelo apoio profissional, consultoria e amizade.
- Aos estudantes de iniciação científica Tatiana Lobo, Cásio Tâmara e Alan Neves pela participação ativa e entusiasmo demonstrado, lado a lado, na execução do levantamento de dados epidemiológicos.
- Aos demais colegas e amigos do Lab. de Pat. e Biol. Molecular/CPqGM, que vivenciaram e compartilharam os momentos difíceis e vitoriosos.
- A Sra. Ana Maria Fiscina, bibliotecária, pela normalização desse trabalho e revisão das referências bibliográficas.
- Ao corpo clínico do HCM e às bioquímicas Kátia Salgado e Neide Oliveira Silva, pelos isolamentos e fornecimentos das amostras bacterianas.
- Ao Dr. Warren Johnson Jr., Chefe da Divisão Internacional de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de Cornell, New York; e Dr. Lee Riley Prof. da Escola de Saúde Pública da Califórnia, Berkeley, pela disponibilidade de recursos que contribuíram para a realização desse trabalho.
- Ao Dr. Carmo Melles e Ana Paula Lemos, Instituto Adolfo Lutz/SP, pela disponibilidade dos resultados de sorotipagem e fornecimento de amostras de *N. meningitidis*.
- Aos participantes do estudo, pelo consentimento e aceitação desta pesquisa.
- A todos aqueles que, embora não citados nominalmente, também contribuíram, de alguma forma, para o nosso êxito.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	11
1.2. EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE MENINGOCÓCICA	12
1.3. VACINAS CONTRA A DOENÇA MENINGOCÓCICA	15
1.4. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. HIPÓTESES	20
4. OBJETIVOS	21
4.1. GERAL	21
4.2. ESPECÍFICOS.....	21
5. ARTIGO 1 - HOSPITAL-BASED SURVEILLANCE FOR MENINGOCOCCAL MENINGITIS IN SALVADOR, BRAZIL.	22
5.1. ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA VIGILÂNCIA REFERENTE AO ARTIGO1	30
5.1.1. Características clínicas e epidemiológicas da meningite meningocócica em Salvador, Bahia nos dez anos de vigilância hospitalar ativa.	30
5.1.2. Características fenotípicas das amostras de <i>N. meningitidis</i>	32
6. ARTIGO 2 - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> IN SURVEILLANCE SETTINGS: USEFULNESS OF REPETITIVE EXTRAGENIC PALINDROMIC SEQUENCE BASED-PCR	35
7. ARTIGO 3 - MULTILOCUS RESTRICTION FRAGMENT TYPING (MLRFT) AS A STRAIN TRACKING TOOL FOR <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	49
7.1. ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA VIGILÂNCIA REFERENTE AO ARTIGO3	65
7.1.1. Tipagem molecular da <i>Neisseria meningitidis</i> em Salvador-BA pelo MLRFT.....	65
8. DISCUSSÃO.....	68
9. CONCLUSÕES	72
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO I - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	83
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO	86
ANEXO III - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ET	<i>electrophoretic typing</i> - tipo eletroforético
HCM	Hospital Couto Maia
MLEE	eletroforese de enzima multilocus
MLRFT	tipagem de fragmentos de restrição de multilocus
MLST	tipagem por sequenciamento de multilocus
NT	não sorotipável
nt	não sorosubtipável
ORF	fase aberta de leitura
OMV	<i>outer membrane vesicles</i> - vesícula da membrana externa
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - reação da polimerase em cadeia
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i> - eletroforese em campo pulsado
PorA	porina A
PorB	porina B
Rep- PCR	reação da polimerase em cadeia de regiões repetitivas
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> - análises de endonuclease de restrição
RT	tipo de restrição
ST	tipo de sequência

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos índices de incidência da doença meningocócica no Brasil entre o período de 1980 e 2004.	14
Figura 2. Distribuição anual da incidência da meningite meningocócica e da letalidade identificadas no HCM, Salvador, BA no período de 1996 a 2006.	30
Figura 3. Distribuição anual de meningite meningocócica identificada no HCM, Salvador - BA no período de 1996 a 2006, estratificada por sexo.....	31
Figura 4. Distribuição anual do número de casos de meningite meningocócica identificada no HCM, Salvador - BA no período de 1996 a 2006, estratificada por faixa etária.	31
Figura 5. Distribuição dos casos de meningite meningocócica por faixa etária, identificados no HCM, Salvador-BA no período de 1996 a 2006.....	32
Figura 6. Distribuição dos casos (n=575) por sorogrupo de <i>N. meningitidis</i> , de isolados identificados no HCM no período 1996 a 2006.....	33
Figura 7. Distribuição dos sorotipos:sorosubtipos de <i>N. meningitidis</i> (n=534) identificadas no período de 1996 a 2006, no Hospital Couto Maia- Salvador/BA.....	33
Figura 8. Distribuição das porcentagens anuais do fenótipo B:4,7.P1.19,15 identificadas no período de 1996 a 2006, no Hospital Couto Maia-Salvado/BA.....	34
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do multiplex PCR sorogrupo alelo específico de isolados de <i>N. meningitidis</i> identificados Hospital Couto Maia-Salvado/BA.....	66
Tabela 1. Distribuição dos padrões obtidos na tipagem de 337 isolados de <i>Neisseria meningitidis</i> pelo MLRFT.....	67

RESUMO

Atualmente a *Neisseria meningitidis* é a principal causa de meningite bacteriana em todo o mundo. Este estudo teve como objetivo consolidar os dados clínicos, epidemiológicos e microbiológicos da meningite meningocócica em Salvador, Brasil num período de onze anos, decorrente de um sistema de vigilância hospitalar. Entre fevereiro de 1996 e dezembro de 2006, foram identificados os casos de meningite meningocócica comprovados por cultura positiva no Hospital Couto Maia, Salvador, BA. Dados demográficos e clínicos foram obtidos através de entrevista e revisão de prontuário. Anti-soro e anticorpos monoclonais foram usados para determinar os sorogrupos e sorotipos:sorosubtipos, respectivamente. Durante este período, dois métodos simples para genotipagem da *Neisseria meningitidis* foram utilizados, um baseado na amplificação de elementos repetitivos por PCR (NgRep-PCR) e um outro baseado em RFLP (polimorfismo dos fragmentos de restrição) o MLRFT (tipagem de fragmentos de restrição de multilocus). Foram identificados 648 casos de meningite meningocócica, com uma taxa de letalidade de 11,3%. A incidência anual média entre 324 casos residentes em Salvador foi de 1,20 casos/100.000 habitantes. A incidência foi maior em crianças menores de 4 anos de idade (9,77 casos/100.000 habitantes). Dos 575 isolados com resultados de sorogrupo, 79,3%, 18,1%, 1,7% e 0,9% foram classificados como B, C, W135 e Y, respectivamente. Um único sorotipo:sorosubtipo (4,7:P1.19,15) foi responsável por 62,7% de todos os casos. As análises utilizando os métodos de NgRep-PCR e MLRFT demonstraram padrões genotípicos com alta reprodutibilidade, eficiência e conveniência, permitindo identificar os clones hipervirulentos, tais como os do complexo ET-5 encontrados em nosso estudo. Estes métodos foram comparáveis com o “padrão ouro” (MLST- tipagem por sequenciamento de multilocus), demonstrando algumas vantagens: execução rápida, simples, de baixo custo e de fácil aplicação em laboratórios de países em desenvolvimento. Em conclusão, um serviço de vigilância continuado é necessário para caracterizarmos cepas e para definir estratégias futuras no controle e prevenção da meningite meningocócica.

ABSTRACT

Nowadays *Neisseria meningitidis* is the main cause of bacterial meningitis worldwide. This study aims to compile the clinical, epidemiological, and microbiological features of meningococcal meningitis in Salvador, Brazil, in eleven-years of hospital-based surveillance. Between February 1996 and December 2006, hospital-based surveillance identified cases of culture positive meningococcal meningitis in the Couto Maia Hospital, Salvador, BA. Demographic and clinical data were collected through interview and medical chart review. Antiserum and monoclonal antibodies were used to determine the isolates' serogroup and serotype:serosubtype, respectively. During this period we used two simplified methods for subtyping *Neisseria meningitidis*, a PCR amplification of repetitive elements (Rep-PCR) and a multilocus restriction fragment typing (MLRFT). Surveillance identified a total of 648 cases of meningococcal meningitis with a case fatality rate of 11.3%. Mean annual incidence for the 324 cases with residence in Salvador was 1.20 cases per 100,000 population. Infants younger than 4 years-old presented the highest incidence (9.77 cases per 100,000 population). Of the 575 serogrouped isolates, 79.3%, 18.1%, 1.7% and 0.9% belong to serogroup B, C, W135 and Y, respectively. A single serotype:serosubtype (4,7:P1.19,15) accounted for 62.7% of all cases. Both Rep-PCR and MLRFT showed patterns with high reproductibility, accuracy and convenience, being able to identify hypervirulent clones such as ET-5 complex. These methods were comparable with the gold standard MLST, but with certain advantages: rapid, simple, inexpensive, and readily applicable in laboratories of the developing countries to track meningococcal disease where it is occurring. In conclusion, continued surveillance is necessary to characterize strains and to define future prevention and control strategies.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *NEISSERIA MENINGITIDIS*

A doença meningocócica foi primeiro descrita por Vieusseux em 1805, depois de uma epidemia ocorrida em Genebra, Suíça (VIEUSSEUX, 1805), entretanto só após 1887 Anton Weichseibaum observou a bactéria no líquido cefalorraquidiano e nomeou o microrganismo de *Diplococcus intracellularis* (WEICHSELBAUM, 1887). Meningococos são diplococos Gram - negativos, aeróbios, imóveis e não esporulados, com as paredes adjacentes achatadas, dando uma aparência cordiforme, quando observado através da coloração de Gram. Possuem tamanho entre 0,6-0,8µm e requerem condições especiais para o crescimento, incluindo temperatura entre 35-37°C, umidade aproximada de 50%, atmosfera de 3 a 10% de CO₂, em meio de agar chocolate (VOLK et al., 1996). Similar a outras bactérias Gram - negativas, apresentam envolvidos por uma membrana externa composta por lipídios, proteínas e lipo-oligossacarídeos (JENNINGS et al., 1999; van DEUREN et al., 2000).

Em função da especificidade imunológica dos polissacarídeos capsulares, os meningococos podem ser classificados em 13 diferentes sorogrupos: A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E e W135. Os sorogrupos A, B, C, W135 e Y destacam-se por serem os mais freqüentes causadores de doença invasiva (VEDROS, 1987). Os sorogrupos são subdivididos em sorotipos e sorosubtipos, de acordo com as diferenças imunológicas das principais proteínas da membrana externa (VEDROS, 1987). Os sorotipos são designados com base nas diferenças imunológicas das proteínas de membrana externa classe 2 e classe 3, Porina B (PorB), e os sorosubtipos são nomeados com base na especificidade imunológica da proteína de membrana externa de classe 1, Porina A (PorA). A nomenclatura de sorogrupo e sorotipo foi recomendada no subcomitê Família Neisseriaceae do Comitê Internacional de Nomenclatura Bacteriana, em 1948, quando ficou determinado que os sorogrupos seriam representados por letras maiúsculas, e que os sorotipos seriam representados por numerais arábicos (BRANHAM, 1953; 1958). Por exemplo, a designação B:4,7:P1.19,15 significa que a bactéria pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4,7 e sorosubtipo P1.19,15. As nomenclaturas designadas

como Nt e nt significam que as proteínas de sorotipo e sorosubtipo não puderam ser identificadas pela técnica.

O microrganismo pode ser encontrado em aproximadamente 10-25% de indivíduos saudáveis sob a forma de portadores assintomáticos, sendo o homem o seu único hospedeiro (WHO, 2003).

Por razões que são desconhecidas, o meningococo pode invadir a mucosa faríngea e na ausência da atividade bactericida no soro, disseminar na corrente sanguínea, causando septicemia. A *N. meningitidis* pode também atravessar a barreira hematoencefálica e infectar o líquido cefalorraquidiano causando meningite. A doença meningocócica sistêmica afeta principalmente crianças jovens e adolescentes, muitas vezes levando a desfechos fatais. Além das epidemias, estima-se que anualmente ocorram, aproximadamente 500.000 casos de doença meningocócica no mundo (WHO, 2003).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE MENINGOCÓCICA

Entre os cinco sorogrupos (A, B, C, Y e W135) responsáveis por cerca de 90% das infecções causadas pela *N. meningitidis*, os sorogrupos A, B, e C são responsáveis pela maioria dos casos de doença meningocócica em todo o mundo. Os sorogrupos A e C predominam, sobretudo na Ásia e África, especialmente em países que formam o “cinturão africano da meningite meningocócica” (Senegal, Gâmbia, Guiné Bissau, Guiné, Burkina Faso, Mauritânia, Mali, Cote d’Ivoire, Níger, Nigéria, Benin, Camerão, Chad, República Central Africana, Sudão, Etiópia, Eritreia, Uganda e Quênia), e os sorogrupos B e C na Europa e nas Américas (CAUGANT et al., 1986; NORHEIM et al., 2006). Nos últimos anos, registro de casos envolvendo o sorogrupo Y foi observado em Israel (GROTTO et al., 1996), Suécia (MEMISH & ALRAJHI, 2002) e nos Estados Unidos (BILUKHA, 2005). Recentemente, o sorogrupo W135 foi associado a surtos entre peregrinos de Hajj, bem como a uma grande epidemia em Burkina Faso durante os anos de 2002 e 2003 (LINGAPPA et al., 2003; WILDER-SMITH et al., 2003). Excepcionalmente, pequenos surtos causados pelo sorogrupo X foram reportados na Nigéria e em Gana entre os anos de 1990 e 2000 (DJIBO ET AL., 2003; GAGNEUX et al., 2002). No ano de 2006 a incidência de casos associados ao sorogrupo X em Niamey, Gana, foi de 27,5 casos por 100.000 habitantes (BOISIER et al., 2007).

Diferente das epidemias causadas por amostras do sorogrupo A, a transmissão da doença meningocócica causada por isolados do sorogrupo B e C leva apenas a um aumento moderado da incidência, mas por outro lado pode durar várias décadas como endemias (GRIFFISS et al., 1987; LYSTAD & AASEN, 1991). Nestas regiões, epidemias ainda podem ocorrer, sendo caracterizadas quando, em uma coletividade ou região, o número de casos observados excede o número esperado em um determinado período de tempo, como aconteceu em São Paulo, Rio de Janeiro e em outros estados brasileiros nas décadas de 70 e 80 (BRASIL, 2001).

No Brasil, na década de 80 observou-se uma baixa incidência da doença, com o predomínio do meningococo sorogrupo B. A partir de 1986, foi observado um aumento na incidência de casos, com vários surtos identificados em diversas regiões do país, provocados pela introdução do sorogrupo B, especificamente, pela cepa cubana 4,7:P1.19,15 (BRASIL, 2001; SACCHI et al., 1992;) e pelo sorogrupo C (LEMOS et al., 2007; PURICELLI et al., 2004; SÃO PAULO, 2007). No ano de 1996, o Ministério da Saúde registrou a maior incidência para a doença meningocócica nos últimos 10 anos. Após este período tem-se observado uma queda na incidência em todo o país (BRASIL, 2005) (Figura 1). Entre os anos de 1990 a 2001 foram notificados 68.332 casos de doença meningocócica no país, e uma incidência anual média estimada entre 1 a 3 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2005).

A distribuição de sorogrupos referentes aos isolados caracterizados no período de 1990 a 2001 no Brasil foi a seguinte: 67% dos isolados pertenciam ao sorogrupo B, em torno de 30% sorogrupo C e 2% sorogrupo W135 (LEMOS et al., 2006). Apesar do predomínio do sorogrupo B no país, tem sido observado uma tendência para o aumento progressivo no número de casos relacionados ao sorogrupo C no Brasil nos últimos anos, principalmente na região Sudeste (BRASIL, 2005).

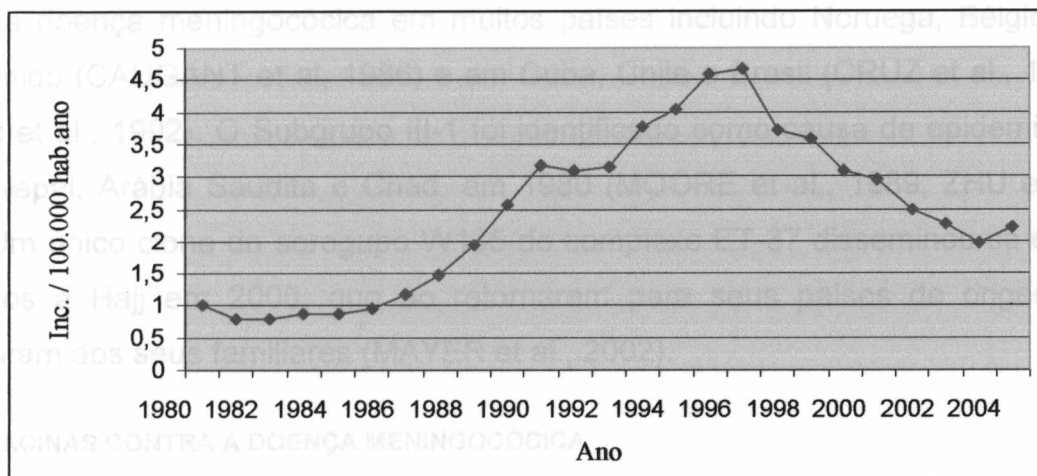


Figura 1. Distribuição da incidência da doença meningocócica no Brasil entre o período de 1980 e 2004 (SVS/MS, 2005).

Em 1973, o perfil epidemiológico da doença meningocócica na cidade de Salvador foi similar ao do país, com uma incidência anual de 4/100.000 hab. Nesta mesma década a incidência anual foi de 39 / 100.000 hab., em 1975, associado principalmente ao sorogrupo C (BRYAN et al., 1990). Uma segunda epidemia ocorreu em 1978, devido ao sorogrupo A, atingindo uma incidência de aproximadamente 18/100.000 hab. A partir de 1978, a incidência da doença meningocócica diminuiu para 3,8/100.000 hab em 1982, com predomínio do sorogrupo B, seguido do sorogrupo C (BRYAN et al., 1990). No Brasil, nos últimos anos os sorogrupos predominantes têm diferido no espaço e no tempo. Por exemplo, nas regiões norte e nordeste, o meningococo sorogrupo B contribuiu com mais de 80% dos isolados no período entre 1990 e 2001. No sul, entre 1990 e 1996, centro-oeste, entre 1990 e 1993, e no sudoeste (44% em 1995), a distribuição dos sorogrupos foi diferente devido à emergência das cepas sorogrupo C, as quais contribuíram com aproximadamente 50% de todos os isolados (LEMOS et al., 2006).

Em todo o mundo, a doença meningocócica está associada à disseminação de um número limitado de clones que aumenta a incidência e a gravidade da doença denominados clones hipervirulentos (CAUGANT, 1998). Tais clones hipervirulentos foram classificadas pelos métodos de eletroforese de enzimas codificadas por multilocus, MLEE, em complexo ET-5, ET-37, Grupo A4, Linhagem III, e Subgrupo I, III-1e IV-1) (Wang et al., 1992; Caugant, 1998), e pela tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST), em complexos ST11, ST32, ST8, ST41/44, ST1, ST5 e ST4 (MAIDEN et al., 1998). O complexo ET-5 foi identificado como clone prevalente em

surtos da doença meningocócica em muitos países incluindo Noruega, Bélgica, e Reino Unido (CAUGANT et al, 1986) e em Cuba, Chile e Brasil (CRUZ et al., 1990, SACCHI et al., 1992). O Subgrupo III-1 foi identificado como causa de epidemia na China, Nepal, Arábia Saudita e Chad, em 1980 (MOORE et al., 1989, ZHU et al., 2001). Um único clone do sorogupo W135 do complexo ET-37 disseminou-se entre peregrinos a Hajj em 2000, que ao retornarem para seus países de origem, o transmitiram aos seus familiares (MAYER et al., 2002).

1.3. VACINAS CONTRA A DOENÇA MENINGOCÓCICA

A única estratégia de longa eficácia na prevenção e controle da infecção meningocócica é a vacinação. Estudos clínicos têm demonstrado que a resposta antigênica da vacina polissacarídica não é satisfatória em crianças menores de dois anos, por isso não é indicada sua introdução na rotina de vacinação e sim em casos de surtos ou na rotina de indivíduos com risco de aquisição da doença (BILUKHA, 2005; REINGOLD et al., 1985). No entanto, conjugando o polissacarídeo a uma proteína a vacina induz à resposta imunológica tipo T-dependente, induzindo resposta inclusive nas crianças menores. A vacina antimeningocócica polissacarídica capsular conjugada a uma proteína foi primeiro licenciada no Reino Unido em 1999, contra o sorogrupos C e demonstrou ser altamente eficaz (MAIDEN & STUART, 2002; RAMSEY et al., 2003). Outro exemplo é a vacina polissacarídica contra meningococo tipo A, C, W135 e Y conjugada com a proteína toxóide diftérica (MCV-4; Menactra [Sanofi Pasteur]) que foi licenciada nos Estados Unidos, em 2005, para uso em pessoas entre 11-55 anos de idade (BILUKHA et al., 2005). Existem estudos para outras vacinas conjugadas que demonstraram uma sólida imunogenicidade nas crianças menores de dois anos (CHIPPAUX, et al. 2004; MACLENNAN et al., 2001).

O grande desafio no momento é o desenvolvimento de uma vacina não polissacarídica de longa eficácia contra o meningococo B, uma vez que, este possui a cápsula polissacarídica fracamente imunogênica em humanos (GRIFFISS et al., 1987), atribuído a uma tolerância devido à sua semelhança com oligômeros α -(2 \rightarrow 8) do ácido siálico ou ácido α -(2 \rightarrow 8) N-acetil-neuramínico, presentes também nos glicopeptídeos humanos (BRISSON et al., 1992). Desta forma, as estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o sorogrupos B, tem como alvo,

principalmente, os antígenos não-capsulares, como por exemplo, antígenos das vesículas da membrana externa, OMVs (FRASCH, 1989).

Vacinas OMV contra sorogrupo B têm sido usadas com sucesso no controle de surtos; embora, seu sucesso seja limitado a surtos clonais, porque a imunogenicidade das vacinas OMV é dirigida primariamente a PorA (porina A) que é altamente variável entre cepas pertencentes ao sorogrupo B (MILAGRES et al., 1994; O'HALLAHAN et al., 2005; SIERRA et al., 1991).

Duas vacinas contra o meningococo sorogrupo B foram desenvolvidas e usadas com sucesso no final dos anos 80 e início dos anos 90, em resposta a surto da doença meningocócica na Noruega e Cuba. A primeira vacina, a VA-MENGOC-BC, foi produzida pelo Instituto Finlay em Havana, Cuba (cepa cubana utilizada, CU385 B:4:P1.15) e a segunda foi produzida no Instituto Nacional de Saúde Pública em Oslo, Noruega (cepa norueguesa utilizada, 44/76, B:15:P1.7,16), baseada em proteínas de membrana externa Classe 2. Estudos de eficácia destas vacinas foram conduzidos durante epidemias que ocorreram na Noruega, Cuba, Brasil e Chile. As vacinas mostraram ser imunogênicas entre adultos e crianças maiores de 2 anos de idade (70-80% de eficácia por ano) (MILAGRES et al., 1994; SIERRA et al., 1994). Em 2001, a Nova Zelândia em colaboração com a Noruega desenvolveu, testou e produziu uma vacina contendo OMVs com PorA e PorB (porina B), bem como lipopolissacarídeo de uma cepa da Nova Zelândia e em 2004, esta vacina recebeu uma licença provisória para seu uso em crianças naquele país (O'HALLAHAN et al., 2005).

A partir da análise de sequenciamento do genoma completo da cepa MC58, que pertence ao sorogrupo B, e baseado no conceito que antígenos de superfície são mais sujeitos ao reconhecimento por anticorpos e, portanto, são mais úteis como candidatos para vacina, o genoma foi pesquisado completamente utilizando-se ferramentas de bioinformática com o objetivo de selecionar áreas abertas de leitura (ORF) que codificassem para tais proteínas. Muitos desses antígenos vêm sendo testados no preparo de vacinas efetivas, inclusive vacinas que sejam capazes de induzir imunidade contra outras cepas patogênicas do meningococo (FERRARI et al., 2006; MASIGNANI et al., 2003; PIZZA et al., 2000; REQUEJO, 1997; SERRUTO et al., 2003). Este processo foi denominado "vacinologia reversa" (RAPPUOLI, 2001). Estes alvos antigênicos têm sido avaliados como candidatos a uma vacina

universal e se efetivo, será muito importante como intervenção contra a doença em situações epidemiológicas como a do Brasil (GIULIANI et al., 2006).

1.4. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Análises de isolados através de técnicas de biologia molecular são de extrema importância para estudos de epidemiologia, pois ajudam na identificação de surtos de doenças infecciosas (WOODS et al., 1996), na caracterização de rotas de transmissão do patógeno (DOMBEK et al., 2000), na identificação de possíveis fontes da infecção (KIDD et al., 2001), no reconhecimento particularmente de cepas hipervirulentas (JOHNSON et al., 2000), no monitoramento de programas de vacinação (WEDEGE et al., 1998), na demonstração da associação entre os casos ou entre casos e portadores durante um surto, como também no monitoramento das mudanças epidemiológicas da doença (OLIVE & BEAN, 1999; ROSEINSTEIN et al., 1999; YAKUBU et al., 1999).

Muitos métodos de tipagem molecular para a caracterização da *N. meningitidis* têm sido utilizados nas investigações epidemiológicas em adição a fenotipagem. Desde o início de 1980, variações da MLEE (eletroforese de enzima multilocus) têm sido utilizadas para subdividir o meningococo em distintos tipos eletroforéticos (ETs) (SELANDER et al., 1986). Esta técnica é ainda considerada o padrão-ouro para a tipagem de *Neisseria meningitidis* e tem sido usada por muito tempo como uma das técnicas de análise mais efetivas para determinar tendências na epidemiologia do meningococo e para identificar os principais clones com potencial epidêmico (MAIDEN et al., 1998; SELANDER et al., 1986; WEIS & LIND, 1996). No entanto, é uma técnica extremamente laboriosa, requer um tempo extenso para sua execução e o maior problema é a dificuldade de reproduzir resultados de uma mesma cepa entre laboratórios (ENRIGHT & SPRATT, 1999). Como alternativa para o MLEE, foi desenvolvida a técnica do MLST (tipagem por sequenciamento de multilocus) que consiste no sequenciamento direto de fragmentos internos de sete genes constitutivos (MAIDEN et al., 1998). Este método é baseado nos fundamentos do MLEE e foi estabelecido em 1998 por Maiden et al. O MLST provê resultados que são únicos, distingue mais alelos por locus que o MLEE e permitindo um maior nível discriminatório entre isolados (ENRIGHT & SPRATT, 1999; FEAVERS et al., 1999). Além disto, permitiu a construção de um grande banco de dados que armazena

informações de milhares de seqüências de genes constitutivos de cepas de *N. meningitidis*, como também de outras espécies bacterianas; o banco de dados do MLST está disponível gratuitamente através do site <http://pubmlst.org>, possibilitando o monitoramento de cepas relacionadas a endemias ou epidemias de meningites meningocócicas (JOLLEY et al., 2004). Porém, esta é uma técnica que requer uma infra-estrutura de alto custo em equipamentos e reagentes que não estão disponíveis na maioria dos países atingidos pelas doenças meningocócicas.

Existe um outro grupo de métodos de tipagem bacteriana que também possui a característica de detectar micro-variações no genoma, necessário para distinguir cepas circulantes dentro de uma região geográfica. Neste grupo, a técnica mais utilizada é o PFGE (eletroforese em campo pulsado) (BYGRAVES & MAIDEN, 1992; RAYMOND et al., 1997), o RFLP (polimorfismo dos fragmentos de restrição), (BJORVATN et al., 1992), a ribotipagem (STULL et al., 1988) e outros métodos baseados em PCR (reação da polimerase em cadeia), como o Rep-PCR (PCR de seqüências repetitivas) (KO et al., 2000; LOOVEREN et al., 1998) e o MLRFT (tipagem de fragmentos de restrição de multilocus) (DIEP et al., 2003).

Para a *N. meningitidis* o Rep-PCR recebe a designação de NgRep-PCR (WOODS et al., 1996). A técnica é relativamente de fácil execução e aplicável a um grande ou pequeno número de amostras (OLIVE & BEAN, 1999). Através deste método, são amplificados múltiplos fragmentos que diferem de um isolado, para o outro, conforme sua proximidade clonal e filogenética. Métodos de tipagem baseados em Rep-PCR têm boa sensibilidade e especificidade, e são de execução rápida, que os torna atrativos, na rotina de vigilância local e investigações epidemiológicas (VERSALOVIC & LUPSKI, 1995). No entanto, alguns trabalhos afirmam que o seu poder discriminatório é menor que o do MLEE e PFGE (YAKUBU et al., 1999), podendo discriminar polimorfismos entre cepas (taxonomia), mas não funciona nas situações epidemiológicas.

O MLRFT apresenta-se como método alternativo de tipagem ao MLST, onde os produtos de PCR correspondentes aos fragmentos que deveriam ser seqüenciados pelo MLST são cortados com enzimas de restrição e o polimorfismo gerado determina um padrão alélico específico. Este método possui duas das importantes características do MLST: o método é altamente discriminatório e possui uma excelente reprodutibilidade. Sendo uma alternativa conveniente ao MLST e PFGE porque requer apenas equipamentos básicos em um laboratório de biologia

molecular, sendo relativamente simples, barato, de fácil execução e análise (DIEP et al., 2003).

A caracterização molecular e epidemiológica de isolados de *Neisseria meningitidis* serve como subsídio para a discriminação de microvariabilidades entre as cepas hipervirulentas e identifica determinantes de patogenicidade associados à transmissão da doença meningocócica, além de fornecer informações valiosas para a definição de políticas de saúde pública.

2. JUSTIFICATIVA

A *Neisseria meningitidis* tornou-se a principal causa de meningite bacteriana em crianças e adultos jovens em todo o mundo após a redução acentuada na incidência de infecções pelo *Haemophilus influenzae* tipo b conseguida como resultado do uso de vacinas conjugadas (RIBEIRO et al., 2003; ROSEINSTEIN et al., 2001). Taxas epidêmicas de doença meningocócica variam de 1 a 5 / 100.000 em muitos países desenvolvidos e de 10 a 25 / 100.000 em alguns países em desenvolvimento (WHO, 2003). Esta diferença na incidência reflete as diferenças das propriedades patogênicas das cepas prevalentes de *N. meningitidis*, as diferenças socioeconômicas e condições ambientais. No Brasil, durante os últimos 10 anos, mais de 4500 casos de doença meningocócica foram reportados anualmente, com uma letalidade em torno de 15-20% (DE FILIPPIS et al., 2004; BRASIL, 2005).

A natureza epidêmica dos casos da doença meningocócica, mais os dados de letalidade, demonstram a importância dos estudos de epidemiologia molecular nos programas de vigilância epidemiológica, através dos quais são fornecidas informações valiosas para a definição de políticas de saúde pública.

3. HIPÓTESES

- A meningite meningocócica em Salvador ocorre sob a forma de uma endemia com predomínio de um clone bacteriano mais virulento, acompanhado por casos esporádicos de outros clones.
- Os métodos moleculares de tipagem baseado na amplificação por PCR das regiões extragênicas entre elementos repetitivos (NgRep-PCR) e na análise de fragmentos de restrição de multilocus (MLRFT) produzem resultados comparáveis com os de fenotipagem e demonstram algumas vantagens, como: execução rápida, simples, de baixo custo e de fácil aplicação em laboratórios de países em desenvolvimento.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

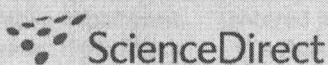
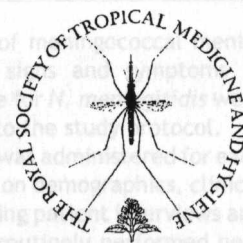
Determinar as características epidemiológicas da meningite meningocócica em Salvador-BA e descrever a distribuição genotípica da *Neisseria meningitidis* identificadas durante a vigilância.

4.2. ESPECÍFICOS

- Identificar as características clínicas e epidemiológicas dos casos de meningite meningocócica e realizar fenotipagem dos isolados de *Neisseria meningitidis* em onze anos de vigilância hospitalar ativa em Salvador, Bahia;
- Utilizar os métodos moleculares de tipagem baseado na amplificação por PCR das regiões extragênicas entre elementos repetitivos (NgRep-PCR) e na análise de fragmentos de restrição de multilocus (MLRFT) como ferramentas para a investigação epidemiológica;
- Identificar e monitorar a ocorrência de cepas hipervirulentas de *Neisseria meningitidis* identificadas durante a vigilância epidemiológica.

5. ARTIGO 1 - HOSPITAL-BASED SURVEILLANCE FOR MENINGOCOCCAL MENINGITIS IN SALVADOR, BRAZIL.

Soraia M. Cordeiro, Alan B. Neves, Cássio T. Ribeiro, Maya L. Petersen, Edilane L. Gouveia, Guilherme S. Ribeiro, Tatiana S. Lôbo, Joice N. Reis, Kátia M. Salgado, Mitermayer G. Reis, Albert I. Ko

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/trst

Hospital-based surveillance of meningococcal meningitis in Salvador, Brazil

Soraia M. Cordeiro^a, Alan B. Neves^a, Cássio T. Ribeiro^a, Maya L. Petersen^b, Edilane L. Gouveia^a, Guilherme S. Ribeiro^a, Tatiana S. Lôbo^a, Joice N. Reis^{a,c}, Kátia M. Salgado^d, Mitermayer G. Reis^a, Albert I. Ko^{a,e,*}

^a Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Rua Waldemar Falcão 121, Salvador, Bahia 40296-710, Brazil

^b Joint Medical Program/Division of Epidemiology, School of Public Health, University of California, Berkeley, CA, USA

^c School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

^d Couto Maia Hospital, Bahia Secretary of Health, Salvador, Brazil

^e Division of International Medicine and Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA

Received 21 March 2007; received in revised form 14 June 2007; accepted 14 June 2007

Available online 6 August 2007

KEYWORDS

Meningococcal disease;
Meningitis;
Neisseria meningitidis;
Serogroup;
Epidemiology;
Brazil

Summary This study aimed to describe the clinical, epidemiological and microbiological features of meningococcal meningitis in Salvador, Brazil. Between February 1996 and January 2001, a hospital-based surveillance prospectively identified cases of culture-positive meningococcal meningitis. Demographic and clinical data were collected through interview and medical chart review. Antisera and monoclonal antibodies were used to determine the serogroup and serotype:serosubtype of the isolates, respectively. Surveillance identified a total of 408 cases of meningococcal meningitis, with a case fatality rate of 8% (32/397). The mean annual incidence for the 304 culture-positive cases residing in metropolitan Salvador was 1.71 cases per 100 000 population. Infants <1 year old presented the highest incidence (14.7 cases per 100 000 population). Of the 377 serogrouped isolates, 82%, 16%, 2% and 0.3% were serogroups B, C, W135 and Y, respectively. A single serotype:serosubtype (4,7:P1.19,15) accounted for 64% of all cases. Continued surveillance is necessary to characterise strains and to define future prevention and control strategies.

© 2007 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neisseria meningitidis is a common cause of disease worldwide, responsible for significant morbidity and mortality in infants and young children (Bilukha and Rosenstein, 2005). Without appropriate antimicrobial treatment, most cases

* Corresponding author. Tel.: +55 71 3176 2302; fax: +55 71 3176 2281.

E-mail address: aik2001@med.cornell.edu (A.I. Ko).

of meningococcal meningitis are fatal (Flexner, 1913) and even with prompt intervention the case fatality rate (CFR) reaches 10% (Caugant, 1998). Among those who survive, permanent sequelae, including deafness, cognitive impairment and paralysis, are common (Edwards and Baker, 1981; Kirsch et al., 1996).

In 1999, the UK introduced a highly efficacious protein-conjugate vaccine against *N. meningitidis* serogroup C (Trotter et al., 2004). Six years later, a tetravalent conjugate meningococcal vaccine, including the capsular polysaccharides of serogroups A, C, Y and W 135, was licensed for use among persons aged 11–55 years (Bilukha and Rosenstein, 2005). Despite these advances, an effective vaccine against serogroup B, a major cause of invasive meningococcal disease in many European countries and the Americas, is not currently available (Bjune et al., 1991; De Moraes et al., 1992; Sierra et al., 1991; Tappero et al., 1999; Tsolia et al., 2006). Future prevention of serogroup B disease will rely both on outer membrane vesicle (OMV) vaccines being used for specific serosubtypes and new vaccines containing multiple other antigens.

In Brazil, serogroup B meningococcal disease has been endemic since the 1980s and is associated with the majority of meningococcal disease. Furthermore, specific serotype:serosubtype combinations of the ET-5 complex, including B:4,7:P1.19,15, have been identified as the predominant serogroup B strain both in epidemic and endemic situations (Sacchi et al., 1992, 2001).

Data on the epidemiology of meningococcal meningitis from population-based surveillance are necessary to characterise better circulating strains and to guide decisions regarding future prevention and control strategies for meningococcal meningitis. However, prior studies in Brazil were based on notification reports and on isolate collections. In the present study, we report the clinical, epidemiological and microbiological findings of a 5-year active hospital-based surveillance for meningococcal meningitis in Salvador, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Surveillance

From 1 February 1996 to 31 January 2001, active hospital-based surveillance for meningococcal meningitis was performed in Couto Maia Hospital, the state reference hospital for infectious diseases in Salvador, Brazil. Currently, metropolitan Salvador is the third largest urban area in Brazil, with a population of 2.6 million inhabitants (Brazilian Institute for Geography and Statistics, 2002). As part of the State Health Department protocol, all suspected cases of meningitis should be referred to this hospital, where diagnostic evaluation, including lumbar puncture and cerebrospinal fluid (CSF) analysis, is performed at the emergency room. Notification of meningitis cases to state health officials is mandatory and the study hospital reports 98% of the cases among residents of metropolitan Salvador. After the initial evaluation, patients with evidence of meningitis are admitted. Rarely, they are transferred to another facility.

During the surveillance period, project personnel reviewed the clinical laboratory results 5 days a week to

identify culture-confirmed cases of meningococcal meningitis. All patients with clinical signs and symptoms of meningitis and CSF culture positive for *N. meningitidis* were entered into the study according to the study protocol.

A standardised data entry form was administered for each case, which collected information on demographics, clinical history and laboratory findings during patient interviews and medical chart review. Physicians routinely performed neurological examinations and assessment of sequelae during hospitalisation. Information on sequelae present at the time of hospital discharge was analysed.

2.2. Laboratory methods

Neisseria meningitidis isolates from CSF cultures were incubated overnight at 37 °C on chocolate agar in a CO₂ atmosphere. Coagglutination with specific antisera was used to identify the isolate serogroup (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Monoclonal antibodies were used to identify isolate serotype and serosubtype, using the dot-blot method as described previously (Wedegge et al., 1990).

2.3. Statistical analysis

Patients residing in the city of Salvador or in one of the 29 municipalities located within 75 km of Salvador (aggregate population of 3.5 million) were included for incidence calculations. The surveillance hospital is the only infectious disease reference centre within this metropolitan area. Incidence calculations were based on the 2000 Brazilian census, provided by the Brazilian Institute for Geography and Statistics without adjusting for population growth (Brazilian Institute for Geography and Statistics, 2002).

Data were entered and managed by Epi Info version 6.04 (CDC, Atlanta, GA, USA) and analysed with SAS for Windows version 8.02 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and Epi Info version 6.04. Ratios and 95% CI were calculated by the Mid-P algorithm (Berry and Armitage, 1995). Statistical significance for comparison of proportions was assessed by χ^2 test or, when the expected cell value was <5, by Fisher's exact test. Median values were compared by the Kruskal–Wallis method. Differences were considered statistically significant when the two-tailed *P*-value was <0.05.

3. Results

During the 5-year study period of active hospital-based surveillance, 408 cases of meningococcal meningitis were identified. The monthly number of cases of meningococcal meningitis varied by season, with the highest proportion of cases observed during the months of increased rainfall in the fall and winter and the lowest proportion of cases occurring during the summer (Figure 1).

Epidemiological data were available for 397 (97%) of the cases. The CFR was 8% (32/397) and neurological sequelae occurred in 3% (11/365) of survivors at the time of hospital discharge (Table 1). The CFR was significantly higher in cases presenting with petechiae (11% vs. 3%; *P*=0.003) and in cases with a hospital course including seizures (15% vs. 6%; *P*=0.04). Blood cultures were performed for 28% of the patients (112/397), of whom 31% (35/112) had positive

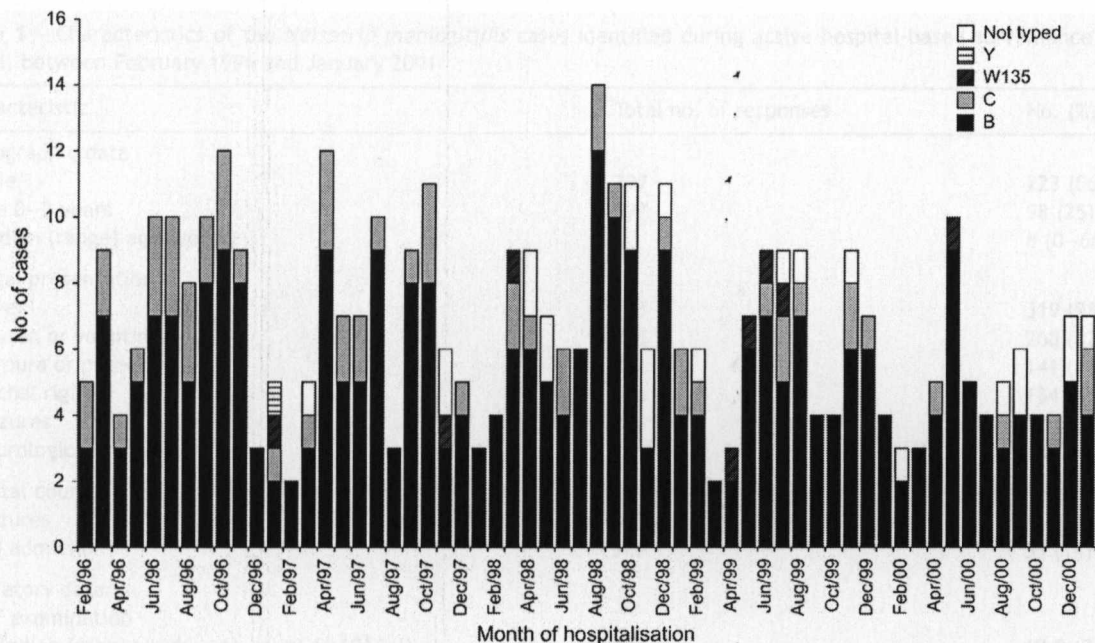


Figure 1 Distribution of meningococcal meningitis cases according to serogroup and month of identification during active hospital-based surveillance in Salvador, Brazil.

cultures for *N. meningitidis*. Patients with positive blood culture results had a higher CFR (17% vs. 5%; $P=0.06$).

The mean annual incidence of meningococcal meningitis, based on the 304 culture-positive cases who were residents of metropolitan Salvador, was 1.71 cases per 100 000 population between February 1996 and January 2001 (Table 2). During the same period, the incidence of culture-positive *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* meningitis was 1.38 and 2.05 cases per 100 000 population, respectively. Overall annual incidences of meningococcal meningitis were 2.00, 1.55, 2.23, 1.55 and 1.24 per 100 000 population in Years 1 through 5, respectively (χ^2 test for trend, $P=0.029$). The age-specific incidence was highest in children <1 year of age (14.7/100 000), peaking at age 4–5 months (29.4/100 000) and declining with increasing age thereafter (Table 2).

Laboratory data were available for 377 (92%) of the cases. Serogroup B was the most frequent serogroup (309/377; 82%), followed by serogroup C (60/377; 16%), W135 (7/377; 2%) and Y (1/377; 0.3%) (Table 1). The most frequent serotype:serosubtype was 4,7:P1.19,15, followed by 4,7:P1.7,1, then 4,7:P1.3 and 2a:P1.2, which were identified in 63.7%, 3.7%, 2.7% and 2.4% of cases, respectively (Table 3).

The median age of patients with serogroups B, C and W135 disease was 7, 10 and 9 years, respectively. Patients with serogroup C disease were more likely to be >2 years of age compared with other serogroup infections (87% vs. 73%; $P=0.03$), whilst patients with serogroup B isolates were more likely to be <2 years old (27% vs. 15%; $P=0.05$).

4. Discussion

This study describes the clinical, epidemiological and microbiological features of meningococcal meningitis in Salvador,

Brazil. Active hospital-based surveillance was performed in metropolitan Salvador and detected a mean annual incidence of 1.71 cases of meningococcal meningitis per 100 000 population, with a CFR of 8.1%. These rates are comparable with those seen in the USA and Europe (Bilukha and Rosenstein, 2005; Rosenstein et al., 1999, 2001). As a caveat, rates of culture-positive meningococcal meningitis are likely to underestimate the true disease burden, which is expected to be higher than that encountered in developed countries, since case ascertainment may not have been complete and use of antibiotics prior to hospitalisation may have interfered with the efficiency of culture isolation.

Our data support previous observations where the incidence of meningococcal meningitis was higher in young children, peaking in infants 4–5 months of age (Peltola, 1983; Rosenstein et al., 1999). However, in the USA and Europe, an elevated rate of meningococcal disease has been reported among teenagers and young adults (Cartwright et al., 2001; Rosenstein et al., 1999). In this situation, increased risk was associated with exposure to diverse strains of *N. meningitidis* during college attendance, especially for students residing in dormitories (Cartwright et al., 2001; Rosenstein et al., 2001). In contrast, meningococcal meningitis cases in Salvador were predominantly members of poor slum (*favela*) communities. A large proportion of the population is presumably exposed early in life owing to high endemic transmission of meningococcal strains in these densely populated communities. The lower attack rates observed among adolescents and adults in comparison with infants may relate to early acquisition of naturally acquired immunity in this high transmission setting.

Increased numbers of meningococcal cases tended to occur during the fall and winter months in Salvador, which is situated in the Southern Hemisphere tropics and has a mean daily relative humidity of 75–90%. The fall and

Table 1 Characteristics of the *Neisseria meningitidis* cases identified during active hospital-based surveillance in Salvador, Brazil, between February 1996 and January 2001

Characteristic	Total no. of responses	No. (%) of patients ^a
Demographic data		
Male	397	223 (56)
Age 0–2 years	397	98 (25)
Median (range) age (years)		8 (0–66)
Clinical presentation		
Fever	325	319 (98)
Nausea or vomiting	325	268 (82)
Purpura or petechiae	342	141 (41)
Nuchal rigidity	326	134 (41)
Seizures	326	51 (16)
Neurological focal signs	281	13 (5)
Hospital course		
Seizures	373	41 (11)
ICU admission	377	53 (14)
Laboratory data		
CSF examination		
Median (range) leukocyte count ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	393	10.0 (7.0–21.2)
Median (range) glucose level (mg/dl)	394	20 (0–220)
Median (range) protein level (mg/dl)	392	300 (0–800)
Positive blood culture	112	35 (31)
Serogroup		
B	377	309 (82)
C	377	60 (16)
W135	377	7 (2)
Y	377	1 (0.3)
Clinical outcome		
Median (range) days of hospitalisation	383	11 (0–43)
Neurological sequelae on hospital discharge ^b	323	11 (3)
No. of deaths (case fatality rate (%))	397	32 (8)

ICU: Intensive Care Unit; CSF: cerebrospinal fluid.

^a Data are No. (%) of patients, unless otherwise indicated.

^b Sequelae among 323 survivors with available information included ataxia (5), auditory deficit (3), motor deficit (2) and cognitive deficit (1).

winter seasons occur between April and September and correspond to the seasonal period of increased rainfall and cooler temperatures. However, variation in temperature is small throughout the year with mean temperatures ranging between 25 °C and 34 °C. In temperate zones in the Northern Hemisphere, seasonal increases in meningococcal cases occur during the winter and spring (Jackson and Wenger, 1993). Seasonality may vary from place to place depending on other risk factors such as age and meningococcal phenotype (Jensen et al., 2003). The observed seasonal increase in cases in Salvador may relate to rainfall and, in turn, to increased household crowding during these periods, which facilitates transmission. However, evaluation of seasonal patterns and the influence of climatic factors will require the use of appropriate analytical approaches such as time-series modelling.

Serogroup B meningococcus emerged in the 1990s to become the major cause of meningococcal meningitis in Salvador. Eighty-two percent of cases were caused by serogroup B strains and 64% of all cases were caused by a single

serosubtype, P1.19,15. These findings confirm results from passive surveillance performed throughout Brazil in 2001, in which 67% of cases were caused by serogroup B and 54% were caused by serosubtype B:4,7:P1.19,15 (Lemos et al., 2006). The high predominance of a single serogroup and serosubtype and the moderately high incidence sustained throughout the study period are characteristic of extended outbreaks, as described in Latin America and other parts of the world following introduction and establishment of strains from the ET-5 complex (Caugant, 1998; Caugant et al., 1987; Diermayer et al., 1999; Poolman et al., 1986; Sacchi et al., 2001).

The overwhelming dominance of serogroup B disease shows that there is no indication for administration of a capsular vaccine against serogroups A and C in Salvador at this time. Continued follow-up in the same hospital revealed that to date serogroup B has remained the prominent serogroup in Salvador, Brazil (data not shown). However, the incidence of serogroup C has increased in most regions of Brazil since 2002, mainly in the southeastern area

Table 2 Annual incidence of meningococcal meningitis and case fatality rates (CFR) by age group and year during active surveillance in Salvador, Brazil, between February 1996 and January 2001^a

Age group (years)	No. of cases	No. (%) of deaths (CFR)	Annual incidence ^b					Average incidence
			1996	1997	1998	1999	2000	
<1	47	5 (10.6)	20.3	15.6	9.4	14.1	14.1	14.7
1-2	35	2 (5.7)	3.9	5.4	10.1	2.3	5.4	5.4
3-4	30	1 (3.3)	8.7	0.8	6.3	5.5	2.4	4.7
5-9	55	5 (9.1)	2.8	3.5	5.0	2.5	3.5	3.5
10-14	52	4 (7.7)	3.5	4.1	3.5	2.0	2.0	3.0
15-19	40	2 (5.0)	2.4	1.4	2.9	1.9	1.0	1.9
20-29	23	3 (13.0)	0.6	0.6	1.3	0.6	0.3	0.7
30-39	12	1 (8.3)	0.7	0.2	0.4	0.7	0.2	0.4
40-49	4	2 (50.0)	0.5	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2
50-59	1	0 (0)	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
≥60	1	0 (0)	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.1
All ages	300	25 (8.3)	2.00	1.55	2.23	1.55	1.24	1.71

^a The table encompasses cases from the metropolitan region of Salvador ($n=304$) less 4 cases whose ultimate outcome was unknown.

^b Cases per 100 000 inhabitants. In 1996, all incidence data were corrected to represent a 12-month period.

(SVS/MS, 2005). Thus, continued surveillance is necessary to detect possible changes in the meningococcal meningitis pattern.

Owing to the poor immunogenicity of the serogroup B capsular polysaccharide, attempts to develop a vaccine protecting against serogroup B disease have involved many bacterial components, including the proteins determining type and subtype specificity. An effective OMV-based vaccine against the dominant serosubtypes present in Brazil could prevent significant morbidity and mortality. The OMV vaccines can be 'tailor-made' and current approaches to vaccine development have been based on preparations derived from strains such as B:4,7:P1.19,15, which are the most predominant invasive strains in high endemicity settings. To address the potential usefulness of such vaccines, it is important to monitor the circulating serogroup B phenotypes as defined by serotype:serosubtype patterns (Lind and Berthelsen, 2005).

A hexavalent OMV-based vaccine developed in The Netherlands against six common serosubtypes (P1.19,15, P1.7,1, P1.7,4, P1.5,2, P1.5,10 and P1.12,13) appears to be safe and immunogenic in adults and older children (Pollard and Levin, 2000). This vaccine, which includes strains with serosubtypes that account for 70.6% of cases of meningococcal meningitis in Salvador, would be a candidate for use in Salvador if it proves efficacious. However, existing limitations of OMV-based meningococcal vaccines, including lower efficacy in young children (Costa et al., 1996; De Moraes et al., 1992; Sierra et al., 1991; Tappero et al., 1999), inability to induce immunological memory (Wedge et al., 1998) and failure to provide cross-protection against non-vaccine strains, may delay their use (Pollard and Levin, 2000). Alternatively, reverse vaccinology approaches have identified antigens that induce antibactericidal antibody responses against the spectrum of meningococcal serogroup B strains associated with invasive disease (Giuliani et al., 2006; Massignani et al., 2003). These target antigens are being evaluated as candidates for a universal serogroup B subunit vaccine and, if effective, will be an important inter-

vention against this disease in epidemiological situations such as encountered in Brazil.

In conclusion, this is the first active hospital-based surveillance study of meningococcal meningitis in Brazil since the 1970s. It confirms that the epidemiological features of meningococcal meningitis have changed dramatically over the past three decades in Brazil, with the disappearance of large-scale epidemics caused by serogroups A and C and the introduction and establishment of serogroup B strains of the ET-5 complex (Sacchi et al., 2001). This study demonstrates that potentially important differences exist between the epidemiological features of meningococcal disease in Brazil and the developed world. Improved understanding of these differences and of the changing trends in the epidemiological features of this disease is essential to plan and implement strategies in order to prevent and reduce the high morbidity and mortality caused by *N. meningitidis*. It is noteworthy that the active hospital-

Table 3 Serotype:serosubtype distribution of *Neisseria meningitidis* isolates identified during active surveillance in Salvador, Brazil, between February 1996 and January 2001

Serotype:serosubtype	No. (%) of isolates ($n=377$)
4,7:P1.19,15	240 (63.7)
4,7:P1.7,1	14 (3.7)
4,7:P1.3	10 (2.7)
2a:P1.2	9 (2.4)
2a:P1.5,2	6 (1.6)
2b:P1.5	5 (1.3)
4,10:P1.9	5 (1.3)
4,7:nt	5 (1.3)
7:P1.19,15	5 (1.3)
Other ^a	64 (17.0)
Non-typeable ^a	14 (3.7)

^a Other includes serotype:serosubtype strains isolated at a frequency of <1%.

based surveillance became continuous and has provided valuable information regarding meningococcal meningitis today.

Authors' contributions: MGR and AIK conceived the idea for the project; SMC, ELG, JNR and AIK designed the study protocol; ABN, CTR, TSL, ELG and GSR performed the clinical evaluations and patient interviews; JNR, ABN and SMC performed the laboratory analyses; SMC, CTR, ABN, MLP and ELG performed the data analysis; SMC, ABN and MLP drafted the manuscript and JNR, MGR and AIK made the final revision. All authors read and approved the final manuscript. AIK is guarantor of the paper.

Acknowledgements: We thank the clinical, laboratory and administrative staff of Couto Maia Hospital, especially Ana Maria Maia and Neide Oliveira Silva; Steve Copolla and Ricardo Martinez Pinheiro for assistance in data collection and processing; Maviany Mota for assistance with laboratory analyses; Brendan Flannery and Luciano K. Silva for assistance with statistical analyses; Edgar Lessa Crusóé, Orgali Marques, Neci Ivo Ramos and Nilda Lúcia Nunes Ivo from Bahia Secretary of Health for providing information on meningitis case notifications; Ana Paula S. Lemos from São Paulo Secretary of Health for providing information about serotype and serosubtype; and Lee W. Riley and Warren D. Johnson Jr for critical advice during study implementation. Most of all we thank the study patients and their families.

Funding: Grants from the Brazilian National Research Council (300.861/96) and National Institutes of Health, USA (TW-00919, TW-007303).

Conflicts of interest: None declared.

Ethical approval: The Institutional Review Boards of the Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health in Salvador, Bahia, Brazil, and Weill Medical College of Cornell University in New York, NY, USA.

References

- Berry, G., Armitage, P., 1995. Mid-P confidence intervals: a brief review. *Statistician* 44, 417–423.
- Bilukha, O.O., Rosenstein, N., 2005. Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* 54, 1–21.
- Bjune, G., Hoiby, E.A., Gronnesby, J.K., Arnesen, O., Fredriksen, J.H., Lindbak, A.K., Nokleby, H., Rosenqvist, E., Solberg, L.K., Closs, O., Eng, J., Froholm, L.O., Lystad, A., Bakkeiteig, L.S., Hareide, B., Halstensen, A., Holten, E., Eng, J., 1991. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 338, 1093–1096.
- Brazilian Institute for Geography and Statistics, 2002. Anuário estatístico do Brasil, 2000. Rio de Janeiro, IBGE.
- Cartwright, K., Noah, N., Peltola, H., 2001. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6–8 October, 2000. *Vaccine* 19, 4347–4356.
- Caugant, D.A., 1998. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 106, 505–525.
- Caugant, D.A., Froholm, L.O., Bovre, K., Holten, E., Frasch, C.E., Mocca, L.F., Zollinger, W.D., Selander, R.K., 1987. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 389–394.
- Costa, E.A., Martins, H., Klein, C.H., 1996. Evaluation of the protection received by a BC antimeningococcal vaccine in the State of Santa Catarina, Brazil, 1990/92. *Rev. Saude Publica* 30, 460–470.
- De Moraes, J.C., Camargo, M.C., Hidalgo, N.T., Barbosa, H.A., Gattas, V.L., Vasconcelos, H.G., Sacchi, C.T., Land Gral, I.M., Perkins, B.A., Wenger, J.D., Plikaytis, B.D., Broome, C.V., 1992. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 340, 1074–1078.
- Diermayer, M., Hedberg, K., Hoesly, F., Fischer, M., Perkins, B., Reeves, M., Fleming, D., 1999. Epidemic serogroup B meningococcal disease in Oregon: the evolving epidemiology of the ET-5 strain. *JAMA* 281, 1493–1497.
- Edwards, M.S., Baker, C.J., 1981. Complications and sequelae of meningococcal infections in children. *J. Pediatr.* 99, 540–545.
- Flexner, S., 1913. The results of serum treatment in thirteen hundred cases of epidemic meningitis. *J. Exp. Med.* 106, 553–576.
- Giuliani, M.M., Adu-Bobie, J., Comanducci, M., Arico, B., Savino, S., Santini, L., Brunelli, B., Bambini, S., Biolchi, A., Capecci, B., Cartocci, E., Ciucchi, L., Di Marcello, F., Ferlicca, F., Galli, B., Luzzi, E., Massignani, V., Serruto, D., Veggi, D., Contorni, M., Morandi, M., Bartalesi, A., Cinotti, V., Mannucci, D., Titta, F., Ovidi, E., Welsch, J.A., Granoff, D., Rappuoli, R., Pizza, M., 2006. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10834–10839.
- Jackson, L.A., Wenger, J.D., 1993. Laboratory-based surveillance for meningococcal disease in selected areas, United States, 1989–1991. *MMWR CDC Surveill. Summ.* 42, 21–30.
- Jensen, E.S., Lundbye-Christensen, S., Pedersen, L., Sørensen, H.T., Schönheyder, H.C., 2003. Seasonal variation in meningococcal disease in Denmark: relation to age and meningococcal phenotype. *Scand. J. Infect. Dis.* 35, 226–229.
- Kirsch, E.A., Barton, R.P., Kitchen, L., Giroir, B.P., 1996. Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15, 967–978, quiz 979.
- Lemos, A.P., Brandao, A.P., Gorla, M.C., Paiva, M.V., Simonsen, V., Melles, C.E., 2006. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. *J. Med. Microbiol.* 55, 751–757.
- Lind, I., Berthelsen, L., 2005. Epidemiology of meningococcal disease in Denmark 1974–1999: contribution of the laboratory surveillance system. *Epidemiol. Infect.* 133, 205–215.
- Massignani, V., Comanducci, M., Giuliani, M.M., Bambini, S., Adu-Bobie, J., Arico, B., Brunelli, B., Pieri, A., Santini, L., Savino, S., Serruto, D., Litt, D., Kroll, S., Welsch, J.A., Granoff, D.M., Rappuoli, R., Pizza, M., 2003. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J. Exp. Med.* 197, 789–799.
- Peltola, H., 1983. Meningococcal disease: still with us. *Rev. Infect. Dis.* 5, 71–91.
- Pollard, A.J., Levin, M., 2000. Vaccines for prevention of meningococcal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 333–344, quiz 345.
- Poolman, J.T., Lind, I., Jonsdottir, K., Froholm, L.O., Jones, D.M., Zanen, H.C., 1986. Meningococcal serotypes and serogroup B disease in north-west Europe. *Lancet* 2, 555–558.
- Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Lefkowitz, L., Cartter, M.L., Danila, R., Cieslak, P., Shutt, K.A., Popovic, T., Schuchat, A., Harrison, L.H., Reingold, A.L., 1999. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992–1996. *J. Infect. Dis.* 180, 1894–1901.
- Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Popovic, T., Hughes, J.M., 2001. Meningococcal disease. *N. Engl. J. Med.* 344, 1378–1388.

- Sacchi, C.T., Zanella, R.C., Caugant, D.A., Frasc, C.E., Hidalgo, N.T., Milagres, L.G., Pessoa, L.L., Ramos, S.R., Camargo, M.C., Melles, C.E., 1992. Emergence of a new clone of serogroup C *Neisseria meningitidis* in Sao Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1282–1286.
- Sacchi, C.T., Lemos, A.P., Popovic, T., De Moraes, J.C., Whitney, A.M., Melles, C.E., Brondi, L.M., Monteiro, L.M., Paiva, M.V., Solari, C.A., Mayer, L.W., 2001. Serosubtypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997–1998: overview and implications for vaccine development. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2897–2903.
- Sierra, G.V., Campa, H.C., Varcacel, N.M., Garcia, I.L., Izquierdo, P.L., Sotolongo, P.F., Casanueva, G.V., Rico, C.O., Rodriguez, C.R., Terry, M.H., 1991. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* 14, 195–207, discussion 208–210.
- SVS/MS, 2005. Série histórica de casos de doenças de notificação compulsória no Brasil (1980–2005). Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brazil.
- Tappero, J.W., Lagos, R., Ballesteros, A.M., Plikaytis, B., Williams, D., Dykes, J., Gheesling, L.L., Carlone, G.M., Hoiby, E.A., Holst, J., Nokleby, H., Rosenqvist, E., Sierra, G., Campa, C., Sotolongo, F., Vega, J., Garcia, J., Herrera, P., Poolman, J.T., Perkins, B.A., 1999. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* 281, 1520–1527.
- Trotter, C.L., Andrews, N.J., Kaczmarski, E.B., Miller, E., Ramsay, M.E., 2004. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet* 364, 365–367.
- Tsolia, M.N., Theodoridou, M., Tzanakaki, G., Vlachou, V., Mostrou, G., Stripeli, F., Kalabalikis, P., Pangalis, A., Kafetzis, D., Kremastinou, J., Konstantopoulos, A., 2006. Invasive meningococcal disease in children in Greece: comparison of serogroup A disease with disease caused by other serogroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 449–456.
- Wedeg, E., Hoiby, E.A., Rosenqvist, E., Froholm, L.O., 1990. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. *J. Med. Microbiol.* 31, 195–201.
- Wedeg, E., Hoiby, E.A., Rosenqvist, E., Bjune, G., 1998. Immune responses against major outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccinees and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. *Infect. Immun.* 66, 3223–3231.

5.1. ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA VIGILÂNCIA REFERENTE AO ARTIGO 1

5.1.1. Características clínicas e epidemiológicas da meningite meningocócica em Salvador, Bahia nos dez anos de vigilância hospitalar ativa.

O sistema de vigilância hospitalar ativa para as meningites bacterianas foi implantado no Hospital Couto Maia, Salvador, BA desde 1996. Para uma melhor compreensão da situação atual da meningite meningocócica na nossa população apresentaremos uma atualização dos resultados obtidos nesses 11 anos de vigilância hospitalar. Tratando-se especificamente da meningite meningocócica, foram identificados no período entre fevereiro de 1996 a dezembro de 2006, 648 casos comprovados por cultura positiva do líquor, sendo 324 casos de Salvador e 302 de outros municípios da Bahia.

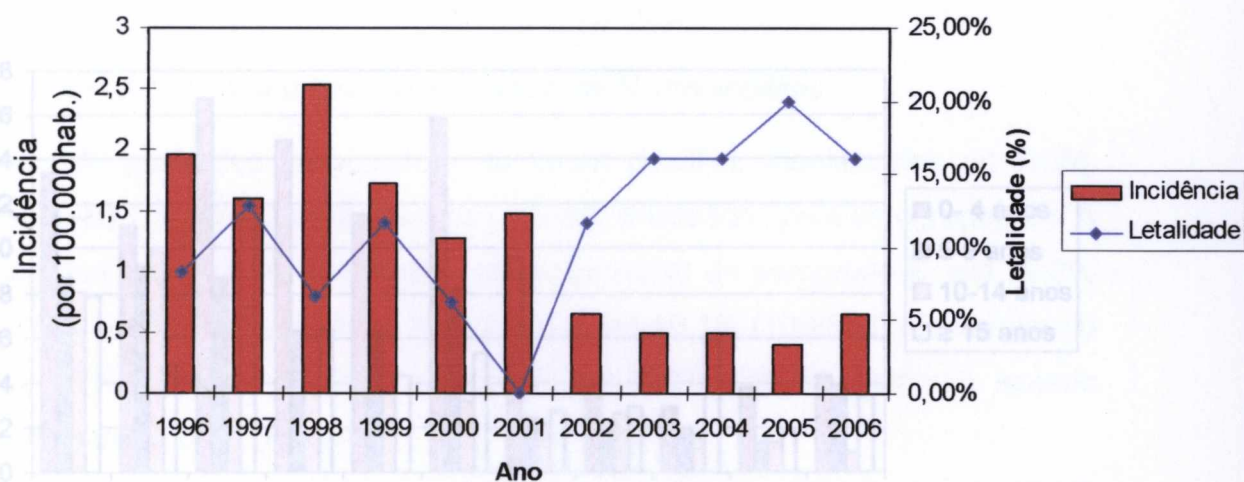


Figura 2. Distribuição anual da incidência da meningite meningocócica e da letalidade identificadas no HCM, Salvador, BA no período de 1996 a 2006.

Neste período de 11 anos, a incidência anual média da meningite meningocócica na cidade de Salvador foi de 1,20 casos por 100.000 habitantes conforme censo (IBGE, 2000) e a taxa de letalidade de 11,3% (Figura 2). No ano de 1998 foi registrada uma incidência de 2,54 casos por 100.000 habitantes, a maior do período, seguida por uma tendência declinante nos anos subsequentes ($p < 10^{-5}$). A incidência anual média, por sexo, foi de 1,45 caso por 100.000 habitantes do sexo masculino e 0,98 caso por 100.000 do sexo feminino. Entretanto, a tendência de redução não variou conforme o sexo (Figura 3).

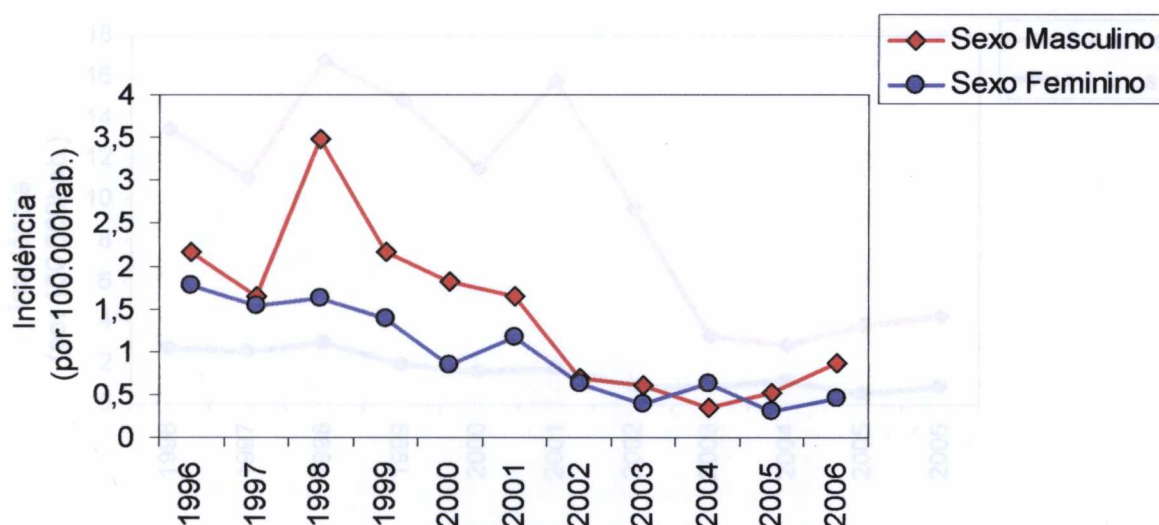


Figura 3. Distribuição anual de meningite meningocócica identificada no HCM, Salvador - BA no período de 1996 a 2006, estratificada por sexo.

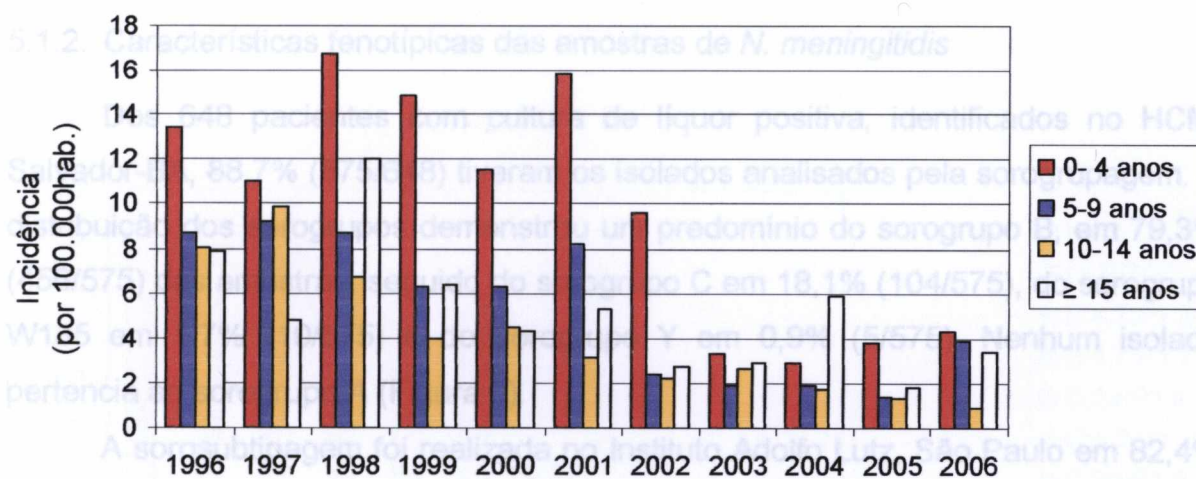


Figura 4. Distribuição anual do número de casos de meningite meningocócica identificada no HCM, Salvador - BA no período de 1996 a 2006, estratificados por faixa etária.

A faixa etária de 0-4 anos foi a que apresentou maior número de casos, com uma incidência anual média de 9,77 casos por 100.000 habitantes. Entretanto, a partir de 2002, a incidência apresenta um declínio nesta faixa etária (Figura 4 e 5).

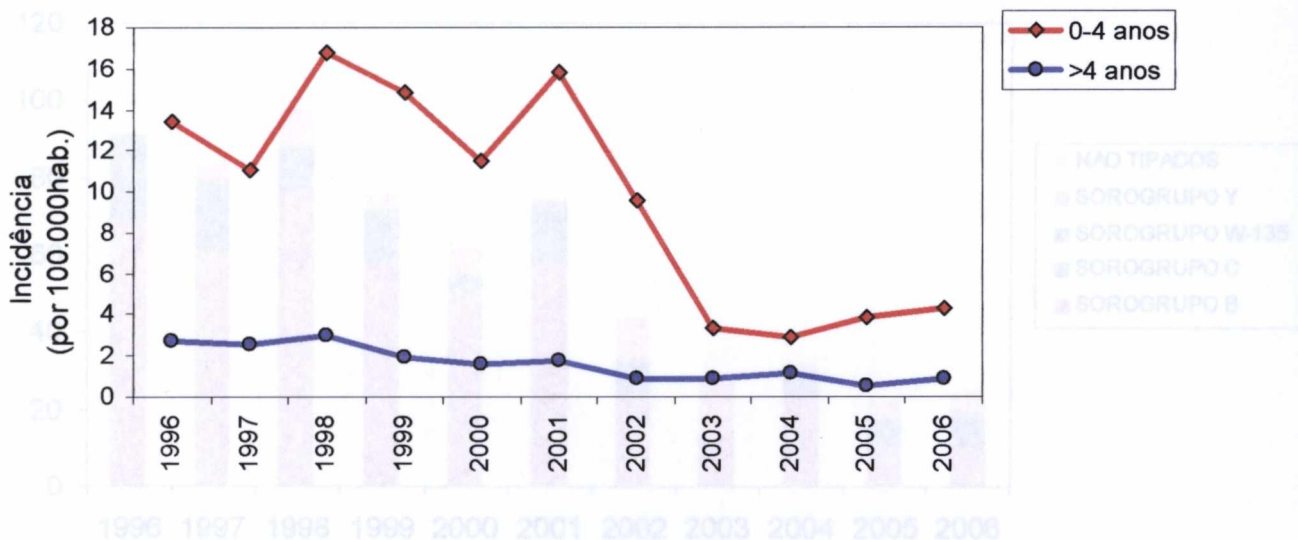


Figura 5 . Distribuição dos casos de meningite meningocócica por faixa etária, identificados no HCM, Salvador-BA no período de 1996 a 2006.

5.1.2. Características fenotípicas das amostras de *N. meningitidis*

Dos 648 pacientes com cultura de líquido cefalorraquidiano positiva, identificados no HCM, Salvador-BA, 88,7% (575/648) tiveram os isolados analisados pela sorogrupagem. A distribuição dos sorogrupos demonstrou um predomínio do sorogrupo B, em 79,3% (456/575) das amostras, seguido do sorogrupo C em 18,1% (104/575), do sorogrupo W135 em 1,7% (10/575) e do sorogrupo Y em 0,9% (5/575). Nenhum isolado pertencia ao sorogrupo A (Figura 6).

A sorosubtipagem foi realizada no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo em 82,4% (534/648) dos isolados e demonstrou o predomínio do sorotipo e sorosubtipo 4,7:P1.19,15 em 62,7% (335/534) das amostras, seguido do tipo 4,7:P1.7,1 em 2,9% (16/534), do 4,7:P1.3 em 2,6% (14/534), do 2a:P1.2 em 2,1% (11/534) e em 29,7% (158/534) outros sorotipos:sorosubtipos, correspondentes a 60 outras combinações, incluindo os parcialmente tipáveis (Figura 7). Entre os 335 isolados do sorotipo e sorosubtipo 4,7:P1.19,15, 94,5% pertenciam ao sorogrupo B e somente 5,5% eram do sorogrupo C. A figura 8 apresenta as porcentagens anuais de casos do principal fenótipo identificado, o B:4,7.P1.19,15, onde se observa o predomínio deste tipo em todos os anos do estudo com exceção dos anos de 2005 e 2006 (Figura 8).

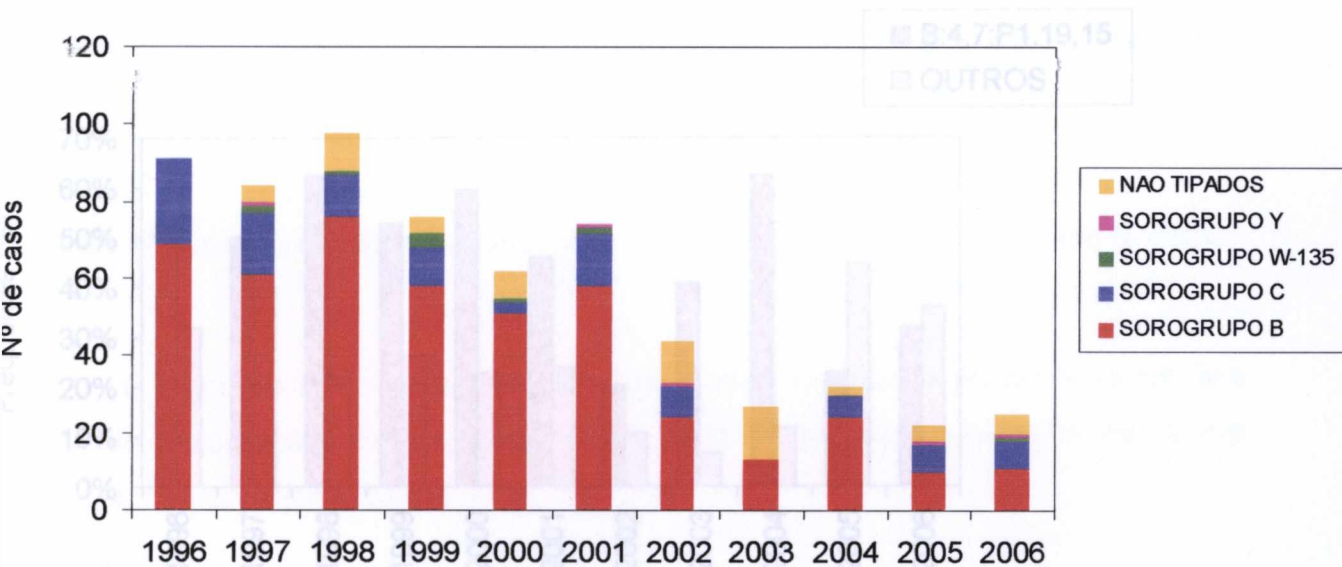


Figura 6. Distribuição dos casos (n=575) por sorogrupos de *N. meningitidis*, de isolados identificados no HCM no período 1996 a 2006.

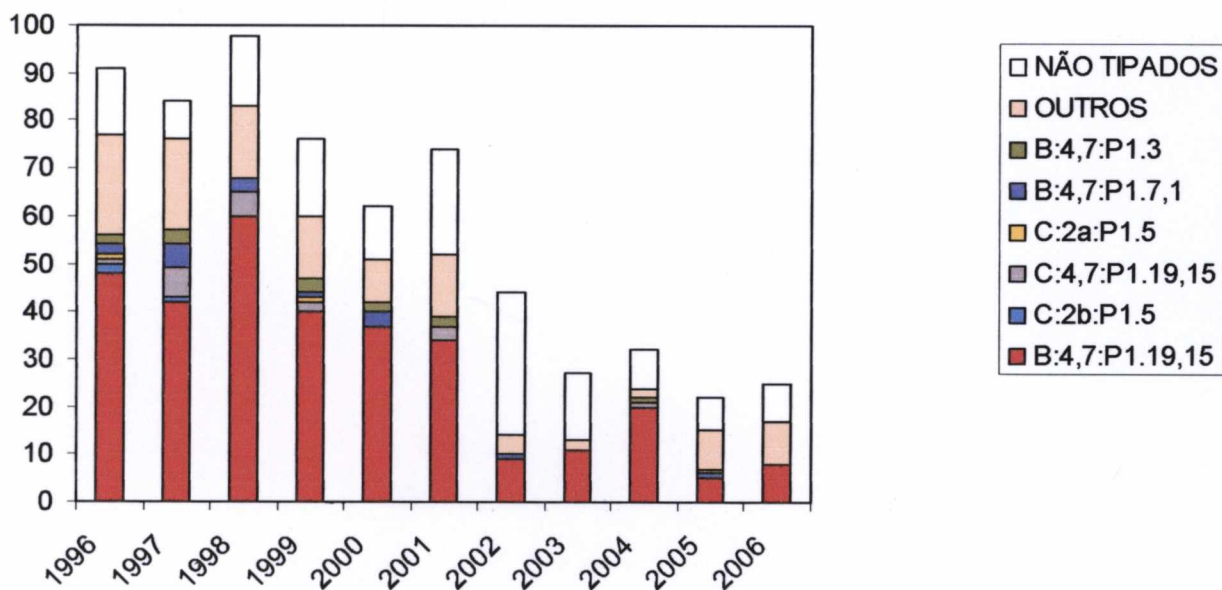


Figura 7. Distribuição dos sorotipos:sorosubtipos de *N. meningitidis* (n=534) identificadas no período de 1996 a 2006, no Hospital Couto Maia- Salvador/BA.

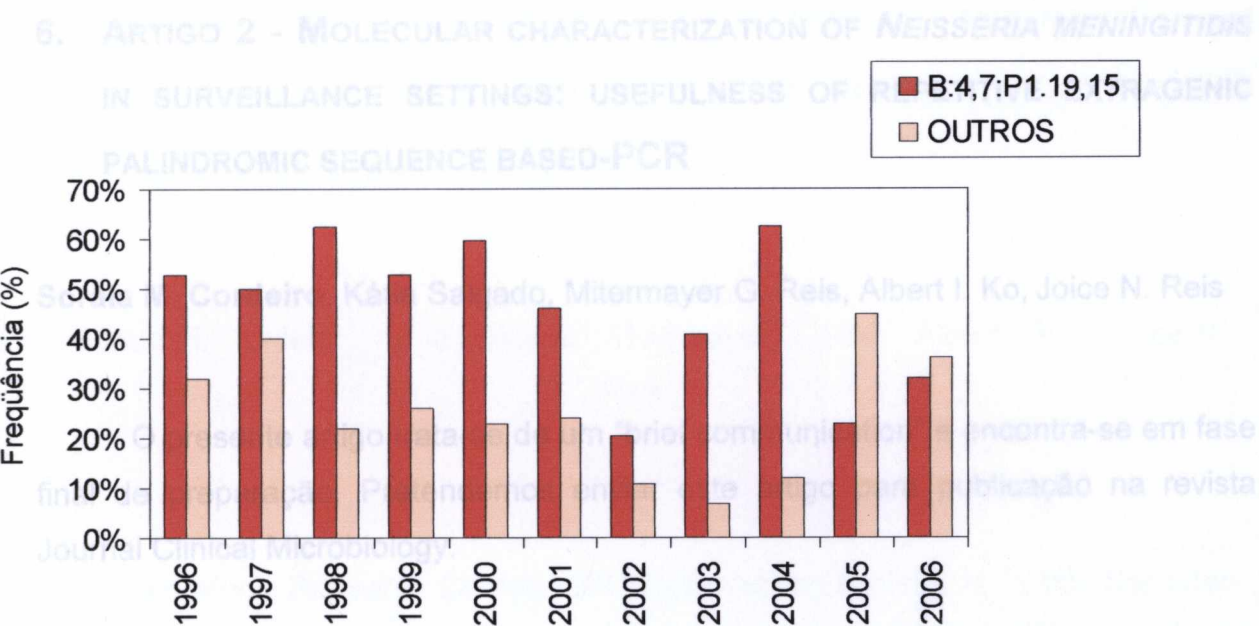


Figura 8. Distribuição das porcentagens anuais do fenótipo B:4,7.P1.19,15 identificadas no período de 1996 a 2006, no Hospital Couto Maia-Salvado/BA.

6. ARTIGO 2 - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* IN SURVEILLANCE SETTINGS: USEFULNESS OF REPETITIVE EXTRAGENIC PALINDROMIC SEQUENCE BASED-PCR

Soraia M. Cordeiro, Kátia Salgado, Mitermayer G. Reis, Albert I. Ko, Joice N. Reis

O presente artigo trata-se de um “brief communication” e encontra-se em fase final de preparação. Pretendemos enviar este artigo para publicação na revista *Journal Clinical Microbiology*.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NEISSERIA MENINGITIDIS IN SURVEILLANCE SETTINGS: USEFULNESS OF REPETITIVE EXTRAGENIC PALINDROMIC SEQUENCE BASED-PCR

Soraia M. Cordeiro¹, Kátia Salgado², Mitermayer G. Reis¹, Albert I. Ko^{1,3} Joice N. Reis^{1,4}

¹Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ/Brazilian Ministry of Health, Salvador-BA, Brazil; ²Couto Maia Hospital, SESAB, Salvador-BA, Brazil; ³Division of International Medicine and Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA. and ⁴School of Pharmacy, UFBA, Salvador-BA, Brazil;

Reprints or correspondence:

Dr. Joice N. Reis

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz,

Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde

Rua Waldemar Falcão 121, Salvador, Bahia 40296-710, Brasil

(joice@ufba.br)

Key words: *Neisseria meningitidis*, genotype, polymerase chain reaction.

ABSTRACT

Amplification of repetitive element (Rep) by PCR was tested for subtyping *Neisseria meningitidis*. Rep-PCR classified 227 clinical isolates into 34 distinct patterns showing high discrimination power. It was able to identify hypervirulent clones such as ET-5 complex and proved to be useful and reliable epidemiological tool in a surveillance system.

ARTICLE BODY

Neisseria meningitidis remains one of the leading causes of bacterial meningitis and sepsis worldwide, causing both endemic and epidemic disease [1-4]. Serogroups A, B and C, have historically been the main cause of most meningococcal disease [4]. Since 1997, meningococcal serogroup B has been considered endemic in Brazil, although small outbreaks caused by serogroup C have been reported in some states [5, 6, 7].

Analyses of *N. meningitidis* isolates using molecular subtyping methods are useful for epidemiological studies. Among the subtyping techniques, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) currently are the most widely adopted epidemiological tools for cluster designation, disease outbreak investigation, and tracking the global spread of meningococcal clones [8, 9]. However they are labor intensive techniques and require expensive dedicated equipment [1, 10, 11]. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods are cheaper, easier to perform, and provide faster results. In this work, we used the Rep-PCR method [12, 13, 14, 15] to characterize isolates of *N. meningitidis* (NgRep-PCR) from Salvador, Brazil, and confirm its value as molecular typing method for epidemiological surveillance.

Active surveillance for meningococcal meningitis was established at the state infectious disease hospital in Salvador, Brazil. As part of the State Health Department protocol, all suspected cases of meningitis should be referred to this hospital and more than 95% of the meningitis cases from the metropolitan region are reported from this site (Unpublished case notification records). Between March 1996 and January 1999, the study team prospectively identified 278 consecutive cases of meningitis with cerebrospinal fluid cultures positive for *N. meningitidis* as determined by morphology on Gram staining of smears and latex agglutination tests [16]. Patients were enrolled into the study according to protocols approved by the Institutional Review Board Committees for Human Investigation of the New York Presbyterian Hospital and Oswaldo Cruz Foundation/Brazilian Ministry of Health.

Of the total isolates, 94.6% (263/278) were tested by the slide agglutination method with polyclonal antiserum (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) revealed that 209 (79.4%) were serogroup B, 50 (19.1%) serogroup C, while serogroups W135 and Y accounted for 3 (1.1%) and 1 (0.4%), respectively. Serotyping and serosubtyping were determined by coagglutination method with

monoclonal antibodies as described previously [17]. The serosubtype, 4,7:P1.19,15, accounted for 63.5% of the isolates, followed by the serosubtype 4,7:P1.7,1 (4.6%), 2a:P1.2 (3.4%), 4,3:P1.3 (1.9%), and another 40 serosubtypes with lower frequencies. These infrequent serosubtypes together totalized the remaining 26.6% of the total isolates.

Of the 263 *N. meningitidis* isolates, 227 were available for NgRep-PCR analyses. In addition we included 18 reference strains obtained from the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. For the purpose of NgRep-PCR strain typing of the isolates, colonies from overnight cultures on chocolate agar were harvested, washed with PBS (pH 7.4), and reconstituted to make a suspension equivalent to a 1.0 McFarland turbidity standard in PBS (pH 7.4). The suspension was boiled for 15 min and centrifuged. A 50- μ L PCR reaction mixture was prepared; the reaction mixture contained 5 μ L of the supernatant, 1 μ M each primer NgREP 1R (5' ACA AAA ACC GGT AC 3') and NgREP2 (5' GTT AAT TCA CTA TA 3') [18], 200 μ M each dNTP (Pharmacia, Piscataway, NJ), 10% dimethyl sulfoxide (Sigma, St. Louis), and 2 U of Taq polymerase (GIBCO Laboratories, Gaithersburg, MD) in its appropriate buffer. The mixture was heated to 94°C for 7 min followed by 35 cycles each consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 38°C for 1 min, and extension at 65°C for 8 min. A final extension step was performed at 65°C for 16 min. During all experiments positive and negative controls were co-amplified with samples to test for contamination, reproducibility and stability of our amplicons. Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis in standard Tris acetate-EDTA buffer at 80 V for 3 h.

Ethidium bromide-stained gels were photographed under ultraviolet transillumination, and DNA banding patterns were analyzed visually. These images were normalized with Gel Compar ii software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), according with densitometric curves and the accompanying hard-copy photograph. Similarity indexes and the dendrogram derived from Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) cluster analysis using Dice coefficient based on 1% optimization and position tolerance.

Among 227 isolates, the method yielded 34 distinct NgREP types. According to the number of bands, types with three or more bands of difference were classified

into types (e.g., uppercase letter A, B, C...) and with less than 3 bands of difference were further subtyped (e.g. 1, 2, ...) and defined to be related. Seven related NgREP types (A, B, C, E, F, G and Q) accounted for 93.4% (212/227) of all isolates and fifteen types were ungrouped or single clones (Figure 1). Based on the analysis of the isolates and reference strains, NgRep-PCR was able to group isolates with correlated serotype and serosubtypes, and, particularly, to identify hypervirulent clones.

The representative NgREP type designated as A1 was the commonest type being identified in 73.1% (166/227) of the isolates. This NgREP type was mainly associated with types B:4,7:P1.19,15(n=130), C:4,7:P1.19,15(n=12) and B:4,7:P1.7,1(n=7), around 90% (149/166). When type A1 was compared with the reference strains by NgRep-PCR patterns, these clones were correlated with ET-5 complex, sequence type (ST) 32. Pattern B was associated with isolates belonging to serotype C:2b:- - and group A₄, ST - 8, 9 and 10, while pattern C was correlated to type B:4,7:P1.3, and the hypervirulent lineage III group, ST-41 and 42. Patterns E and G were associated to type C:2a:- - and to the ET-37 complex, ST-11 (Figure 2).

Seventeen isolates from this study were also analyzed by MLST as described previously [8]. Five NgREP type A1 serosubtype B:4,7:P1.19,15 were classified as ST 33 and four ST 34, three NgREP type C1 serosubtype B:4,7:P1.3 was classified as ST 41 and five NgREP type B1 was classified as ST 8. These STs correspond to the hypervirulent lineages described above and reinforce the usefulness of NgRepCR.

The epidemic nature of meningococcal outbreaks aligned to the lethality rate of this disease has justified molecular epidemiological studies of this pathogen [1-3]. Rapid and accurate subtyping of meningococcal isolates could facilitate public health decisions regarding institution of preventive measures or provide reassurance that no outbreak threat exists. The use of molecular typing methods is necessary because of the limitation of phenotyping methods to characterize bacterial specimens, and useful for its speed and power of discrimination [18, 19].

PCR based method has already been applied in other works and demonstrated excellent utility in molecular epidemiologic studies [20, 21, 22]. Particularly, NgRep-PCR was able to generate types correlated to those

hypervirulent clones classified by MLST and to identify very precisely serotypes and serosubtypes, especially type 4,7:P1.19,15, which was the most important clone identified in the study [22]. This type is the well know “Cuban strain”, which belongs to the ET-5 complex. NgRep-PCR proved to be a valuable tool for characterizing isolates of *N. meningitidis* in surveillance settings. Its application may help efforts to control the disease at the public health level and to evaluate strains for vaccine development.

*In the absence of a PFGE and a sequence facility, necessary for MLST, NgRep-PCR may serve as a rapid screening method to classify a large number of isolates into clusters. This method is simpler than MLST and can be performed in any molecular biology laboratory. This procedure can be used to create a database electrophoresis patterns of the *N. meningitides* isolates from a given institution or community. Such a database may provide a rapid reference source to identify, for instance outbreaks strains. Hence, this simplified strain typing method has clinical as well as epidemiologic applications.*

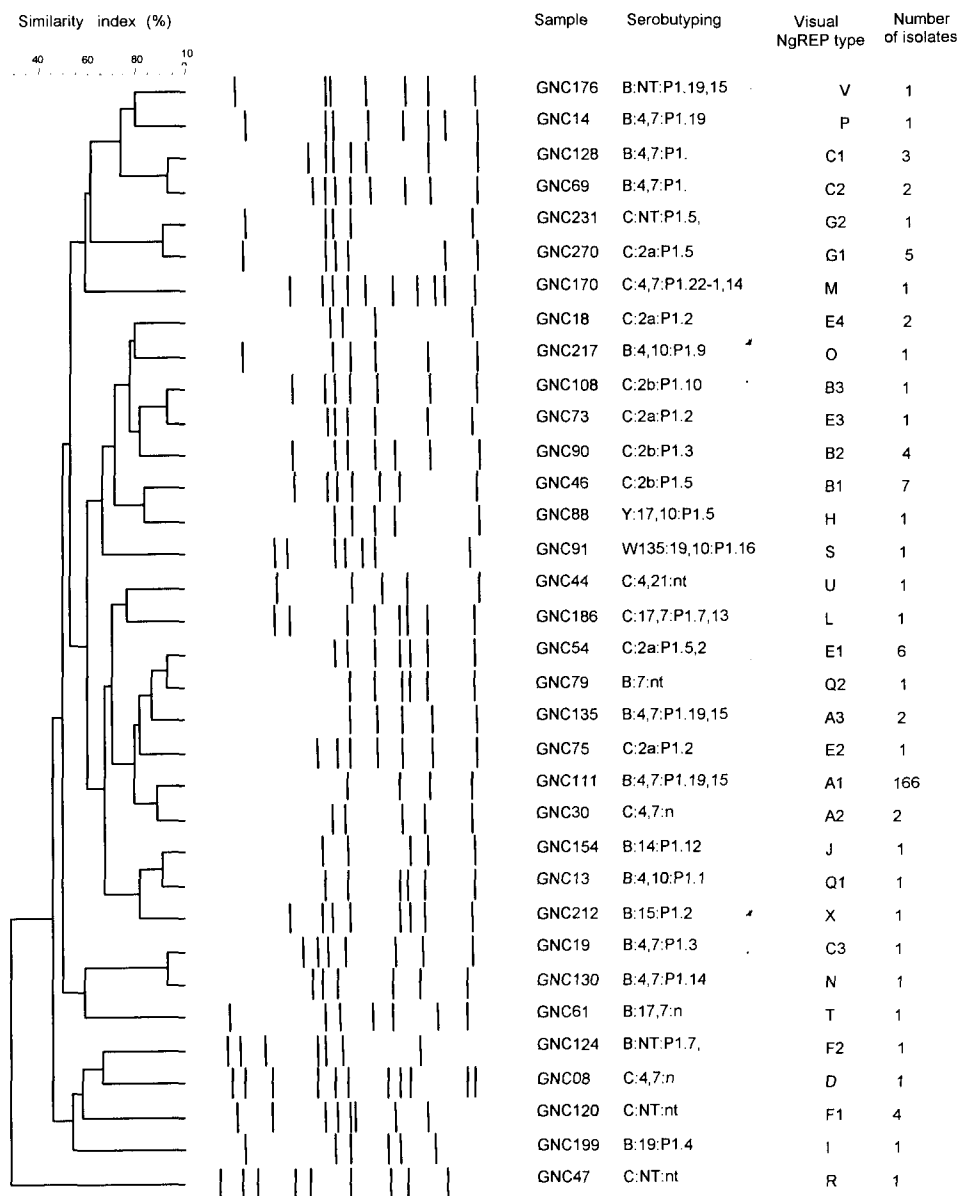


Figure 1. Dendrogram of NgREP-PCR fingerprinting of 34 isolates out of 227 *Neisseria meningitidis* isolates analyzed, representing all different patterns identified from Ng-Rep-PCR analysis.

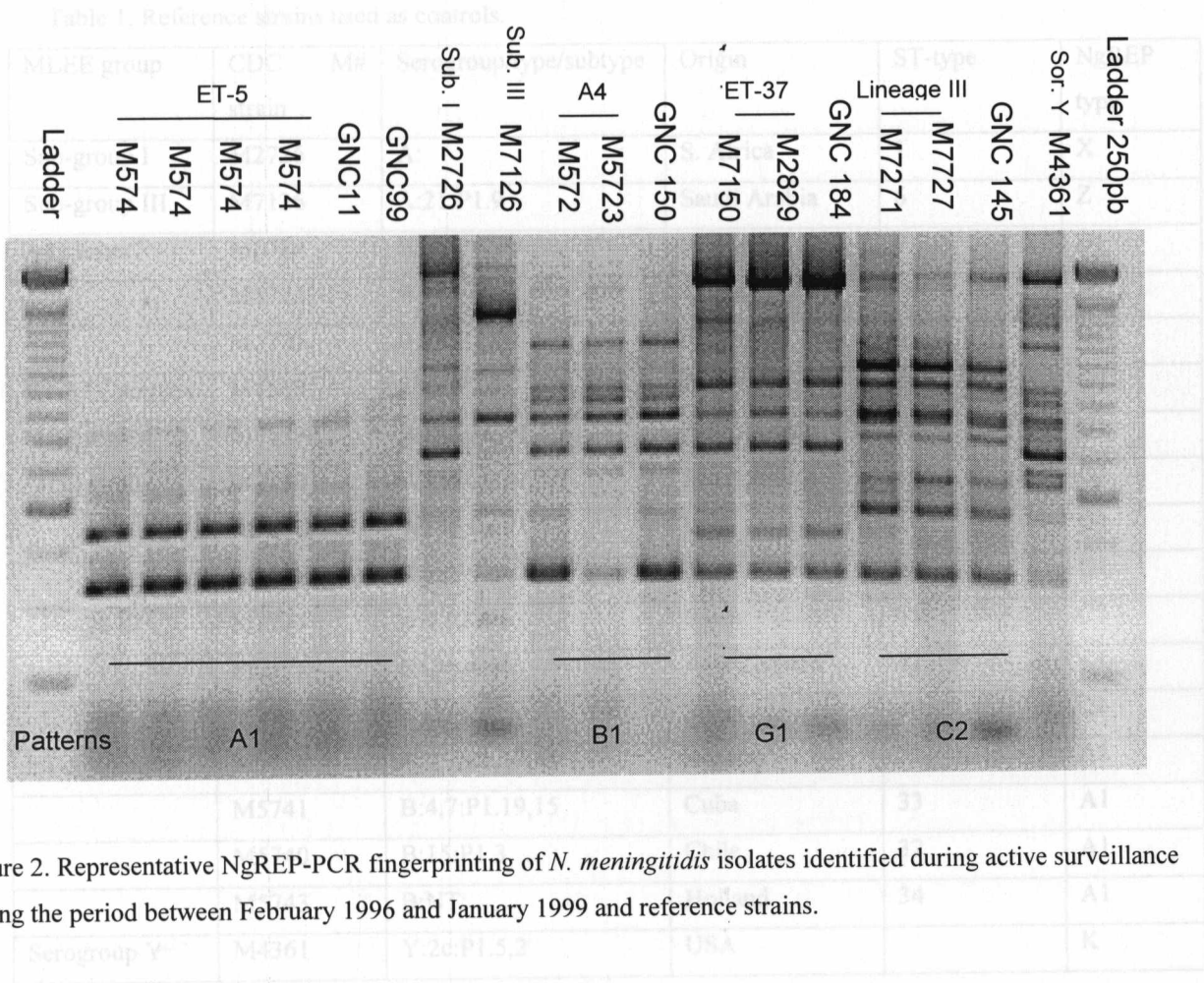


Figure 2. Representative NgREP-PCR fingerprinting of *N. meningitidis* isolates identified during active surveillance during the period between February 1996 and January 1999 and reference strains.

We are grateful to Dr. Leonard Mayer (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) for providing us strains used as controls.

Table 1. Reference strains used as controls.

MLEE group	CDC M# strain	Serogroup/type/subtype	Origin	ST-type	NgREP type
Sub-group I	M2726	A:	S. Africa	1	X
Sub-group III	M7126	A:21:P1.9	Saudi Arabia	6	Z
A4 cluster	M5724	B:2b:P1.16	Holland	9	B1
	M5725	B	Iceland	10	B1
	M5723	B:2b:P1,2	Holland	8	B1
ET-37 Complex	M1569	B:2a:P1.5	USA	11	G1
*Hajj strain	M7153	W135:2a:P1.5,2	Saudi Arabia	11	G1
*Hajj strain	M7150	W135:2a:P1.5,2	Saudi Arabia	11	G1
	M7257	W135:2a:P1.5,2	USA	11	G1
	M2829	C:2a:P1.5	USA	11	G1
Lineage III	M7727	B:4:P1.4	Spain	41	C1
	M7271	B: P1.4	New Zealand	42	C1
	M7744	B:4:P1.4	Spain	41	C1
ET-5 Complex	M5748	B:4,7:P1.19,15	Norway	32	A1
	M5741	B:4,7:P1.19,15	Cuba	33	A1
	M5740	B:15:P1.3	Chile	32	A1
	M5743	B:NT:	Holland	34	A1
Serogroup Y	M4361	Y:2c:P1.5,2	USA		K

We are grateful to Dr. Leonard Mayer (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) for providing us strains used as controls.

REFERENCES

1. NORHEIM G, ROSENQVIST E, ASEFFA A, YASSIN MA, MENGISTU G, KASSU A, FIKREMARIAM D, TAMIRE W, HOIBY EA, ALEBEL T, BERHANU D, MERID Y, HARBOE M, CAUGANT DA. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates from recent outbreaks in Ethiopia and comparison with those recovered during the epidemic of 1988 to 1989. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):861-71.
2. DENNIS K. S. LAW,¹ MANON LORANGE,² LOUISE RINGUETTE,² RÉJEAN DION,² MICHEL GIGUÈRE,³ AVERIL M. HENDERSON,¹ JAN STOLTZ,¹ WENDELL D. ZOLLINGER,⁴ PHILIPPE DE WALS,⁵ AND RAYMOND S. W. TSANG¹ Invasive Meningococcal Disease in Québec, Canada, Due to an Emerging Clone of ST-269 Serogroup B Meningococci with Serotype Antigen 17 and Serosubtype Antigen P1.19 (B:17:P1.19) *Journal of Clinical Microbiology*, August 2006, p. 2743-2749, Vol. 44, No. 8
3. GRODET C, DEQUIN PF, WATT S, LANOTTE P, DE GIALLULY C, TAHA MK, ALONSO JM, QUENTIN R, GOUDEAU A, MEREGHETTI L Outbreak in France of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.12 belonging to sequence type 1403. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Sep;10(9):845
4. CAUGANT, D. A.; FROHOLM, L. O.; BOVRE, K.; HOLTEN, E.; FRASCH, C. E.; MOCCA, L. F.; ZOLLINGER, W. D.; SELANDER, R. K. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic-disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83:4927-31, 1986.
5. CLAUDIO T. SACCHI,^{1,2} ANA PAULA S. LEMOS,² TANJA POPOVIC,¹ JOSE CASSIO DE MORAIS,³ ANNE M. WHITNEY,¹ CARMO ELIAS A. MELLES,² LUCIANA M. G. BRONDI,⁴ LUCIA M. C. MONTEIRO,⁴ MARIA V. PAIVA,² CLAUDE A. SOLARI,⁵ AND LEONARD W. MAYER¹ Serosubtypes and PorA Types of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Isolated in Brazil during 1997-1998: Overview and Implications for Vaccine Development. *Journal of Clinical Microbiology*, August 2001, p. 2897-2903, Vol. 39, No. 8
6. DE LEMOS AP, YARA TY, GORLA MC, DE PAIVA MV, DE SOUZA AL, GONCALVES MI, DE ALMEIDA SC, DO VALLE GR, SACCHI CT Clonal Distribution of Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup C Strains Circulating from 1976 to 2005 in Greater Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2007 Apr;45(4):1266-73.

7. DE LEMOS AP, BRANDAO AP, GORLA MC, PAIVA MV, SIMONSEN V, MELLES CE Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. *J Med Microbiol.* 2006 Jun;55(Pt 6):751-7.
8. POPOVIC T, SCHMINK S, ROSENSTEIN NA, AJELLO GW, REEVES MW, PLIKAYTIS B, HUNTER SB, RIBOT EM, BOXRUD D, TONDELLA ML, KIM C, NOBLE C, MOTHERSHED E, BESSER J, PERKINS BA. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):75-85
9. BREHONY C, JOLLEY KA, MAIDEN MC. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Jan;31(1):15-26.
10. SWAMINATHAN B, MATAR GM, REEVES MW, GRAVES LM, AJELLO G, BIBB WF, HELSEL LO, MORALES M, DRONAVALLI H, EL-SWIFY M, DEWITT W, HUNTER SB Molecular subtyping of *Neisseria meningitidis* serogroup B: comparison of five methods. *J Clin Microbiol.* 1996 Jun;34(6):1468-73
Jun;34(6):1468-73
11. RODRIGUEZ-BARRADAS, M. C.; HAMILL, R. J.; HOUSTON, E. D.; GEORGHIOU, P.R.; CLARRIDGE, J. E.; REGNERY, R. L.; KOEHLER, J.E. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 33:1089-93, 1995.
12. WOODS C. R.; KOEUTH, T.; ESTABROOK, M. M.; LUPSKI, J. R. Rapid determination of outbreaks-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. *J. Infect. Dis.*, 174:760-767, 1996.
13. CORREIA, F. F.; INOUE, S.; INOUE, M. A 26-base-pair repetitive sequence specific for *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis* genomic DNA. *J. Bacteriol.*, 167:1009-1015, 1986.
14. VERSALOVIC, J. & LUPSKI, J. R. DNA Fingerprinting of *Neisseria* strains by rep-PCR. *Methods Mol. Cell. Biol.*, 5:96-104, 1995.

15. VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acids Res.*, 19:6823-6831, 1991.
16. WILLIAMS, R. G. AND HART, A. C. Rapid identification of bacterial antigen in blood cultures and cerebrospinal fluid. *J Clin Pathol.* 1988 June; 41(6): 691–693.
17. SACCHI, C. T.; LEMOS. A. P. S.; BRANDT, M. E.; WHITNEY, A. M; MELLES, C. E. A.; SOLARI, C. A.; FRASCH C. E.; MAYER, L. Correlation between serological and sequencing analyses of the PorB outer membrane protein in the *N. meningitidis* serotyping system. *Clin. Diagn. Lab. Immun.*, 5:348-354, 1998.
18. Diggle MA, Clarke SC Detection and genotyping of meningococci using a nested PCR approach. *J Med Microbiol.* 2003 Jan;52(Pt 1):51-7.
19. Clarke SC, Diggle MA, Edwards GF. Semiautomation of multilocus sequence typing for the characterization of clinical isolates of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep;39(9):3066-71.
20. KO, A. I.; REIS, J.N.; COPPOLA, S. J.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LÔBO, T. S.; PINHEIRO, R. M.; SALGADO, K.; DOURADO, C. M. R.; TAVARES-NETO, J. ROCHA, H; REIS, M. G.; JOHNSON, W. D. J.; RILEY, L. W. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningites in Salvador, Brazil. *Clin. Infect. Dis.*, 30:78-86, 2000.
21. HEALY M, HUONG J, BITTNER T, LISING M, FRYE S, RAZA S, SCHROCK R, MANRY J, RENWICK A, NIETO R, WOODS C, VERSALOVIC J, LUPSKI JR. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):199-207.
22. DE FILIPPIS I, VICENTE AC. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 Nov;53(3):161-7.

23. JOHNSON, J. R.; O' BRYAN, T. Improved repetitive – element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *E.coli*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7:265-273, 2000
24. WEDEGE, E.; HOIBY, E. A.; ROSENQVIST, E.; BJUNE, G. Immune responses against major outer membrane antigens of *N. meningitidis* in vaccines and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian Serogroup B protection trial. Infect. Immun., 66:3223-3231, 1998.

7. ARTIGO 3 - MULTILOCUS RESTRICTION FRAGMENT TYPING (MLRFT) AS A STRAIN TRACKING TOOL FOR *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Binh An Diep, **Soraia M. Cordeiro**, Joice Neves Reis, Mitermayer G. Reis, Albert I. Ko, George F. Sensabaugh

O presente artigo encontra-se em fase final de preparação. Pretendemos enviar este artigo para publicação na revista Journal Clinical Microbiology.

MULTILOCUS RESTRICTION FRAGMENT TYPING (MLRFT) AS A STRAIN TRACKING TOOL FOR NEISSERIA MENINGITIDIS

Binh An Diep¹

Soraia M. Cordeiro²

Joice Neves Reis^{2,4}

Mitermayer G. Reis²

Albert I. Ko^{2,3}

George F. Sensabaugh^{1*}

¹Division of Infectious Diseases, School of Public Health, University of California, Berkeley, CA

94720 USA

²Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Brazil

³Division of International Medicine and Infectious Diseases, Department of Medicine, Weill Medical

College of Cornell University, New York, New York 10021

⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA

*Corresponding author:

George F. Sensabaugh

School of Public Health

140 Warren Hall MC#7360

University of California

Berkeley, CA 94720-7360

Phone: 510-642-1271

Fax: 510-642-6350

Email: sensaba@uclink4.berkeley.edu

ABSTRACT

We describe a rapid and simplified approach for tracking *N. meningitidis* strains, Multilocus Restriction Fragment Typing (MLRFT). This method involves PCR amplification of seven housekeeping gene loci as described for Multilocus Sequence Typing (MLST) (Maiden et al., PNAS1998 95:3140-3145). PCR amplicons are digested with a restriction enzyme and the resulting restriction fragment (RF) pattern is resolved by conventional agarose gel electrophoresis. MLST allele sequence data from the original 107 sample MLST reference collection were analysed to select restriction enzymes providing high discrimination between alleles. MLRFT alleles are defined by visual comparison of RF banding patterns to the predicted RF banding patterns. For the 107 MLST reference strains, MLRFT was predicted to resolve 44 restriction fragment types (RTs); this approaches the 50 sequence types (STs) resolved by MLST. The MLRFT typing scheme was experimentally validated by typing 41 strains (ST-1 - ST-41) from the MLST reference collection; the observed RF banding patterns confirmed the computer-based prediction. To illustrate the convenience of this method, MLRFT was applied on site in Salvador, Brazil to characterize 60 clinical *N. meningitidis* isolates collected locally. This analysis identified a predominant RT which was predicted on the basis of the interconverting relationship between MLRFT and MLST to belong to the hypervirulent ET-5 complex; MLST confirmed the predominant RT as ST-33. In short, MLRFT provides a convenient alternative to MLST because it is rapid, simple, inexpensive, and readily applicable in laboratories of the developing countries to track meningococcal disease where it is occurring.

INTRODUCTION

The pathogenic *Neisseria meningitidis* causes significant morbidity and mortality in children and adults worldwide. Serogroups A, B and C caused most meningococcal disease cases, with serogroups B and C predominating in the Americas and Europe, and serogroups A and C in Asia and Africa (12, 13). In the United States, serogroup B and C outbreaks are increasingly reported (5, 8, 9). However, such outbreaks only account for 2 to 3 percent of the total number of cases in the United States (12). In Africa, serogroup A meningococcal disease continues to be a significant public health threat. A major outbreak involving 152,813 cases occurred in 1997 in the African meningitis belt, with 15,783 deaths (12). In 2002, an international outbreak of serogroup W-135 occurred among Hajj pilgrims and their contacts (11). Accordingly, there exists a real public health need for improved methods for tracking disease-associated strains in order to gain a better understanding of the complex dynamics of clonal spread.

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) played a central role in the identification of hyperinvasive meningococcal clonal complexes and the association of these clonal complexes with antigenic type and particular epidemiological disease patterns (2, 3). Multilocus sequence typing (MLST) is replacing its MLEE forerunner as the gold standard for meningococcal strain typing (3). MLST data are accessible through internet-based database repositories (www.mlst.net), making it feasible for any laboratory with DNA sequencing capability to investigate the big-picture or global meningococcal disease questions. However, sequence-based technologies are not yet applicable in the clinical settings for routine surveillance purposes because of the specialized equipment, costly sequencing reagents, and the time consuming nature of analyzing raw DNA sequence data. In particular, cost is the limiting factor for MLST application in the developing countries where most meningococcal disease occurs.

We recently described a rapid and simplified strain typing method, multilocus restriction fragment typing (MLRFT), based on the MLST approach for characterizing *Staphylococcus aureus* (4). MLRFT detected sequence variations in the seven MLST housekeeping gene loci by restriction fragment (RF) pattern analysis rather than DNA sequencing. We designed MLRFT for *S. aureus* based on a simple idea, that MLRFT allelic assignment can be made unambiguously by visual comparison of the observed RF banding patterns against the predicted RF banding patterns derived from the MLST

sequence data (4). Because MLRFT alleles are defined on the basis of, and linked to, sequence-based MLST alleles, it is possible to work back and forth between the typing systems, thereby allowing users of MLRFT to utilize the information in the MLST database. Herein, we describe MLRFT to simplify the MLST approach for the strain typing of *N meningitidis*. This low-cost and rapid genotyping method can generate timely information that enables local public health responses, especially in developing country settings.

(This work was presented in part at the American Society for Microbiology General Meeting, May 2000, Los Angeles, California.)

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. A sample of 107 *N. meningitidis* strains was used for the original validation of the MLST method(10). For the 107 MLST reference strains, computer-based analysis predicted that MLRFT would resolve 44 restriction fragment types (RTs), similar to the 50 sequence types (STs) resolved by MLST. For the purpose of evaluating this prediction, we selected 41 strains from this collection (kindly provided by Dr. Leonard Mayer, CDC, Atlanta, Georgia) which represented ST-1 through ST-41. MLST, MLEE and serotype information for these strains are described in the MLST database (www.mlst.net). Additionally, MLRFT was performed on a second set of 60 clinical isolates to evaluate the use of this method in epidemiological investigations. Isolates were randomly selected from 381 strains obtained between February 1996 and January 2001 during active surveillance for meningococcal disease in the city of Salvador, Brazil.

MLRFT and MLST. *N. meningitidis* DNA was prepared for PCR by boiling as previously described (4). The 7 PCR amplicons of housekeeping genes analysed in the MLRFT are the same as those which are sequenced in MLST and were obtained using previously described primers (10) and PCR conditions (4). Amplicons were digested with restriction enzymes (Promega Corporation, Madison WI) listed in Table 1 according to the previously described protocol (4). Restriction fragments were separated by electrophoresis on 4.0% Metaphor agarose containing 0.1X concentration GelStar Nucleic Acid Stain (Cambrex Bio Science, Inc., Rockland Maine). Gels were visualized either as digital images on a FluorImagerSI (Molecular Dynamics, CA) or on film under UV

illumination. A 50-bp DNA ladder (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg MD) was used to aid the visual determination of restriction fragment size.

RF allele assignment was made by visual comparison of RF banding patterns against the predicted banding patterns derived from primary MLST sequence data. RF alleles are given letter designations; an MLRFT allele definition table is provided as supplemental table 1. A RFT was defined by the combination of alleles at the seven loci (e.g. RT-DAAAACD in the order RT-*abcZ-adk-aroE-fumC-gdh-pdhC-pgm*).

For the analysis of the set of Salvador clinical isolates, one isolate from the four RTs with predicted linkage to hypervirulent lineages was selected for MLST as previously described (10).

Statistical Analysis. Discrimination indices (DIs) were calculated based on Simpson's index of diversity as previously described (7).

RESULTS

Development of MLRFT. We selected restriction enzymes for MLRFT based on a systematic analysis of the primary DNA sequence data available from the 107 MLST reference strains described by Maiden, et al. (10). Briefly, for each locus, computer-based analysis compared the capacity of all commercially available restriction enzymes to yield highly discriminating restriction fragment banding patterns that would maximally differentiate alleles in the 107 MLST reference strains. On balancing between the cost of restriction enzymes and their discrimination power, we selected the set of restriction enzymes listed in Table 1.

To achieve a standardized scoring method and nomenclature system for MLRFT, for each locus, we assigned a letter designation for each distinguishable RF banding pattern predicted from the primary MLST sequence data. In this way, every sequence-based allele can be linked to a RF-based allele. At most loci, the restriction fragment patterns allow unambiguous differentiation of alleles as illustrated in figure 1 for the *adk* locus. In some cases, however, alleles at a locus possess adjacent restriction sites and the resulting restriction fragment patterns cannot be distinguished by conventional agarose electrophoresis. For example, the sequence-based *abcZ*-3 and *abcZ*-44 alleles have a single *TaqI* restriction site at nucleotide position 181 relative to the forward sequencing primer; the

sequence-based *abcZ*-22 allele with TaqI restriction sites at nucleotide positions 175 and 181 would be predicted to yield an indistinguishable RF banding pattern on conventional agarose gel electrophoresis. Thus, the three *abcZ* alleles are scored together as the *abcZ*-C allele (see MLRFT allele definition table in supplementary table 1).

Computer-based assessment of MLRFT discrimination power. The discrimination index, based on the Simpson's index of diversity, provides a statistical assessment of the capacity of a given strain typing tool to discriminate isolates of one type from unrelated types based on the frequency of types that occur in the population (7). For the 107 MLST reference strains, the average per locus discrimination index predicted for the selected restriction enzymes is 0.648 based on the frequency of the predicted restriction fragment-based alleles (Table 1). In contrast, the average per locus discrimination index observed for MLST is 0.849. However, using the combined discrimination power of seven loci, MLRFT is predicted to differentiate the 107 isolates into 44 RTs giving a DI of 92.8%. MLST differentiated the 107 isolates into 50 STs giving a discrimination index (DI) of 95.4%. Thus for these MLST reference strains, MLRFT detected 97% of the discrimination power of MLST.

Experimental validation of the MLRFT approach. To assess the computer-based development of MLRFT, we selected 41 strains from the 107 MLST reference strain collection (kindly provided by Dr. Leonard Mayer, CDC, Atlanta, Georgia), which represented ST-1 through ST-41. MLRFT was applied to the 41 strains in a blinded manner. The results confirmed the computer-based predictions (Table 2).

Evaluation of MLRFT for distinguish and categorizing strains. A major benefit of MLST is that genetic relationships among strains can be identified. STs that share at least five alleles are grouped as clonal clusters. To evaluate MLRFT for distinguishing and categorizing *N. meningitidis* strains, we analyzed the first 500 STs in the MLST database by converting the MLST information into MLRFT using the translational properties between MLST and MLRFT outlined above. The 500 STs were differentiated into 361 RTs (data not shown). MLRFT correctly grouped 95% (475/500) of related STs into clonal complexes as defined by MLST and/or MLEE (at least five of seven housekeeping gene loci in common) (Table 3). MLRFT misclassifications occurred when STs belonging to different clonal complexes were grouped together. For example, ST-4, ST-5 and ST-6 belong to two related serogroup A clonal complexes, ST-4 complex/subgroup IV and ST-5

complex/subgroup III; these three STs are RT-AAAABBA and so would be grouped together by MLRFT (Table 2). Overall, these results demonstrate the capability of MLST to identify and group strains into genotypes that correlate with the hypervirulent lineages defined by MLST and MLEE (Table 2).

Application of MLRFT for meningococcal disease surveillance. To illustrate the use of MLRFT in epidemiological investigations, MLRFT was applied on site in the city of Salvador, Brazil to a set of 60 clinical *N. meningitidis* isolates recovered locally. These were randomly selected from 381 isolates obtained between February 1996 and January 2001 during active meningococcal disease surveillance. MLRFT classified 29 (48.3%) of 60 isolates, serologically classified as B:4:P1.15,19 (serogroup:type:serosubtype), as RT-FCABCBF (Table 4). This RT is linked to ST-32 complex/ET-5 complex (Table 2). In addition, three other RTs were linked to hypervirulent lineages: RT-CCBCACF (ST-44 complex/Lineage 3), RT-DACAABA (ST-8 complex/ Cluster A4) and RT-FCABBBF (ST-32 complex/ET-5 complex). MLST was applied on a one representative isolates from each of these four RTs, the results confirmed the clonal complex predictions by MLRFT (Table 4).

DISCUSSION

The application of MLRFT for *N. meningitidis* strain typing is demonstrated here. This genotyping method offers several useful features: (1) a standardized nomenclature, based on MLST nucleotide sequence data, affords unambiguous scoring of restriction fragment patterns across different laboratories, (2) a direct linkage with MLST due to the fact that both genotyping methods assess genetic variations from the same set of seven PCR amplicons allows for conversion of MLST data into MLRFT, and hence, access to the information wealth of the MLST database (<http://www.mlst.net>), and (3) a minimal requirement for inexpensive reagents (about \$6 per isolate) and equipment.

As demonstrated for the original reference set of 107 *N. meningitidis* isolates, the discrimination power of MLRFT approaches that of MLST. This is, no doubt, a consequence of the high rate of recombination in *N. meningitidis*; alleles are shuffled via recombination to yield a large number of combinations. Thus although MLRFT detects fewer alleles per locus than MLST, over 4.4 million RTs can be distinguished based on the RF alleles identified in STs 1-500, (Table 1). Moreover,

given that an allele is four-fold more likely to be changed by a recombination event than by mutation, new MLRFT alleles are generated by recombining existing restriction sites into novel combinations (6). Thus, although MLST is much more discriminating than MLRFT in principle. MLRFT should be adequate for addressing many epidemiologic questions. The demonstration of MLRFT on the clinical isolates from Brazil shows the usefulness of MLRFT in identifying a single predominating RT, predicted by MLRFT and later confirmed by MLST to belong to ST-32 complex/ET-5 complex.

A strain typing approach based on the same principle as described here has been reported recently by Bennett and Cafferkey (1); they referred to their approach multilocus restriction typing (MLRT). Our approach differs from the MLRT method in two significant aspects. First, our use of the MLST “sequencing” primers to generate amplicons allows direct linkage between MLRFT and MLST that is, allelic assignment for MLRFT is made by visual comparison of the restriction fragment banding patterns against the predicted banding patterns derived from primary MLST sequence data (4). MLRT uses the MLST “amplification” primers which prime at sites located outside the nested “sequencing” primer sites; this generates larger amplicons which may contain unknown restriction sites in the unsequenced regions between the “amplification” and “sequencing” primer sites. This undermines the standardized nomenclature system of MLRFT based on the MLST sequence database with its attendant potential for data portability. Second, the selection of restriction enzymes for MLRFT was based upon an *in silico* analysis of the MLST sequence data for the capacity of all commercially available restriction endonucleases to yield unambiguous restriction fragment patterns that maximally differentiated alleles in the MLST validation strains. This systematic selection scheme resulted in a more discriminating set of restriction enzymes than those used by Bennett and Cafferkey (1); their set of restriction enzymes only distinguished 23 types among the 49 STs in the original MLST validation set as compared to 44 types by MLRFT.

In summary, we have described MLRFT, a new strain tracking tool for *N. meningitidis*. This genotyping method is amenable to processing large number of isolates using relatively inexpensive reagents and equipment. The portability of MLRFT data, coupled with its clear linkage to the MLST database, makes this a powerful method for meningococcal disease surveillance, especially in the developing countries where the burden of disease is highest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was initiated as a teaching exercise in a graduate-level laboratory course administered by the Division of Infectious Diseases, School of Public Health, UC Berkeley, California; we thank the students in this class for their contribution to the development of the MLRFT scheme. We thank also the students at Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, for their assistance in the field study and Dr. Leonard Mayer (CDC, Atlanta, Georgia) for providing MLST reference samples. This work was supported in part by a Faculty Research Bridging Grant (G.F.S.), an Undergraduate Biology Fellows Program Grant (B.D.), the Brazilian National Research Council (300.861/96-6, A.I.K), and National Institutes of Health (TW00919, A.I.K, and TW007303, J.N.R.P).

TABLES

Table 1. Evaluation of the Restriction Enzyme Selection Scheme for MLRFT.

Locus	Size of product (bp) [§]	Restriction Enzyme	Based on 107 MLST reference strains				Based on ST-1 through ST-500*	
			No. of MLST alleles/locus	MLS T DI	No. of MLRFT alleles/locus	MLRFT DI	No. of MLST alleles/locus	No. of MLRFT alleles/locus
<i>abcZ</i>	516	<i>TaqI</i>	15	0.815	9	0.793	79	15
<i>adk</i>	512	<i>TaqI</i>	12	0.765	5	0.563	55	17
<i>aroE</i>	637	<i>AluI</i>	18	0.906	5	0.647	91	9
<i>fumC</i>	627	<i>StyI</i>	18	0.826	4	0.609	87	4
<i>gdh</i>	589	<i>AluI</i>	16	0.88	3	0.665	68	6
<i>pdhC</i>	584	<i>AluI</i>	24	0.898	4	0.613	93	5
<i>pgm</i>	493	<i>CfoI</i>	21	0.853	6	0.646	76	16

[§]The sequences in the MLST database are trimmed to a length shorter than the distance between the sequencing primer-binding sites. Thus, the size of the PCR amplicon was measured from the primer-binding sites using the the primary sequence data from the whole genome sequence (14).

* This data was downloaded from the MLST database (www.mlst.net) in August 2003.

Table 2. Application of MLRFT on 41 MLST reference strains.

MLST Reference strains	ST	MLST allelic profile ^a	MLST and MLEE lineage ^b	MLRFT allelic profile ^a
B40	1	1-3-1-1-1-1-3	ST-1 complex/subgroup I/II	AACACAA
Z4024	2	1-3-4-7-1-1-3	ST-1 complex/subgroup I/II	AAABCAA
Z4081	3	1-3-1-1-1-23-13	ST-1 complex/subgroup I/II	AACACAC
Z2491	4	1-3-3-1-4-2-3	ST-4 complex/subgroup IV	AAAABBA
Z3524	5	1-1-2-1-3-2-3	ST-5 complex/subgroup III	AAAABBA
Z3906	6	1-1-2-1-3-2-11	ST-5 complex/subgroup III	AAAABBA
Z5826	7	1-1-2-1-3-2-19	ST-5 complex/subgroup III	AAAABBD
BZ10	8	2-3-7-2-8-5-2	ST-8 complex/Cluster A4	DACAABA
BZ163	9	2-3-8-10-8-5-2	ST-8 complex/Cluster A4	DACBABA
B6116/77	10	2-3-4-2-8-15-2	ST-8 complex/Cluster A4	DAAAABA
L93/4286	11	2-3-4-3-8-4-6	ST-11 complex/ET-37 complex	DAAAACD
NG 3/88	12	4-3-2-16-8-11-20		BAAAABB
NG 6/88	13	4-10-15-7-8-11-1	ST-269 complex	BCABABA
NG F26	14	4-1-15-7-8-11-1	ST-269 complex	BAABABA
NG E31	15	13-3-16-1-3-11-9	ST-364 complex	IAAABBF
DK 24	16	15-9-9-13-8-19-15		ECBDABF
3906	17	8-3-13-1-11-12-4		FADABBB
EG 328	18	7-8-10-19-10-1-2	ST-18 complex	BBEDAAA
EG 327	19	7-8-10-19-8-1-2	ST-18 complex	BBEDAAA
1000	20	6-8-10-17-10-1-2	ST-18 complex	BBEAAAA
B534	21	1-5-1-1-2-16-17		ACCACBF
A22	22	11-5-18-8-11-24-21	ST-22 complex	ICCBFFF
71/94	23	10-5-18-9-11-9-17	ST-23 complex/Cluster A3	FCCBBBF
860060	24	2-5-2-7-15-20-5		DCABECC
NG G40	25	6-5-2-12-6-13-14		BCADCCC
NG E28	26	6-5-2-12-12-10-14		BCADCBC
NG H41	27	3-5-6-5-7-18-2		CCDCADA
890326	28	13-4-6-17-5-18-2		IADABDA
860800	29	2-7-6-9-16-18-8		DDDBADF
NG 4/88	30	6-5-6-5-1-21-8		BCDCCBF
E32	31	14-5-6-2-3-8-18	ST-334 complex	ICDABBF
44/76	32	4-10-5-4-6-3-8	ST-32 complex/ET-5 complex	BCABCBF
204/92	33	8-10-5-4-6-3-8	ST-32 complex/ET-5 complex	FCABCBF
BZ83	34	8-10-5-4-5-3-8	ST-32 complex/ET-5 complex	FCABBBF
SWZ107	35	4-10-11-18-6-10-12	ST-35 complex	BCDACBC
EG 011	36	12-7-4-8-5-21-16		IDABBBF
NG H38	37	12-2-15-5-13-21-10		IBACBBA
DK 353	38	12-2-15-5-13-17-10		IBACBDA
BZ 232	39	5-4-17-15-14-7-16	ST-198 complex	EABDBBF
E26	40	3-6-9-5-9-22-9	ST-44 complex/Lineage 3	CCBCACF
400	41	3-6-9-5-9-6-9	ST-44 complex/Lineage 3	CCBCACF

^aMLST allelic profiles are displayed in the order *abcZ-adk-aroE-fumC-gdh-pdhC-pgm*. MLRFT allelic profiles are also displayed in that

order but without the dashes. ^bLineage information was retrieved from the MLST database (www.mlst.net).

Table 3. Usefulness of MLRFT in distinguishing and categorizing strains compared to MLST.^a

No. of ST(s) within an RT	No. of Occurrences	No. of STs correctly clustered by MLRFT ^b	No. of STs misclustered by MLRFT ^b
1	305	305	0
2	33	58	8
3	11	29	4
4	10	37	3
5	1	4	1
6	1	5	1
7	4	21	7
8	1	8	0
9	1	8	1
		Total=475	Total=25

^aThis computer-based analysis is based on converting the

first 500 STs in the MLST database (www.mlst.net) into RTs

and comparing assignments into clonal clusters.

^bMLRFT correct and incorrect classifications are based on clustering defined either as (1) membership in clonal complexes defined by

MLST

and/or MLEE, or (2) five of seven MLST gene loci being the same.

Table 4. Distribution of RTs among 60 Brazilian clinical *N. meningitidis* isolates and the Clonal**Complex Predictive Value of MLRFT.**

MLRFT allelic profile	No. of Isolates	Serogroup:serotype: serosubtype ^a	Predicted Linkage to Clonal Complex ^b	Sequence Type (allelic profile) ^c
FCABCBF	29	B:4,7:P1.19,15	ST-32 Complex/ET-5 complex	ST-33 (8-10-5-4-6-3-8)
FCABBBF	7	B:4,7:P1.19,15	ST-32 Complex/ET-5 complex	ST-34 (8-10-5-4-5-3-8)
DACAABA	5	C:2b	ST-8 Complex/Cluster A4	ST-8 (2-3-7-2-8-5-2)
CCBCACF	3	B:4,7:P1.3	ST-44 Complex/Lineage 3	ST-41 (3-6-9-5-9-6-9)
FABABDA	3	C:NT:NT		
CCBBACF	2	B:NT:NT		
DAAAACE	2	C:2a:P1.2		
FCABCBC	1	B:4,7:P1.7,1		
FCABCCF	1	C:4,7:P1.19,15		
FCBBCBF	1	B:4,7:P1.19,15		
BCAACBC	1	C:4,7:NT		
ICBBACF	1	B:7:NT		
ICBBACC	1	C:17,7:P1.7,13		
ICBBBBF	1	B:4,10:P1.9		
ICBBBCF	1	C:4,21:NT		

^aThe predominant serogroup:serotype:serosubtype is shown. NT denotes none typeable.

^bThe predicted linkage is based upon the comparison of the observed MLRFT allelic profile to the computer-based predicted MLRFT allelic profiles in Table 2. A more extensive version of Table 2 (from an analysis of 500 STs) can be found in table 1 in the supplementary material.

^cA single isolate from each of the four predominant RT was subjected to MLST.

FIGURE LEGEND

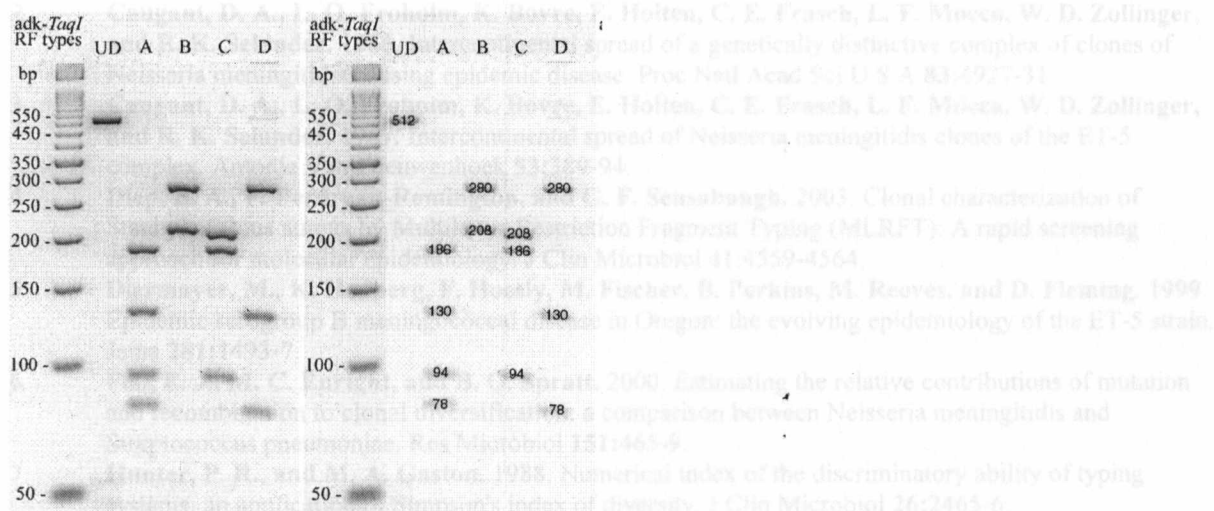


Figure 1. Unambiguous Assignment of RF Alleles. Restriction fragment banding patterns generated by digestion of *adk* PCR amplicon with *TaqI*. UD, undigested PCR amplicon. A-D, *adk* allele assignments made on the basis of restriction fragment length (numbers shown on the RF bands on the right panel) predicted from the MLST sequence data.

1. Beuett, D. E., and M. T. Caffertey. 2003. Multilocus restriction typing: a tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. *J Med Microbiol* 52:781-7.
2. Leung, D. A., M. W. Reeves, N. Al-Hamdan, C. T. Satchi, M. K. Taha, G. W. Aiello, S. E. Sabhan, D. A. Cavagni, J. Lingappa, N. E. Rosenstein, and T. Popovic. 2002. Outbreak of W135 meningococcal disease: a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-17 complex. *J Infect Dis* 185:1596-605.
3. Rosenstein, N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic, and J. M. Hughes. 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 344:1373-85.
4. Schwartz, B., P. S. Moore, and C. V. Broome. 1989. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* 2 Suppl:S118-24.
5. Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heitriberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwina, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Dhair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Colton, T. R. Utrichack, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, J. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287:1809-15.

REFERENCES

1. **Bennett, D. E., and M. T. Cafferkey.** 2003. Multilocus restriction typing: a tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. *J Med Microbiol* **52**:781-7.
2. **Caugant, D. A., L. O. Froholm, K. Bovre, E. Holten, C. E. Frasch, L. F. Mocca, W. D. Zollinger, and R. K. Selander.** 1986. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:4927-31.
3. **Caugant, D. A., L. O. Froholm, K. Bovre, E. Holten, C. E. Frasch, L. F. Mocca, W. D. Zollinger, and R. K. Selander.** 1987. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* **53**:389-94.
4. **Diep, B. A., F. Perdreau-Remington, and G. F. Sensabaugh.** 2003. Clonal characterization of *Staphylococcus aureus* by Multilocus Restriction Fragment Typing (MLRFT): A rapid screening approach for molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* **41**:4559-4564.
5. **Diermayer, M., K. Hedberg, F. Hoesly, M. Fischer, B. Perkins, M. Reeves, and D. Fleming.** 1999. Epidemic serogroup B meningococcal disease in Oregon: the evolving epidemiology of the ET-5 strain. *Jama* **281**:1493-7.
6. **Feil, E. J., M. C. Enright, and B. G. Spratt.** 2000. Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **151**:465-9.
7. **Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**:2465-6.
8. **Imrey, P. B., L. A. Jackson, P. H. Ludwinski, A. C. England, 3rd, G. A. Fella, B. C. Fox, L. B. Isdale, M. W. Reeves, and J. D. Wenger.** 1996. Outbreak of serogroup C meningococcal disease associated with campus bar patronage. *Am J Epidemiol* **143**:624-30.
9. **Jackson, L. A., A. Schuchat, M. W. Reeves, and J. D. Wenger.** 1995. Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States. An emerging threat. *Jama* **273**:383-9.
10. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3140-5.
11. **Mayer, L. W., M. W. Reeves, N. Al-Hamdan, C. T. Sacchi, M. K. Taha, G. W. Ajello, S. E. Schmink, C. A. Noble, M. L. Tondella, A. M. Whitney, Y. Al-Mazrou, M. Al-Jefri, A. Mishkhis, S. Sabban, D. A. Caugant, J. Lingappa, N. E. Rosenstein, and T. Popovic.** 2002. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis* **185**:1596-605.
12. **Rosenstein, N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic, and J. M. Hughes.** 2001. Meningococcal disease. *N Engl J Med* **344**:1378-88.
13. **Schwartz, B., P. S. Moore, and C. V. Broome.** 1989. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* **2 Suppl**:S118-24.
14. **Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Massignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter.** 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **287**:1809-15.

7.1. ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA VIGILÂNCIA REFERENTE AO ARTIGO 3

7.1.1. Tipagem molecular da *Neisseria meningitidis* em Salvador-BA pelo MLRFT

Foram analisados pelo MLRFT 52% (337/648) dos isolados identificados. Sendo que 75% dos isolados pertencentes ao tipo B:4,7:P1.19,5 (159/208) foram analisados apenas pelo o *locus gdh*, pois esse foi o único *locus* que apresentou diferença na tipagem dos isolados pertencentes ao fenótipo B:4,7:P1.19,15. Através deste método foram identificados 21 RTs diferentes (Tabela 1). Destes, seis RTs foram responsáveis por 84% dos casos de meningite meningocócica identificados no período do estudo. O principal RT identificado foi o RT-33, responsável por 60% dos casos (201/337) e 77% das cepas B:4,7:P1.19,15 (160/208). Cinco dessas cepas foram caracterizadas pelo MLST e classificadas como ST-33, confirmando os resultados obtidos pelo MLRFT, ST este que corresponde ao complexo hipervirulento ET-5 (MAIDEN et al., 1998). Vinte e três por cento (48/208) das cepas B:4,7:P1.19,15 foram classificadas como RT-34 que representa uma vantagem deste método em relação a fenotipagem e genotipagem pelo Ngrep-PCR, os quais não foram capazes de diferenciar estes isolados como pertencentes a grupos distintos. Quatro isolados RT-34 foram analisados pelo MLST e confirmado como sendo ST-34.

Observando-se a distribuição geográfica e temporal das cepas RT-34, foi detectado um padrão de 13 casos de meningite meningocócica entre agosto e outubro de 1998 na cidade de Salvador. Oito desses casos são de distritos sanitários vizinhos, São Caetano/Valéria (n=5) e Liberdade (n=3). Os cinco casos restantes não foram agrupados geograficamente. Dez desses casos ocorreram em pacientes entre 13 e 26 anos de idade. Os outros três casos ocorreram em crianças menores que quatro anos de idade. Destes, dois casos foram fatais; o primeiro um adolescente de 16 anos e o outro de 23 anos de idade. Um caso foi detectado no distrito sanitário do Subúrbio Ferroviário e, subsequente, mais três casos foram identificados no primeiro semestre de 1999.

Dezoito cepas identificadas como C:4,7:P1.19,15 estão relacionadas clonalmente com cepas B:4,7:P1.19,15, pois foram classificadas como pertencentes

ao tipo RT-33 pelos sete locus do MLRFT. Este resultado também foi confirmado pelo NgRep-PCR pois ambos agruparam no padrão A1, o que pode sugerir troca de cápsula do microorganismo, que ocorre através da conversão do gene polisialiltransferase do grupo B para o grupo C. Para confirmar a sorogrupagem foi realizado o multiplex PCR sorogrupo alelo específico seguindo o protocolo de Taha et al., 2000 (Figura 7). O grupo C/RT33 produziu amplificação somente com os primers para o sorogrupo C alelo *synE*.

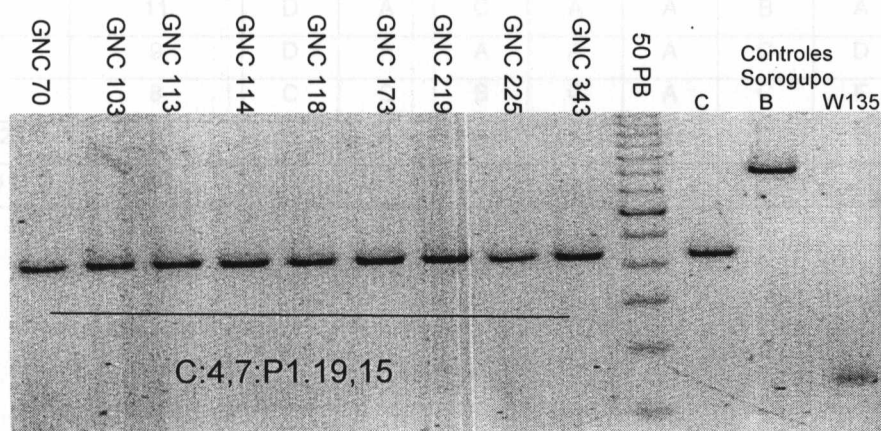


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do multiplex PCR sorogrupo alelo específico de isolados de *N. meningitidis* identificados Hospital Couto Maia-Salvado/BA.

Um total de 3,3% dos isolados (11/337) foi classificado com sendo RT-8. Cinco desses isolados foram caracterizado pelo MLST e classificados como ST-8. O ST-8 está associado ao clone hipervirulento A4.

O RT-11 foi responsável por 2,7% (9/337) dos casos identificados no estudo. Este RT está correlacionado ao complexo ET-37.

O RT-40 foi responsável por 2,4% (8/337) dos casos. Os ST-40, 41, 45, 159, 274, 414, 485, 776, 778, 788, 1090, 1091, e 1153 possuem o mesmo sítio de restrição usado pelas enzimas de restrição do MLRFT e, deste modo, foram classificados como RT-40. O MLST foi realizado em três isolados B:4,7:P1.3, RT-40 e foi caracterizado como ST-41, que está associado ao clone hipervirulento Linhagem 3.

As cepas classificadas como RT-1026 (5/337) pertenciam ao fenótipo C:2a:P1.2 ou C:2a:P1.5,2. O RT-1026 difere do RT-11 (complexo ET-37) somente

8. DISCUSSÃO

O uso de vacinas conjugadas contra o *Haemophilus influenzae* e o *Streptococcus pneumoniae* (BILUKHA & ROSENSTEIN, 2005; BLACK et al., 2001; RIBEIRO et al., 2001, 2007) na última década, tem reduzido acentuadamente o número de casos de meningites bacterianas causadas por estes organismos; no entanto, a doença meningocócica continua sendo um sério problema para a saúde pública por se tratar de uma doença grave, potencialmente letal e devido as conseqüências clínicas a ela associada (ROSENSTEIN et al., 2001). Atualmente a *Neisseria meningitidis* é a principal causa de meningite bacteriana em todo o mundo (BRASIL, 2005; HARISSON, 2006; RIBEIRO et al., 2007; ROSENSTEIN et al., 2001; SHAO et al., 2006). Apesar dos esforços que vêm sendo realizados no sentido de realizar estudos de base populacional, o isolamento e caracterização das cepas circulantes devem ser contínuos e efetivos para que possamos monitorar as cepas circulantes e desenhar estratégias para o controle e prevenção da doença meningocócica.

O sistema de vigilância ativa para as meningites bacterianas realizado no Hospital Couto Maia identificou 648 casos comprovadas por cultura positiva do líquido, sendo que aproximadamente 50% deles foram provenientes de Salvador e os demais de cidades do interior do estado. A incidência média da meningite meningocócica comprovada por cultura na cidade de Salvador-BA foi de 1,20 casos por 100.000 hab. A maior incidência foi no ano de 1998, no qual se observou uma taxa de 2,54 casos por 100.000 hab. Após o ano de 1999 tem sido observada uma queda acentuada na incidência sendo registrada uma taxa de 0,86 caso por 100.000 hab no ano de 2006. Esta queda na incidência foi também observada no estado da Bahia como um todo e em outros estados do Brasil, de acordo aos resultados apresentados pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (BAHIA, 2007) e pela Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (BRASIL, 2005).

Essa diminuição no número de casos é mais bem caracterizada a partir da análise da distribuição dos sorogrupos identificados no período do estudo. Na nossa população o predomínio do sorogrupo B foi constante nos onze anos da vigilância, tendo em vista que isolados sorogrupo B representaram 79,3%, seguido do sorogrupo C (18,1%) e casos esporádicos dos sorogupos W135 (1,6%) e Y (0,9%).

Ao longo desses anos observou-se a diminuição acentuada do número de casos associados ao sorogrupo B. Isto deve estar relacionado diretamente com a queda na incidência nos anos do estudo, o que deverá ser confirmado após a sorogrupagem dos isolados ainda não tipados para que seja realizada uma análise mais completa. Este achado está de acordo com a literatura, onde um número elevado de casos por sorogrupo B tendem a ocorrer em períodos cíclicos superiores a 10 anos, com subsequente redução nos anos subsequentes, enquanto as “ondas” por sorogrupo C tendem usualmente a ocorrer entre 1 e 3 anos (WENGER, 1999).

Semelhantemente, quando observamos a classificação quanto ao sorotipo e sorosubtipo observamos uma redução ao longo dos anos do sorotipo:sorosubtipo 4,7:P1.19,15, que foi caracterizado em 62,7% dos isolados caracterizados e está relacionado a cepa cubana hipervirulenta pertencente ao complexo ET-5, RT33/34. Isolados de *N. meningitidis* B:4,7:P1.19,15 pertencentes ao complexo ET-5 RT-33/34 estão presente no Brasil desde 1980. Seu potencial para o desenvolvimento de epidemias de meningite foi reconhecido pela sua disseminação nos EUA através de refugiados cubanos (CAUGANT et al., 1986, 1998). Vale ressaltar ainda que logo após a sua introdução no Brasil, substituiu as cepas endêmicas do sorogrupo C como causa primária da doença meningocócica e foi responsável por epidemias no final dos anos 80, estabelecendo-se definitivamente no Brasil (SACCHI et al., 1992). Entre os anos de 1990 e 2001, a circulação do sorogrupo B, sorogrupo mais prevalente manteve-se relativamente estável e com alta disseminação, enquanto o sorogrupo C foi menos persistente e mais localizado (LEMOS et al., 2006).

De acordo com análises dos resultados obtidos pelo *MLRFT* e confirmados pelo *MLST* frente aos dados populacionais foram observados casos pertencentes ao genótipo RT-34/ST-34. Este ST também foi documentado em isolados na Bahia analisados simultaneamente com outros isolados provenientes de quatro estados brasileiros (DE FILIPPIS et al., 2005). Embora não tenhamos tido a possibilidade de avaliar outros fatores inerentes ao hospedeiro e ou do ambiente que contribuísem para o surgimento destes casos, observamos que dois casos de doença endêmica foram causados por cepas RT-34 ocorridas no distrito sanitário de São Caetano/Valéria em setembro de 1996 e no distrito da Liberdade em junho de 1997 anteriormente aos casos ocorridos em 1998. É importante destacar também que no distrito Ferroviário, onde ocorreu um caso de meningite meningocócica em 1998 houve subsequentemente mais três casos no primeiro semestre de 1999.

Outro ponto importante a ser destacado é de que 70% dos casos de meningite meningocócica identificados no HCM foram causados por apenas seis tipos clonais. Todos esses seis clones têm sido reconhecidos previamente pelo potencial de causar doença meningocócica invasiva (CAUGANT et al., 1986, 1998), demonstrando a extrema importância de uma vigilância contínua para a identificação destes clones hipervirulentos. Como exemplo, o clone relacionado ao tipo C:2b/RT-8/ST-8 responsável por doença meningocócica esporádica na Bahia, em São Paulo cepas foram responsáveis pelo aumento da incidência da doença meningocócica no final da década de 80 e é atualmente um dos três principais clones das cepas pertencentes ao sorogrupo C circulantes na Grande São Paulo (LEMOS et al., 2007; SACCHI et al., 1992).

Um outro importante clone é o relacionado ao tipo RT-11/ST-11 associado ao complexo ET-37, outra linhagem meningocócica hipervirulenta. É importante destacar que os isolados dos sorogrupos W135 e C freqüentemente associados à cepa ST-11 tem aumentado no Brasil (LEMOS et al., 2007). Esta informação deve ser considerada pois, este complexo clonal pode disseminar-se rapidamente em populações susceptíveis, como observado em outras epidemias por todo o mundo (MAYER et al., 2002).

Para responder á pressão seletiva, o meningoco desenvolveu um mecanismo de mudança de suas estruturas capsulares através da troca de cápsula. O mecanismo responsável por esta troca dá-se pela recombinação do gene polisialiltransferase, no qual o alelo *synD* do sorogrupo B foi substituído pelo alelo *synE* do sorogrupo C (SWARTLEY et al., 1997). Este fenômeno foi demonstrado na população durante uma epidemia na costa norte do Pacífico nos EUA com o aparecimento de casos de sorogrupo C pertencente ao complexo ET-5 durante o fim da epidemia por sorogrupo B do completo ET-5 (B:15:P1.7,16) (SWARTLEY et al., 1997). A troca de cápsula tem sido identificada também após campanhas de vacinação contra a doença meningocócica causada pelas cepas do complexo ET-37/C:2a:P1.5,2. Kertesz e colaboradores (1998) observaram que a vacinação de massa exerceu pressão para a seleção de complexos ET-37 (B:2a:P1.5,2). O nosso sistema de vigilância revelou que 18 isolados C:4,7:P1.19,15 são clonalmente relacionadas ao sorogrupo B:4,7:P1.19,15 pois, ambos são RT/33 pelo MLRFT e amplificação somente com os primers para o sorogrupo C alelo *synE*.

Finalmente, através deste estudo validamos e implantamos testes moleculares na Bahia e realizamos estudo de epidemiologia molecular que fornecem dados relevantes para as políticas de saúde pública tais como, o reconhecimento das cepas hipervirulentas e monitoramento dos padrões destas cepas.

9. CONCLUSÕES

- A meningite meningocócica em Salvador está fortemente associada à faixa etária de 0-4 anos, quando os indivíduos apresentam maior susceptibilidade à doença invasiva e apesar de maior número de casos do sexo masculino, não parece apresentar associação significativa com o sexo;
- Conforme o presente estudo, podemos notar uma redução considerável na incidência da doença meningocócica nos últimos 10 anos, sobretudo no número de casos referentes ao sorotipo:sorosubtipo B:4,7:P1.19,15;
- A tipagem molecular utilizando o NgRep-PCR e o MLRFT apresentaram alto poder discriminatório com esperado. Métodos estes capazes de diferenciar cepas durante a vigilância com vantagens em relação aos métodos de fenotipagem: menor custo e tempo;
- A implementação de estudos de epidemiologia molecular da meningite meningocócica na Bahia fornece dados relevantes para as políticas de saúde pública, tais como o reconhecimento e identificação de cepas hipervirulentas e monitoramento dos padrões dessas cepas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAHIA. (Estado). Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Anuário estatístico, 2002**. Disponível em:
http://www.saude.ba.gov.br/dados_saude/publicacoes/anuario_2002.pdf.
Acesso em: 29 out. 2007.
2. BILUKHA, O.O.; ROSENSTEIN, N.; National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm. Rep.**, v. 54 n. RR-7, p. 1-21, 2005.
3. BJORVATN, B.; HASSAN-KING, M.; GREENWOOD, B.; HAIMANOT, R. T.; FEKADE, D.; SPERBER, G. DNA Fingerprinting in the epidemiology of African serogroup A *Neisseria meningitidis*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 24, p. 323-32, 1992.
4. BLACK, S.; SHINEFIELD, H.; FIREMAN, B.; LEWIS, E.; RAY, P.; HANSEN, J.R.; ELVIN, L.; ENSOR, K.M.; HACKELL, J.; SIBER, G.; MALINOSKI, F.; MADORE, D.; CHANG, I.; KOHBERGER, R.; WATSON, W.; AUSTRIAN, R.; EDWARDS, K. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 19, p. 187-95, 2000.
5. BOISIER, P.; NICOLAS, P.; DJIBO, S.; TAHA, M.K.; JEANNE, I.; MAINASSARA, H.B.; TENEBRAY, B.; KAIRO, K.K.; GIORGINI, C.S. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, p. 657-63, 2007.
6. BRANHAM, S. E. Reference strains for the serologic groups of meningococcus. In: VEDROS, N. A. (Ed.) **Evolution of meningococcal disease**. Florida: CRC Press Inc., 1987. v. 2, p. 33-37.
7. BRANHAM, S. E. Serological relationships among meningococci. **Bacteriol. Rev.**, v. 17, p. 175-88, 1953.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2001.

9. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Série histórica de casos de doenças de notificação compulsória no Brasil (1980-2005)**. Disponível em:
http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/zip/casos_e_obitos2006.zip.
Acesso em: 29 out. 2007.
10. BRISSON, J. R.; BAUMANN, H.; IMBERETY, A.; PÉREZ, S.; JENNINGS, H.J. Helical epitope of the group B meningococcal α -(2 α 8)-linked sialic acid polysaccharide. **Biochemistry**, v. 31, p. 4996-5004, 1992.
11. BRYAN, J. P.; SILVA, H. R.; TAVARES, A.; ROCHA, H.; SCHELD, W. M. Etiology and mortality of bacterial meningitis in northeastern Brazil. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. 128-35, 1990.
12. BYGRAVES, J. A.; MAIDEN, M. C. J. Analysis of the clonal relationships between strains of *N. meningitidis* by pulsed field electrophoresis. **J. Gen Microbiol.**, v. 138, p. 52-3, 1992.
13. CAUGANT, D. A. Population genetics and molecular epidemiology of *N. meningitidis*. **APMIS**, v. 106, p. 505-25, 1998.
14. CAUGANT, D. A.; FROHOLM, L. O.; BOVRE, K.; HOLTEN, E.; FRASCH, C. E.; MOCCA, L. F.; ZOLLINGER, W. D.; SELANDER, R. K. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic-disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 83, p. 4927-31, 1986.
15. CHIPPAUX, J. P. ; GARBA, A. ; ETHEVENAUX, C. ; CAMPAGNE, G. ; CHABALIER, F. DE ; DJIBO, S. ; NICOLAS, P.; ALJ, H. ; CHARRONDIERE, M. ; RYALL, R.; BYBEL, M.; SCHUCHAT, A. Immunogenicity, safety, and memory of different schedules of *Neisseria meningitidis* A/C-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants in Niger. **Vaccine**, v. 22, p. 3303–11, 2004.
16. CRUZ, C.; PAVEZ, G.; AGUILAR, E.; GRAWE, L.; CAM, J; MENDEZ, F.; GARCIA, J.; RUIZ, S.; VICENT, P.; CANEPA, I.; MARTINEZ, M.; BOSLEGO, J.; ZOLLINGER, W.; ARTUR, J.; CAUGANT, D. Serotype - specific outbreak of group B meningococcal disease in Iqueque, Chile. **Epidemiol. Infect.**, v. 105, p. 119-26, 1990.
17. DE FILIPPIS, I.; SALLES, C.A.; ZAHNER, V.; DO NASCIMENTO, C.R.; MOMEN, H. Genetic diversity of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil, evaluated by multilocus enzyme electrophoresis. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 39, p. 232-9, 2004.

18. DJIBO, S.; NICOLAS, P.; ALONSO, J.M.; DJIBO, A.; COURET, D.; RIOU, J.Y.; CHIPPAUX, J.P. Outbreaks of serogroup X meningococcal meningitis in Niger 1995-2000. **Trop. Med. Int. Health**, v. 8, p. 1118-23, 2003.
19. DIEP, B.; PERDREAU-REMINGTON, F.; SENSABAUGH, G. F. Clonal characterization of *Staphylococcus aureus* by multilocus restriction fragment typing, a rapid screening approach for molecular epidemiology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4559-64, 2003.
20. DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of repetitive DNA sequence and the PCR to differentiate *E.coli* isolates from human and animal sources. **AEM**, v. 66, p. 2572-77, 2000.
21. ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 482-7, 1999.
22. FEAVERS, I. M.; GRAY, S. J.; URWIN, R.; RUSSEL, J. E.; BYGRAVES, J. A.; KACZMARSKI, E. B.; MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3883-7, 1999.
23. FERRARI, G.; GARAGUSO, I.; ADU-BOBIE, J.; DORO, F.; TADDEI, A.R.; BIOLCHI, A.; BRUNELLI, B.; GIULIANI, M.M.; PIZZA, M.; NORAIS, N.; GRANDI, G. Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. **Proteomics**, v. 6, p. 1856-66, 2006.
24. FRASCH, C.E. Vaccines for prevention of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 134-8, 1989.
25. GAGNEUX, S.P.; HODGSON, A.; SMITH, T.A.; WIRTH, T.; EHRHARD, I.; MORELLI, G.; GENTON, B.; BINKA, F.N.; ACHTMAN, P. G. Prospective study of a serogroup X *Neisseria meningitidis* outbreak in northern Ghana. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 618-26, 2002.
26. GIULIANI, M.M.; ADU-BOBIE, J.; COMANDUCCI, M.; ARICO, B.; SAVINO, S.; SANTINI, L.; BRUNELLI, B.; BAMBINI, S.; BIOLCHI, A.; CAPECCHI, B.; CARTOCCI, E.; CIUCCHI, L.; DI MARCELLO, F.; FERLICCA, F.; GALLI, B.; LUZZI, E.; MASIGNANI, V.; SERRUTO, D.; VEGGI, D.; CONTORNI, M.; MORANDI, M.; BARTALESI, A.; CINOTTI, V.; MANNUCCI, D.; TITTA, F.; OVIDI, E.; WELSCH, J.A.; GRANOFF, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 103, p. 10834-39, 2006.

27. GRIFFISS, J. M.; BRANT, B. L.; JARVIS, G. A. Natural immunity to *N. meningitidis*. In: VEDROS, N. A. (Ed.). **Evolution of meningococcal disease**. Florida: CRC Press Inc., 1987. v. 2, p. 99-119.
28. GROTTTO, I.; BLOCK, C.; LERMAN, Y.; WIENER, M.; ASHKENAZI, S. Meningococcal disease in the Israel Defense Force: epidemiologic trends and new challenges. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 31, p. 54-8, 1995.
29. HARRISON L. H. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 142-64, 2006.
30. IBGE, 2002. Anuário estatístico do Brasil, 2000. Rio de Janeiro, IBGE.
31. JENNINGS, M. P.; SRIKHANTA, Y, N.; MOXON, E. R.; KRAMER, M.; POOLMAN, J. T.; KUIPERS, B.; van der LEY, P. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. **Microbiology**, v. 145, p. 3013-21, 1999.
32. JOHNSON, J. R.; O' BRYAN, T. Improved repetitive – element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *E.coli*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 265-73, 2000.
33. JOLLEY, K.A.; CHAN, M.S.; MAIDEN, M.C. MlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. **BMC Bioinf.**, v. 5, p. 86, 2004.
34. KIDD, M.; ATHERTON, J. C.; LASTOVICA, A. J.; LOUW, J. A. Clustering of South African *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer disease patients is demonstrated by repetitive extragenic palindromic – PCR fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1833-39, 2001.
35. KO, A. I.; REIS, J.N.; COPPOLA, S. J.; GOUVEIA, E. L.; CORDEIRO, S. M.; LÔBO, T. S.; PINHEIRO, R. M.; SALGADO, K.; DOURADO, C. M. R.; TAVARES-NETO, J. ROCHA, H; REIS, M. G.; JOHNSON, W. D. J.; RILEY, L. W. Clonally related penicilin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningites in Salvador, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 78-86, 2000.
36. LEMOS, A.P.; BRANDAO, A.P.; GORLA, M.C.; PAIVA, M.V.; SIMONSEN, V.; MELLES, C.E. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains

isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 751-7, 2006.

37. LEMOS, A.P.; YARA, T.Y.; GORLA, M.C.; DE PAIVA, M.V.; DE SOUZA, A.L.; GONCALVES, M.I.; DE ALMEIDA, S.C.; DO VALLE, G.R.; SACCHI, C.T. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1266-73, 2007.
38. LINGAPPA, J.R.; AL-RABEAH, A.M.; HAJJEH, R.; MUSTAFA, T.; FATANI, A.; AL-BASSAM, T.; BADUKHAN, A.; TURKISTANI, A.; MAKKI, S.; AL-HAMDAN, N.; AL-JEFFRI, M.; AL MAZROU, Y.; PERKINS, B.A.; POPOVIC, T.; MAYER, L.W.; ROSENSTEIN, N.E. Serogroup W-135 meningococcal disease during the Hajj, 2000. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 665-71, 2003.
39. LINGAPPA, J. R.; ROSENSTEIN, N.; ZELL, E. R.; SHUTT, K. A.; SCHUCHAT, A.; BRADLEY A. Perkins and Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Team. Surveillance for meningococcal disease and strategies for use of conjugate meningococcal vaccines in the United States. **Vaccine**, v. 19, p. 4566-75, 2001.
40. LOOVEREN, M. V.; VANDAMME, P.; HAUCHECORNE, M.; WIJDOOGHE, M.; CARION, F.; CAUGANT, D. A.; GOOSSENS, H. Molecular epidemiology of recent belgian isolates of *Neisseria meningitidis* serogroup B. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2828-34, 1998.
41. LYSTAD, A.; AASEN, S. The epidemiology of meningococcal disease in Norway 1975-91. **NIPH Ann.**, v. 14, p. 57-66, 1991.
42. MACLENNAN, J.; OBARO, S.; DEEKS, J.; LAKE, D.; ELIE, C.; CARLONE, G.; MOXON, E.R.; GREENWOOD, B. Immunologic memory 5 years after meningococcal A/C conjugate vaccination in infancy. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 97-104, 2001.
43. MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL., E.; MORELLI, G.; RUSSEL, J. E.; URWIN, R; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, p. 3140-45, 1998.
44. MAIDEN, M.C.; STUART, J.M. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. **Lancet**, v. 359, p. 1829-31, 2002.

45. MASIGNANI, V.; COMANDUCCI, M.; GIULIANI, M.M.; BAMBINI, S.; ADU-BOBIE, J.; ARICO, B. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 6, p. 789–99, 2003.
46. MAYER, L.W.; REEVES, M.W.; AL-HAMDAN, N.; SACCHI, C.T.; TAHA, M.K.; AJELLO, G.W.; SCHMINK, S.E.; NOBLE, C.A.; TONDELLA, M.L.; WHITNEY, A.M.; AL-MAZROU, Y.; AL-JEFRI, M.; MISHKHIS, A.; SABBAN, S.; CAUGANT, D.A.; LINGAPPA, J.; ROSENSTEIN, N.E.; POPOVIC, T. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 1596-605, 2002.
47. MEMISH, Z. A; ALRAJHI, A. A. Meningococcal disease. **Saudi. Med. J.**, v. 23, p. 259-64, 2002.
48. MILAGRES, L.G.; RAMOS, S.R.; SACCHI, T.C.; MELLES, C.E.; VIEIRA, V. S. D.; SATO, H.; BRITO, G. S.; MORAES, J. C.; FRASCH, C.E. Immune response of Brazilian children to a *N. meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. **Infect. Immun.**, v. 20, p. 4419-24, 1994.
49. MOORE, P. S.; REEVES, M. W.; SCHWARTZ, B.; GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. **Lancet**, v. 7, p. 260-63, 1989.
50. NORHEIM, G.; ROSENQVIST, E.; ASEFFA, A.; YASSIN, M.A.; MENGISTU, G.; KASSU, A.; FIKREMARIAM, D.; TAMIRE, W.; HOIBY, E.A.; ALEBEL, T.; BERHANU, D.; MERID, Y.; HARBOE, M.; CAUGANT, D.A. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates from recent outbreaks in Ethiopia and comparison with those recovered during the epidemic of 1988 to 1989. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 861-71, 2006.
51. O'HALLAHAN, J.; LENNON, D.; OSTER, P. The strategy to control New Zealand's epidemic of group B meningococcal disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 23, p. S293–8, 2004.
52. OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1661-69, 1999.
53. PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M. M.; ARICÓ, B.; COMANDUCCI; JENNINGS, G.T.; GALEOTTI, C. L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.;

SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D. W.; JEFFRIES, A. C.; SAUNDERS, N. J.; GRANOFF, D.W.; VENTER, J. C.; MOXON, E. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, p. 1816-20, 2000.

54. PURICELLI R.C.; KUPEK, E.; BERTONCINI, R. DE C. Control of a community outbreak of group C meningococcal meningitis in Corupa, Santa Catarina State, Brazil, based on rapid and effective epidemiological surveillance and immunization. **Cad. Saúde Públ.**, v. 20, p. 959-67, 2004.
55. RAMSEY, M.; ANDREWS, N.J.; TROTTER, C.L.; KACZMARSKI, E.B.; MILLER, E. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. **BMJ**, v. 326, p. 365-6, 2003.
56. RAPPUOLI, R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. **Vaccine**, v. 19, p. 2319-22, 2001.
57. RAYMOND, N. J.; REEVES, M.; AJELLO, G.; BAUGHMAN, W.; GHEESLING, L. L.; CARLONE, G. M.; WENGER, J.D.; STEPHENS, D.S. Molecular epidemiology of sporadic (endemic) serogroup C meningococcal disease. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1277-84, 1997.
58. REINGOLD, A. L.; HIGHTOWER, A. W.; BOLAN, G. A.; JONES, E. E.; TIENDREBEOGO, H.; BROOME, C. V.; AJELLO, G.W.; ADAMSBAUM, C.; PHILLIPS, C.; YADA, A. Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. **Lancet**, v. 2, p. 114-8, 1985.
59. REQUEJO, H. I. Z. Comportamento imunológico das vacinas antimeningocócicas **Rev. Saúde Públ.**, v. 31, 402-16, 1997.
60. RIBEIRO, G.S.; LIMA, J.B.; REIS, J.N.; GOUVEIA, E.L.; CORDEIRO, S.M.; LOBO, T.S.; PINHEIRO, R.M.; RIBEIRO, C.T.; NEVES, A.B.; SALGADO, K.; SILVA, H.R.; REIS, M.G.; KO, A.I. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**, v. 25, p. 4420-8, 2007.
61. RIBEIRO, G.S.; REIS, J.N.; CORDEIRO, S.M. LIMA, J.B.; GOUVEIA, E.L.; PETERSEN, M.; SALGADO, K.; SILVA, H.R.; ZANELLA, R.C.; ALMEIDA, S.C.; BRANDILEONE, M.C.; REIS, M.G.; KO, A.I. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with

type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 109-16, 2003.

62. ROSENSTEIN, N. E.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; LEFKOWITZ, L.; CARTTER, M. L.; DANILA, R.; CIESLAK, P.; SHUTT, K. S.; POPOVIC, T.; SCHUCHAT, A.; HARRISON, L. H.; REINGOLD, A. L. The changing epidemiology of meningococcal disease in the USA, 1992-1996. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1894-901, 1999.
63. ROSENSTEIN, N. E.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; POPOVIC, T.; HUGHES, J.M. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1378-88, 2001.
64. SACCHI, C. T.; PESSOA, L. L.; RAMOS, S. R.; MILAGRES, L. G.; CAMARGO, M. C. C.; HIDALGO, N. T.; MELLES, C. E. A; CAUGANT, D. A; FRASCH, C. E. Ongoing group B *N. meningitidis* epidemic in São Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1734-38, 1992.
65. SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Centro de Vigilância Epidemiológica "Professor Alexandre Vranjac"**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 29 out. 2007.
66. SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **App. Environ. Microbiol.**, v. 51, p. 873-84, 1986.
67. SERRUTO, D.; ADU-BOBIE, J.; SCARSELLI, M.; VEGGI, D.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. **Mol Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 323– 34, 2003.
68. SHAO, Z.; LI, W.; REN, J.; LIANG, X.; XU, L.; DIAO, B.; LI, M.; LU, M.; REN, H.; CUI, Z.; ZHU, B.; DAI, Z.; ZHANG, L.; CHEN, X.; KAN, B.; XU, J. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. **Lancet**, v. 367, n. 9508, p. 419-23, 2006.
69. SIERRA, V. G.; CAMPA, C.; TERRY, H.; ECHEVERRI, M.L. Epidemiologic and laboratory of the Cuban meningococcal vaccine BC, three years of follow-up. In: Pathobiology and Immunobiology of Neisseriaceae .In: INTERNATIONAL PATHOGENIC NEISSERIA CONFERENCE, 8. Mexico, p. 909-15, 1994.

70. STULL, T. L.; LIPUMA, J. J.; EDLIND, T.D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 280-86, 1988.
71. TAHA, M. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 855-57, 2000.
72. van DEUREN, M. V.; BRANDTZAEG, P.; MEER, J. W. M. V. D. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 144-66, 2000.
73. VEDROS, N. A. Evolution of meningococcal disease. In: **Development of meningococcal serogroups and serotyping**. Boca Raton: Florida, 1987. v. 2, p. 33-54.
74. VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. DNA Fingerprinting of *Neisseria* strains by rep-PCR. **Methods Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 96-104, 1995.
75. VIEUSEAUX, M. Mémoire sur la maladie qui a regne a Geneve du printemps de 1805. *Journal de Médecine Chirurgie Pharmacie*, 11:163, 1805. In: **Medicina Tropical - Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. BATISTA, R. S.; GOMES, A. P.; IGREJA, R.P.; HUGGINS, D.W. (ed.). *Cultura Médica*, 521-9, 2000.
76. VOLK, W. A.; GEBHARDT, B.M.; HAMMARSKJOLD, M; KADNER, R. J. **Essentials of medical microbiology**. 5. ed. Philadelphia: Copyright, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.348-55.
77. WANG, J.; CAUGANT, D. A.; LI, X.; HU, X.; POOLMAN, J. T.; CROWE, B. A.; ACHTMAM, M. Clonal and antigenic analysis of serogroup A *N. meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in China. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 5267-82, 1992.
78. WEDEGE, E.; HOIBY, E. A.; ROSENQVIST, E.; BJUNE, G. Immune responses against major outer membrane antigens of *N. meningitidis* in vaccines and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian Serogroup B protection trial. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3223-31, 1998.
79. WEICHSELBAUM, A. Ueber die Aetiologie der akuten Meningitidis cerebrospinalis. *Otschr Med.* 1887;5:573-83. In: **Medicina Tropical - Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. BATISTA, R. S.; GOMES, A. P.; IGREJA, R.P.; HUGGINS, D.W. (ed.). *Cultura Médica*, 521-9, 2000.

80. WEIS, N.; LIND, I. Usefulness of the DNA-fingerprinting pattern and the multilocus enzyme electrophoresis profile in the assessment of outbreaks of meningococcal disease. **Epidemiol. Infect.**, v. 116, p. 103-14, 1996.
81. WORLD Health Organization. **Fact Sheet, 141**. Disponível em: <http://<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/index.html>>. Acesso em: 29 out. 2007.
82. WORLD Health Organization. **Communicable Disease Surveillance & Response**. Disponível em: http://<www.who.int/csr/resources/publications/meningitis/WHO_CDS_CSR_GAR_2004_17.pdf>. Acesso em: 29 out. 2007.
83. WENGER J. D. Serogroup B meningococcal disease: new outbreaks, new strategies. **JAMA.**, v. 281, p. 1541-3, 1999.
84. WILDER-SMITH, A.; BARKHAM, T. M.; RAVINDRAN, S.; EARNEST, A.; PATON, N. I. Persistence of W135 *Neisseria meningitidis* carriage in returning Hajj pilgrims: risk for early and late transmission to household contacts. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 123-6, 2003.
85. WOODS C. R.; KOEUTH, T.; ESTABROOK, M. M.; LUPSKI, J. R. Rapid determination of outbreaks-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. **J. Infect. Dis.**, v. 174, p. 760-7, 1996.
86. YAKUBU, D. E.; ABADI, F.J.R.; PENNINGTON, T. H. Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 1055-64, 1999.
87. ZHU, P.; VAN DER ENDE, A.; FALUSH, D.; BRIESKE, N.; MORELLI, G.; LINZ, B.; POPOVIC SCHUURMAN, I.G.; ADEGBOLA, R.A.; ZURTH, K.; GAGNEUX, S.; PLATONOV, A.E.; RIOU, J.Y.; CAUGANT, D.A.; NICOLAS, P.; ACHTMAN, M. Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, p. 5234-9, 2001.

ANEXO I - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

ESTUDO DE MENINGITE MENINGOCÓCICA

I. Identificação do Paciente:

- A. Número de identificação do estudo
- B. Número de identificação no HCM (registro ou PA)
- C. Se pcte foi de outro hospital, qual? _____
- D. Data de admissão / /
- E. Nome _____

II. Critérios de Inclusão e Identificação Microbiológica

1. Coloração de Gram é positiva para *N. meningitidis*
2. Látex é positivo para *N. meningitidis*
3. Cultura do líquor é positiva para *N. meningitidis*
5. Hemocultura positiva para *N. meningitidis* (8=não fez)
- IIIa. Entrevista: (1=entrevistado ; 2=revisão prontuário; 3=prontuário PA)

- IIIb. Consentimento (1=s; 0=n; 9=ns; 8=nsa)

IV. Dados Demográficos

1. Idade (Se <1 ano, coloque 0)
- Se <2 anos, idade do paciente em meses:
- Se <1 mês, idade do paciente em dias:
2. Sexo (1=M, 0=F, 9=ns):
3. Procedência (1=Salvador, 0=Interior; 8=nsa; 9=ns):
- Rua: _____
- Bairro: _____ Cidade: _____
4. Escolaridade:
- (1=analfabeto; 2= prim. grau (1a - 4a series); 3= prim. grau (5a - 8a series); 4=2º. grau (incompleto); 5=2º. grau (completo); 6=universidade(incompleta); 7=universidade comp)

V. Começo dos Sintomas : (1=s,0=n;8=nsa;9=ns)

- | | Dias antes do HCM |
|--|---|
| 1. Quando começou a doença: | <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 2. Febre: <input type="checkbox"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 3. Dor de cabeça: <input type="checkbox"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 4. Convulsões: <input type="checkbox"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 5. Rigidez de nuca: <input type="checkbox"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 6. Náusea/vômito: <input type="checkbox"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> |

VI. Antecedentes médicos:

1. Doenças anteriores: 1) _____
2) _____
2. O paciente apresenta doença crônica (1=s,0=n;9=ns):
- 2.1. Alcoolismo:
- Evidência: _____
Evidência: _____

VII. História de Hospitalizações Anteriores:

1. Foi internado de 0 a 3 dias antes de iniciar sintomas de meningite? Motivo: _____
2. a. Hospit. antes dessa doença, por mais de 24 h no último mês:
Onde? _____ Dias?
- b. Hospit. nos últimos 2-3 meses (1=s, 0=n, 9=ns):
Onde? _____ Dias?
- c. Hospit. nos últimos 4-6 meses (1=s, 0=n, 8=nsa, 9=ns):
Onde? _____ Dias?
- d. Hospit. nos últimos 6 meses (1=s, 0=n, 8=nsa, 9=ns):
Onde? _____ Dias?

VIII. História Epidemiológica do Paciente:

1. Paciente trabalha mais do que 20 horas/semana: Ocupação _____
2. Paciente vai para escola: (0= n, 1=s, 9=ns):
- 2.1. Se sim, Qual _____ Bairro: _____
3. Paciente vai para creche: (0=n, 1=s, 9=ns):
- 3.1. Se sim, qual _____ Bairro: _____
4. Horas fora de casa por dia? (1= <8 horas; 2 = 8-12 horas; 3 = 13-15 horas; 4= >16 horas; 9= ns):
5. Paciente fuma:
6. Conhece outro paciente com infecção meningocócica:
- 6.1. Se sim, quem : _____ Quando teve meningite: _____

IX. Informação sobre Contactantes:

1. Quantas pessoas moraram na casa por > 4 sem nos últimos 6 meses:
2. Quantos cômodos tem a casa
3. Morador da casa fuma
4. História de viagem no último mês (0=N, 1=S, 9=NS, 8=NSA)
- | | Paciente | Contactante |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. Viagem para fora da cidade da residência | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Se mora interior, viagem a Salvador | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Viagem para fora do Estado | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

X. Apresentação Clínica na Admissão:

1. Se Criança < 2 anos; qual o comprimento | Percentil
2. Dados Vitais:
TAS = TAD = TAM =
3. Lesões de pele: (1=s, 0=n, 9=ns)
4. Tipo: { 1=púrpura/equimose (> 5 mm); 2=petéquia (< 5mm); 9=ns; 8=sem lesão }
5. Sinais neurológicos focais (1=s;0=n;9=ns):
- 5.1. Se sim, qual: _____
6. Consciente na admissão? (adultos)
- 6.1. Sensório do paciente: (adultos)
- 1=Alerta , orientado e capaz de obedecer comandos; 5= Irresponsivo;
2= Alerta, não bem orientado ou capaz de obedecer comandos; 8= Não se aplica;
3= Letárgico mas acordado; 9= Não sabe;
4= Acordado apenas à estimulação dolorosa vigorosa;
7. Se criança <2 anos sensório do paciente: (1=alerta/irritável; 2= sonolento/letárgico; 3= comatoso; =nsa; 9=ns)

XI. Informação Laboratorial na Admissão:

1. Em que dia de hospitalização o Hemograma foi feito
2. Contagem de leucócitos (em milhares): |
3. Leucograma diferencial: PMNs: % Bastões: %
4. Eritrograma: Hb: Ht: % Pla: .000
5. Dados do Líquor: (0=n;1=s;9=ns;8=nsa)
- 5.1. Prejudicada:
- 5.2. Leucócitos:
- 5.3. Predominância de PMN(>75%):
- 5.4. Glicose (mg/dl):
- 5.5. Proteína (mg/dl):

XII. Tratamento:

1. Esquema inicial incluiu (1=s, 0=n):
 - a. penicilina ou ampicilina
 - b. cloranfenicol
 - c. Rocefim (ceftriaxona)
 - d. ceftazidima
2. Para os casos que não começou com o Rocefim, foi incluída depois
3. Foi tratada com esteroide IV (1=s, 0=n, 9=n): quantos dias: dias
que dia começou: DIH

XIV. Evolução Clínica: Alta final

1. Data da alta: / /
2. Tipo de alta (1=curado; 2=transferido; 3 = outro diagnóstico; 4= óbito):
3. Dias internados no HCM:
4. Dias internados na UTI do HCM:
5. Convulsões durante o internamento (1=s;0=n;9=ns;8=nsa):
6. Evoluiu com sinais neurológicos focais (1=s, 0=n, 9=ns):
- 6.1. Se sim, Qual _____
7. Déficit neurológico na alta:
(0= não tem; 1= perda auditiva; 2=deficit motor; 3 = alt. nervos cranianos; 4 = ataxia ; 5= alteração estado mental)

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Consentimento para Investigação Clínica: Página I

Título do Projeto: Estudo de Meningite Bacteriana no Hospital Couto Maia.

Paciente: _____ No. na Pesquisa: _____

Introdução:

As informações que se seguem descrevem o estudo e seu papel como participante. O entrevistador responderá todas as perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar 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 meningite bacteriana. A meningite é uma inflamação que ocorre no cérebro, é uma doença grave que acomete principalmente crianças, mas pode ocorrer em qualquer idade.

O objetivo do nosso estudo é conhecer mais as bactérias que causam meningite, estudando como elas são transmitidas; quais são os fatores que fazem com que algumas pessoas apresentem um quadro mais grave que outras; porque algumas crianças parecem ter no sangue uma defesa (anticorpos) contra a bactéria e como elas adquiriram esta defesa. Obtendo estas informações teremos condições, no futuro, de implantar medidas para diminuir o número de pessoas com meningite.

Você está sendo convidado(a) a participar porque você tem meningite bacteriana confirmada por exames ou porque com certeza você não tem esta doença. Todo estudo científico deste tipo precisa comparar pessoas que tem a doença com pessoas que não tem; só assim, saberemos o que é realmente importante para a doença e o que é apenas coincidência.

Procedimento:

Se você voluntariamente decidir participar deste estudo após ter lido este formulário de consentimento, o investigador lhe fará perguntas sobre o local onde você mora, sua ocupação (trabalho) e sua história médica e lerá seu prontuário médico para obter os resultados de seus exames no hospital.

Sigilo:

As perguntas feitas durante a entrevista ou 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.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista. Sua recusa em participar no estudo ou em parte do mesmo, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações como Hospital Couto Maia no

Hospital Couto Maia/Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Consentimento para Investigação Clínica: Página 2

Título do Projeto: Estudo de Meningite Bacteriana no Hospital Couto Maia.

Paciente: _____ No. na Pesquisa: _____

presente ou no futuro. Uma cópia deste formulário lhe será dada e você pode ficar com ela. Você não será responsável por nenhuma despesa relacionada a este estudo.

Com quem contatar:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo você pode contatar a Dra. Cibele Dourado pelo telefone: (071) 312-0084. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor entre em contato com Dr. Edilson Sacramento, Presidente da Comissão de Ética do Hospital Couto Maia, pelo telefone (071) 312-0084. Tanto Dra. Cibele quanto Dr. Edilson podem ainda ser contatados no Hospital Couto Maia cujo endereço é Rua São Francisco, s/n, Monte Serrat, no. 40, CEP 40.425-001, Salvador, Bahia.

Consentimento:

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto em participar deste estudo.

Assinatura do paciente

Data

Hora



Impressão datiloscópica do paciente

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto que o paciente do qual eu sou pai ou mãe ou guardião legal participe deste estudo.

Assinatura do pai ou mãe ou guardião legal

Data

Hora



Impressão datiloscópica do pai ou mãe ou guardião legal

Assinatura da testemunha

Data

Hora

Assinatura do Investigador

Data

Hora

ANEXO III - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Rua Waldemar Falcão, 121, CEP: 40295-001
Tel.: (071) 356 8785 Fax: (071) 356 4292
E-mail: sherlock@server01.cpqgm.fiocruz.br
Salvador - Bahia - Brasil

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS DO CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

PARECER Nº 0038

Protocolo: 0038

Projeto de Pesquisa: "Epidemiologia Molecular das Meningites Bacterianas em Salvador/Bahia".

Pesquisador Responsável: Dr. Albert Ko

Instituição ou Departamento: CPqGM

Considerações: Foram atendidas e esclarecidas todas as pendências referentes aos aspectos éticos do Projeto "Epidemiologia Molecular das Meningites Bacterianas em Salvador/Bahia".

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga favorável o projeto supracitado.

Salvador, 30 de novembro de 1998


Dr. Italo A. Sherlock
Coordenador do CEP-CPqGM/FIOCRUZ

**CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DA BAHIA
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HOSPITAL COUTO MAIA**

Salvador 08 de novembro de 1998
Of. N°

Prezado Dr. Mitermayer

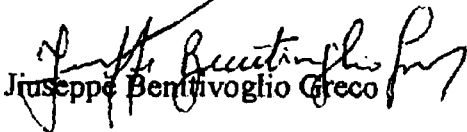
A Comissão de Ética Médica do Hospital Couto Maia após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado; "**Epidemiologia molecular das Meningites Bacterianas em Salvador**". Achou - o de alta relevância e, por não ferir nenhum capítulo do Código de Ética Médica, Declaração de Helsinque e a Declaração Universal do Direitos do Homem aprova o referido projeto para sua realização no Hospital Couto Maia.

A Comissão de Ética Médica do Hospital Couto Maia esta a disposição da referida equipe do projeto para qualquer orientação e esclarecimento.

Atenciosamente



Edilson Sacramento da Silva



Giuseppe Benivoglio Greco



Everaldo Benedito da Silva costa

Ilm° Sr.
Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Nesta