

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

Aline Carvalho de Azevedo

**DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE ACETILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO  
CAPSULAR E PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CEPAS DE *Neisseria meningitidis*  
SOROGRUPO C CIRCULANTES NO BRASIL NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-  
VACINAL**

Rio de Janeiro  
2019

Aline Carvalho de Azevedo

DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE ACETILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO  
CAPSULAR E PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CEPAS DE *Neisseria meningitidis*  
SOROGRUPO C CIRCULANTES NO BRASIL NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-VACINAL

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Ivano de Filippis

Rio de Janeiro  
2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Azevedo, Aline

Determinação do estado de acetilação do polissacarídeo capsular e perfil epidemiológico de cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C circulantes no Brasil nos períodos pré e pós-vacinal. / Aline Azevedo. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

113 f. : fig. ; graf. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: Ivano de Filippis.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Vacina. 3. Polissacarídeo capsular. 4. Acetilação. 5. Epidemiologia. I. Título.

Acetylation status establishment of capsular polysaccharide and epidemiological profile of *Neisseria meningitidis* serogroup C strains in Brazil in the pre- and post-vaccination periods.

Aline Carvalho de Azevedo

DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE ACETILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO  
CAPSULAR E PERFIL EPIDEMIOLOGICO DE CEPAS DE *Neisseria meningitidis*  
SOROGRUPO C CIRCULANTES NO BRASIL NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-VACINAL

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Ivano de Filippis

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Fabio Aguiar Alves (Doutor)  
Universidade Federal Fluminense

---

Claudia Maria da Conceição (Doutor)  
Fundação Oswaldo Cruz

ORIENTADOR

---

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor) – Orientador  
Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho aos meus maiores  
incentivadores, meus pais Jaime e Rosiléa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para chegar até aqui.

Aos meus pais Jaime e Rosiléa que sempre acreditaram no meu potencial.

Ao meu marido Diego, presente nos momentos mais importantes da minha vida.

A minha família, em especial aos meus sobrinhos Théo e Thomás que alegam meus dias.

Ao meu orientador Dr. Ivano pela oportunidade de ingresso na Fiocruz, confiança, parceria e incentivo no desenvolvimento de projetos.

Ao Dr. Antônio Eugenio pelas participações nas bancas de seminário, as sugestões para esse trabalho e utilização do seu laboratório.

A Dra. Maria Helena Villas Bôas agradeço a revisão deste trabalho e disponibilidade para participar da banca examinadora.

A Dra. Claudia Conceição agradeço o acolhimento em seu laboratório, os ensinamentos, discussões e ideias que foram importantes para o desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Filipe Quirino pelas explicações e pela disponibilidade em discutir sobre os “polis”.

Aos professores Dr. Fábio Alves e Dra. Ana Caroline Botelho pelas participações nas bancas dos seminários e valiosas sugestões.

Aos professores da pós-graduação, em especial à Dra. Katia Leandro pelos ensinamentos em Vigilância Sanitária.

Aos profissionais do LAMAN de Bio-Manguinhos, Luanna e Patricia pela ajuda nas tentativas de *dot-blotting*.

Aos profissionais do LATEB de Bio-Manguinhos, Dra. Ivna Alana, Dra. Maria de Lourdes Leal e Dra. Marilza Batista pela parceria, disponibilidade e doação dos polissacarídeos.

Aos profissionais do LATEB de Bio-Manguinhos, Denise, Fernanda, Milton e em especial a Dra. Ana Paula dos Santos pela paciência, discussões de protocolos e ajuda nos ensaios.

A Dra. Ana Bispo pela doação dos anticorpos secundários.

Às Pesquisadores do FDA, Katharin Stein and Marjorie Shapiro, agradeço a colaboração com a doação dos anticorpos monoclonais.

Ao “Public Health Laboratory”, Manchester, Reino Unido pela doação da cepa contendo o polissacarídeo de-O-acetilado.

Ao Dr. Heike Claus agradeço pelo envio da sequência completa do gene *oatc*.

Aos colegas do Departamento de Química Ana Caroline, Débora, Raíssa e Patrícia pelo acolhimento e acompanhamento nos ensaios de imunoblotting.

Aos colegas do Departamento de Imunologia do INCQS Deivid, Renata, Victoria e Marcello pelas sugestões de protocolo de ELISA.

Aos colegas do Departamento de Imunologia WilldeBerg e Wlamir pela leitura das placas de ELISA.

Ao amigo Wellington Moura pela revisão do *abstract*.

As secretárias da pós-graduação Jéssica, Gisele e Sâmela sempre dispostas a ajudar. Aos colegas da pós-graduação pela companhia nesta jornada.

Aos amigos Talita, João, Catia, Jandira, Claudia, Nathália, Nathércia, Carla, Ingrid, Luíza, Raphael, Marcello e Juliana agradeço pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos colegas do Laboratório de Micro-organismos de Referência pela companhia no dia a dia e por compartilhar boas ideias nas práticas de laboratório.

À equipe do Setor meio de cultura do INCQS – Will, Monica, Marcos, Jorge e Pedro Paulo pela ajuda na preparação dos meios.

À equipe do Setor de esterilização do INCQS – Sineide, Edmilson, Renê e Renata pela ajuda e serviços prestados.

A Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz, Subunidade de Sequenciamento de DNA-RJ agradeço a parceria.

À CAPES e FAPERJ agradeço o apoio financeiro.

## RESUMO

A doença meningocócica (DM) é uma infecção grave causada pela *Neisseria meningitidis* (meningococo). O meningococo é classificado em sorogrupos de acordo com composição da cápsula polissacarídica. O sorogrupo C é atualmente o principal responsável pelos casos de DM no Brasil, constituindo um sério problema de Saúde Pública. As vacinas meningocócicas disponíveis contra o sorogrupo C são desenvolvidas a partir do polissacarídeo capsular (PSC), que é altamente imunogênico. A vacina meningocócica sorogrupo C conjugada (MenC) é capaz de induzir resposta imune em níveis aceitáveis, além de provocar resposta T-dependente e memória imunológica, sustentando sua eficácia. Em 2010, a MenC foi inserida no calendário do Programa Nacional de Imunizações. A constatação de uma variação estrutural do PSC (O-acetilado e de-O-acetilado) levou a identificação de 12 a 15% de cepas com o PSC de-O-acetilado nos EUA e Reino Unido, respectivamente. A vacina produzida com o PSC de-O-acetilado do sorogrupo C (NeisvacC®) apresentou capacidade de induzir títulos de IgG duas vezes maiores e atividade bactericida mais acentuada contra os PSC O-acetilado e de-O-acetilado, quando comparada a MenC. A partir da década de 70, a maior imunogenicidade verificada em NeisvacC® foi sugerida como uma alternativa na prevenção do sorogrupo C. Para o melhor entendimento da biologia das cepas brasileiras circulantes, utilizamos nesse estudo métodos imunológicos e moleculares com o objetivo de determinar, pela primeira vez, o estado da acetilação do PSC do meningococo C no Brasil. Paralelamente, foram gerados dados epidemiológicos baseados nas relações clonais (MLST) e nos antígenos vacinais entre as amostras avaliadas. Entre os ensaios imunoenzimáticos testados, o ELISA *whole cell* apresentou melhores resultados, mas não foram suficientemente capazes de detectar informações precisas sobre a de-O-acetilação do PSC. A análise do gene *oatC*, mostrou que deleções nucleotídicas formando regiões variáveis (RV) na sequência de aminoácidos, presente somente em cepas de-O-acetiladas, podem estar envolvidas na de-O-acetilação do PSC devido a alterações na enzima O-acetiltransferase. Assim, foram identificadas 23% de cepas de-O-acetiladas. Dados inferidos antes e após o período introdutório da MenC indicam que a de-O-acetilação do PSC está presente, pelo menos, a partir de 2007, não havendo correlação entre o estado de acetilação do PSC, o perfil clonal e fenótipos identificados. O perfil antigênico das cepas circulantes no Brasil mostrou a prevalência do fenótipo C: P1.22,14-6,36-2: F3-9: ST-3780 (CC103). A análise dos antígenos vacinais demonstrou que a vacina proteica contra o sorogrupo B (Bexsero®) induz baixa

resposta imune contra cepas brasileiras sorogrupo C, não sendo suficiente para proteger contra este sorogrupo. De acordo com os dados previamente relatados, NeisvacC® se apresenta como uma alternativa imunológica contra cepas de-O-acetiladas, visto o significativo percentual de circulação dessas cepas no Brasil.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*. Vacina. Polissacarídeo capsular. Acetilação. Epidemiologia.

## ABSTRACT

Meningococcal disease is a serious infection caused by *Neisseria meningitidis* (meningococcus), and it is classified into serogroups according to the polysaccharide capsule composition. The group of bacteria most directly responsible for cases in Brazil is serogroup C, representing a serious public health problem. Meningococcal vaccines have been developed from capsular polysaccharide (CPS), which is highly immunogenic. The meningococcal serogroup C conjugate (MCC) vaccine can induce immune response at acceptable levels as well as induce T-dependent response and immunological memory. In 2010, MCC was included in the calendar of the National Immunization Program. A structural variation in CPS (O-acetylated and de-O-acetylated) was identified, which led to the identification of 12 to 15% of strains with de-O-acetylated CPS in the USA and UK. The vaccine produced with serogroup C de-O-acetylated CPS (NeisvacC®) induced two-fold higher IgG titers and more pronounced bactericidal activity against O-acetylated and de-O-acetylated PSCs than MCC. Since the 1970s, NeisvacC® has been suggested as an alternative to prevent of serogroup C due to its higher immunogenicity. To better understand the biology of strains that circulates the most in Brazil, this study applied immunological and molecular methods to determine, for the first time, the state of CPS acetylation of meningococcus C. In parallel, epidemiological data were determined through Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis and vaccine antigens. Although it did not provide accurate information on CPS de-O-acetylation, whole-cell ELISA resulted better among the tested enzyme-linked immunosorbent assays. Nucleotide deletions, which form variable regions in the amino acid sequence, and are present only in de-O-acetylated strains, may be involved in CPS de-O-acetylation due to changes in the enzyme O-acetyltransferase, according to the molecular analysis of the *oatC* gene which identified 23% of de-O-acetylated strains. Data inferred before and after the introductory period of MCC indicate that CPS de-O-acetylation has been present since at least 2007, with no correlation between the acetylation status of the polysaccharide, the clonal profile and/or identified phenotypes. The serogroup C phenotype [P1.22,14-6,36-2: F3-9: ST-3780 (CC103)] was more prevalent according to the antigenic profiles of circulating strains in Brazil. The vaccine antigen analysis showed that the protein vaccine against serogroup B (Bexsero®) induces a low immune response against Brazilian strains of serogroup C, which is insufficient to protect against them. According to previously

reported data, NeisvacC<sup>®</sup> is an immunological alternative against de-O-acetylated strains due to their high circulation rates in Brazil.

Key-words: *Neisseria meningitidis*. Vaccine. Capsular polysaccharide. Acetylation. Epidemiology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura externa de <i>N. meningitidis</i> demonstrando os principais fatores de virulência: cápsula, proteínas de superfície, moléculas e lip-oligossacarídeo. ....	24
Figura 2 - Estruturas químicas de unidades monossacarídicas dos polissacarídeos meningocócicos para as quais existem atualmente vacinas conjugadas.....	29
Figura 3 - Organização genética do <i>locus cps</i> em <i>N. meningitidis</i> sorogrupo C.....	31
Figura 4 - Distribuição dos sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> em diferentes regiões do mundo. ....	32
Figura 5 - Número de casos confirmados de DM e óbitos registrados no Brasil nos últimos anos.....	35
Figura 6 - Distribuição dos sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> no Brasil ao longo dos anos.....	36
Figura 7 - Taxas de incidência de DM antes e após a vacinação de rotina MenC no Brasil, 2008-2014.....	41
Figura 8 - Distribuição do quantitativo de cepas de <i>N. meningitidis</i> avaliadas.....	48
Figura 9 - Sequências das cepas O-acetiladas. ....	61
Figura 10 - Deleção encontrada na posição 441 da cepa de-O-acetilada P4400.....	62
Figura 11 - Cromatograma das cepas O-acetilada (a) e de-O-acetilada (b). ....	63
Figura 12 - Alinhamento das cepas de referência (P4344 e P4400) com cepas de origem clínica pelo software <i>Bioedit</i> . ....	66
Figura 13 - Distribuição das 12 cepas de-O-acetiladas de acordo com a presença das regiões variáveis (RV1, RV2 e RV3).....	67
Figura 14 - Árvore filogenética evidenciando a distância evolutiva entre as cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas, de acordo com a presença das regiões variáveis.....	70
Figura 15 - Distribuição dos complexos clonais entre cepas sorogrupo C.....	71
Figura 16 - Distribuição dos CC entre os estados brasileiros.....	72
Figura 17 - Incidência e prevalência de CC no Brasil (2007-2016).....	73
Figura 18 - Frequência das variantes da proteína PorA entre as cepas avaliadas .....	74
Figura 19 - Frequência das variantes da proteína fetA entre as cepas avaliadas.....	75
Figura 20 - Frequência dos principais peptídeos de NHBA entre as cepas avaliadas.....	76
Figura 21 - Frequência dos principais peptídeos de fHbp entre as cepas avaliadas.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura das unidades de repetição dos polissacarídeos nos sorogrupos A, B, C, Y e W-135. ....	27
Tabela 2 - Propriedades do gene <i>oatC</i> no meningococo sorogrupo C. ....	31
Tabela 3 - Cronograma de vacinação das vacinas meningocócicas conjugadas C e taxa de cobertura no Brasil, estado de São Paulo e Salvador. ....	39
Tabela 4 - Condições físicas e químicas do conteúdo de PSC dos sorogrupos A, C, Y e W-135 na formulação da vacina de acordo com FDA, OMS e Farmacopeia Americana (USP). ....	43
Tabela 5 - Propriedades e controle do polissacarídeo O-acetilado utilizado no estudo ....	46
Tabela 6 - Iniciadores utilizados na identificação de <i>N. meningitidis</i> sorogrupo C. ....	48
Tabela 7 - Características dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo. ....	49
Tabela 8 - Iniciadores utilizados no MLST. ....	53
Tabela 9 - Iniciadores utilizados na PCR para detecção das variantes das proteínas de membrana externa. ....	55
Tabela 10 - Titulação dos anticorpos monoclonais, utilizando PSC a 1mg/mL. ....	57
Tabela 11 - Reação cruzada entre polissacarídeos O-acetilado e de-O-acetilado com anticorpos monoclonais em diferentes concentrações de uso. ....	58
Tabela 12 - Especificidade de ligação dos PSC e cepas vacinais inativadas (P4344 e P4400) aos MAbs. ....	59
Tabela 13 - Total de cepas analisadas por ELISA <i>whole-cell</i> para determinação da de-O-acetilação. ....	60
Tabela 14 - Tratos homopoliméricos presentes nas cepas estudadas e comparação ao proposto por Claus et al (2004). ....	62
Tabela 15 - Presença de deleções e inserções nas cepas de-O-acetiladas e a consequente presença de RV. ....	67
Tabela 16 - Presença, ausência e presença parcial das regiões variáveis (RV1, RV2 e RV3) da sequência proteica de cepas de referência O-acetilada (P4344), de-O-acetilada (P4400) e das cepas de origem clínica. Continua. ....	68
Tabela 17 - Perfil clonal de três novos tipos sequenciais que foram sugeridos ao banco. ....	72
Tabela 18 - Comparação do perfil clonal das cepas O-acetilada P4344 e de-O-acetilada P4400. ....	73

Tabela 19 - Equivalência entre as subfamílias e variantes de acordo com análise da proteína fHbp.....	76
Tabela 20 - Relação entre a acetilação do polissacarídeo capsular e diversidade genética em <i>N. meningitidis</i> . Continua.....	78
Tabela 21 - Similaridade da diversidade clonal (MLST) e genética em cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas. ....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>abcZ</i>	transportador putativo ABC
ABTS	2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) – substrato com peroxidase
<i>adk</i>	adenilato-quinase
<i>aroE</i>	chiquimato desidrogenase
BAST	<i>Bexsero Antigen System Typing</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina do soro bovino
CC	Complexo Clonal
CDC	<i>Central of Disease Control</i>
CPS	Cápsula polissacarídica
CRIES	Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais
CRM <sub>197</sub>	<i>cross-reacting material 197</i>
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DM	Doença Meningocócica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FetA	<i>Ferric enterobactin transport protein</i>
FHbp	<i>factor H binding protein</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>fumC</i>	fumarato hidratase
<i>gdH</i>	glicose-6-fosfato desidrogenase
GMI	Iniciativa Meningocócica Global
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IS	Elemento de inserção
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LACEN	Laboratórios Central de Saúde Pública
LATEB	Laboratório de Tecnologia Bacteriana
LCR	líquido cefalorraquidiano

LOS	lipoligossacarídeos
LPS	lipopolissacarídeos
MAB	Anticorpo monoclonal ( <i>monoclonal antibody</i> )
MAB +	Anticorpo monoclonal com ligação ao polissacarídeo C O-acetilado
MAB -	Anticorpo monoclonal específico ao polissacarídeo C de-O-acetilado
MenC	Vacina meningocócica conjugada C
mHSA	Albumina sérica humana metilada
MLST	<i>Multilocus Sequencing Typing</i>
MS	Ministério da Saúde
NadA	<i>Neisseria adhesion A</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHBA	<i>Neisseria heparin binding antigen</i>
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
<i>nspA</i>	<i>Neisseria surface protein</i>
OAc+	estrutura polissacarídica O-acetilada
OAc-	estrutura polissacarídica de-O-acetilada
oatC	O-acetiltransferase
OD	Densidade óptica
OMP	Proteínas de membrana externa ( <i>outer membran protein</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMV	Vesículas de membrana externa ( <i>outer membran vesicle</i> )
ORF	sequencia aberta de leitura ( <i>open reading frame</i> )
PATH	<i>Program for Appropriate Technology in Health</i>
pb	pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>pdhC</i>	piruvato desidrogenase
<i>pgm</i>	fosfoglucomutase
PDTIS	Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PorA	Porina A
PorB	Porina B
POP	Procedimento Operacional Padronizado

PSC	Polissacarídeo capsular
PSC OAc+	Polissacarídeo capsular O-acetilado
PSC OAc-	Polissacarídeo capsular de-O-acetilado
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RMN-H	Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio
RV	Região variável
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
<i>siaD</i>	Gene da polisialiltransferase
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
ST	Tipo Sequencial
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBS	Tampão Tris-salino
TTBS	TBS + Tween 20
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
USP	Farmacopéia Americana ( <i>United States Pharmacopeia</i> )
VISA	Vigilância Sanitária
VR	Região variável de PorA
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Proteção à saúde no Brasil.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Programa Nacional de Imunizações .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Informações de saúde .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Doença meningocócica .....</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Agente etiológico .....</b>	<b>23</b>
1.5.1 Classificação do meningococo .....	25
<b>1.6 Cápsula polissacarídica.....</b>	<b>26</b>
1.6.1 Bases moleculares da acetilação do polissacarídeo capsular .....	30
<b>1.7 Epidemiologia da doença meningocócica no mundo.....</b>	<b>31</b>
<b>1.8 Epidemiologia da doença meningocócica no Brasil.....</b>	<b>34</b>
<b>1.9 MLST.....</b>	<b>37</b>
<b>1.10 Prevenção da doença meningocócica .....</b>	<b>38</b>
1.10.1 Controle das Vacinas Meningocócicas .....	42
<b>1.11 Relevância .....</b>	<b>43</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Cepas vacinais.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Polissacarídeos capsulares .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Seleção e caracterização das cepas de origem clínica.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Determinação da acetilação do polissacarídeo capsular .....</b>	<b>49</b>
3.4.1 Imunoquímica .....	49
3.4.1.1 Antígenos e anticorpos monoclonais .....	49
3.4.1.2 Ensaio imunoenzimático.....	49
3.4.1.2.1 SDS-PAGE e Immunoblotting .....	50
3.4.1.2.2 ELISA sanduiche e ELISA whole-cell.....	50
3.4.2 Análise do gene <i>oatC</i> .....	51
<b>3.5 Perfil epidemiológico das cepas de <i>N. meningitidis</i> .....</b>	<b>52</b>
3.5.1 Tipificação molecular.....	52

3.5.2	Análise das proteínas de membrana externa .....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Confirmação de espécie e sorogrupo .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Imunoquímica .....</b>	<b>56</b>
4.2.1	SDS-PAGE e <i>Imunoblotting</i> .....	56
4.2.2	ELISA .....	56
4.2.2.1	<i>Titulação dos anticorpos monoclonais e anticorpo secundário</i> .....	56
4.2.2.2	<i>ELISA whole-cell</i> .....	57
4.2.2.3	<i>ELISA sanduíche</i> .....	60
<b>4.3</b>	<b>Análise do gene <i>oatC</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>4.4</b>	<b>Diversidade genética em <i>N. meningitidis</i> .....</b>	<b>71</b>
4.4.1	Tipificação por MLST.....	71
4.4.2	Análise das proteínas de membrana externa .....	74
<b>4.5</b>	<b>Relação entre a acetilação do polissacarídeo e a diversidade genética em <i>N. meningitidis</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
	<b>APÊNDICE A - PROTOCOLO DE REMOÇÃO DOS GRUPOS O-ACETIL DO POLISSACARÍDEO SOROGRUPO C NATIVO .....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE B - FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS PROPOSTAS NESTE ESTUDO .....</b>	<b>103</b>
	<b>APÊNDICE C – REPRESENTAÇÃO DE UMA PLACA DE ELISA DEMONSTRANDO A TITULAÇÃO EM DUPLICATAS DE ANTICORPOS DE CAPTURA, IgG ANTI-PSC E ANTÍGENO UTILIZADOS NO ELISA SANDUÍCHE .....</b>	<b>104</b>
	<b>APÊNDICE D - PROTOCOLO DE ELISA <i>WHOLE-CELL</i> DE ACORDO COM RUBISTEIN E STEIN (1988), COM ADAPTAÇÕES .....</b>	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE E - RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DO PERFIL CLONAL POR MLST E DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMP) DAS 115 AMOSTRAS ANALISADAS.....</b>	<b>106</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Proteção à saúde no Brasil

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define saúde como “um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não somente ausência de afecções e enfermidades”. De acordo com o artigo 196 da Constituição Federal a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação. A proteção à saúde implica o direito de cidadania e necessita da atuação dos Estados Nacionais na garantia do seu acesso, de forma universal, e a regulação daquilo que interfere na saúde da população (LOBATO; GIOVANELLA, 2013).

A Vigilância em Saúde é responsável por ações de vigilância, prevenção e controle de doenças transmissíveis, pela vigilância de fatores de risco no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, saúde ambiental e do trabalhador e também pela análise de situação de saúde da população brasileira. Dentro desse contexto, o Ministério da Saúde (MS), por meio da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), tem a função de coordenar programas de prevenção e controle de doenças transmissíveis de relevância nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Ao instituir o Sistema Único de Saúde (SUS), a Lei Orgânica da Saúde (Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990) definiu Vigilância Sanitária como um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços do interesse da saúde. A atuação da Vigilância Sanitária é abrangente, sendo responsável pelo controle de todos os processos — desde a produção ao consumo — dos bens que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (DE SETA, 2007).

As atividades da Vigilância Sanitária surgiram da necessidade de proteção à população em decorrência da propagação de doenças transmissíveis nos agrupamentos urbanos, com o objetivo de eliminar situações de risco à saúde. Portanto, seus métodos de intervenção não se restringem às ações meramente técnicas, porém têm como eixos propulsores as ações dirigidas ao fortalecimento da sociedade e da cidadania com o propósito da promoção da saúde e da prevenção de danos ou agravos (SILVA JR, 2004; TEIXEIRA; COSTA, 2003).

A partir da década de 1970, a Vigilância Sanitária começou a se apresentar de maneira mais visível ao setor de saúde com a criação da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) durante o processo de reformulação do MS (COSTA; FERNANDES; PIMENTA, 2008). Na atualidade, as ações da Vigilância Sanitária são regidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), destacando as atividades de regulação, justificada frente à notória necessidade de se equilibrar as falhas existentes no mercado da saúde (CASTRO, 2002). É incumbência da ANVISA regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública (Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, art. 8º).

A Vigilância Epidemiológica é definida pela Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990, como um "conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos". É uma ferramenta de priorização das ações em saúde que permite monitorar o estado de saúde da população em relação aos agravos que foram ou permanecem como objeto de prevenção e controle. Trata-se de um conjunto de atividades destinadas a obter informações necessárias para se conhecer a situação epidemiológica em questão, detectando ou prevenindo as alterações prováveis dos condicionantes focalizados e orientando a aplicação de medidas preventivas, mantendo-as ou modificando-as, com o propósito de atingir os melhores resultados possíveis em termos de efetividade e impacto na população (FORATINNI, 2004).

## **1.2 Programa Nacional de Imunizações**

As vacinas foram desenvolvidas para ser uma das mais bem-sucedidas e rentáveis medidas de saúde pública, para prevenir doenças e salvar vidas. Desde a última metade do século XX, doenças que antes eram muito comuns, tornaram-se raras no mundo desenvolvido, devido principalmente à imunização generalizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) foi formulado em 1973 com o objetivo de coordenar as ações de imunizações no país que se caracterizavam, até então, pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura. Em 1975, o PNI foi institucionalizado resultante do somatório de fatores, de âmbito nacional e internacional, que convergiam para estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, buscando a integridade das ações de imunizações realizadas no país. O PNI passou a coordenar as atividades de imunizações desenvolvidas rotineiramente na rede de serviços e, para tanto,

traçou diretrizes pautadas na experiência da Fundação de Serviços de Saúde Pública, com a prestação de serviços integrais de saúde através de sua rede própria (DATASUS, 2019).

O PNI define os calendários de vacinação considerando a situação epidemiológica, o risco, a vulnerabilidade e as especificidades sociais, com orientações específicas para crianças, adolescentes, adultos, gestantes, idosos e povos indígenas. Para que o programa continue representando um sucesso na saúde pública, cada vez mais esforços devem ser despendidos. Todas as doenças prevenidas pelas vacinas que constam no calendário de vacinação, se não forem alvo de ações prioritárias, podem voltar a se tornar recorrentes (BRASIL, 2018).

Algumas das funções do PNI abrangem a investigação de surtos de doenças, a coordenação da rede nacional de laboratórios de saúde pública, o gerenciamento dos sistemas de informação de mortalidade, agravos de notificação obrigatória e nascidos vivos, a realização de inquéritos de fatores de risco, a coordenação de doenças e agravos não transmissíveis e análise da situação de saúde, incluindo investigações e inquéritos sobre fatores de risco de doenças não transmissíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Um dos fatores preponderantes para o sucesso das práticas de imunização é o uso de imunobiológicos de qualidade comprovada. A responsabilidade pela qualidade, segurança e eficácia do produto biológico é primeiramente do fabricante, entretanto, a autoridade sanitária nacional de cada país é responsável por estabelecer procedimentos para assegurar que os fabricantes e os produtos, importados ou de produção nacional, cumpram os critérios necessários.

A integração entre várias entidades parceiras como as instituições de saúde, a vigilância epidemiológica de doenças transmissíveis, as coordenações estaduais e municipais de imunização, o PNI, a ANVISA, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), os laboratórios produtores detentores de registro, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a OMS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014) é necessária para o acompanhamento epidemiológico e sanitário.

No Brasil, é do INCQS a responsabilidade oficial exclusiva sobre a fiscalização e o controle de qualidade dos imunobiológicos. As demandas vêm do PNI ou da ANVISA. No caso dos soros e das vacinas, quem faz os pedidos de análise é o PNI. Em casos extraordinários, chegam demandas da Organização Mundial da Saúde (OMS) ou da Organização Pan-americana de Saúde (Opas), sobretudo para programas de vacinação na América Latina. A fiscalização dos imunobiológicos é feita lote a lote, de acordo com normas

internacionais. Os laudos são enviados para o PNI, que distribui os soros e vacinas para mais de cinco mil municípios do Brasil. No caso dos biofármacos, as demandas, em sua totalidade, são oriundas da ANVISA. (INCQS, 2019).

### **1.3 Informações de saúde**

A mensuração do estado de saúde da população é uma tradição em saúde pública. Teve seu início com o registro sistemático de dados de mortalidade e de sobrevivência. Com os avanços no controle das doenças infecciosas e com a melhor compreensão do conceito de saúde e de seus determinantes populacionais, a análise da situação sanitária passou a incorporar outras dimensões do estado de saúde (DATASUS, 2019).

O Departamento de Informática do SUS (DATASUS) é uma plataforma *online* do governo federal que disponibiliza informações que podem servir para subsidiar análises objetivas da situação sanitária, tomadas de decisão baseadas em evidências e elaboração de programas de ações de saúde. Dados de morbidade, acesso a serviços, condições de vida e fatores ambientais passaram a ser medidas utilizadas na construção de indicadores de saúde, que se traduzem em informação relevante para a quantificação e a avaliação das informações em saúde.

O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), criado pelo MS, tem por objetivo o registro e processamento dos dados sobre agravos de notificação em todo o território nacional, fornecendo informações para análise do perfil da morbidade e contribuindo para a tomada de decisão em níveis municipal, estadual e federal. O SINAN é alimentado, principalmente, pela notificação e investigação de casos de doenças e agravos descritos na lista nacional de doenças de notificação compulsória (Portaria GM/MS nº 5, de 21 de fevereiro de 2006). No entanto, é facultado a estados e municípios incluir outros problemas de saúde importantes em sua região.

### **1.4 Doença meningocócica**

A doença meningocócica (DM) é uma infecção grave causada pela bactéria *Neisseria meningitidis*, também conhecida como meningococo. A DM pode se manifestar como meningite (ao atingir as meninges e a medula espinhal) ou septicemia (ao invadir a corrente

sanguínea). A doença é fatal em 50 a 80% dos casos não tratados, e as taxas de mortalidade, mesmo em indivíduos tratados, são de 10 a 15% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015).

A transmissão ocorre pelo contato direto com indivíduos colonizados (pacientes ou portadores) através de secreção ou saliva. Os sintomas iniciais são dor de cabeça, rigidez do pescoço, confusão mental e petéquias, podendo evoluir para a falência de órgãos.

A progressão da doença é rápida e aproximadamente 30% dos pacientes que sobrevivem à DM apresentam sequelas que afetam o funcionamento físico, cognitivo e psicológico. Isso pode levar a comprometimento neurológico, perda da audição, amputação de membros e dedos ou cicatrizes na pele (EDMOND et al., 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). O diagnóstico imediato da doença e o tratamento precoce com antibióticos são cruciais no combate à DM.

O tratamento para DM inclui a administração de antibióticos na tentativa de reduzir a mortalidade e restringir sua disseminação, devido à rápida proliferação do micro-organismo e à produção de endotoxinas. Atualmente, o meningococo tem se mostrado sensível especialmente a ceftriaxona, com susceptibilidade reduzida a penicilina G e ampicilina (GORLA et al, 2018). Manter-se atualizado com as vacinas recomendadas é a melhor defesa contra a DM (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015).

As crianças são particularmente mais vulneráveis à DM devido à sua imaturidade imunitária, justificada pela falta de resposta a antígenos polissacarídicos, como os presentes na cápsula do meningococo. Mais de 75% de todos os casos de meningite meningocócica e septicemia ocorrem em crianças menores de 5 anos de idade. Adolescentes e adultos jovens são o grupo com maior prevalência de transporte nasofaríngeo e a DM é relativamente comum nessa faixa etária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A DM ocorre como uma doença endêmica com casos esporádicos, epidemias ou surtos (DWILOW; FANELLA, 2015). A incidência da DM pode aumentar em todos os grupos etários durante surtos e epidemias, associados a aglomerações de pessoas em ambientes fechados como escolas, dormitórios universitários e quartéis. Outro grupo de risco inclui indivíduos com deficiências no sistema complemento ou asplenia (GOLDSCHNEIDER, 1969 apud DWILOW; FANELLA, 2015).

A DM está incluída na relação nacional de doenças de notificação compulsória e todos os casos suspeitos de meningite devem ser notificados imediatamente aos serviços de saúde pública, já que apresenta potencial epidêmico e alto índice de letalidade. Os resultados

laboratoriais, procedentes de investigação de surtos, devem ser notificados de forma imediata pelos Laboratórios de Saúde Pública dos Estados (LACEN) e Laboratórios de Referência Nacional ou Regional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). De acordo com a OMS, não há estimativas precisas da carga global da DM, uma situação causada pela vigilância inadequada em muitas partes do mundo.

As autoridades de Vigilância em Saúde devem iniciar a investigação epidemiológica e controle sanitário na avaliação da necessidade de adoção de medidas de controle pertinentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b). Anualmente, estima-se que 500 mil casos de DM e 50 mil casos de óbitos ocorram no mundo (RUTTIMANN et al., 2014).

### 1.5 Agente etiológico

*Neisseria meningitidis* (meningococo) foi isolado pela primeira vez em 1887, a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR) de um paciente e identificado como um dos agentes causadores da meningite bacteriana (WEICHSELBAUM, 1887 apud ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Antes da década de 1920, sem tratamento adequado, a doença era fatal em até 70% dos casos (BROKER; BERTIB; CONSTANTINO, 2016).

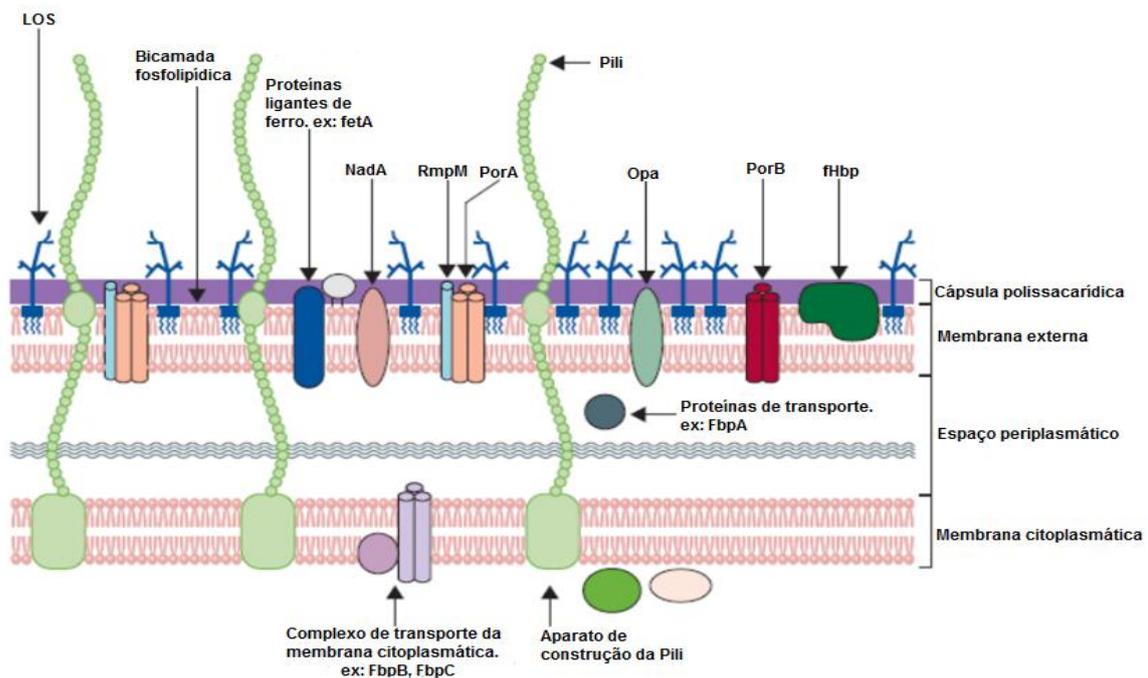
O meningococo é a principal causa de meningite em todo o mundo. É uma bactéria com morfologia de diplococo Gram-negativo imóvel, com aspecto reniforme. É um micro-organismo aeróbio, oxidase e catalase positivas, pertencente à família Neisseriaceae. Prefere ambiente úmido e temperatura de 37°C para crescimento ótimo, que pode ser favorecido com uma concentração de 5-10% de CO<sub>2</sub> (ARDITI; YOGEV, 1997).

*N. meningitidis* é um patógeno obrigatório humano que coloniza as membranas mucosas do trato respiratório superior (STEPHENS et al., 2007). A fixação e a invasão às células humanas são importantes eventos na colonização nasofaríngea, na penetração às células endoteliais e na possível passagem pela barreira hematoencefálica; eventos esses facilitados pela pili, proteínas de membrana externa (OMP) e lipo-oligossacarídeos (LOS) (BARTLEY et al., 2013). Diferentemente do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias entéricas, o LPS meningocócico não possui antígenos O e, portanto, é frequentemente referido como lipo-oligossacarídeos (LEWIS; RAM, 2014).

*N. meningitidis* apresenta um espectro de fatores de virulência (**Figura 1**) designados a evadir do sistema imunológico do hospedeiro, incluindo a cápsula, a proteases IgA, as OMP e as vesículas superficiais contendo LOS, que é a endotoxina bacteriana (BATISTA-

DUHARTE et al., 2013). A pili desempenha um papel fundamental no processo de aderência, invasão e colonização. A cápsula polissacarídica e o LOS são os principais fatores de virulência responsáveis pela patogenicidade da bactéria, pois, respectivamente conferem propriedades antifagocíticas e induzem a produção de mediadores pró-inflamatórios que levam ao choque séptico do paciente (BRANDTZAEG et al., 2001).

Figura 1 - Estrutura externa de *N. meningitidis* demonstrando os principais fatores de virulência: cápsula, proteínas de superfície, moléculas e lip-oligossacarídeo.



Fonte: Adaptado de SADARANGANI; POLLARD, 2010.

O meningococo pode ser carregado de forma assintomática por aproximadamente 10% da população. Enquanto cepas associadas a portadores assintomáticos são muito diversas, alguns clones genéticos hiperinvasivos da espécie podem se espalhar rapidamente por populações humanas, resultando em epidemias de meningite meningocócica no mundo (CAUGANT, 2008).

Características fenotípicas baseadas na cultura e isolamento do micro-organismo, como a observação das características morfológicas pela coloração de Gram e os testes sorológicos para determinação do sorogrupo são usuais na identificação do meningococo. Atualmente, métodos moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (qPCR) são utilizados na identificação da espécie e geralmente são

complementares à caracterização fenotípica. O sequenciamento do gene 16S rRNA e a detecção de genes como *nspA* (DE FILIPPIS et al., 2005), *sodC* (DOLAN THOMAS et al., 2011) e *crgA* (TAHA, 2000) são alternativas para identificar o meningococo, principalmente a partir de material clínico quando não se consegue isolamento do micro-organismo. Diene et al (2016), após o sequenciamento do genoma de *N. meningitidis*, sugeriram a análise dos genes *metA* e *tauE* para detecção da espécie por qPCR.

### 1.5.1 Classificação do meningococo

A classificação precisa de isolados de *N. meningitidis* de casos de DM é essencial para a vigilância epidemiológica adequada, para a adoção de medidas preventivas e para evitar a disseminação da doença.

A classificação mais abrangente do meningococo é baseada em sorogrupos. *N. meningitidis* é classificada em doze sorogrupos com base na variação antigênica da cápsula polissacarídica, no entanto apenas seis (A, B, C, Y, W-135 e X) são responsáveis por mais de 90% dos casos de DM no mundo (HARRISON et al., 2013; STEPHENS, 2007). A classificação em sorogrupos pode ser realizada através de métodos imunológicos como a aglutinação em látex ou por métodos moleculares, pela análise da amplificação dos genes *siaD* (TAHA, 2000) ou *tza* (TZANAKAKI et al., 2003). Os métodos moleculares são mais sensíveis por permitirem a determinação presuntiva dos sorogrupos diretamente a partir de material clínico. A detecção do gene *siaD*, que codifica a polisialiltransferase é utilizada na determinação dos sorogrupos B, C, Y e W-135 (LEWIS et al., 2003).

Os meningococos apresentam alta diversidade genética e conseqüentemente grande variedade de genótipos e fenótipos. A caracterização e diferenciação sorológica dos meningococos são importantes não somente para o diagnóstico e investigações epidemiológicas, mas também para o desenvolvimento ou atualização de vacinas específicas para cada sorogrupo (BROKER, 2003). Estudos anteriores relataram que o meningococo é capaz de invadir as mucosas e se deslocar para as células epiteliais e endoteliais. A adesão às células e aos tecidos epiteliais do hospedeiro é necessária para a colonização e transmissão bacteriana e é comum a cepas invasivas e não invasivas (STEPHENS et al., 2009). A aderência e penetração são facilitadas pela ação das OMP, principalmente porinas e adesinas. O micro-organismo pode ser classificado em sorotipos/subtipos e imunotipos, de acordo com variantes das porinas (Porina B (PorB) e Porina A (PorA)) e do lipo-oligossacarídeo,

respectivamente (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Alguns sistemas genéticos conservados nas bactérias patogênicas, como a transformação do DNA e a variabilidade dos antígenos provavelmente, contribuem para a colonização e sobrevivência no hospedeiro (ROTMAN; SEIFERT, 2014).

Algumas das proteínas de superfície (fHbp, NadA, PorA e NHBA) possuem ainda importância imunológica pois são utilizadas como antígenos vacinais no desenvolvimento de vacinas proteicas contra cepas do sorogrupo B, cujo polissacarídeo não é imunogênico e portanto não há vacina polissacarídica contra esse sorogrupo. A proteína FetA regula a captação de ferro e está presente em quase todos os isolados de meningococos invasivos, e como a PorA, exibe um alto nível de diversidade antigênica (THOMPSON et al., 2003), além de compor a nomenclatura oficial fenotípica do meningococo (HARRISON, 2013).

A diversidade e a dinâmica de populações de *N. meningitidis* podem ser relatadas por sistemas de tipificações de alta resolução como o *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (MAIDEN, 1998). O MLST é um método muito discriminatório que permite a classificação em complexos clonais (CC) e tipos sequenciais (ST) a partir da análise de sete genes conservados.

## 1.6 Cápsula polissacarídica

Muitas bactérias patogênicas possuem uma cápsula polissacarídica que delimita a célula, regula o fluxo de nutrientes e a protege contra desidratação (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2016). A cápsula polissacarídica do meningococo possui a função de proteção contra mediadores do hospedeiro e fagocitose, possibilitando sua sobrevivência durante a invasão da corrente sanguínea e no ambiente intracelular da célula humana. A cápsula é definida de acordo com a sua reatividade a anticorpos e sua composição polissacarídica determina a classificação em sorogrupos (SPINOSA et al., 2007). Embora a cápsula seja considerada um importante fator de virulência dos meningococos, as cepas de *N. meningitidis* não encapsuladas também podem causar doença invasiva (TZENG; THOMAS; STEPHENS, 2015). A determinação dos genes (ou combinações de genes) que são responsáveis pela virulência é um campo ativo de investigação.

Os sorogrupos B, C, Y e W-135 possuem suas cápsulas compostas por ácido siálico (ROSESTEIN et al., 2001). O ácido siálico refere-se a uma família de carboidratos derivados do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), encontrados em um número limitado de micro-

organismos patogênicos (KLEIN; ROUSSEL, 1998). O ácido siálico na célula hospedeira evita a ação do sistema imunológico (VIMR et al., 2004). A **tabela 1** apresenta a estrutura das unidades de repetição dos polissacarídeos nos sorogrupos A, B, C, Y e W-135.

Tabela 1 - Estrutura das unidades de repetição dos polissacarídeos nos sorogrupos A, B, C, Y e W-135.

Sorogrupo	Unidades	Ligação	Localização O-acetil
A	→6)-α-D-ManNac-1( PO4→	α-(1→6)	C-3 de manosamina
B	→8)-α-D-NeuNac-(2 →	α-(2→8)	Ausente
C	→9)-α-D-NeuNac-(2 →	α-(2→9)	C-7 e C-8 do ácido siálico
Y	→6)-α-D-Glcp-Nac-(1→4)-α-D-NeupNac-2→	α-(2→6)	C-3 e C-4 da Galactose C-7 do ácido siálico
W-135	→6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-NeupNac-2→	α-(2→6)	C-7 e C-9 do ácido siálico

ManNac, N-acetilmanose; NeuNac, ácido N-acetilneuramínico; Glcp-Nac, N-acetilglicosamina.

Fonte: TZENG et al, 2015

A organização dos genes da cápsula de *N. meningitidis* é semelhante à de outros micro-organismos como *Haemophilus influenza* e *Escherichia coli* (GUDLAVALLETI et al., 2004). Os mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese da cápsula de *N. meningitidis* foram identificados e os genes envolvidos nesse processo e na translocação da superfície celular são agrupados em um único *locus* cromossômico denominado *cps* (HARRISON et al., 2013).

Os genes necessários para a expressão capsular são constituídos por cinco regiões (A-E). A região A é responsável pela síntese do polissacarídeo, a região B participa no processo de modificação do lipídeo, a região C é responsável pelo transporte do polissacarídeo para o exterior da célula, a região D é envolvida na síntese do LOS e a função da região E ainda não é bem conhecida (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004).

A expressão da cápsula é necessária para manifestação da DM. Alterações na estrutura da cápsula DM (por exemplo, hipo ou hiper encapsulamento, troca de sorogrupo, acetilação) podem influenciar os ensaios diagnósticos ou levar à fuga imune. A perda ou redução da regulação da cápsula também é crítica na biologia meningocócica, facilitando a fixação de meningococos, a formação de microcolônias e a colonização das superfícies mucosas humanas (TZENG; THOMAS; STEPHENS et al., 2015).

Os polissacarídeos capsulares (PSCs) são polímeros de alto peso molecular que contêm uma unidade de repetição, que pode ser um único monossacarídeo ou um oligossacarídeo com estrutura linear ou ramificada (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2016). Os PSCs constituem o principal fator de virulência de muitas bactérias patogênicas que causam doenças invasivas e, portanto, constituem parte essencial de várias vacinas contra doenças causadas por organismos encapsulados (HARRISON, 2013). Os PSCs são antígenos T-independentes do tipo 2, não induzem a geração de células de memória e a capacidade dos indivíduos responderem a eles depende da maturidade imunológica relacionada com a idade (FRASCH, 1990).

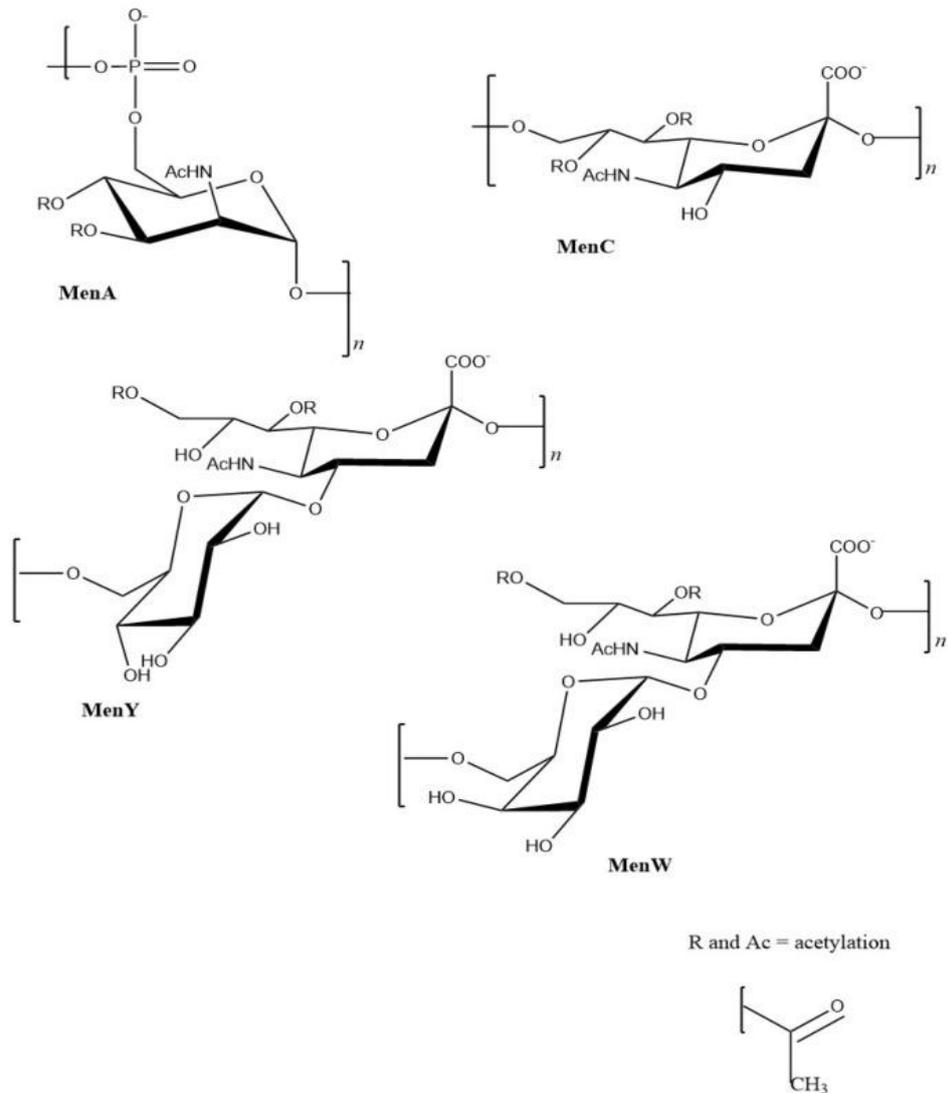
Bhattacharjee et al. (1975) fizeram os primeiros relatos sobre a estrutura do ácido siálico do PSC meningocócico dos sorogrupos C, W-135 e Y. Mais de 40 tipos diferentes de modificações ocorrem naturalmente na estrutura do ácido siálico, como grupos acetil, metil, lactil, sulfato e fosfato. A acetilação influencia muitas propriedades da molécula do ácido siálico.

Liu et al (1971) sugeriram que os PSCs correspondentes aos sorogrupos B e C são quimicamente e imunologicamente diferentes. O PSC do sorogrupo C pode apresentar as formas O-acetilada ( $OAc^+$ ) ou de-O-acetilada ( $OAc^-$ ), enquanto que o PSC do sorogrupo B apresenta-se apenas de-O-acetilado, além de apresentar ligação química diferenciada (Tabela 1). Nos sorogrupos C, W-135 e Y, o ácido siálico pode ser modificado pela acetilação (BHATTACHARJEE et al., 1975).

A maioria das cepas do sorogrupo C produzem um PSC  $OAc^+$ , um homopolímero de ácido *N*-acetilneuramínico com grupos O-acetil nas posições  $C_7$  ou  $C_8$  do ácido siálico (JENNING et al., 1977; BURRAGE, 2002). As possíveis conformações da acetilação do PSC foram reveladas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H) (JONES; LEMERCINIER, 2002). A **Figura 2** apresenta as diferentes estruturas dos PSCs de acordo com os sorogrupos.

Em 1976, utilizando método de imunofluorescência, Apicella e Feldman concluíram que 15% das cepas do sorogrupo C circulantes nos Estados Unidos (EUA) possuíam PSC  $OAc^-$ . Posteriormente, estudos de caracterização antigênica dos meningococos no Reino Unido constataram que 12% das cepas sorogrupo C causadoras de doença não continham o radical O-acetil em sua cápsula polissacarídica (BORROW et al., 2000).

Figura 2 - Estruturas químicas de unidades monossacarídicas dos polissacarídeos meningocócicos para as quais existem atualmente vacinas conjugadas.



Sítios de O-acetilação são indicados por grupos R e Ac.  
 Fonte: MCCARTHY et al., 2018.

O desenvolvimento de uma vacina contendo o PSC OAc<sup>-</sup> (Neisvac-C<sup>®</sup> - Laboratório Baxter) apresentou níveis de IgG duas vezes maiores e a atividade bactericida mais acentuada quando comparada a vacina meningocócica C conjugada, que contém o PSC OAc<sup>+</sup> (RICHMOND et al., 2001). Michon et al. (2000) demonstraram que a imunogenicidade dos PSCs era inversamente correlacionada ao grau de acetilação: PSC OAc<sup>+</sup> mostrou ser menos imunogênico quando comparado ao PSC OAc<sup>-</sup> (ARAKERE; FRASCH, 1991, MICHON et al., 2000). Ensaios clínicos conduzidos nas décadas de 1970 e 1980 sugeriram que o PSC OAc<sup>-</sup> poderia substituir o PSC OAc<sup>+</sup> no desenvolvimento da vacina (GLODE, 1979). A

vacina produzida com o PSC OAc- (Neisvac-C<sup>®</sup>) foi introduzida em 32 países (PELTOLA, 1985 apud FUSCO et al., 2007).

Por recomendação da OMS, ensaios que demonstrem a segurança e a imunogenicidade de uma vacina são baseados na atividade bactericida e na avaliação de respostas imunológicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). A atividade bactericida do PSC OAc- foi maior quando comparada ao PSC OAc+ nas posições C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub>, sendo o último, dez vezes maior quando comparado ao PSC OAc+ no C<sub>7</sub> (FUSCO et al., 2007). A vacina de-O-acetilada induz à produção de anticorpos direcionados contra haptenos presentes nas cepas de meningococo com e sem o radical O-acetil, gerando, assim, uma resposta mais abrangente e maiores títulos de anticorpos bactericidas (RICHMOND et al., 1999a; SNAPE; POLLARD, 2005). Tais evidências sugerem que vacinas produzidas com o PSC OAc- podem garantir maior imunogenicidade quando comparadas à vacina contendo o PSC OAc+.

#### 1.6.1. Bases moleculares da acetilação do polissacarídeo capsular

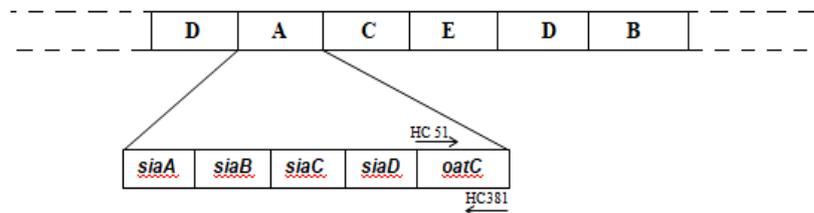
As O-acetiltransferases são enzimas muito comuns em bactérias e possuem a capacidade de modificar substratos, como carboidratos, aminoácidos e xenobióticos. Podem ser proteínas encontradas no citosol, associadas ou integradas à membrana interna e incluem membros de diferentes famílias de proteínas (BERGFELD et al., 2009). Agentes patogênicos, tais como o pneumococo sorotipo 9V, *Salmonella enterica* serovar Typhi VI, *Staphylococcus aureus* sorotipos 5 e 8 e *E. coli* K1 expressam cápsulas O-acetiladas. A importância biológica da acetilação da cápsula parece ser dependente de espécies ou subespécies. A função da acetilação altera as propriedades físico-químicas do PSC (KLEIN; ROUSSEL, 1998) e, em alguns agentes patogênicos, a acetilação do PSC está envolvida no reconhecimento imune (CLAUS et al., 2004; GUDLAVALLETI, 2004). A acetilação parcial ou a migração dos grupos O-acetil entre diferentes hidroxilas modifica o grau de heterogenicidade dos PSCs (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2016).

Em *N. meningitidis* sorogrupo C, o gene *oatC* codifica modificações no PSC devido às alterações na O-acetiltransferase do meningococo. Claus et al. (2004) foram os pioneiros na descrição do gene *oatC*. Ao analisar a cepa 2120 (OAc<sup>+</sup>, CC 11), uma sequência aberta de leitura (ORF) foi encontrada próxima ao gene *siaD* e nomeada *oatC*. Por meio de buscas no *Genbank* e *Swiss-prot*, os autores observaram que a sequência não possuía homologia com qualquer outro gene ou proteína. O gene *oatC* compartilha alto conteúdo A+T com o operon

*sia*. Resultados da RT-PCR demonstraram que o gene *oatC* é co-transcrito com o operon e pode ser considerado parte da região A do *locus cps* (**Figura 3**) (CLAUS et al., 2004).

Em meningococos com cápsula composta de ácido siálico, a região A do *locus cps* compreende os genes *siaA-siaD*, com o *siaC* codificando enzimas requeridas para a ativação da síntese do ácido siálico e o *siaD* codificando polisialiltransferases de diferentes sorogrupos (VOGEL et al., 2004). As características do gene *oatC* estão apresentadas na **tabela 2**.

Figura 3 - Organização genética do *locus cps* em *N. meningitidis* sorogrupo C.



HC51 e HC381 são os iniciadores utilizados na amplificação do gene *oatC*.

Fonte: Adaptado de CLAUS et al., 2004.

Tabela 2 - Propriedades do gene *oatC* no meningococo sorogrupo C.

Característica	OatC
Tamanho do gene	1383 pb
Tamanho da proteína	461
Conteúdo A+T	71%
Operon	Transcrito com operon <i>sia</i> (síntese do ácido polisiálico)
Varição de fase	Trato homopolimérico
Inserções e deleções	Não observado

Fonte: Adaptado de VOGEL et al., 2004.

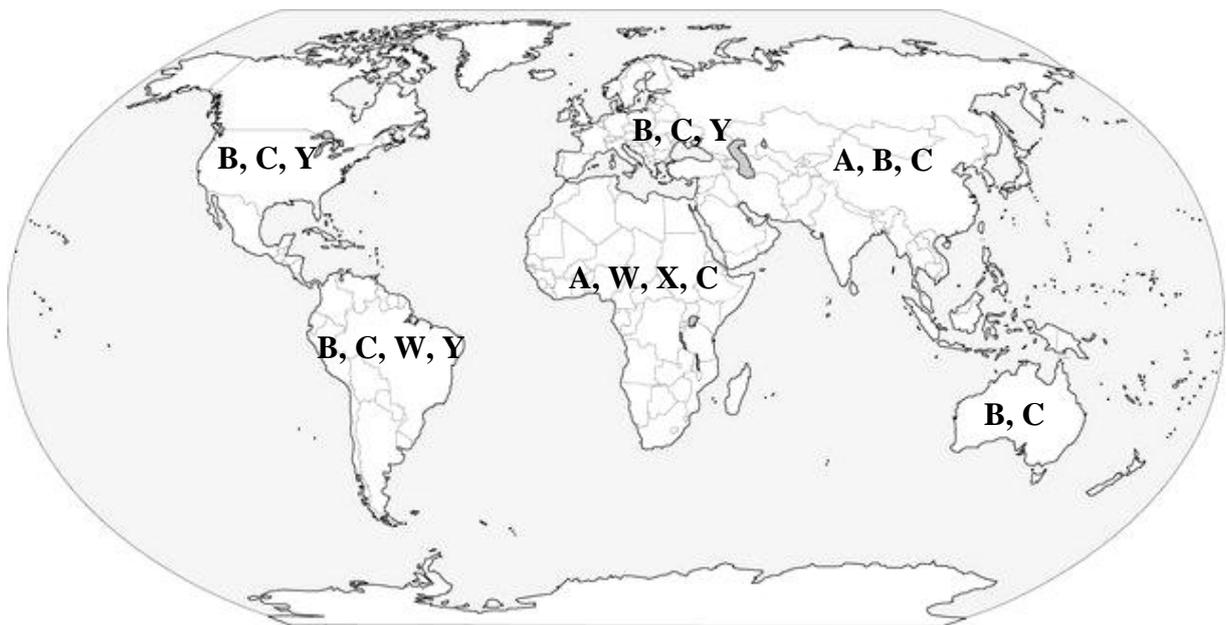
## 1.7 Epidemiologia da doença meningocócica no mundo

A epidemiologia da DM é dinâmica, com mudanças contínuas nas incidências de sorogrupos de *N. meningitidis* e com o surgimento de novas variantes, principalmente após a introdução de vacinas altamente efetivas como a MenC. É difícil estimar os números relativos à incidência de DM devido a imprecisões nos relatos, nas variáveis de vigilância epidemiológica em todo o mundo, juntamente com a subnotificação reconhecida em muitos

países em desenvolvimento. Em países desenvolvidos, a incidência conhecida de DM diminuiu para menos de um caso por 100.000 habitantes por ano (NADEL; NINIS, 2018).

A taxa de frequência da doença meningocócica e a distribuição dos sorogrupos varia entre diferentes regiões geográficas (SÁFADI et al., 2010) (**Figura 4**). Alguns fatores associados à distribuição da DM são faixa etária, condições socioeconômicas e perfil clonal. Em geral, a incidência da doença é maior em países em desenvolvimento, especialmente em áreas com grandes aglomerados populacionais, que favorecem seu potencial epidêmico.

Figura 4 - Distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis* em diferentes regiões do mundo.



Fonte: BORROW, 2017; HALPERIN, 2012.

Em 2009, uma epidemia sazonal em uma larga faixa da África subsaariana infectou aproximadamente 88 mil pessoas e matou mais de cinco mil. No final de 2010, menos de uma década após a criação do Projeto de Vacina da Meningite (uma parceria entre a OMS e o *Program for Appropriate Technology in Health - PATH*), as autoridades nacionais dos três países mais afetados, introduziram uma nova vacina conjugada contra o sorogrupo A – MenAfricVac. A vacina é capaz de dar imunidade de longa duração para crianças a partir de um ano de idade, por um preço acessível (PATH, 2014). No continente Africano, entre 67 a 77% da doença é causada pelos sorogrupos A, C, W-135 ou Y. O último pico de incidência, em 2006, foi atribuído ao sorogrupo W-135 e o CC11 foi o mais prevalente, com altas taxas de infecção em crianças e adolescentes (MEIRING et al., 2014). A descrição de surtos

relacionados ao sorogrupo X destacam a necessidade de uma nova abordagem baseada na vacina conjugada (BOISIER et al., 2007).

Um estudo realizado dois anos após o início do programa de vacinação infantil na África mostrou a prevalência de 10% de adolescentes que carregam o meningococo na nasofaringe, onde o sorogrupo C foi o mais comum (1,32%), seguido dos sorogrupos B (0,99%), E (0,74%), Y (0,49%) e W-135 (0,25%) (IBARZ-PAVÓN et al., 2012). A infecção pelo vírus da AIDS têm sido associada a uma incidência aumentada de DM, maior risco de bacteremia e maior taxa de mortalidade em populações não infectadas (VON GOTTBORG et al., 2008).

A incidência da DM é atualmente baixa em muitas partes da Europa, com diferente distribuição de sorogrupos e diferentes políticas de vacinação (BORROW et al., 2016). Estratégias de vacinação de rotina foram implementadas na França, Alemanha, Holanda e Espanha, reduzindo drasticamente a incidência de DM relacionada ao sorogrupo C (ECDC, 2015). Na Rússia, a notificação de DM é obrigatória. Apesar da falta de metodologias de tipificação, a disponibilidade de métodos baseados na PCR está aumentando (KOROLEVA, 2014 apud BORROW, 2017). O sorogrupo B atualmente é dominante em toda a Europa, esse aumento foi constatado após o uso generalizado da vacina meningocócica conjugada C (HALPERIN et al., 2012).

Na América do Norte, com exceção do México, os sistemas de vigilância estão em vigor e são considerados ativos. Os sorogrupos B e C são os sorogrupos predominantes; no entanto, surtos localizados causados por clones pertencentes a diferentes sorogrupos foram observados. No México, nem todos os isolados são submetidos ao Laboratório de Referência Nacional. Como consequência, o número de casos de DM é subestimado e poucos isolados recebem caracterização. Nos EUA, grande parte do sorogrupo B foi associada a um isolado pertencente ao CC32 (FISCHER; PERKINS apud BACCARINI et al., 2013). O sorogrupo Y tornou-se recentemente uma importante causa de DM invasiva nos EUA, mas ainda não foi relatado no Canadá (BACCARINI et al., 2013). No Canadá, entre 2009 e 2012, quando todos os programas de vacinação tinham sido estabelecidos, a incidência da DM diminuiu em 77% (SADARANGANI et al., 2014).

A epidemiologia da DM na América Latina é caracterizada por diferenças marcantes de país para país. Os sorogrupos B e C são responsáveis pela maioria dos casos de DM, mas o surgimento de sorogrupos W-135 e Y foram relatados em alguns países. No Chile, devido a frequência de diferentes sorogrupos, a vacina tetravalente MenACWY foi incluída no

programa nacional de imunização para todas as crianças com idade  $\geq 1$  ano (SÁFADI; CINTRA, 2010).

Em 1993, a OPAS e a OMS implantaram um programa de rede de vigilância, chamado *Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonias y Meningitis Bacterianas* (SIREVA), para casos de *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae* e *N.meningitidis*. A rede SIREVA realiza uma análise sistemática de todas as cepas disponibilizadas pela rede de pesquisa epidemiológica de 20 países da América Latina (SÁFADI; CINTRA, 2010).

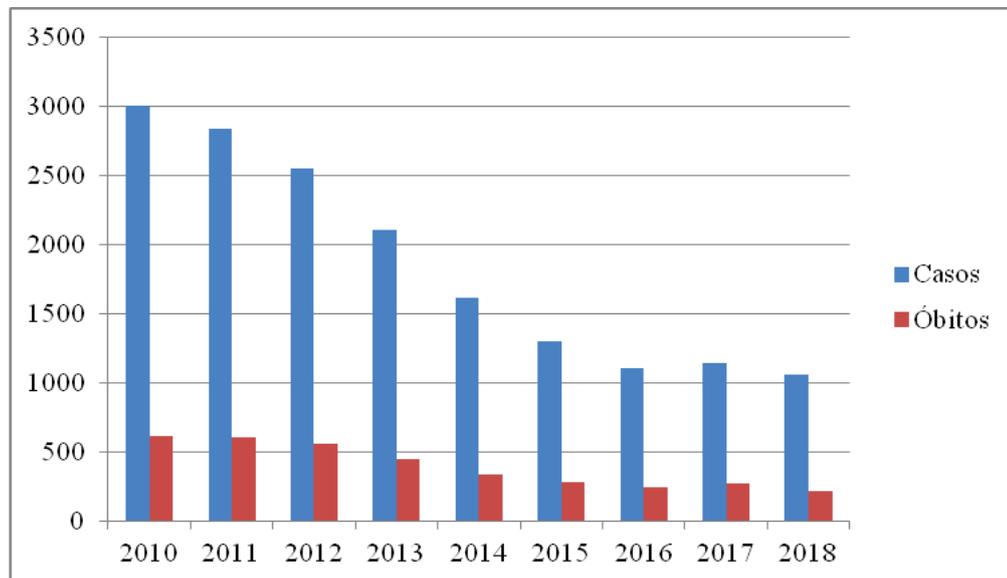
## 1.8 Epidemiologia da doença meningocócica no Brasil

O Brasil viveu uma grande epidemia de DM causada pelo sorogrupo B na primeira metade da década de 70. Nos anos 80 e 90, a elevação da incidência foi localizada, atingindo várias cidades brasileiras. A incidência desse sorogrupo atingiu seu pico em 1996 com 7,8 casos por 100 mil habitantes, com epicentro no estado de São Paulo, onde 80% dos casos foram relacionados ao sorogrupo B, mantendo sua prevalência até 2002. No mesmo ano, foi observado um significativo aumento na proporção de casos da doença causados pelo sorogrupo C nos estados da Bahia, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Em 2006, o sorogrupo C foi responsável por 55,2% dos casos identificados, o sorogrupo B por 38,2%, o sorogrupo W-135 por 5% e o sorogrupo Y por 1,6% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

A proporção de cepas sorogrupo B diminuiu de 74,5% em 2000 para 25,7% em 2008, correspondendo a uma queda de 0,6 para 0,1 casos por 100 mil habitantes na incidência média anual. A taxa de notificação da DM entre 2009 e 2010 foi de sete casos em 100 mil habitantes, relatados em crianças menores de dois anos (AZEVEDO et al., 2013).

A partir do ano 2002 houve uma significativa troca da prevalência entre os sorogrupos mais circulantes no país. O sorogrupo B que possuía uma maior prevalência foi substituído pelo sorogrupo C, que se tornou o sorogrupo mais frequente. A frequência do sorogrupo C aumentou em vários estados brasileiros, de 22,4% para 67,7%. A incidência anual do sorogrupo C passou de 0,2 casos por 100 mil habitantes em 2000 para 0,41 casos por 100 mil habitantes em 2008. O sorogrupo C continua a ser a causa mais comum da doença (DATASUS, 2019). O índice de letalidade da DM no país é considerado alto, alcançando 18% a 20% dos casos (**Figura 5**).

Figura 5 - Número de casos confirmados de DM e óbitos registrados no Brasil nos últimos anos.

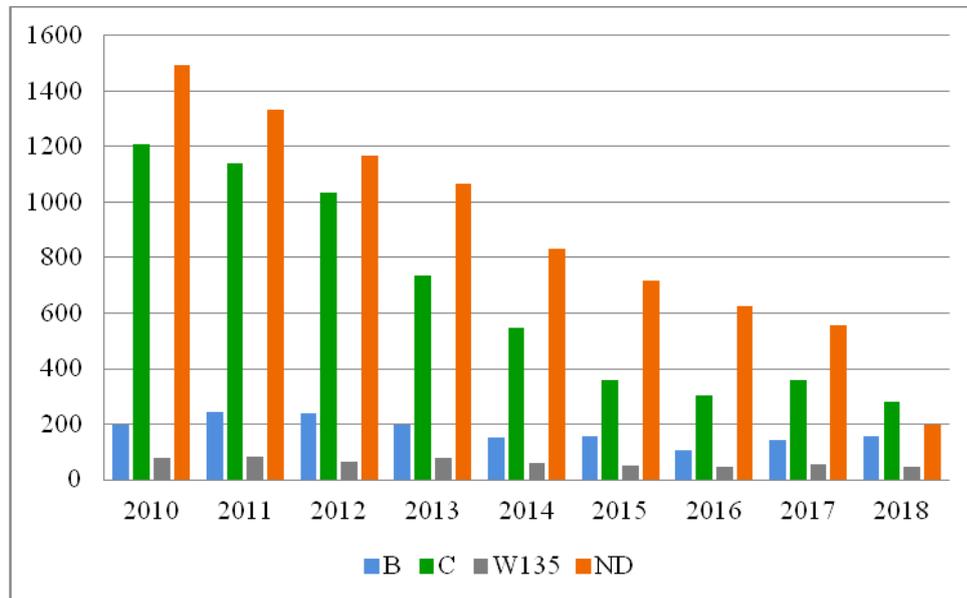


Fonte: DATASUS, 2019.

O primeiro relato de *N. meningitidis* sorogrupo W-135 no Brasil ocorreu em 1983 em São Paulo. Os relatos da DM causada por esse sorogrupo já foram descritos em diversos estados brasileiros associadas ao CC11 (LEMOS et al., 2010). Casos de sorogrupo W-135 no estado do Rio de Janeiro identificaram o mesmo fenótipo presente em cepas da Arábia Saudita (Hajj), indicando que esse clone está se espalhando por países em todo o mundo (BARROSO; REBELO, 2007). No Rio Grande do Sul, o aumento do número de casos do sorogrupo W-135, relatado a partir de 2003, tem sido associado à emergência do clone hipervirulento W135:P1.5,2:ST-11(CC11) (WEIDLICH et al., 2008). O sorogrupo W não aumentou tanto na Argentina ou no Chile, embora o mesmo clone esteja envolvido em casos esporádicos (LUCIDARME et al., 2015). A distribuição dos sorogrupos no Brasil nos últimos anos encontra-se na **Figura 6**.

Salvador é a terceira cidade mais populosa do país. Antes da introdução da vacinação com a MenC pelo PNI, uma epidemia do sorogrupo C ocorreu na cidade em 2010, contabilizando altas taxas da DM. O governo local iniciou uma campanha de vacinação em massa, tendo como público-alvo crianças menores de cinco anos de idade e indivíduos entre 10 a 24 anos até agosto de 2010. Desta forma, a vacinação em Salvador se estendeu a um grupo de risco em resposta ao surto na cidade, com cobertura estimada de 92% (CARDOSO et al., 2015; ANDRADE et al., 2017).

Figura 6 - Distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis* no Brasil ao longo dos anos.



ND, Não detectado.

Fonte: DATASUS, 2019.

Em Pernambuco, no período entre 2007 e 2013, a DM apresentou comportamento endêmico, com a ocorrência média anual de 100 casos, com predomínio do sorogrupo C a partir de 2008. A letalidade da doença variou ao longo dos anos e em 2013 foi de 19,8%. Algumas ações de vigilância foram colocadas em prática, dentre elas destacam-se a identificação de indivíduos que tiveram contato próximo e prolongado com o caso suspeito, orientação quanto ao surgimento dos sinais e sintomas e, quando necessária, a administração de antibióticos. A situação epidemiológica da DM no estado é divulgada através do Informe Semanal de Doença Meningocócica, elaborado pela Secretaria Estadual de Saúde (SES) de Pernambuco (SES, 2013).

No âmbito do estado e da cidade do Rio de Janeiro a DM possui primordial relevância, tendo sido historicamente relatados vários surtos e epidemias. No estado do Rio de Janeiro, a incidência da DM evidenciou grande variação durante as seis últimas décadas, contudo, raramente atingiu uma incidência média anual superior a 10 casos por 100 mil habitantes (PESSUTI; SORIANO; MACIEL, 2016). Entre os fatos históricos memoráveis de DM no estado do Rio de Janeiro, destacam-se o surto que ocorreu entre militares na cidade em 1842 e a epidemia de DM no estado em 1974 (PESSUTI; SORIANO; MACIEL, 2016).

O programa de vigilância das meningites no estado de São Paulo, o mais populoso estado do país, é considerado de alta qualidade com a pesquisa ativa de casos e a identificação

do agente etiológico. A análise do impacto da vacinação com a MenC é realizada pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e Instituto Adolfo Lutz, que asseguram a qualidade dos dados (ANDRADE et al., 2017). Durante 2010, surtos de DM sorogrupo C ocorreram em duas refinarias de petróleo no estado de São Paulo, levando a vacinação em massa de funcionários com a vacina polissacarídica A/C (SÁFADI et al., 2014).

## 1.9 MLST

A diversidade e a dinâmica das populações de *N. meningitidis* necessitam de sistemas de tipificação de alta resolução abrangentes para a vigilância da DM (JOLLEY et al., 2007). Estudos por tipificação molecular têm permitido um melhor entendimento da disseminação do meningococo, assim como nas relações existentes entre doença endêmica e epidêmica (YAZDANKHAH et al., 2005). Estes dados são essenciais para a gestão nacional e internacional mais eficaz da DM, além de serem inestimáveis nos estudos de biologia e evolução da população de meningococos. Essa metodologia é amplamente utilizada em laboratórios de referência em todo o mundo com protocolos validados (JOLLEY et al., 2007).

MLST é atualmente o método mais utilizado para tipificação de *N. meningitidis*. A técnica do MLST consiste na amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de 450-500 pares de base (pb) de sete genes constitutivos: *abcZ* (transportador putativo ABC), *adk* (adenilato-quinase), *aroE* (chiquimato desidrogenase), *fumC* (fumarato hidratase), *gdh* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *pdhC* (piruvato desidrogenase), *pgm* (fosfoglucomutase). MLST tem sido utilizado globalmente para monitorar a epidemiologia da DM e determinar as relações entre isolados em surtos localizados.

MLST utiliza a variação na sequência dos genes para definir um tipo sequencial (ST). Para cada *locus* são atribuídos número de alelos e um conjunto de sete alelos formam um tipo sequencial (ST). Um grupo de STs que tenha, no mínimo, quatro alelos em comum é definido como um complexo clonal (CC), ou seja, tem um genótipo ancestral comum definido como ST central. Com a designação de ST e CC é possível estabelecer a relação epidemiológica dos micro-organismos em questão. (MAIDEN et al., 1998).

Este método de genotipagem foi desenvolvido como um método portátil, universal e definitivo para a caracterização de bactérias e mais recentemente protozoários e fungos. Genes constitutivos são utilizados por não sofrerem pressão seletiva e portanto apresentarem evolução lenta tornando-se bons marcadores de evolução e relações genéticas entre cepas da

mesma espécie (MAIDEN et al., 1998). Grupos de meningococos geneticamente relacionados são agrupados em CC. Uma minoria de CC, as chamadas linhagens hiperinvasivas, são relativamente estáveis com períodos de vida de muitas décadas e com disseminação geográfica global. Essas linhagens são responsáveis por um número desproporcional de casos de doenças com características específicas do fenótipo (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

### **1.10 Prevenção da doença meningocócica**

As vacinas são consideradas a melhor estratégia de controle na prevenção da DM. No desenvolvimento de vacinas contra bactérias encapsuladas, o antígeno de maior eficiência para a formulação de vacinas é o próprio polissacarídeo componente da cápsula e principal fator de virulência. Vacinas com esta formulação são designadas vacinas polissacarídicas.

As primeiras vacinas polissacarídicas utilizadas na prevenção da DM foram desenvolvidas contra os sorogrupos A e C, licenciadas em 1975 nos EUA e na Europa pelo Instituto Merieux. A vacina tetravalente ACYW foi licenciada nos EUA em 1981, a partir da demonstração da satisfação da resposta de anticorpos bactericidas para cada um dos quatro polissacarídeos (AYME apud FRASCH, 1990). A descrição detalhada das etapas de produção da vacina meningocócica polissacarídica foi publicada pela OMS em seus relatórios técnicos e algumas descrições adicionais foram propostas por Gotschlich, Liu e Artenstein em 1969. A partir da década de 1970, as vacinas tetravalentes começaram a ser produzidas no mundo inteiro apresentando boa eficácia. Apesar de induzir a formação de anticorpos bactericidas, o polissacarídeo é um antígeno T-independente, isto é, não induz memória imunológica e a imunogenicidade em crianças menores de dois anos é baixa (LI et al., 2014).

O sucesso das vacinas conjugadas de *H. influenzae* tipo b (Hib) na redução da incidência de doença invasiva por Hib na infância acelerou o desenvolvimento de vacinas conjugadas destinadas a prevenir a infecção por outras bactérias encapsuladas (BOOY et al., 1994). A vacina demonstrou que a imunogenicidade dos polissacarídeos aumentaria caso o mesmo fosse conjugado a uma proteína carreadora, induzindo uma resposta T-dependente (ADAMS et al., 1993).

O Reino Unido foi o primeiro país a introduzir a vacina meningocócica conjugada C no seu calendário de vacinação em 1999. A vacina foi desenvolvida acoplando-se uma proteína carreadora timo-dependente (toxóide diftérico ou tetânico) ao polissacarídeo do meningococo formando um complexo antigênico capaz de induzir a produção de níveis

elevados de anticorpos bactericidas e a formação de populações de linfócitos T de memória de duração prolongada (CONSTANTINO et al., 1992). Atualmente existem vacinas conjugadas contra os sorogrupos A, C, W-135 e Y (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A primeira vacina conjugada licenciada era composta pelo PSC OAc+ de uma cepa do sorogrupo C (BORROW et al., 2000). Também foi estudada, no Reino Unido, a vacina conjugada ao toxóide tetânico com polissacarídeo do sorogrupo C de-O-acetilado para ser administrada em uma única dose em adultos saudáveis demonstrando ser imunogênica e bem tolerada por este grupo.

A vacina meningocócica conjugada C - CRM<sub>197</sub> (mutação da toxina diftérica) (MenC) foi desenvolvida para ser segura e imunogênica em crianças até 3 anos de idade. A vacina foi licenciada em 2003, mas só foi disponibilizada no setor público em Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIES) para crianças com condições de risco elevado e outras indicações como asplenia congênita ou adquirida, indícios de imunodeficiência congênita e receptores de transplante de medula óssea (SSESP, 2013).

Com o objetivo de interromper a transmissão e conseqüentemente os surtos de DM, em 2010, o MS aprovou a MenC e incluiu no calendário do PNI em três doses, a partir dos dois meses de idade com intervalo mínimo de um mês entre as doses e de uma vacina meningocócica conjugada C (toxóide tetânico) administrada em duas doses, a partir dos dois meses de idade, com intervalo mínimo de dois meses entre as doses. Para crianças acima de um ano de idade, adolescentes e adultos, qualquer uma destas vacinas pode ser aplicada em uma única dose (SÁFADI; BARROS, 2006, SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, 2012, CDC, 2012). As taxas de cobertura da vacina antes e após a introdução das vacinas meningocócicas conjugadas são apresentadas na **tabela 3**.

Tabela 3 - Cronograma de vacinação das vacinas meningocócicas conjugadas C e taxa de cobertura no Brasil, estado de São Paulo e Salvador. (continua)

Região	Cronograma de vacinação	Início da vacinação	Vacina	Taxa de cobertura				
				2010	2011	2012	2013	2014
<b>Brasil</b>								
Rotina de imunização	3, 5, 12 meses	Novembro, 2010	MenC-CRM197 <sup>a</sup>	26.9	100.0	96.2	99.7	95.8
<b>São Paulo</b>								
Rotina de Imunização	3, 5, 12 meses	Novembro, 2010	MenC-CRM197 <sup>a</sup>	10.8	100.0	98.7	100.0	97.4

Tabela 4 - Cronograma de vacinação das vacinas meningocócicas conjugadas C e taxa de cobertura no Brasil, estado de São Paulo e Salvador. (conclusão)

<b>Salvador</b>									
Campanha de vacinação	<5anos	Fev, 2010	MenC-TT <sup>b</sup>	92.2					
	10-14anos	Mai-Ago, 2010	MenC-TT <sup>b</sup>	80.4					
	15-19anos	Jun-Ago, 2010	MenC-TT <sup>b</sup>	67.4					
	20-24anos	Ago, 2010	MenC-TT <sup>b</sup>	40.7					
Rotina de imunização	3, 5, 12 meses	Nov, 2010	MenC-CRM197 <sup>a</sup>	100.0	95.4	92.7	93.8	86.9	

<sup>a</sup> Novartis; <sup>b</sup> Neisvac-C Baxter; TT, toxóide tetânico.

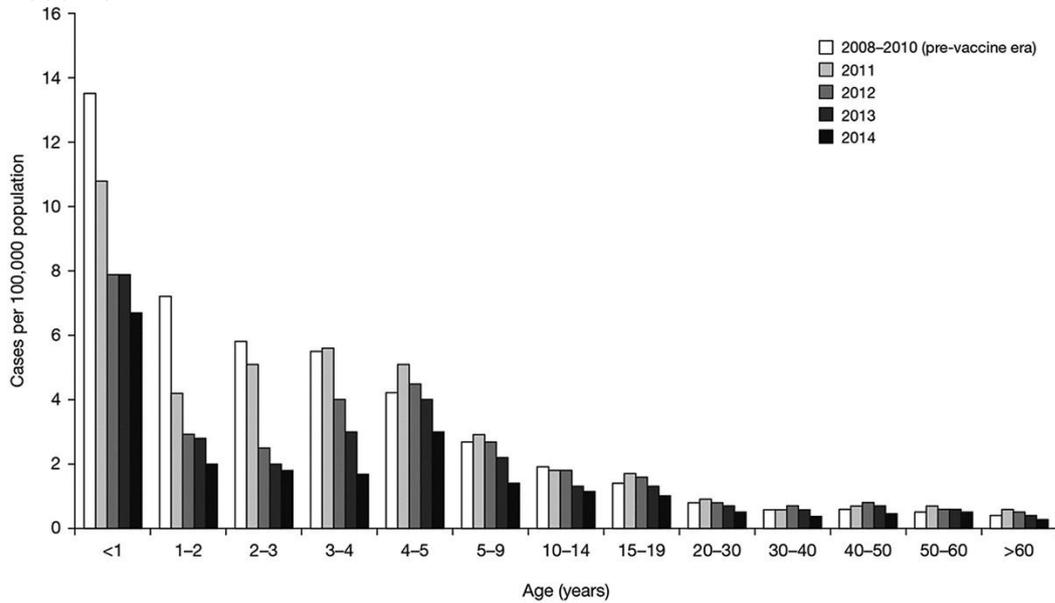
Fonte: ANDRADE et al. 2017.

A utilização de uma vacina polissacarídica C conjugada à proteína aumenta a eficácia da cobertura, pois é capaz de proteger crianças menores de um ano, o que não é possível com a vacina polissacarídica sem proteína carreadora. O tipo de proteína carreadora usado na conjugação pode afetar a imunogenicidade e o perfil de reatogenicidade da vacina (ARAKERE; FRASCH, 1991). A introdução da MenC no Brasil em 2010 proporcionou uma redução imediata das taxas de incidência de DM, especialmente nas crianças, público-alvo da vacinação (**Figura 7**).

As vacinas conjugadas oferecem algumas vantagens quando comparada a vacinas polissacarídicas, entre elas a produção de níveis elevados de anticorpos, a indução a memória imunológica, o que proporciona uma excelente resposta amnésica (efeito *booster*) na reexposição, persistência de proteção, imunidade de rebanho e redução do estado de portador (GRANOFF; FEAVERS; BORROW, 2004).

Em janeiro de 2017, o MS incluiu uma dose da MenC para adolescentes entre 12 e 13 anos, que foi ampliada em 2018 para 11-14 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Figura 7 - Taxas de incidência de DM antes e após a vacinação de rotina MenC no Brasil, 2008-2014.



Fonte: BORROW, 2017.

Outra categoria de vacinas desenvolvidas são aquelas baseadas em vesículas de membrana externa (OMV), utilizadas no controle da DM causada pelo sorogrupo B. Os polissacarídeos capsulares do sorogrupo B são pouco imunogênicos e compartilham similaridade estrutural com os carboidratos encontrados em tecidos humanos (FINNE; LEINONEN; MÄKELÄ, 1983). A vacinologia reversa permitiu o desenvolvimento das vacinas proteicas 4CMenB (Bexsero®, GSK) (SERRUTO, 2012) e Trumenba® (Pfizer) (GHANDI; BALMER; YORK, 2016). A vacina 4CMenB é composta pelas variantes proteicas fHbp-1, NHBA-2, NadA-8 e P1.7-2,4 das regiões variáveis 1 e 2 da PorA (RODRIGUES et al., 2018). A vacina Trumenba é composta por antígenos da proteína fHbp da subfamília A (variante A05) e da subfamília B (variante B01) (GHANDI; BALMER; YORK, 2016). Apesar da 4CMenB ter sido licenciada para a prevenção da doença causada pelo sorogrupo B, grande parte da comunidade científica acredita que os peptídeos de alguns ou todos os antígenos vacinais podem estar presentes em meningococos de outros sorogrupos (RODRIGUES et al., 2018), aumentando sua abrangência a todos os sorogrupos da DM (BORROW, 2012). Uma nova nomenclatura baseada nas variantes antigênicas da Bexsero, denominada BAST (*Bexsero Antigen System Typing*) foi desenvolvida para descrever a variabilidade de cepas meningocócicas B frente à vacina. Algumas evidências sugerem associações entre o número de BAST e o CC (BREHONY, 2016).

A Iniciativa Global Meningocócica (GMI) foi criada em 2009 para promover a prevenção de DM em todo o mundo por meio da educação, da pesquisa, da cooperação internacional e da vacinação. A GMI é um grupo internacional de clínicos e cientistas com experiência em DM nas áreas de imunologia, microbiologia, epidemiologia e saúde pública. Desde a sua criação, várias reuniões globais e regionais são realizadas e resultaram em publicações sobre a DM (HARRISON et al., 2011).

#### 1.10.1 Controle das Vacinas Meningocócicas

As recomendações para a produção e controle das vacinas meningocócicas polissacarídicas foram adotadas pela OMS e pelo Comitê de Padronização Biológica em 1976 e aperfeiçoadas em 1978 e 1981. Estudos clínicos com essas vacinas demonstraram eficácia em aproximadamente 90% dos casos e provou ser altamente eficiente em intervenções de saúde pública.

Algumas características das cepas vacinais de *N. meningitidis* devem ser levadas em conta no controle da vacina, como a pureza e qualidade do PSC. A quantificação do conteúdo O-acetil também é um critério de controle de qualidade no protocolo de desenvolvimento de vacinas. O conteúdo O-acetil do PSC é geralmente determinado pelo método colorimétrico de Hestrin (HESTRIN, 1949), porém tem apresentado baixa sensibilidade. Atualmente utiliza-se a RMN para determinar o estado de acetilação do PSC. A **tabela 4** informa as propriedades do PSC do sorogrupo C utilizado na formulação das vacinas meningocócicas de acordo com o FDA, OMS e Farmacopeia Americana (USP). Para os quatro polissacarídeos meningocócicos (referentes aos sorogrupos A, B, C e Y), há um nível mínimo de O-acetilação especificado (JONES; LEMERCINIER, 2002).

As vacinas meningocócicas são purificadas através de processos químicos e a estratégia de controle depende muito da avaliação da caracterização das moléculas e da purificação para garantir que cada lote de vacina seja consistente com as especificações para confirmar sua segurança e imunogenicidade. Adicionalmente, a imunogenicidade é avaliada em camundongos e os dados gerados indicam a consistência e a integralidade da vacina (ARAKERE; FRASCH, 1991).

Tabela 5 - Condições físicas e químicas do conteúdo de PSC dos sorogrupos A, C, Y e W-135 na formulação da vacina de acordo com FDA, OMS e Farmacopeia Americana (USP).

Polissacarídeo	FDA				OMS				USP			
	A	C	Y	W-135	A	C	Y	W-135	A	C	Y	W-135
Fósforo (>%)	8,0	-	-	-	8,0	-	-	-	8,0	-	-	-
Ácido neuramínico (>%)	-	80,0	56,0	56,0	-	80,0	56,0	56,0	-	80,0	56,0	56,0
O-acetil (>nmol/g)	2,0	2,0	0,3	0,3	2,0	1,5	0,3	0,3	2,0	1,5	14,3	0,3
Proteína (<%)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ácidos nucleicos (<%)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Peso molecular (<K <sub>d</sub> )	0,7	0,7	0,57	0,68	0,65	0,75	0,8	0,8	0,65	0,75	0,8	0,8

Medidas de acordo com 0,025µg/Kg de polissacarídeo.

Fonte: FRASCH, 1990; JONES; LEMERCINIER, 2002.

### 1.11 Relevância

A saúde no Brasil é uma questão político-social direcionada ao controle de doenças específicas e ao acesso à assistência médica. Estudos relacionados a doenças infecciosas epidêmicas, sobretudo àquelas de notificação compulsória, necessitam de uma atenção rigorosa na adoção e atualização das medidas preventivas e de controle, visto o risco que conferem à população.

A DM é uma doença com grande potencial epidêmico. Algumas características da DM como a facilidade de transmissão, rápida evolução, possibilidade de sequelas cognitivas e físicas e o risco de óbito em poucas horas reforçam a necessidade de um diagnóstico rápido e início imediato de tratamento. A MenC foi introduzida no Brasil em 2010 como medida preventiva e resultou em um significativo declínio dos casos de DM na população vacinada e não vacinada, este último grupo relacionado à proteção de rebanho (BIJLSMA et al., 2014).

A MenC foi desenvolvida a partir PSC de *N. meningitidis* sorogrupo C, que é altamente imunogênico. Estudos com o PSC meningocócico demonstraram que as cepas pertencentes ao sorogrupo C apresentam, em sua maioria, o polissacarídeo O-acetilado em C<sub>7</sub> e/ou C<sub>8</sub>. A presença de cepas denominadas de-O-acetiladas, isto é, sem o radical O-acetil na estrutura do polissacarídeo, já foram relatadas em países desenvolvidos em aproximadamente 12% a 15% das cepas circulantes (APICELLA; FELDMAN, 1976, BORROW, 2000). A vacina produzida com o PSC OAc- (NeisvacC®) apresentou maior título de anticorpos

quando comparada a vacina meningocócica conjugada (RICHMOND et al., 2001). Esses dados estimularam estudos bioquímicos e imunológicos sobre o polissacarídeo capsular, e a substituição pela vacina contendo o PSC de-O-acetilado já foi considerada.

A vacina vigente no calendário do PNI (MenC) apresentou níveis de eficácia que garantem a proteção contra os meningococo C circulantes no Brasil. Apesar de ressaltada a importância da conjugação proteica como um propulsor na resposta imune, a utilização do PSC de-O-acetilado na formulação da vacina conjugada aumentaria sua imunogenicidade (RICHMOND et al., 2001). Muito se discute a respeito da influência que o estado da acetilação do polissacarídeo poderia gerar na dinâmica e prevenção da DM. Assim, este estudo se apresenta como uma nova referência neste aspecto, pela investigação, tanto a nível molecular quanto a nível imunológico, da presença das cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas no Brasil.

A possível presença de cepas contendo o polissacarídeo de-O-acetilado no Brasil se revela como uma nova informação no meio acadêmico, pois até o momento não se tinha conhecimento sobre esta característica. Os resultados obtidos poderão revelar dados inéditos no Brasil. Novos esforços devem ser dispendidos para a vigilância efetiva dos clones circulantes, assim como a verificação da necessidade de atualização da vacina disponibilizada pelo PNI no país. Por ser apresentado como o primeiro relato de cepas de-O-acetiladas, é necessário que esses estudos apresentem uma continuidade para que haja o acompanhamento da circulação dessas cepas, pela versatilidade que o microrganismo apresenta.

Em paralelo, a análise epidemiológica das cepas circulantes pela averiguação dos clones circulantes e o conhecimento dos fenótipos de *N. meningitidis* no país irão auxiliar o entendimento da dinâmica desse micro-organismo nas populações de risco e colaborar na geração de informações para a atualização de uma vacina mais eficaz.

A correlação entre os dados do PSC e os dados sobre a epidemiologia da DM podem fornecer novas informações a respeito da circulação do meningococo no país. Desta forma, este estudo visa contribuir no aprimoramento das ações da vigilância em saúde, destacando sua relevância para a saúde pública.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar a presença de cepas com PSC meningocócicos nas formas O-acetilada e de-O-acetilada e associar tais características a dados epidemiológicos gerados nos períodos anterior e posterior à introdução da MenC no Brasil, garantindo novas informações sobre as cepas brasileiras circulantes no país.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar a especificidade dos PSC OAc+ e OAc- frente a anticorpos monoclonais específicos e a possibilidade de reação cruzada;
- Investigar as bases moleculares da acetilação dos PSC em cepas de *N. meningitidis* sorogrupo C a partir da comparação com os padrões vacinais O-acetilado e de-O-acetilado;
- Inferir uma porcentagem de cepas de-O-acetiladas a partir da realização de métodos imunoenzimáticos e moleculares;
- Determinar o perfil clonal das cepas circulantes no período proposto, pela metodologia do MLST e averiguar a presença de linhagens invasivas;
- Classificar as cepas de *N. meningitidis* C de acordo com o perfil antigênico pela análise das OMPs;
- Verificar a ocorrência de cepas que possuam antígenos vacinais contra o sorogrupo B (Bexsero) a fim de estabelecer a imunogenicidade desta vacina ao sorogrupo C;
- De acordo com os resultados obtidos, prever os impactos da vacina meningocócica conjugada sobre a estrutura do PSC e sobre epidemiologia do meningococo pela avaliação dos períodos pré e pós-vacinal.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Cepas vacinais

As cepas vacinais meningocócicas do sorogrupo C contendo o PSC OAc+ (C11) e OAc- (M99) serviram como referência em todas as análises deste estudo, em especial na determinação do estado de acetilação do PSC. A cepa O-acetilada foi cedida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e a cepa de-O-acetilada foi cedida pelo *Public Health Laboratory*, Manchester, Inglaterra. Essas cepas de referência foram depositadas na Coleção de Pesquisa do INCQS e identificadas como P4344 e P4400, respectivamente.

#### 3.2 Polissacarídeos capsulares

Os PSCs utilizados neste estudo foram: PSC nativo O-acetilado (PSC OAc+) (lote 125EMPCP 07) (**Tabela 5**), polissacarídeo oriundo de uma cepa vacinal e utilizado na composição da MenC que foi previamente isolado e purificado por métodos certificados para a fabricação da MenC em Bio-Manguinhos; e polissacarídeo de-O-acetilado (PSC OAc-), mesmo polissacarídeo nativo O-acetilado descrito anteriormente que foi desacetilado por métodos químicos.

O PSC OAc+ foi desacetilado de acordo com adaptações ao protocolo estabelecido por Bhattacharjee et al (1975) pela equipe técnica do Laboratório de Tecnologia Bacteriana (LATEB) de Bio-Manguinhos, e confirmados por RMN-H, em colaboração com a Rede de Plataforma de Métodos Analíticos, subunidade de Ressonância Magnética Nuclear em Farmanguinhos – Fiocruz (APÊNDICE A). Os PSCs foram gentilmente cedidos pela Dra. Maria de Lourdes Leal e Dra. Marilza Batista Corrêa de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Tabela 6 - Propriedades e controle do polissacarídeo O-acetilado utilizado no estudo

PSC	Proteína (≥1% p/p)	DNA (≥1% p/p)	LPS (≥20 EU/μg de PS)	Tamanho molecular em KDa<0.5	O-acetil (≥1,5 μmoles/mg)	Ácido Siálico (≥80%)	Ca <sup>+2</sup> (%)
OAc+	0,58	0,24	9,44	99,00	2,10	81,40	5,76

PSC: polissacarídeo capsular; LPS: lipopolissacarídeo; EU: unidades de endotoxinas.

Fonte: Do autor, 2019.

### 3.3 Seleção e caracterização das cepas de origem clínica

Foram selecionadas 113 cepas de *N. meningitidis* oriundas de amostras clínicas, em geral sangue e líquido, de pacientes com diagnóstico confirmado para DM causada por *N. meningitidis*. As amostras são procedentes de hospitais ou centros de referências públicos: Laboratório Central de Saúde Pública (LACENs) de Pernambuco e Bahia; Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião e Hospital Municipal Lourenço Jorge do Rio de Janeiro; e Hospital de Botucatu de São Paulo. O Laboratório de Micro-organismos de Referência (LMR) do INCQS recebeu o material clínico como demanda espontânea durante trabalho de colaboração entre o INCQS e esses LACEN para diagnóstico de casos negativos por testes laboratoriais convencionais.

A cultura e isolamento dos micro-organismos foram realizados anteriormente no LMR, seguido pela coloração de Gram, testes sorológicos e provas bioquímicas da catalase e oxidase para confirmação da espécie. Após a identificação, as cepas foram criopreservadas e depositadas na Coleção de Micro-organismos de Pesquisa do INCQS/Fiocruz. Os micro-organismos foram criopreservados em ampolas e a liofilização foi realizada segundo o Procedimento Operacional Padronizado (POP) número 65.3230.001 (INCQS/FIOCRUZ).

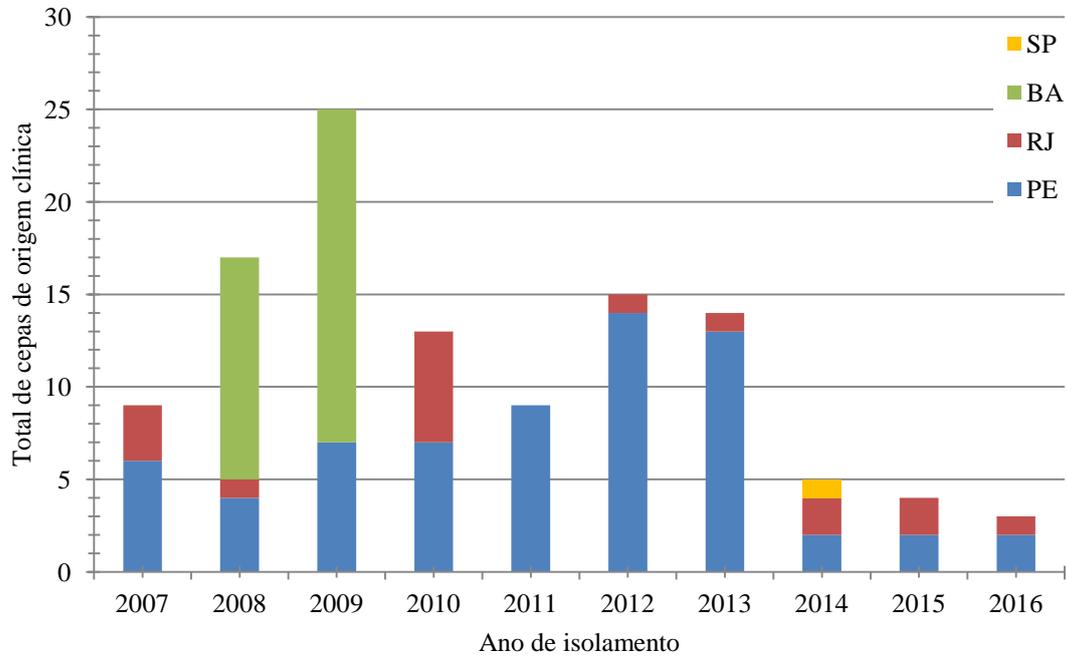
Para este estudo foram selecionadas 66 cepas de Pernambuco, 16 cepas do Rio de Janeiro, 30 cepas da Bahia e uma de São Paulo, isoladas no período de 2007 a 2016 (**Figura 8**). O intervalo dos anos 2007 a 2010 foi considerado como período pré-vacinal e o intervalo dos anos 2011 a 2016 foi considerado como período pós-vacinal.

As ampolas liofilizadas foram abertas, hidratadas em caldo Soja Trypticaseína (TSB) e cultivadas em meio de cultura em base ágar Columbia com 5% de sangue equino (ágar chocolate) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24h (GRANOFF; FEAVERS; BORROW, 2004). Para cada ampola aberta foram produzidos três criotubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerol, que foram armazenados em freezer -70°C, como uma alternativa de criopreservação.

Para o desenvolvimento deste estudo, as cepas previamente identificadas foram certificadas por metodologia molecular. A extração do DNA genômico foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®) de acordo com o protocolo para Gram-negativos seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% através do digitalizador de imagens ImageQuant 300 (GE). O DNA das amostras foi quantificado pelo kit de quantificação fluorométrica Qubit™,

fabricado pela ThermoFisher Scientific. Diluições foram realizadas para uma concentração de uso de 50ng/ $\mu$ L de DNA.

Figura 8 - Distribuição do quantitativo de cepas de *N. meningitidis* avaliadas



Fonte: Do autor, 2019.

A confirmação da espécie foi realizada pela técnica de PCR, utilizando iniciadores *nspA* e a confirmação dos sorogrupos foi realizada pela PCR do gene *siaD<sub>C</sub>* (Tabela 6). O fluxograma deste estudo com as metodologias utilizadas está sintetizado no Apêndice B.

Tabela 7 - Iniciadores utilizados na identificação de *N. meningitidis* sorogrupo C.

Gene	Nome do Iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>nspA</i>	nsp1	AGCACTTGCCACACTGATTG	480	DE FILIPPIS et al., 2005
	nsp2	GGAACGGACGTTTTTGACAG		
<i>siaD<sub>C</sub></i>	siaDcF	TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT	250	TAHA, 2000
	siaDcR	CAATCACGATTTGCCCAATTGAC		

Fonte: De Filippis et al., 2005; Taha, 2000.

### 3.4 Determinação da acetilação do polissacarídeo capsular

#### 3.4.1 Imunoquímica

##### 3.4.1.1 Antígenos e anticorpos monoclonais

O PSC OAc+, o PSC OAc-, as cepas vacinais inativadas (P4344 e P4400) e as cepas de origem clínica inativadas foram utilizadas como antígenos nos ensaios imunoenzimáticos.

O processo de inativação das cepas vacinais e das cepas de origem clínica foi realizado através da ressuspensão do meningococo em solução salina (escala 2 de McFarland), seguido de incubação em banho-maria a 60°C por 30 min. A garantia de inativação das células ficou comprovada pela ausência de crescimento de colônias após 48 h de incubação em condições favoráveis ao crescimento. Para cada reação foi utilizado 1 mL da suspensão do meningococo.

Os anticorpos monoclonais (MAbs) 2016.3 (BORROW et al., 2000) e 1075.18 (GARCÍA-OJEDA et al., 2000) foram gentilmente fornecidos pela Dra Marjorie Shapiro e Dra. Beatty Shanon, pesquisadoras do *Food and Drug Administration* (FDA). As características dos anticorpos são apresentadas na **tabela 7**.

Tabela 8 - Características dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo

MAb	Isotipo	Concentração	Volume	Ligação	Referência
1705.18	IgG3 k	1,1 mg/mL	1 mL	PSC OAc+ PSC OAc-	RUBINSTEIN; STEIN, 1988 BORROW et al., 2000
2016.3	IgG3 k	1,0 mg/mL	0,5 mL	PSC OAc-	GARCIA-OJEDA et al., 2000

MAb, anticorpo monoclonal; PSC OAc+, polissacarídeo O-acetilado; PSC OAc-, polissacarídeo de-O-acetilado  
Fonte: Rubinstein; Stein, 1988; Borrow et al., 2000; Garcia-Ojeda et al., 2000

##### 3.4.1.2 Ensaios imunoenzimáticos

As especificidades dos dois MAbs foram testadas frente aos epítomos de cada antígeno, tanto os polissacarídeos nativos isolados quanto as cepas inativadas contendo os polissacarídeos (*whole-cell*); seguido da avaliação da existência de reação cruzada (avaliação de especificidade do MAb 2016.3 ao epítomo do polissacarídeo O-acetilado). Os dois MAb (1705.18 (MAb+) e 2016.3 (MAb-)) devem apresentar afinidade ao epítomos do PSC OAc+,

enquanto que o MAb- deverá ter afinidade somente ao epítopo do o PSC OAc-, pois o mesmo apresenta epítomos únicos que são mascarados pelo radical O-acetil (ARAKERE; FRASCH, 1991).

Como controle negativo foi utilizado o PSC de *H. influenzae* e como controle branco da reação foi utilizada albumina do soro bovino (BSA). Para a análise dos PSCs das cepas de origem clínica, foram selecionadas 21 cepas, escolhidas a partir de características sugestivas que poderiam conter o PSC OAc- pelos métodos moleculares propostos, como o MLST e análise das OMPs. Àquelas cepas com características similares, quanto ao CC, ST e perfil antigênico à cepa vacinal contendo o PSC OAc- (P4400) foram escolhidas para esse fim.

#### 3.4.1.2.1 SDS-PAGE e Immunoblotting

A eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando o detergente aniônico dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada com 0,5 µL, 1 µL e 5 µL do PSC a 1mg/mL seguido da transferência para membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) no sistema de transferência submersa MiniTrans-Blot Cell® por 1 hora (150mA). Os PSCs transferidos foram ligados à superfície da membrana, favorecendo à imunodeteção pelos reagentes. Após o período de incubação foram realizadas sucessivas lavagens com os tampões TBS e TTBS (pH 7,6). Após o bloqueio dos sítios de ligação não específicos (5 g de *Skin Milk*, 0,01 g de azida sódica em 100 mL de TBS), os MAb+ e MAb- (12µg/mL) foram adicionados a um tampão de anticorpo. Após 24 h, lavagens seguidas com TBS foram realizadas e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi adicionado. Lavagens com as soluções tampão foram novamente realizadas. A reação foi parada por lavagem da membrana com água deionizada.

#### 3.4.1.2.2 ELISA sanduiche e ELISA whole-cell

A titulação dos reagentes para o ensaio *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sanduiche foi desenvolvida pela avaliação da reação anticorpo de captura nas concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL, do anticorpo anti-polissacarídeo meningocócico C em diluições 1:2000, 1:4000 e 1:8000 e dos polissacarídeos a 5, 10 e 20 µg/mL. Para o controle negativo da reação, foi utilizado tampão PBS + soro fetal bovino (SFB). Esta etapa foi realizada em parceria com a equipe do Laboratório de Tecnologia Bacteriana, do setor de Imunoenzimáticos de Bio-Manguinhos (APÊNDICE C).

O ELISA *whole-cell* indireto foi realizado de acordo com protocolo proposto por Rubinstein et al (1998) e Arakere e Frasch (1991), com adaptações (APÊNDICE D). Albumina sérica humana metilada (mHSA) (5 µg/mL) foi conjugada ao PSC OAc+ e PSC OAc- e adicionados à placa Immulux (Dynex®). Para os testes de titulação, os PSCs foram hidratados em tampão fosfato-salino (PBS) nas concentrações: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL. A titulação dos MAbs para este ensaio foi realizada testando-se as concentrações: 12 µg /mL, 6 µg/mL, 3 µg/mL e 1,5 µg/mL. O anticorpo secundário, anticorpo contra IgG de camundongo conjugado com peroxidase (KPL®), foi testado nas concentrações 0,05 µg/mL (1:20000) 0,2 µg/mL (1:5000) e 1 µg/mL (1:1000), seguindo as recomendações do fabricante.

A absorbância foi lida a 450 nm após 15 min de reação. Para cada resultado, foram gerados os resultados de densidade óptica (DO) pelo software SoftMax Pro 5.0.1. Foram considerados resultados positivos aqueles que apresentaram DO~1,0 sendo o valor do controle negativo menor que o dobro do controle positivo.

#### 3.4.2 Análise do gene *oatC*

O gene *oatC*, que codifica a enzima O-acetiltransferase responsável pela diversidade estrutural do PSC do sorogrupo C, foi analisado. Os iniciadores descritos por Claus et al (2004) HC51: 5'-ATGTCAATCAATACGTTTG-3' e HC381: 5' CGCATATCAGGATTGGAATAG-3 foram utilizados para amplificação de uma região de 1.383 pb.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com kit FastAP Thermosensitive Alkaline, fornecido pela Thermo Fisher Scientific (QIAGEN). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando Big Dye® Terminator (Applied Biosystems) para marcação dos nucleotídeos e as etapas de precipitação foram realizadas com EDTA/etanol. O sequenciamento dos genes foi realizado em colaboração com a Rede Plataformas Tecnológicas, subunidade de sequenciamento de DNA da Fiocruz, no sequenciador automático ABI PRISM 3730.

Os fragmentos amplificados das cepas P4344 (O-acetilada) e P4400 (de-O-acetilada) foram sequenciados para a determinação das bases moleculares da acetilação do polissacarídeo da *N. meningitidis* sorogrupo C. As ferramentas de bioinformática permitiram a diferenciação entre as cepas O-acetilada e de-O-acetilada e a comparação desta região com as demais cepas de origem clínica. O alinhamento das sequências com o *software Bioedit*

(ClustalW) e a tradução das sequências de nucleotídeos para proteína pela plataforma *Transeq* foram fundamentais na distinção entre os PSC OAc+ e OAc-. Por meio da análise de regiões variáveis na sequência de aminoácidos, foram sugeridas quais cepas de origem clínica eram O-acetiladas e quais eram de-O-acetiladas. A árvore filogenética foi construída através do *software* SplitsTree.

Como última análise, foi realizada a correlação entre cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas com os CC e a averiguação da seleção das linhagens hipervirulentas após o período de vacinação.

### 3.5 Perfil epidemiológico das cepas de *N. meningitidis*

#### 3.5.1 Tipificação molecular

Com o objetivo de analisar dados de um grupo representativo de cepas identificadas como *N. meningitidis* sorogrupo C, o método escolhido para a tipificação molecular e consequente determinação do perfil clonal foi o *Multilocus Sequence Typing* (MLST), descrito em <http://pubmlst.org/neisseria>. Os sete genes constitutivos analisados para a determinação dos tipos sequenciais e alocação dos isolados em CC são: *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC*, *pgm*. Os iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento dos sete genes são apresentados na **tabela 8**. Os protocolos estão descritos em [pubmlst.org/neisseria](http://pubmlst.org/neisseria).

A reação de PCR foi realizada com volume total de 25 µL, contendo 5 µL de DNA (40-50 ng/µL), 12,5 µL de mastermix universal GoTaq® (Promega) e 1 µL (50 pmol/µL) de cada iniciador. Os produtos de PCR foram purificados com o kit FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, as reações de sequenciamento foram realizadas utilizando Big Dye® Terminator (Applied Biosystems) para marcação dos nucleotídeos e as etapas de precipitação foram realizadas com EDTA/etanol. O sequenciamento dos genes foi realizado em colaboração com a Rede Plataformas Tecnológicas, subunidade de sequenciamento de DNA da Fiocruz, no sequenciador automático ABI PRISM 3730.

As sequências obtidas foram comparadas com as existentes no banco de dados de MLST para o gênero *Neisseria* (<http://pubmlst.org/neisseria/>). Com a análise do perfil alélico foi possível avaliar a prevalência dos CC no período de 2007 a 2016. Novos ST que não haviam sido descritos anteriormente foram sugeridos ao banco.

Tabela 9 - Iniciadores utilizados no MLST.

Gene	Nome do iniciador	Sequência (5'-3')'	Tamanho do amplicon
<i>abcZ</i>	abcZ-P1C	TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC	900pb
	abcZ-P2C	TCCCCGTCGTAAAAACAATC	
	abcZ-S1	AATCGTTTATGTACCGCAGR	Sequenciamento
	abcZ-S2	GAGAACGAGCCGGGATAGGA	
<i>adk</i>	adk-P1B	CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC	800pb
	adk-P2B	TGCCCAATGCGCCCAATAC	
	adk-S1	AGGCWGGCACGCCCTTGG	Sequenciamento
	adk-S2	CAATACTTCGGCTTTCACGG	
<i>aroE</i>	aroE-P1B	TTTGAAACAGGCGGTTGCGG	900pb
	aroE-P2B	CAGCGGTAATCCAGTGCGAC	
	aroE-S1	GCGGTCAAYACGCTGRTK	Sequenciamento
	aroE-S2	ATGATGTTGCCGTACACATA	
<i>fumC</i>	fumC-P1B	TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG	900pb
	fumC-P2B	GCCCGTCAGCAAGCCCAAC	
	fumC-S1	TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG	Sequenciamento
	fumC-S2	TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC	
<i>Gdh</i>	gdh-P1B	CTGCCCCCGGGTTTTTCATCT	700pb
	gdh-P2B	TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG	
	ghh-S3	CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC	Sequenciamento
	gdh-S4C	RCGCACGGATTCATRYGG	
<i>pdhC</i>	pdhC-P1B	CCGGCCGTACGACGCTGAAC	800pb
	pdhC-P2B	GATGTCCGAATGGGGCAAACA	
	pdhC-S1	TCTACTACATCACCCCTGATG	Sequenciamento
	pdhC-S2	ATCGGCTTTGATGCCGTATTT	
<i>pgm</i>	pgm-P1	CTTCAAAGCCTACGACATCCG	1.000pb
	pgm-P2	CGGATTGCTTTCGATGACGGC	
	pgm-S1	CGGCGATGCCGACCGCTTGG	Sequenciamento
	pgm-S2A	GGTGATGATTTTCGGTYGCRCC	

pb: pares de bases, K= G ou T, R= A ou G, W= A ou T, Y= C ou T.

Fonte: pubmlst.org/neisseria.

### 3.5.2 Análise das proteínas de membrana externa

Para a determinação do perfil antigênico e conhecimento epidemiológico, as proteínas de membrana externa (OMP) analisadas foram *Porin A* (PorA), *Ferric enterobactin*

*transport protein* (FetA), *factor H binding protein* (fHbp), *Neisseria adhesin A* (NadA) e *Neisseria heparin-binding antigen* (NHBA). Os iniciadores utilizados nas reações de PCR estão descritos na **tabela 9**.

A purificação dos produtos da PCR foi realizada com kit FastAP Thermosensitive Alkaline (1U/ $\mu$ L), produzido pela Thermofisher Scientific (QIAGEN). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando Big Dye® Terminator (Applied Biosystems) para marcação dos nucleotídeos e as etapas de precipitação foram realizadas com EDTA/etanol de acordo com o protocolo Big Dye® Terminator. O sequenciamento foi realizado na Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz – subunidade de sequenciamento de DNA, no sequenciador automático ABI PRISM3730. As sequências dos genes *fetA*, *porA*, *nadA*, *NHBA* e *fHbp* foram submetidas aos respectivos bancos de dados *Neisseria FetA variable region typing*, *Neisseria PorA typing*, *NadA sequence typing*, *Neisserial Heparin Binding Antigen protein sequence typing* e *Neisseria Factor H binding protein sequence typing*, disponíveis em <http://pubmlst.org/neisseria/> para designação das variantes proteicas.

De acordo com os dados gerados foi possível classificar os perfis antigênicos correspondentes as 113 cepas de origem clínica em *Bexsero Antigen System Typing* (BAST). O BAST foi desenvolvido com o objetivo de identificar os perfis circulantes das cepas meningocócicas a partir da análise de peptídeos relativos às proteínas PorA, NHBA, NadA, fHbp. Essas proteínas são componentes da vacina Bexsero (GSK) e, de acordo com alguns autores, essa vacina pode ser imunogênica a outros sorogrupos, como o C, alvo do nosso estudo. Desta forma, pelo pubmlst.org foi possível não só classificar os perfis, como também sugerir novas combinações de acordo com o conjunto das quatro proteínas, e assim, adicionar novos números de BAST.

Tabela 10 - Iniciadores utilizados na PCR para detecção das variantes das proteínas de membrana externa.

Gene	Nome do iniciador-Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>porA</i>	210 -ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTC 211-AATGAAGGCAAGCCGTCAAAAACA 122L-GGCGAGATTCAAGCCGCC*	1.200	URWIN, 2001
<i>fetA</i>	S1-CGGCGCAAGCGTATTCGG S8-TTCAACTTCGACAGCCGCCTT S15-TTGCAGCGCGTCRTACAGGCG*	1.200	URWIN, 2001
<i>nadA</i>	nadAF-TCGACGTCCTCGATTACGAAGGC nadaR-TGGCTGTGGTCAGTACTTTGGATGG	1.150	BIDMOS et al., 2011
<i>NHBA</i>	nhbaF-GGCGTTCAGACGGCATATTTTTACA nhbaR-GGTTTATCAACTGATGCGGACTTGA	1.800	JACOBSSON et al., 2006
<i>fHbp</i>	A1a-GACCTGCCTCATTGATG B2a-CGGTAAATTATCGTGTTCCGGACGGC	1.000	MASIGNANI et al., 2003

\* Iniciadores utilizados para o sequenciamento. Para *nadA*, *NHBA* e *fHbp*, os mesmos iniciadores da PCR foram utilizados no sequenciamento.

Fonte: Urwin, 2001; Bidmos et al, 2011; Jacobson et al., 2006; Massignani et al., 2003

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Confirmação de espécie e sorogrupo

As 113 cepas de origem clínica foram certificadas como *N. meningitidis* sorogrupo C pela detecção dos genes *nspA* e *siaD*, respectivamente. A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

### 4.2 Imunoquímica

#### 4.2.1 SDS-PAGE e *Imunoblotting*

Não foi possível obter resultados referentes à técnica de *imunoblotting*. Essa técnica é um processo de interação antígeno-anticorpo, onde, em geral, são detectadas proteínas específicas de baixo peso molecular pela visualização de bandas na membrana de PVDF ou nitrocelulose. Apesar de ser utilizado em larga escala para detecção de proteínas, alguns protocolos foram estabelecidos utilizando-se polissacarídeos bacterianos (TIKKANEN et al., 1996, KILCOYNE et al., 2006), o que impulsionou o desenvolvimento deste método no presente estudo.

Tentativas de otimização do protocolo foram realizadas, como a não utilização de SDS na composição do gel, regulagem na potência da eletroforese e diferentes gradientes do gel, de 5% a 20%. No entanto, tais modificações não foram suficientes para a detecção das amostras. Notou-se que, possivelmente, os polissacarídeos não penetraram no gel ou não houve transferência das amostras do gel para a membrana. Ainda assim, foi realizada coloração da membrana com nitrato de prata, que comprovou a falta de sinal referente à amostra.

#### 4.2.2 ELISA

##### 4.2.2.1 Titulação dos anticorpos monoclonais e anticorpo secundário

O teste de titulação por ELISA demonstrou que a melhor concentração de uso (DO~1,0) do anticorpo monoclonal 1705.18 (MAB+) e do anticorpo monoclonal 2016.3 (MAB-) foi 12 µg/mL, utilizando na reação os PSCs a 1mg/mL (**Tabela 10**).

Para a titulação do anticorpo secundário, seguiu-se a recomendação do fabricante: 1 µg/mL.

Tabela 11 - Titulação dos anticorpos monoclonais, utilizando PSC a 1mg/mL.

Titulação do MAB+ com PSC OAc+	DO	Titulação do MAB- com PSC OAc-	DO
<b>MAB + (12 µg/mL)</b>	<b>1,10</b>	<b>MAB - (12 µg/mL)</b>	<b>0,97</b>
MAB + (6 µg/mL)	1,02	MAB - (6 µg/mL)	0,79
MAB + (3 µg/mL)	0,94	MAB - (3 µg/mL)	0,77
MAB + (1,5 µg/mL)	0,71	MAB - (1,5 µg/mL)	0,45
PSC Hib (12 µg/mL)	0,51	PSC Hib (12 µg/mL)	0,62

PSC, polissacarídeo capsular; OAc-, de-O-acetilado; OAc+, O-acetilado; MAB-, anticorpo monoclonal com ligação ao polissacarídeo de-O-acetilado; MAB+, anticorpo monoclonal específico ao polissacarídeo O-acetilado; DO, densidade óptica; PSC Hib, polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* utilizado como controle negativo; negrito, melhor DO com 12µg/mL de MAB.

Fonte: Do autor, 2019.

#### 4.2.2.2 ELISA whole-cell

A partir da titulação dos componentes da reação foi realizado o teste de reação cruzada, em especial para o MAB+, já que o MAB- reage a ambos os PSCs. A **tabela 11** demonstra os ensaios realizados com os dois PSCs e MABs em diferentes concentrações. O MAB- pode reagir a ambos os PSCs: com o PSC OAc+ apresentou DO = 1,10 e com o PSC OAc- apresentou DO = 0,85. O MAB+ deve ter afinidade apenas ao PSC OAc+ apresentando DO = 0,77 com esse anticorpo, no entanto, o MAB+ com o PSC- resultou em DO = 0,69. A inespecificidade do MAB+ somente ao PSC OAc+ não garantiu a exatidão dos resultados. A descrição de valores de DO refere-se à concentração de 12µg/mL dos MABs.

Tabela 12 - Reação cruzada entre polissacarídeos O-acetilado e de-O-acetilado com anticorpos monoclonais em diferentes concentrações de uso.

Ensaio com MAb+	DO	Ensaio com MAb-	DO
<b>PSC OAc+ MAb+ (12 µg/mL)</b>	<b>0,77</b>	PSC OAc- MAb- (12 µg/mL)	0,85
PSC OAc+ MAb+ (6 µg/mL)	0,70	PSC OAc- MAb- (6 µg/mL)	0,85
PSC OAc+ MAb+ (3 µg/mL)	0,68	PSC OAc- MAb- (3 µg/mL)	0,52
<b>PSC OAc- MAb+ (12 µg/mL)</b>	<b>0,69</b>	PSC OAc+ MAb- (12 µg/mL)	1,10
PSC OAc- MAb+ (6 µg/mL)	0,52	PSC OAc+ MAb- (6 µg/mL)	1,05
PSC OAc- MAb+ (3 µg/mL)	0,34	PSC OAc+ MAb- (3 µg/mL)	0,44
PSC Hib MAb+ (12 µg/mL)	0,52	PSC Hib MAb- (12 µg/mL)	0,28
PSC Hib MAb+ (3 µg/mL)	0,45	PSC Hib MAb- (3 µg/mL)	0,21

PSC, polissacarídeo capsular; OAc-, de-O-acetilado; OAc+: O-acetilado; MAb-, anticorpo monoclonal com ligação ao polissacarídeo de-O-acetilado; MAb+, anticorpo monoclonal específico ao polissacarídeo O-acetilado; DO, densidade óptica; PSC Hib, polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* utilizado como controle negativo. Negrito: inespecificidade do MAb+ aos PSCs.

Fonte: Do autor, 2019.

Os PSCs isolados e as cepas vacinais inativadas foram avaliados quanto à especificidade de reação aos dois MAb disponíveis. Algumas combinações com os PSCs, as cepas vacinais e os MAb foram realizadas a fim de se determinar qual melhor antígeno para o ensaio (PSC isolado ou cepa vacinal inativada), conforme os valores de DO. A **tabela 12** compara os dois MAb ao PSC OAc+, PSC OAc- e cepas vacinais: o MAb- com o PSC OAc- ou a cepa de-O-acetilada apresentou resultados esperados (DO=0,76 e DO=1,06, respectivamente). No entanto, a especificidade esperada do MAb+ não foi observada: a reação MAb+ com a cepa P4344 (O-acetilado) apresentou alto baixo de DO (0,39), assim como com a cepa P4400 (de-O-acetilada) que deveria apresentar inespecificidade demonstrou DO=0,38. Assim, o MAb+ não se revelou um bom marcador para os ensaios imunoenzimáticos na detecção de cepas de-O-acetiladas. Os controles MAb+ e MAb- com o PSC de *H. influenzae* permaneceram com DO = 0,34 e 0,14, respectivamente.

Tabela 13 - Especificidade de ligação dos PSC e cepas vacinais inativadas (P4344 e P4400) aos MAb.

Combinações PSC e MAb	DO
PSC OAc- e MAb+	0,53
PSC OAc- e MAb-	0,76
<b>P4344 e MAb+</b>	<b>0,39</b>
P4344 e MAb-	1,20
<b>P4400 e MAb+</b>	<b>0,38</b>
P4400 e MAb-	1,06
PSC Hib e MAb+	0,34
PSC Hib e MAb-	0,14

PSC, polissacarídeo capsular; OAc-, de-O-acetilado; OAc+, O-acetilado; MAb, anticorpo monoclonal; MAb-, anticorpo monoclonal com ligação ao polissacarídeo de-O-acetilado; MAb +, anticorpo monoclonal específico ao polissacarídeo O-acetilado; DO, densidade óptica; P4344, cepa inativada com o polissacarídeo O-acetilado; P4400, cepa inativada com o polissacarídeo de-O-acetilado; PSC Hib, polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* utilizado como controle negativo. Negrito: inespecificidade do MAb+ aos PSCs.

Fonte: Do autor, 2019.

Para a determinação da acetilação do PSC com a célula inativada por ELISA *whole-cell* foi utilizado como controle de-O-acetilado a cepa P4400. Foram avaliadas 21 cepas com os dois anticorpos disponíveis (MAb+ e MAb-) com o objetivo de determinar a melhor ligação a cada um deles. Não foi possível inferir certeza nos resultados já que o MAb+ não apresentou especificidade ao PSC OAc+, aqui representado pela P4344 (**Tabela 13**). Apesar do MAb- apresentar alto valor de DO frente às cepas testada, sendo sugerido um grande potencial para a de-O-acetilação, o mesmo não garante a especificidade somente a cepas de-O-acetiladas, e sim, a cepas que apresentem as duas conformações do polissacarídeo quanto à presença e ausência do grupamento O-acetil.

Tabela 14 - Total de cepas analisadas por ELISA *whole-cell* para determinação da de-O-acetilação.

Cepas	MAb-	MAb+
P4400*	1,06	0,38
P3297	1,08	0,51
P3292	0,93	0,25
P3307	1,11	0,15
P3289	0,70	0,16
P3293	0,92	0,12
P3300	0,79	0,17
P3303	0,75	0,11
P3365	0,90	0,11
P3369	0,70	0,15
P3554	0,98	0,14
P3475	0,95	0,15
P3478	0,84	0,15
P3479	0,97	0,12
P3480	0,96	0,23
P3076	1,11	0,89
P3712	0,89	0,63
P4005	0,98	0,61
P4007	1,18	0,27
P4030	1,18	0,19
P4032	0,95	0,72
P4072	0,77	0,35

\*Cepa utilizada como referência do polissacarídeo de-O-acetilado; MAb+, anticorpo monoclonal específico à cepas O-acetiladas. MAb-, anticorpo monoclonal com ligação às cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas. Valores em DO.

Fonte: Do autor, 2019.

#### 4.2.2.3 ELISA *sanduíche*

A titulação do anticorpo de captura (soro padrão humano) foi 20 µg/mL, o anticorpo anti-polissacarídeo C do meningococo apresentou melhor diluição em 1:2.000 e o polissacarídeo na concentração de 10 µg/mL (APÊNDICE C).

Para a detecção dos PSC isolados frente aos MAbs, seria necessária a produção do meningococo em larga escala, aproximadamente 10 litros de suspensão bacteriana em meio de cultura líquido e assim, tentar o isolamento do PSC com uma massa significativa para os

métodos seguintes de ELISA sanduíche. Desta forma, a produção de um grande volume de suspensão bacteriana de 21 cepas de origem clínica seria inviável, pois seria necessária infraestrutura para produção em larga escala, o que dificultou o desenvolvimento do protocolo.

### 4.3 Análise do gene *oatC*

A sequência correspondente ao gene *oatC* da cepa vacinal cedida por Bio-Manguinhos e depositada na Coleção de Pesquisa do INCQS como P4344, foi alinhada à sequência da cepa O-acetilada depositada no banco de dados *GenBank* sob o código AJ243686.2 (CLAUS et al., 2004). O alinhamento permitiu verificar que as duas sequências apresentaram 100% de similaridade, confirmando a cepa P4344 como O-acetilada, conforme esperado (**Figura 9**). A presença de tratos homopoliméricos (isto é, repetições seguidas de um mesmo nucleotídeo) é uma característica associada a determinadas regiões do gene *oatC*.

Figura 9 - Sequências das cepas O-acetiladas.

	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
P4344 (oac+)	AGCTAAGTGAATATTTCAATGAAAAATCAGATATTAAGATTTTTTTATTTTTGAAATTTTGGCTGAATGCTATTTTCTGCAAAATGACCTT									
HClaus	AGCTAAGTGAATATTTCAATGAAAAATCAGATATTAAGATTTTTTTATTTTTGAAATTTTGGCTGAATGCTATTTTCTGCAAAATGACCTT									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
P4344 (oac+)	CTCAACAAAAGAAAAAGATTTCAAACCTACGCATTATTGCCTATATCCAATTAAGAAAAAGTATTTTAAGGCATATAATAACCTGAAATTACTCA									
HClaus	CTCAACAAAAGAAAAAGATTTCAAACCTACGCATTATTGCCTATATCCAATTAAGAAAAAGTATTTTAAGGCATATAATAACCTGAAATTACTCA									

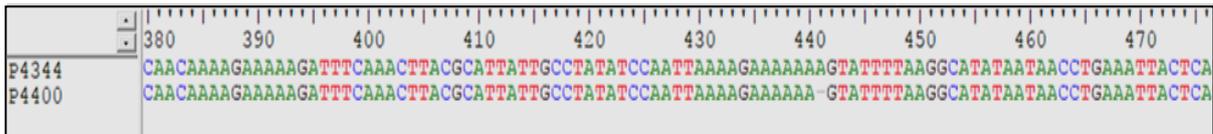
Notar a presença do trato homopolimérico em 212-224 pb e 455-466 pb da sequência de nucleotídeos. P4344 = cepa vacinal O-acetilada; HClaus = cepa O-acetilada depositada no *Genbank* com o código de acesso AJ243686.2.

Fonte: Do autor, 2019.

A análise do gene *oatC* permitiu a detecção de diferenças nos padrões vacinais O-acetilado e de-O-acetilado, sendo estas posteriormente comparadas às sequências *oatC* das cepas de origem clínica. Possíveis combinações nos tratos homopoliméricos podem influenciar a acetilação e a de-O-acetilação do PSC. A região 212-224 pb pode apresentar um trato homopolimérico de 12 ou 13 timinas separadas por uma adenina, representada por (T)<sub>7</sub>A(T)<sub>5</sub> e (T)<sub>8</sub>A(T)<sub>5</sub>, esta última observada apenas em uma cepa. A região 455-466 pb pode apresentar um trato homopolimérico de 10 ou 11 adeninas separadas por uma guanina, representada por (A)<sub>4</sub>G(A)<sub>6</sub> ou (A)<sub>4</sub>G(A)<sub>7</sub> (**Figura 10**). As combinações nos tratos homopoliméricos deste estudo e as propostas por Claus et al (2004) para cepas O-acetiladas e

de-O-acetiladas estão apresentadas na **tabela 14**. A deleção de uma adenina no trato homopolimérico, já evidenciada por esses autores foi confirmada neste estudo, garantida por repetições no sequenciamento e pela boa qualidade do cromatograma (**Figura 11**). No entanto, uma cepa com características para O-acetilação apresentou (T)<sub>8</sub> na região 216-224 e (A)<sub>7</sub> na região 459-466, o que descaracteriza essa combinação como possível marcador de cepas de-O-acetiladas.

Figura 10 - Deleção encontrada na posição 441 da cepa de-O-acetilada P4400.



Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 15 - Tratos homopoliméricos presentes nas cepas estudadas e comparação ao proposto por Claus et al. (2004).

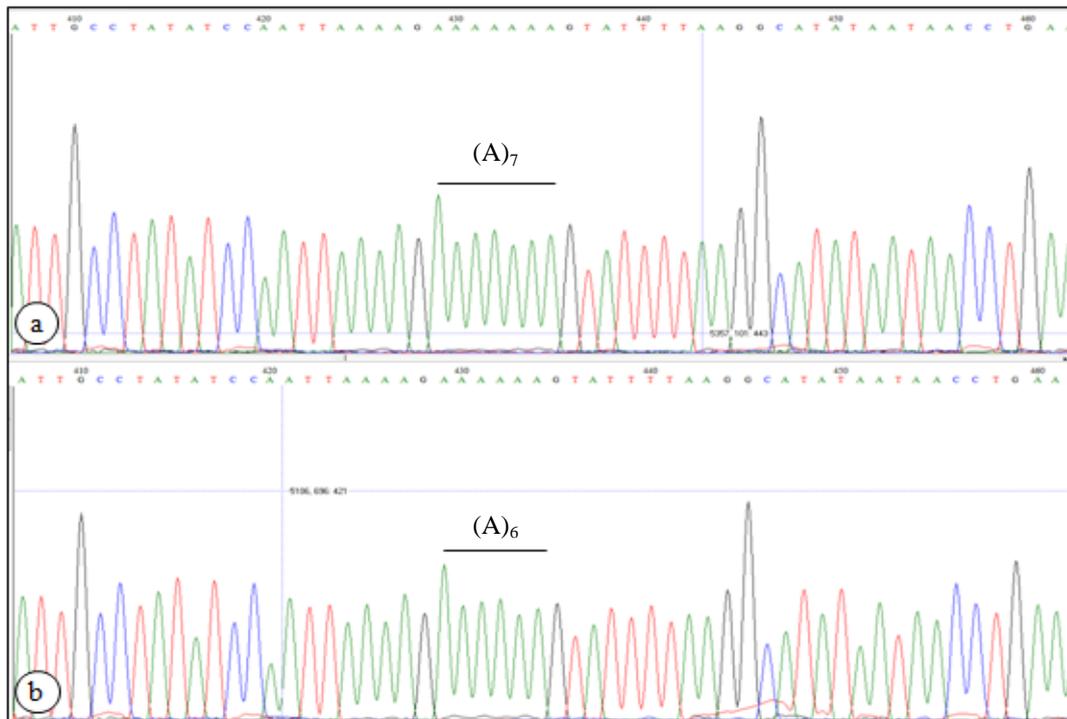
Meningococo sorogrupo C	Nº de isolados	Posição 216-224	Posição 458-466	
De-O-acetilado	Este estudo	1	(T) <sub>7</sub>	(A) <sub>6</sub>
		7	(T) <sub>7</sub>	(A) <sub>6</sub>
	Claus et al (2004)	1	(T) <sub>7</sub>	(A) <sub>8</sub>
		1	(T) <sub>6</sub>	(A) <sub>7</sub>
		1	(T) <sub>8</sub>	(A) <sub>7</sub>
O-acetilado	Este estudo	51	(T) <sub>7</sub>	(A) <sub>7</sub>
		1	(T) <sub>8</sub> *	(A) <sub>7</sub> *
	Claus et al (2004)	14	(T) <sub>7</sub>	(A) <sub>7</sub>
		2	(T) <sub>2</sub> C(T) <sub>4</sub>	(A) <sub>7</sub>

\* = nova combinação proposta neste estudo para cepas O-acetiladas.

Negrito: deleções previamente descritas por Claus et al (2004) também foram evidenciadas neste estudo.

Fonte: Do autor, 2019.

Figura 11 - Cromatograma das cepas O-acetilada (a) e de-O-acetilada (b).



**a.** Região poli A (A)<sub>7</sub> na cepa O-acetilada, **b.** Região poli A (A)<sub>6</sub> na cepa de-O-acetilada.  
Fonte: Do autor, 2019.

Após o estabelecimento da análise referente às cepas vacinais, as cepas de origem clínica foram sequenciadas. O trato homopolimérico da cepa P3297, na região 458-466, apresentou a deleção de um nucleotídeo (adenina) assim como observado em P4400, referência para de-O-acetilação. A cepa P3297 foi isolada em 2009, com procedência da Bahia.

A partir da sequência de nucleotídeos traduzida para aminoácidos, foi realizada uma nova análise com 52 cepas de origem clínica, utilizando as duas cepas vacinais como padrões de acetilação. Através do *website Transeq* foi possível traduzir a sequência de nucleotídeos em aminoácidos. O alinhamento com o *software Bioedit* permitiu analisar as sequências de aminoácidos das cepas selecionadas. Observou-se, nas cepas de referência P4344 e P4400 três regiões com divergências nas sequências de aminoácidos, denominadas neste estudo de regiões variáveis (RV). As três regiões (RV1, RV2 e RV3) possivelmente estão envolvidas na acetilação/desacetilação do polissacarídeo. O alinhamento das sequências de aminoácidos das demais cepas vacinais com as cepas de origem clínica mostrou que, algumas dessas cepas apresentavam a sequência de aminoácidos similar à cepa O-acetilada e outras com similaridade à cepa de-O-acetilada (**Figura 12**). A cepa P4400 apresentou três RV. As cepas

de origem clínica que possivelmente apresentem o polissacarídeo de-O-acetilado devem ter, ao menos, uma das RV. Assim, foi possível inferir, pela presença das RV, o predomínio de cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas no Brasil. De um total de 52 cepas de origem clínica, sete apresentaram RV1, oito apresentaram RV2, 11 apresentaram RV3, uma apresentou RV1 + RV2, uma apresentou RV1+RV3, duas apresentaram RV2+RV3 e cinco apresentaram RV1 + RV2 + RV3 (**Figura 13**).

A presença das RV levou a investigação das sequências de nucleotídeos e foi observado nas cepas com RV a presença de deleções e/ou inserções de nucleotídeos em diferentes posições, o que justifica a distinção da proteína oatC em regiões variáveis (**Tabela 15**). Deleções e inserções de nucleotídeos sugerem o rearranjo das regiões codificadoras (códon). A adição ou deleção de um único par de bases de DNA muda a matriz de leitura do restante do processo de tradução, a partir do sítio de mutação do par de bases até o próximo códon na nova matriz de leitura. Essas modificações, chamadas de mudanças de matriz de leitura interferem na sequência de aminoácidos seguintes ao sítio mutante, que se torna completamente diferente da proteína original. É evidente que essa mudança afeta totalmente a função da proteína codificada por aquele gene. Este estudo demonstra, pela primeira vez, como a análise da matriz de leitura dos aminoácidos pode indicar a estrutura química do polissacarídeo do meningococo.

Foi realizada a análise pelo *software SplitsTree* gerando uma “árvore filogenética em rede não enraizada” (do inglês, *Unrooted Phylogenetic Network*), sendo possível avaliar a distância evolutiva entre as cepas O-acetilada e de-O-acetilada, novamente utilizando P4344 e P4400 como referências. Ao analisar a árvore, observou-se que as cepas O-acetiladas, isto é, que não apresentaram as RV, encontram-se reunidas na base da árvore, sugerindo um ponto de origem, enquanto que as cepas de-O-acetiladas estão agrupadas de acordo com as RV (**Figura 14**).

O grupo compreendido pelas cepas clínicas P4007, P3076, P4005 e P3712 além da cepa de referência 4400, apesar de apresentarem diferentes combinações de RV, seguiram um padrão de distanciamento das cepas O-acetiladas, mas sem desvio do campo central sugerindo apenas divergência das sequências. A presença concomitante de RV1+RV2+RV3, apesar de se apresentar no eixo central da árvore, demonstra uma característica marcante de cepas de-O-acetiladas, já que possuem o mesmo padrão da P4400. No entanto, as cepas clínicas P4133, P3584, P3297, P3283 e P3480, além de distâncias variáveis do grupo de cepas O-acetiladas,

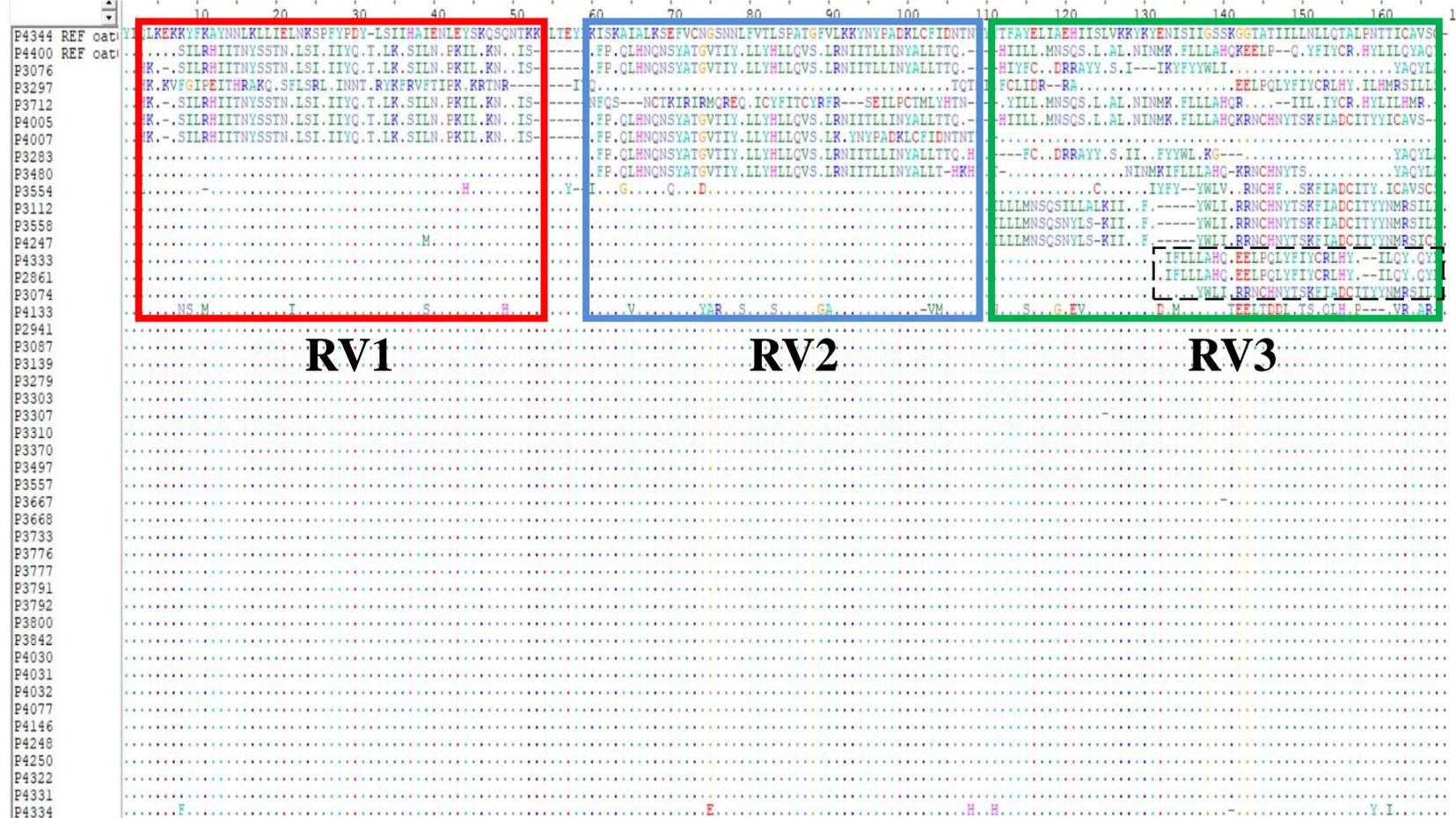
apresentaram um desvio acentuado do ramo principal sugerindo uma possível diferenciação populacional desse grupo de cepas de-O-acetiladas (**Figura 14**).

As cepas que apresentaram RV3 parcial (P3558, P4247 e P3112) ficaram separadas das cepas O-acetiladas na análise filogenética e apresentaram um desvio do eixo principal acentuado e bem anterior aos outros. Além disso, a presença de inserções e deleções ratifica a RV3 parcial como um marcador, justificando sua classificação como de-O-acetiladas. Apesar disso, três cepas de origem clínica (P2861, P3074 e P4333) também apresentaram apenas parte da RV3, mas não foram consideradas como de-O-acetiladas, pois não foi possível determinar deleções ou inserções de nucleotídeo responsáveis pelo polimorfismo da proteína naquela região (representado por retângulo tracejado na **Figura 12**). A **tabela 16** apresenta as características da de-O-acetilação baseadas na presença, ausência e presença parcial das regiões variáveis (RV1, RV2 e RV3) da sequência de aminoácidos de cepas de referência O-acetilada (P4344), de-O-acetilada (P4400) e das 52 cepas de origem clínica.

De acordo com a análise da sequência do gene *oatC*, de um total de 52 cepas de origem clínica, 12 foram classificadas como de-O-acetiladas, isto é, 23% do total analisado. Este resultado tem um valor significativo, por ser o primeiro a descrever a presença de cepas de-O-acetiladas no Brasil e por apresentar um valor acima da média de cepas de-O-acetilada nos EUA (15%) e Reino Unido (12%), únicos países onde essa análise foi realizada. A partir da análise molecular, é sugerido que cepas de-O-acetiladas possam estar em circulação no Brasil.

A de-O-acetilação não se relaciona à introdução da MenC no Brasil, pois foi observada a presença dessas cepas nos dois períodos analisados. Isso significa que a administração da vacina não interferiu na modificação estrutural do polissacarídeo, que se apresenta de-O-acetilado, pelo menos, a partir de 2007. Fica evidente, a necessidade do acompanhamento e análise do gene *oatC* de um número maior de isolados de *N. meningitidis*. Foram avaliadas cepas de quatro estados brasileiros (Bahia, Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro).

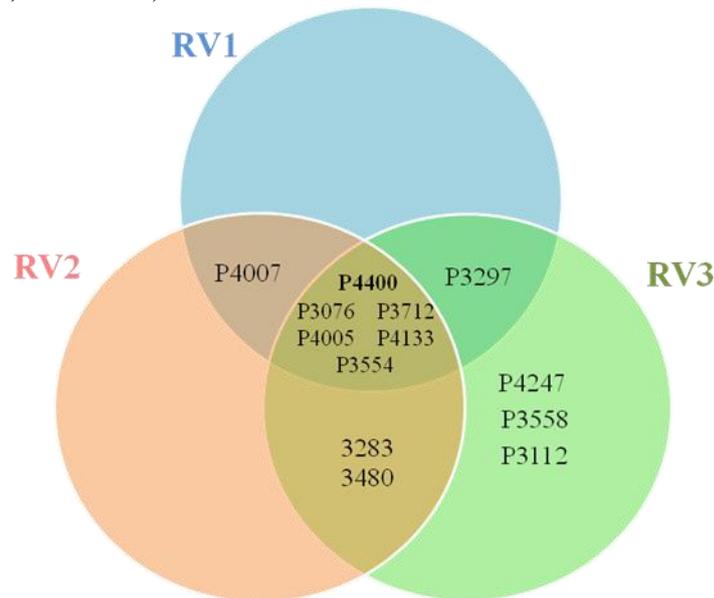
Figura 12 - Alinhamento das cepas de referência (P4344 e P4400) com cepas de origem clínica pelo software *Bioedit*.



Similaridade da P4400 com as cepas de origem clínica permitiu a determinação de três regiões (RV1, RV2, RV3). Linhas pontilhadas: similaridade ao padrão O-acetilado P4344. Retângulo tracejado: cepas com parte de RV3 com resultado inconclusivo.

Fonte: Do autor, 2019.

Figura 13 - Distribuição das 12 cepas de-O-acetiladas de acordo com a presença das regiões variáveis (RV1, RV2 e RV3).



Em negrito, a cepa de referência de-O-acetilada (P4400) apresenta as três regiões variáveis.  
Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 16 - Presença de deleções e inserções nas cepas de-O-acetiladas e a consequente presença de RV.

Cepas de-O-acetiladas	Deleções						Inserções		Presença de RV
	92pb	135pb	177pb	397pb	565pb	714pb	102pb	133pb	
P4400		X		X	X	X			1+2+3
P3076				X	X	X	X		1+2+3
P3712	X	X		X	X	X			1+2+3
P4005	X			X	X	X			1+2+3
P4133	X		X						1+2+3
P3554	X								1+2+3
P4007				X	X			X	1+2
P3297				X		X		X	1+3
P3283					X	X		X	2+3
P3480					X	X		X	2+3
P3558						X		X	3
P4247						X		X	3
P3112		X				X			3

Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 17 - Presença, ausência e presença parcial das regiões variáveis (RV1, RV2 e RV3) da sequência proteica de cepas de referência O-acetilada (P4344), de-O-acetilada (P4400) e das cepas de origem clínica. (continua)

Cepa	Ano	RV 1	RV 2	RV 3	oatC	CC
P4344	2014	-	-	-	+	NA
<b>P4400</b>	<b>2014</b>	+	+	+	-	<b>11</b>
P2861	2007	-	-	/	?	32
P2941	2007	-	-	-	+	NA
P3074	2008	-	-	/	?	NA
<b>P3076</b>	<b>2008</b>	+	+	+	-	<b>103</b>
P3087	2008	-	-	-	+	11
P3100	2008	-	-	-	+	NA
<b>P3112</b>	<b>2008</b>	-	-	+	-	<b>11</b>
P3139	2008	-	-	-	+	103
P3279	2008	-	-	-	+	NA
<b>P3283</b>	<b>2008</b>	-	+	+	-	<b>103</b>
<b>P3297</b>	<b>2009</b>	+	-	+	-	<b>11</b>
P3303	2009	-	-	-	+	11
P3307	2009	-	-	-	+	11
P3310	2009	-	-	-	+	32
P3369	2009	-	-	-	+	NA
P3370	2009	-	-	-	+	NA
<b>P3480</b>	<b>2009</b>	-	+	+	-	<b>103</b>
P3497	2009	-	-	-	+	NA
<b>P3554</b>	<b>2010</b>	/	/	/	-	<b>NA</b>
P3557	2010	-	-	-	+	NA
<b>P3558</b>	<b>2010</b>	-	-	+	-	<b>NA</b>
P3637	2010	-	-	-	+	32
P3668	2010	-	-	-	+	NA
<b>P3712</b>	<b>2010</b>	+	+	+	-	<b>NA</b>
P3733	2010	-	-	-	+	NA
P3766	2010	-	-	-	+	32
P3776	2010	-	-	-	+	NA
P3777	2010	-	-	-	+	NA
P3791	2011	-	-	-	+	103
P3792	2011	-	-	-	+	103
P3800	2011	-	-	-	+	103
P3842	2011	-	-	-	+	103
<b>P4005</b>	<b>2012</b>	+	+	+	-	<b>103</b>
<b>P4007</b>	<b>2012</b>	+	+	-	-	<b>103</b>
P4030	2012	-	-	-	+	103
P4031	2012	-	-	-	+	103
P4032	2012	-	-	-	+	103
P4072	2012	-	-	-	+	103

Tabela 18 - Presença, ausência e presença parcial das regiões variáveis (RV1, RV2 e RV3) da sequência proteica de cepas de referência O-acetilada (P4344), de-O-acetilada (P4400) e das cepas de origem clínica. (conclusão)

<b>Cepa</b>	<b>Ano</b>	<b>RV 1</b>	<b>RV 2</b>	<b>RV 3</b>	<b>oatC</b>	<b>CC</b>
P4073	2012	-	-	-	+	103
P4077	2012	-	-	-	+	103
<b>P4133</b>	<b>2012</b>	/	/	/	-	<b>103</b>
P4146	2012	-	-	-	+	NA
<b>P4247</b>	<b>2013</b>	-	-	+	-	<b>NA</b>
P4248	2013	-	-	-	+	103
P4250	2013	-	-	-	+	103
P4322	2013	-	-	-	+	103
P4331	2013	-	-	-	+	103
P4333	2013	-	-	/	?	103
P4334	2013	-	-	-	+	103
P4335	2013	-	-	-	+	103
P4336	2013	-	-	-	+	103
P4338	2014	-	-	-	+	103

RV1, RV 2 e RV3: regiões variáveis 1, 2 e 3; oatC +: polissacarídeo O-acetilado, oatC -: polissacarídeo de-O-acetilado; CC: complexo clonal; +: presença, -: ausência; /: presença parcial, ?: Resultado inconclusivo. NA: ST não associado a um CC. Negrito: cepas identificadas como de-O-acetiladas pela presença de RV. Sombreado: cepas que apresentaram apenas parte da RV3 com resultado inconclusivo.

Fonte: Do autor, 2019.



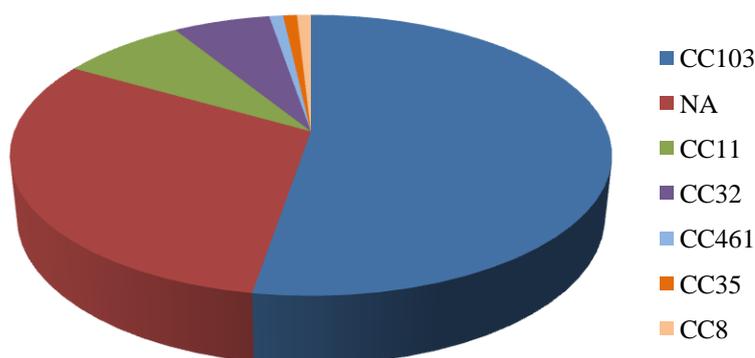
#### 4.4 Diversidade genética em *N. meningitidis*

##### 4.4.1 Tipificação por MLST

A tipificação molecular por MLST revelou que os isolados de *N. meningitidis* apresentaram-se altamente diversos. Quarenta e três diferentes ST foram identificados entre 115 isolados com perfis completos de MLST. Eles foram agrupados em seis CC diferentes: CC103, CC32, CC11, CC35, CC461, CC8 e outros ST não atribuídos a um CC, denominados “não associados”.

Complexos de linhagens hiperinvasivas foram detectados e incluíram CC11, CC103 e CC32. Os CC mais comumente representados foram CC103, com 60 isolados (52,2%) e 13 diferentes ST, seguido pelo grupo não associado com 35 isolados (30%) e 17 ST e CC11 com nove isolados (9%) e cinco ST (**Figura 15**). Sete cepas (6%) pertencem ao CC32; uma cepa pertence ao CC461 e uma ao CC35. Os dois ST mais prevalentes foram o ST-3780 (CC103) com 36 isolados e o ST-10781 (pertencente ao grupo dos não associados) com nove isolados. Três novos ST foram descritos neste estudo, com um total de cinco cepas (**Tabela 17**). ST-13600, ST-13601 e ST-14233 que apresentaram uma nova combinação de alelos, no entanto não foram associados a um CC.

Figura 15 - Distribuição dos complexos clonais entre cepas sorogrupo C.



NA, ST não associado a um complexo clonal.

Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 19 - Perfil clonal de três novos tipos sequenciais que foram sugeridos ao banco.

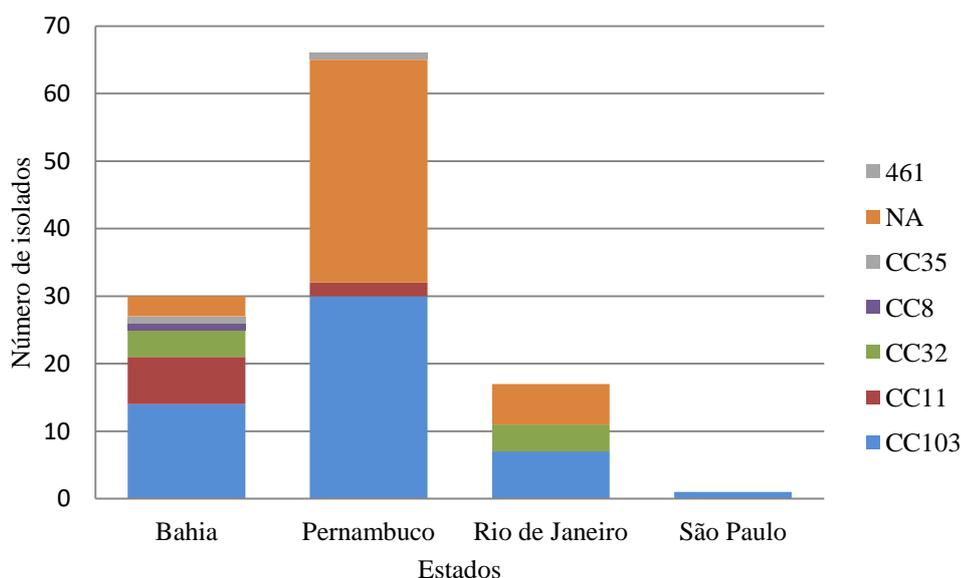
ST	<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	n°
13600	276	7	4	242	22	18	28	1
13601	276	4	9	410	5	18	340	3
14233	8	10	154	17	26	21	340	1

n, número de cepas com esse perfil clonal.

Fonte: Do autor, 2019.

Apesar da diferente proporção de isolados entre os estados avaliados, o estado da Bahia apresentou a maior diversidade de CC, enquanto que Rio de Janeiro e Pernambuco apresentaram uma distribuição similar entre o CC103 e o grupo não associado (**Figura 16**).

Figura 16 - Distribuição dos CC entre os estados brasileiros

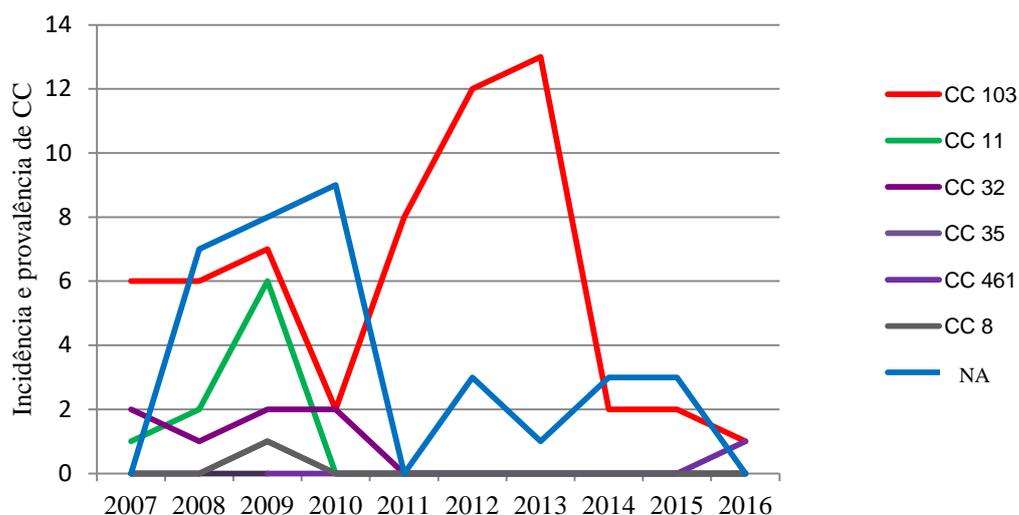


NA, ST não associado a um complexo clonal.

Fonte: Do autor, 2019.

Após o período introdutório da vacina foi possível observar o declínio dos CC11 e CC8, o aumento do CC103 e a redução da diversidade de CC (**Figura 17**). A diversidade de ST também foi influenciada pela introdução da MenC em 2010: o período pré-vacinal (2007-2010) mostrou 32 diferentes ST entre 64 cepas e o período pós-vacinal (2011-2016) apresentou 14 ST entre 50 cepas.

Figura 17 - Incidência e prevalência de CC no Brasil (2007-2016).



NA, ST não associado a um complexo clonal.

Fonte: Do autor, 2019.

A partir da análise do perfil clonal por MLST ficou evidente que a cepa P3297 (classificada como de-O-acetilada) possui o mesmo perfil alélico quando comparada a cepa padrão de-O-acetilada P4400. No entanto, isso não significou que esse perfil seja compatível apenas às cepas de-O-acetiladas, pois as cepas P3040 e P3112 possuem o mesmo perfil clonal, e de acordo com abordagem molecular são O-acetiladas. Assim, podemos sugerir que aparentemente não há uma relação entre o estado de acetilação do polissacarídeo e o perfil clonal. Nenhum isolado pertencente ao CC103 apresentou o perfil de antígeno coberto pela vacina 4CMenB. O perfil clonal das cepas O-acetilada e de-O-acetilada encontra-se na **Tabela 18**.

Tabela 20 - Comparação do perfil clonal das cepas O-acetilada P4344 e de-O-acetilada P4400.

Cepa	<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	CC
P4344	67	5	6	3	83	11	13	345	-
P4400	2	3	4	3	8	4	6	11	11

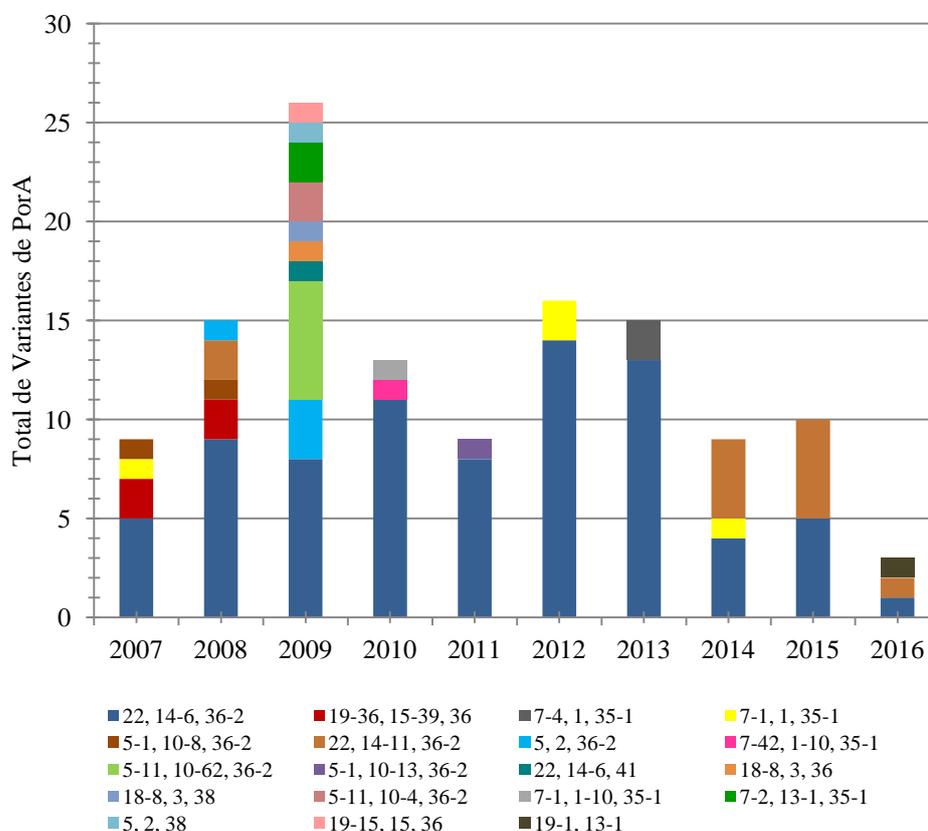
CC, complexo clonal; ST, tipo sequencial.

Fonte: Do autor, 2019.

#### 4.4.2 Análise das proteínas de membrana externa

O perfil fenotípico das OMP PorA, FetA, NadA, NHBA e fHbp demonstrou a diversidade de famílias e variantes antigênicas presentes em cepas brasileiras. A partir da análise das 113 cepas de origem clínica e de duas cepas vacinais, a proteína PorA apresentou 19 perfis antigênicos diferentes, baseados na combinação das regiões variáveis (VR) VR1, VR2 e VR3. A diversidade antigênica dentro de VR1 e VR2 foi evidenciada pela presença de 13 diferentes variantes em VR1, 17 variantes em VR2 e apenas quatro variantes em VR3. A diversidade fenotípica baseada em PorA foi reduzida pela metade após a introdução da MenC em 2010. No anos 2011, 2012, 2013 e 2015 apenas dois perfis antigênicos foram relatados (**Figura 18**). O fenótipo mais comum encontrado foi P1.22, 14-6, 36-2, presente em todos os anos estudados, totalizando 68% do total dos isolados. O perfil P1.7-2, 4, coberto pela vacina 4CMenB foi encontrado em duas cepas da Bahia em 2009. Esses isolados predominaram no período pré vacinal e pertencem aos CC35 e CC11, respectivamente.

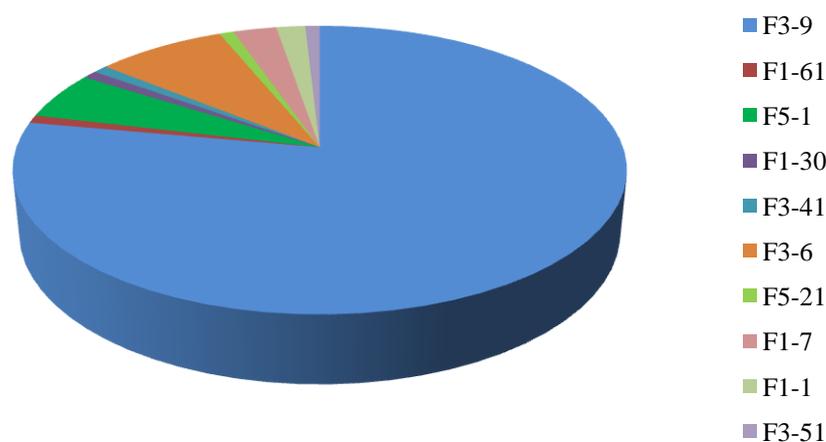
Figura 18 - Frequência das variantes da proteína PorA entre as cepas avaliadas



Fonte: Do autor, 2019.

A análise da proteína fetA evidenciou a presença de 10 variantes entre as cepas estudadas, com alta prevalência do epítopo F3-9 (76%). Os epítopos F1-61, F5-1, F1-30, F3-41, F3-6, F5-21, F1-7, F1-1, F3-51 foram encontrados em menor número (24%) (**Figura 19**). A presença de fetA F3-9 está associada ao CC103, mas não é uma característica exclusiva deste clone.

Figura 19 - Frequência das variantes da proteína fetA entre as cepas avaliadas.



Fonte: Do autor, 2019.

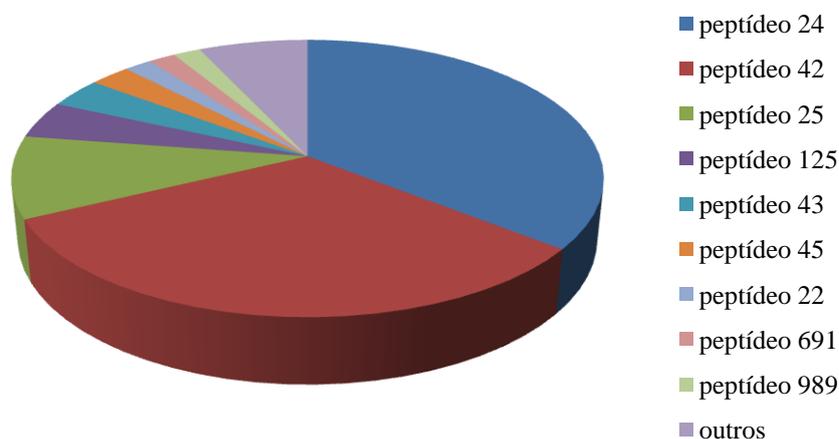
Entre as 115 cepas analisadas, o gene *nadA* foi detectado em apenas sete cepas de *N. meningitidis*. A presença de *nadA* foi confirmada exclusivamente em cepas pertencentes aos CC hipervirulentos 103, 32 e 11.

No estudo, todas as cepas expressaram o gene *NHBA*, representando um total de 17 variantes, sendo o peptídeo 24 o mais prevalente (35%), seguido pelo peptídeo 42 (32%) (**Figura 20**). Foi possível relacionar o CC103 ao peptídeo 24, entretanto, essa variante não é exclusiva desse clone; algumas cepas pertencentes ao CC11 e CC8 também apresentaram o peptídeo 42.

A variação em subfamílias da proteína fHbp de acordo com a classificação da Pfizer, apresentou maior predomínio da subfamília A (87%), quando comparada a subfamília B (13%). Na classificação da Novartis em variantes, a variante 2 foi a mais prevalente (84%), seguida pela variante 1 (13%) e variante 3 (3%). As duas classificações se relacionam: as variantes 2 e 3 equivalem a subfamília A, enquanto que a variante 1 refere-se a subfamília B (**Tabela 19**). O peptídeo 25, pertencente à

subfamília A (variante 2), foi o mais prevalente entre as cepas analisadas, associado exclusivamente ao CC103 e distribuído em todos os anos avaliados. O peptídeo fHbp1, presente na vacina Bexsero, foi encontrado em sete cepas analisadas (6%) (**Figura 21**).

Figura 20 - Frequência dos principais peptídeos de NHBA entre as cepas avaliadas



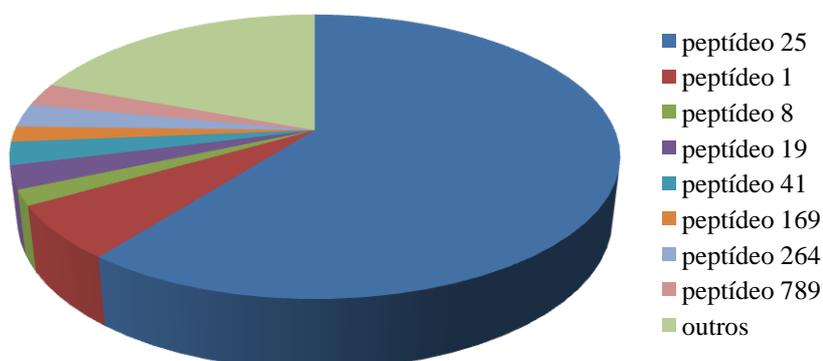
Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 21 - Equivalência entre as subfamílias e variantes de acordo com análise da proteína fHbp.

Subfamílias	A	B	
n	87%	13%	
Variantes	2	3	1
n	84%	3%	13%

Fonte: Do autor, 2019.

Figura 21 - Frequência dos principais peptídeos de fHbp entre as cepas avaliadas.



Fonte: Do autor, 2019.

Até o momento, de acordo com o perfil antigênico gerado pela análise das OMP e com o perfil clonal sugerido pela metodologia do MLST, o fenótipo circulante com maior prevalência no Brasil no período estudado foi: C: P1.22, 14-6: F3-9: ST-3780 (CC103). O resultado referente à diversidade clonal e genética das 115 cepas encontra-se no APÊNDICE E.

#### **4.5 Relação entre a acetilação do polissacarídeo e a diversidade genética em *N. meningitidis***

De acordo com os resultados gerados, foi possível estabelecer uma correlação entre os dados referentes à acetilação do polissacarídeo pelos métodos imunoenzimáticos e molecular. No total foram analisadas 63 cepas por ELISA *whole-cell* ou sequenciamento do gene *oatC*, sendo 61 clínicas e duas controles. Considerando falhas verificadas nos testes sorológicos pela falta de especificidade do MAb+ ao PSC OAc+, podemos afirmar que o resultado obtido com o sequenciamento apresentou maior confiabilidade na determinação das cepas de-O-acetiladas. Assim, considerando o sequenciamento do gene *oatC* como padrão para determinação da O-acetilação, do total de cepas analisadas por esse sistema, 23% podem ser consideradas cepas de-O-acetiladas.

Não foi possível correlacionar informações sobre a acetilação do PSC a dados epidemiológicos, pois elas pertencem aos complexos clonais 103 (n = 6), 11 (n = 2) e quatro não possuem um complexo associado ao seu ST (**Tabela 20**). Além disso, as cepas não estabeleceram uma relação com os períodos propostos, pois foram isoladas nos anos 2008, 2009, 2010 (período pré-vacinal), 2012 e 2013 (pós-vacinal).

Da mesma forma, considerando o total de cepas definidas como de-O-acetiladas (n=12) e O-acetiladas (n=40) pelo sequenciamento, observamos um perfil epidemiológico similar (**Tabela 21**). Pelo baixo número de isolados e pela heterogeneidade dos isolados em relação ao ano de isolamento, não há como inferir qualquer hipótese que possa pontar uma tendência de isolamento maior de cepas O-acetiladas ou de-O-acetiladas, em um determinado período.

Tabela 22 - Relação entre a acetilação do polissacarídeo capsular e diversidade genética em *N. meningitidis*. (continua)

<b>Cepas</b>	<i>oatC</i>	<b>CC</b>	<b>Fenótipo</b>
P4400	1	NA	P1.22,14-6; F1-1
P4344	2	11	P1.22,14-6; F1-7
P2861	2	32	P1.22,14-6; F1-61
P2941	2	32	P1.7-1,1; F1-30
P3074	2	NA	P1.22, 14-11; F3-9
P3076	1	103	P1.22,14-11; F3-9
P3087	2	11	P1.5-1,10-8; F3-6
P3100	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3112	1	11	P1.5,2; F3-9
P3139	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3279	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3283	1	103	P1.22,14-6; F3-9
P3289	0	11	P1.5,2; F3-6
P3292	0	103	P1.22,14-6; F3-9
P3293	0	NA	P1.19-15; 15; F5-21
P3297	1	11	P1.5-11,10-4; F3-6
P3300	2	8	P1.7-2,13-1; F3-9
P3303	0	11	P1.7-2,13-1; F3-9
P3307	2	11	P1.5-11,10-4; F3-6
P3310	2	32	P1.18-8,3; F5-1
P3365	0	NA	P1.22, 14-6; F3-9
P3369	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3370	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3475	0	103	P1.5-11,10-62; F3-9
P3478	0	103	P1.5-11,10-62; F3-9
P3479	0	103	P1.5-11,10-62; F3-9
P3480	1	103	P1.22,14-6; F3-9
P3497	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3554	1	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3557	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3558	1	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3637	2	32	P1.7-42,1-10; F5-1
P3668	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3712	1	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3733	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3766	2	32	P1.7-1,1-10; F5-1
P3776	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3777	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P3791	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P3792	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P3800	2	103	P1.22,14-6; F3-9

Tabela 23 - Relação entre a acetilação do polissacarídeo capsular e diversidade genética em *N. meningitidis*. (conclusão)

<b>Cepas</b>	<i>oatC</i>	<b>CC</b>	<b>Fenótipo</b>
P3842	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4005	1	103	P1.22,14-6; F3-9
<b>P4007</b>	<b>1</b>	103	P1.22,14-6; F3-9
P4030	0	103	P1.22,14-6; F3-9
P4031	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4032	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4072	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4073	2	103	P1.22,14-6; F1-1
P4075	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P4077	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4133	1	103	P1.22,14-6; F3-9
P4144	2	NA	P1.22,14-6; F3-9
P4146	2	NA	P1.22,14-6; F3-51
P4247	1	NA	P1.22,14-6; F3-9
P4248	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4250	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4322	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4331	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4333	2	103	P1.7-4,1; F3-9
P4334	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4335	2	103	P1.22,14-6; F3-9
P4336	2	103	P1.7,4-1; F3-9
P4338	2	103	P1.22,14-6; F3-9

0, não determinado; 1, de-O-acetilado; 2, O-acetilado; NA, ST não associado a um complexo clonal.  
Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 24 - Similaridade da diversidade clonal (MLST) e genética em cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas.

<b>Diversidade de cepas</b>	<b>MLST</b>			<b>PorA</b>			<b>FetA</b>	<b>Período</b>	
	<b>CC103</b>	<b>CC 32</b>	<b>CC 11</b>	<b>P1. 22,14</b>	<b>P1. 5</b>	<b>P1. 7,1</b>	<b>F3-9</b>	<b>2007-2010</b>	<b>2011-2016</b>
O-acetiladas	70%	17%	8%	78%	5%	10%	93%	46%	54%
De-O-acetiladas	70%	10%	20%	81%	12%	6%	69%	69%	31%

Cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas baseadas em dados gerados pelo sequenciamento do gene *oatC*.  
Fonte: Do autor, 2019.

## 5 DISCUSSÃO

Vacinas meningocócicas conjugadas foram desenvolvidas com o objetivo de controlar várias manifestações clínicas causadas por diferentes sorogrupos do meningococo. No Brasil, o sorogrupo C tem sido responsável por surtos desde o início deste século. Considerando que o PSC meningocócico é antígeno vacinal específico utilizado no desenvolvimento das vacinas conjugadas meningocócicas, estudos que envolvam sua bioquímica, funcionalidade e imunogenicidade são importantes para garantir a eficácia da vacina.

O objetivo deste estudo foi estimar a porcentagem de cepas contendo o polissacarídeo nas formas O-acetilada e de-O-acetilada. Métodos moleculares e imunoenzimáticos foram desenvolvidos para a obtenção de resultados mais robustos. Paralelamente, foi realizada a avaliação do perfil epidemiológico de cepas pela descrição fenotípica baseada em proteínas de membrana externa e a relação clonal existente entre as cepas estudadas, com o objetivo de avaliar possíveis marcadores genéticos, fenotípicos ou epidemiológicos associados ao estado de acetilação do polissacarídeo capsular de meningococos do sorogrupo C. Esse é o primeiro relato da descrição de cepas de-O-acetiladas no Brasil.

Inicialmente, a relevância biológica da O-acetilação dos PSC da superfície bacteriana ainda não era clara, mas era certo que poderia gerar informações úteis no desenvolvimento e atualização das vacinas. A avaliação do PSC Oac- sorogrupo A demonstrou baixa atividade bactericida, o que implica diretamente na imunogenicidade do PSC sorogrupo A. Mesmo conjugado ao toxóide tetânico, alguns epítomos do PSC de-O-acetilado sorogrupo A induzem uma resposta imunológica fraca. Assim, a O-acetilação do grupo A é claramente um parâmetro imunológico importante a ser mantido durante a conjugação do PSC à proteína (BERRY, 2002). Estudos com MAb foram desenvolvidos e indicaram que o PSC do sorogrupo C expressa pelo menos três epítomos diferentes com diferentes atividades funcionais (LONGWORTH, 2002). De acordo com Fusco et al (2007), o papel do grupo O-acetil no PSC sorogrupo C no organismo humano é formar um epítomo mal direcionado, isto é, mascarar o alvo suscetível e, assim, escapar do sistema imune do hospedeiro.

Ensaio imunoenzimático são metodologias frequentes na detecção de antígenos meningocócicos (BELO et al., 2010). A determinação do estado de acetilação

dos meningococos para diferentes sorogrupos foi testada por diferentes métodos imunológicos. A análise do PSC sorogrupo C foi realizada por *dot blotting* (BORROW, 2000) e imunofluorescência (APICELLA; FELDMAN, 1976); do PSC sorogrupos Y e W-135 por *dot blotting* (LONGWORTH et al., 2002) e do PSC sorogrupo A por ELISA (BERRY et al., 2002). Para o sorogrupo C, as cepas de-O-acetiladas interagem apenas com o MAb- 2016.3, enquanto as cepas O-acetiladas possuem ligação ao MAb+ e MAb- (2016.3 e 2055.5), ambos desenvolvidos pelo FDA (BORROW, 2000). MAbs com as mesmas especificidades (1705.3 e 2016.3, FDA) foram testados em ensaios de *immunoblotting* e ELISA, pois tentativas por *dot blotting* (utilizando membrana de nitrocelulose) apresentaram resultados insatisfatórios.

A proporção identificada de O-acetil foi de 8% para o sorogrupo W-135, 80% para o sorogrupo Y e 85-88% para o sorogrupo C (LONGWORTH et al., 2002; BORROW, 2000; APICELLA; FELDMAN, 1976). Esses dados sugerem a circulação de cepas de-O-acetiladas nos EUA e Reino Unido desde a década de 70. Nosso estudo demonstrou que o método ELISA *whole-cell* utilizando a cepa inativada apresentou resultados mais satisfatórios, quando comparado ao *immunoblotting* e ELISA sanduíche. A conjugação do PSC à albumina metilada, por possuir carga positiva, contribuiu para a aderência do PSC às placas Immulux (Dyner®) (ARAKERE E FRASCH, 1991).

As cepas consideradas de-O-acetiladas por ELISA foram aquelas que apresentaram especificidade na ligação ao MAb-, apresentando valor de DO ~1,0. O alto índice de cepas de-O-acetiladas (16/21), demonstrado pelo ELISA *whole-cell*, pressupõe uma incerteza nos resultados, pela ineficácia dos controles positivos utilizados. Apesar das tentativas de identificação de cepas de-O-acetiladas por ELISA, tornou-se necessário a aplicação de outros métodos de detecção para uma melhor confiança dos resultados.

O primeiro estudo baseado em dados moleculares identificou características importantes no gene *oatC*, que resultaram em alterações na enzima O-acetiltransferase. A análise deste gene demonstrou a presença de 71% de A+T. O deslocamento no emparelhamento das fitas, conhecido como *Slipped-strand mispairing*, é o motivo do alto teor A+T. Este deslocamento pode influenciar a ocorrência natural da acetilação do PSC C (CLAUS et al., 2004). No presente estudo foram avaliadas 115 cepas de *N. meningitidis* e em todas se observou o alto conteúdo A+T, característico do gene *oatC*.

A busca por informações que permitissem diferenciar as cepas O-acetiladas e de-O-acetiladas resultou da detecção de diferentes combinações nos tratos homopoliméricos do gene *oatC* (regiões 212 e 455) que poderiam estar envolvidas na acetilação (CLAUS, 2004). O presente estudo confirmou tais divergências entre as sequências nas duas regiões citadas, no entanto com uma combinação diferente daquelas propostas por Claus et al (2004): o meningococo O-acetilado na posição 212-219 pode possuir oito timinas, representado como (T)<sub>8</sub> e na posição 460-466 possuir sete adeninas (A)<sub>7</sub>. Assim, esse polimorfismo parece não ser suficiente para influenciar na acetilação do PSC do meningococo. Em nosso estudo, a análise da sequência de aminoácidos revelou novas informações que podem estar diretamente relacionadas à O-acetilação ou de-O-acetilação do PSC. A identificação de três regiões variáveis nas cepas de referência de-O-acetiladas foi reconhecida em cepas de origem clínica. A presença dessas regiões promove alterações na enzima O-acetiltransferase codificada pelo gene *oatC*, que conseqüentemente, implicará na conformação do polissacarídeo. Nota-se, a partir da árvore filogenética, que a de-O-acetilação pode estar associada a uma característica evolutiva do meningococo em razão do princípio de formação de novas clades. A investigação evolutiva com 52 cepas clínicas de *N. meningitidis* permitiu sugerir que a ocorrência de três regiões variáveis, presentes no padrão de-O-acetilado aumenta a chance de classificação como cepas de-O-acetiladas. A presença, mesmo que parcial de RV3 foi justificada pela presença de deleções e inserções nucleotídicas que podem mudar toda a matriz de leitura da proteína. Desse modo, foi possível estabelecer uma relação entre cepas com características de-O-acetiladas, pela análise das sequências de aminoácidos, que não tinha sido discutida antes. De um total de 52 cepas de origem clínica, 12 foram classificadas como de-O-acetiladas o que corresponde a 23% do total analisado. Levando em consideração que nos EUA e Reino Unido a presença de cepas de-O-acetiladas sorogrupo C corresponde a aproximadamente 12 a 15% das cepas circulantes, nossos dados representam um significativo percentual quando comparados a outros estudos disponíveis na literatura.

A identificação de PSC OAc- obtidos por métodos imunológico e molecular revelaram algumas divergências. Por ELISA, de 21 cepas analisadas, 16 mostraram-se de-O-acetiladas. Pela análise do gene *oatC*, das 52 cepas analisadas, 12 apresentaram as RV que caracterizam as cepas de-O-acetiladas e 3 apresentaram um RV parcial (RV3), que não foi considerada como potencial marcador de de-O-acetilação pela falta de

provas (deleções e inserções) no nucleotídeo. Comparando as análises, concluímos que apenas quatro cepas foram caracterizadas como de-O-acetiladas concomitantemente pelos dois métodos citados: P3297, P3554, P3480 e P4007. Apesar disso, para este estudo os métodos moleculares demonstraram maior exatidão por terem sido executadas várias repetições apresentando os mesmos resultados, o que levou a determinação de variantes na análise do gene *oatC*, sendo assim considerados positivos apenas os resultados obtidos pelo sequenciamento: 23% de cepas de-O-acetiladas.

A diversidade fenotípica das cepas de-O-acetiladas observada aqui já foi relatada previamente por Borrow et al. (2000). Neste estudo esta característica não se relacionou a dados epidemiológicos. Números similares de cepas de-O-acetiladas pertencentes aos CC11 e CC103, com perfis fenotípicos P1.22,14-6; P1.5-11,10-4 e P1.5,2; F3-9, de todos os estados analisados, no período anterior e posterior a introdução da MenC, foram descritos. A vacina não foi um obstáculo para a circulação dessas cepas e a presença de cepas de-O-acetiladas não está relacionada à introdução da MenC em 2010, pois elas estavam presentes em todo o período pré-vacinal analisado.

A identificação do CC11 na cepa de-O-acetilada isolada na Inglaterra e enviada pelo FDA para ser utilizada como referência em nossos experimentos, é esperada, pois tanto no Reino Unido quanto nos EUA não há circulação do CC103 e a grande maioria das cepas do sorogrupo C pertencem ao CC11. Nossos resultados mostraram uma maior ocorrência de cepas de-O-acetiladas no Brasil quando comparados com esses países. Se considerarmos que de acordo com o banco de dados de MLST (Neisseria.org), mais de 64% das cepas do sorogrupo C circulantes na Europa e nos EUA pertencem ao CC11 e apenas 1,3% ao CC103; mais de 31% das cepas sorogrupo C do Brasil pertencem ao CC103 e 28% ao CC11 e que a ocorrência de cepas de-O-acetiladas no UK e EUA é de 12% a 15% e no Brasil, de acordo com o nosso estudo, é de 23%, podemos inferir que o CC103 é potencialmente um CC formado por um número considerável de cepas de-O-acetiladas. Portanto a constatação inferida por outros estudos que a vacina produzida a partir de cepas de-O-acetiladas induz maior produção de anticorpos bactericidas com ação mais eficaz contra cepas carregando ambos os tipos de PSC, podemos inferir que no Brasil a adoção desse tipo de vacina seria recomendável devido à maior ocorrência de cepas de-O-acetiladas do que em outros países.

A semelhança fenotípica de isolados C de-O-acetilados com isolados W-135 O-acetilados sugere uma relação clonal. Fenotipicamente, os isolados W-135 O-acetilados

foram sorosubtipo P1.3,6 e os isolados P1.5,2 foram de-O-acetilados (LONGWORTH, 2002). O fenótipo P1.5,2 presente nas cepas analisadas neste estudo também é característico de cepas de-O-acetiladas.

Nosso estudo se apresenta como a primeira referência a respeito da de-O-acetilação do PSC sorogrupo C no país e os dados aqui apresentados podem auxiliar futuramente o entendimento de propriedades bioquímicas e imunológicas do microorganismo. Além disso, será possível estabelecer uma relação entre a de-O-acetilação às características do meningococo, como mecanismos de defesa, diferenças na susceptibilidade a antimicrobianos, troca de cápsula e transferência de genes, entre outros.

Outro dado relevante proposto neste trabalho foi o conhecimento dos clones do meningococo C circulantes no Brasil, possibilitando a comparação de resultados e a divulgação de novos dados aqui gerados. Os CC11, CC8, CC41/44, CC269 foram responsáveis pela maioria das doenças invasivas dos sorogrupos B e C em todo o mundo a partir da década de 1960 (CAUGANT, 2008). Alguns CC, como o CC11, podem estar associados a vários sorogrupos (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012), no entanto outros CC apresentam-se fortemente associados a sorogrupos, como o CC32 ao sorogrupo B e o CC103 ao sorogrupo C (DE FILIPPIS, 2013).

No Brasil, estudos com isolados do sorogrupo C no período de 1976 até 2005 identificaram a prevalência de quatro grandes CC entre as cepas invasivas: CC11, CC8, CC32 e CC103 (SÁFADI; CINTRA, 2010; SARDINHA et al., 2013; DE FILIPPIS et al., 2013). A partir do ano 2002, observou-se um aumento substancial na proporção de casos atribuídos ao sorogrupo C do meningococo associado ao CC103, sendo este o atual responsável pela maioria dos casos de doença meningocócica no Brasil (GORLA et al., 2012; SÁFADI et al., 2013). O declínio dos CC11 e CC8 após o período introdutório da vacina e aumento do CC103 já foi evidenciado em outros estudos (DE FILIPPIS et al., 2013, SARDINHA et al., 2013). Isso sugere que a introdução da vacina MenC em 2010 pode ter alterado a diversidade de cepas no Brasil, implicando na diminuição desses complexos entre as cepas estudadas. O aumento na frequência do sorogrupo C, em especial do CC103, induziu a introdução da vacinação contra o meningococo no calendário do PNI em novembro de 2010. Assim, o Brasil se tornou o primeiro país da América Latina a introduzir a MenC ano calendário de vacinação (BRASIL, 2017). No presente estudo é evidente o alto número de cepas pertencentes ao

CC103, alcançando mais de 50% do total de cepas analisado nos dois períodos estudados.

Epidemias em Salvador foram associadas aos ST-3779 e ST-3780, ambos pertencentes ao CC103 (CORDEIRO, 2018). Neste trabalho, foi observado que o ST-3780 foi o mais prevalente, associado a 32% das cepas analisadas. De acordo com o que foi relatado por Sardinha et al em 2013, no Brasil o CC11 foi substituído pelo CC103 a partir de 2005 e hoje é o clone mais frequente entre as cepas do sorogrupo C. Neste estudo o CC103 está presente em 50% do total dos isolados, seguido do CC11 (n = 11) e CC32 (n = 7). A presença dos CC11 e CC32 foi relatada neste estudo, sendo os CC461 e CC35, CC relacionados ao sorogrupo C pela primeira vez no Brasil. A presença de CC32 associado ao sorogrupo C sugere a mudança de cápsula de B para C, pois este CC está fortemente associado a cepas do sorogrupo B. Presume-se que a troca capsular meningocócica ocorre quando um ST dentro de um sorogrupo, não usualmente associado a esse ST, e mais frequentemente associado a outro sorogrupo é encontrado (CASTIÑEIRAS, 2012), como a relação do CC32 ao sorogrupo B.

A determinação das variantes antigênicas presentes na superfície bacteriana foi realizada para avaliar a diversidade fenotípica das cepas brasileiras nos períodos pré e pós-vacinal e assim avaliar as implicações da vacina na variabilidade do micro-organismo. Dados epidemiológicos sobre a DM são necessários para caracterizar cepas circulantes e orientar futuras estratégias de prevenção e controle (PRESA et al., 2018). As OMPs estão intimamente relacionadas à aderência e à invasão de células humanas, importantes no processo de colonização da nasofaringe, invasão de células endoteliais e possível penetração da barreira hematoencefálica (BARTLEY et al., 2013). A vacina proteica desenvolvida para combater o meningococo sorogrupo B evidencia as propriedades imunológicas das proteínas de superfície.

O fenótipo P1.22,14-6, predominante neste estudo, tem sido relacionado ao CC103 (DE FILIPPIS et al., 2012). O perfil P1.22,14-6 foi o mais prevalente em São Paulo em um estudo que relatou um aumento deste fenótipo nos últimos anos (LEMOS et al., 2007). Weidlich et al (2008) relataram a frequência deste perfil antigênico em um surto no Rio Grande de Sul, entre 2003 e 2005 sempre associado ao CC103, sorogrupos B e C. Os autores consideraram a possibilidade de uma relação genética e epidemiológica entre as cepas do RS e SP, fato que explicaria o aumento significativo

do sorogrupo C no RS durante 2003-2005, o que é preocupante devido à possibilidade de uma distribuição clonal deste subtipo ao longo do todo país, podendo causar uma epidemia de DM.

O menor número de variantes relatado à VR3 em PorA foi descrito por de Filippis et al (2007) em cepas brasileiras. A menor diversidade genética observada em VR3 quando comparada a VR1 e VR2 sugere que este epítipo está sob menor pressão seletiva. Essa aparente maior estabilidade de VR3 pode ser explicada pelo menor nível de exposição da alça VR3 ao ambiente extracelular, facilitando o escape desse epítipo ao ataque do sistema imune do hospedeiro (DE FILIPPIS et al., 2007). Os mesmo autores sugeriram ainda a existência de dois perfis que correspondem exclusivamente a doença invasiva (P1.19,15,36) ou estado de portador (P1.12-5,1,35-1). Neste estudo, o perfil P1.19, 15 foi identificado em seis cepas brasileiras associados aos CC103, CC32 e CC461.

O gene que codifica a proteína *nadA* está presente em cerca de 50% dos isolados e sua distribuição varia de 100% em alguns CC como CC11 e CC32, a 0% em outros, por exemplo, CC41 e CC44 (LUCIDARME et al., 2009). *NadA* é um fator de patogenicidade com um papel na adesão celular do hospedeiro e invasão (LUCIDARME et al., 2010). Neste estudo foram identificadas apenas sete cepas contendo o gene *nadA*. Entre elas, não foi observada a presença de *nadA*-8, presente na vacina contra o sorogrupo B. A presença de *nadA* foi verificada apenas em cepas pertencentes aos CC103, CC32 e CC11 e frequentemente associada a linhagens hipervirulentas (COMANDUCCI, 2004).

Apesar da importância de avaliar a proteína NHBA em cepas sorogrupo B, cepas sorogrupo C também devem garantir uma análise minuciosa dessa proteína, devido à sua importância imunológica e à interação com o hospedeiro. Neste estudo, a presença predominante do peptídeo 42 e dos demais encontrados, difere do peptídeo NHBA presente na vacina Bexsero. Essa informação pode ser explicada pelas distintas variações de NHBA presentes em cepas do sorogrupo B e C (VACCA, 2016).

Variações em fHbp e proteínas relacionadas foram consideradas fatores importantes na determinação da suscetibilidade à DM (SEIB et al., 2015). Apesar de estar presente na maioria dos meningococos, a expressão de fHbp na superfície varia significativamente entre as cepas. O sequenciamento do gene *fHbp* em isolados meningocócicos revelou uma variação da sequência, consistente com classificações de

fHbp em duas subfamílias de acordo com a classificação da Pfizer (A e B) (FLETCHER et al., 2004) ou três grupos variantes principais de acordo com a classificação da Novartis (1, 2 e 3) (MASIGNANI et al., 2003), cada um incluindo várias sub-variantes. O alelo 25 destacou-se por estar presente em aproximadamente 50% das cepas analisadas.

Cepas pertencentes ao CC103 apresentaram baixa diversidade fenotípica de acordo com as variantes proteicas fHbp e NHBA. Esses dados sugerem um perfil fenotípico associado às cepas brasileiras sorogrupo C: P1.22, 14-6: F3-9: ST-3780 (cc103). A variabilidade ampla de estruturas expostas à superfície permite que os microorganismos sempre tenham subpopulações de tipos antigênicos divergentes para evitar a vigilância imunológica e contribuir para a variação funcional.

A distribuição dos antígenos vacinais 4CMenB (Bexsero) são, no geral, avaliados em cepas sorogrupo B. A administração dessa vacina propõe uma eficaz proteção a cepas pertencentes a outros sorogrupo (RODRIGUES et al., 2018). Nossos dados permitiram realizar uma avaliação da imunogenicidade da 4CMenB frente a cepas sorogrupo C. Para isso, os dados de variante e alelos correspondentes a vacina foram deduzidos à peptídeos. O perfil de BAST-1 compreende a composição exata da vacina: FHbp1, NHBA2, NadA8 e PorA7-2, 4. A análise demonstrou que as cepas sorogrupo C expressaram apenas duas variantes de PorA e sete de fHbp compatíveis com as variantes incluídas na vacina. Os peptídeos correspondentes a NHBA e NadA apresentaram-se completamente diferentes da composição vacinal. Estudos garantem que a presença de ao menos uma variante da vacina seria capaz de induzir imunogenicidade a cepas meningocócicas. Esses dados provam que, apesar das OMPs estarem presente efetivamente em todos os isolados meningocócicos, a variabilidade entre sorogrupos pode dificultar o acesso à imunogenicidade às cepas que não são sorogrupo B. A vacina proteica foi desenvolvida a partir da seleção das variantes peptídicas mais prevalentes no sorogrupo B.

As informações geradas por esse trabalho garantem um conhecimento mais detalhado sobre as cepas brasileiras do sorogrupo C em circulação. Dados sobre O-acetilação, apesar de não se relacionarem claramente aos clones circulantes, podem auxiliar o entendimento da epidemiologia e da evolução da DM. O MLST demonstrou que o CC103 continua sendo o mais prevalente no Brasil entre as cepas do sorogrupo C, não sendo influenciado pela introdução da MenC.

## 6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos a partir da presença de cepas de-O-acetiladas no Brasil possibilitaram o maior entendimento da dinâmica estrutural do PSC meningocócico. Aparentemente, a distribuição dessas cepas parece não ter sido afetada pela introdução da MenC;
- Nosso estudo sugere que, a partir da análise das sequências dos aminoácidos geradas pelo sequenciamento do gene *oatC*, três regiões variáveis contendo aproximadamente 50 aminoácidos podem estar diretamente envolvidas na de-O-acetilação do PSC, o que pôde ser constatado pelo alinhamento com as cepas utilizadas como referência neste estudo e confirmadas; em alguns casos, pelo ensaio de ELISA *whole-cell*;
- Cepas de-O-acetiladas pela análise do gene *oatC* apresentaram, pelo menos, uma RV (parcial ou completa) confirmando ser a presença dessas regiões o marcador que indica o estado de desacetilação do PSC dos meningococos do sorogrupo C;
- Ensaio imunoenzimáticos não forneceram informações precisas a respeito da (de)-O-acetilação. O ELISA *whole cell* foi o método que apresentou resultados mais relevantes, porém a inespecificidade do MAb - não garante a certificação dos resultados. A dificuldade de desenvolvimento de um protocolo que isolasse o polissacarídeo a partir de suspensão bacteriana em larga escala para ser utilizado no ELISA sanduíche foi uma barreira no estudo;
- Todos os isolados foram tipificados por MLST mostrando que a população meningocócica é representativa e geneticamente diversa. O MLST se mostrou uma ferramenta muito eficaz na determinação dos perfis clonais e permitiu uma análise minuciosa sobre a epidemiologia da DM no período estudado. Concluímos que o CC103 permanece ainda como o principal clone circulante no Brasil entre as cepas do sorogrupo C. Por ser atualmente o sorogrupo com mais circulação no país, por consequência o CC103 é também o de maior circulação;
- O perfil antigênico gerado pela análise das OMPs nos forneceu dados úteis na classificação do meningococo. O baixo percentual de antígenos vacinais da vacina 4CMenB (7%) desenvolvida contra o sorogrupo B em cepas do sorogrupo C permite concluir que esta vacina não seria capaz de induzir resposta imune contra cepas brasileiras do sorogrupo C;

- Tanto os isolados O-acetilados como os de-O-acetilados apresentaram-se fenotipicamente diversos, não sendo possível correlacionar as formas polissacarídicas com o perfil clonal e período anterior ou posterior à vacina;
- Nossos dados sugerem que a de-O-acetilação do PSC sorogrupo C pode estar associada ao CC103. Esta hipótese é sustentada pela constatação de que mais de 94% das cepas sorogrupo C do UK e EUA são CC11 e apenas 1,3% CC103 e mais de 31% das cepas sorogrupo C do Brasil são CC103 e 28% são CC11. Considerando que a ocorrência de cepas de-O-acetiladas no UK e EUA é de aproximadamente 15% e no Brasil é de 23%, podemos inferir que o CC103 é potencialmente um CC formado por um número considerável de cepas de-O-acetiladas;
- Outros estudos demonstraram que uma vacina produzida a partir de cepas de-O-acetiladas induz maior produção de anticorpos bactericidas com ação mais eficaz contra cepas carregando PSC OAc+ e PSC OAc-. Com essa constatação e considerando a hipótese anterior, podemos inferir que no Brasil a adoção desse tipo de vacina seria recomendável devido à maior ocorrência de cepas de-O-acetiladas, comparada a outros países.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, W. *et al.* Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b disease in the Hib vaccine era. **Journal of the American Medical Association**, v. 269, p. 221-6, 1993.

ANDRADE, A. L. *et al.* Impact of meningococcal C conjugate vaccination four years after introduction of routine childhood immunization in Brasil. **Vaccine**, v. 35, p. 2025-33, 2017.

APICELLA, M. A.; FELDMAN, H. A. Meningococcal group C subgroup determinant detected by immunofluorescence. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 152, p. 289-91, 1976.

ARAKERE, G.; FRASCH, C. E. Specificity of antibodies to O-acetyl-positive and O-acetyl-negative group C meningococcal polysaccharides in sera from vaccines and carries. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4349-56, 1991.

ARDITI, M.; YOGI, R. Common etiologic agents of bacterial meningitidis. *In*: Shulman, S.T.; Phair, J. P.; Peterson, L. R.; Warren, J. R. **The Biologic and Clinical Basis of Infectious Disease**. 5. ed. Philadelphia, USA: W. B. Saunders Company, p.316-322, 1997.

AZEVEDO, L. C. P.; TOSCANO, C. M.; BIERRENBACH, A. L. Bacterial meningitis in Brazil: baseline epidemiologic assessment of the decade prior to the introduction of pneumococcal and meningococcal vaccines. **Plos One**, v. 8, p. i.6, 2013.

BACCARINI, C. *et al.* The changing epidemiology of meningococcal disease in North America 1945–2010. **Human vaccines e Immunotherapeutics**, v. 9, n. 1, p. 162–71, 2013.

BARTLEY, S. N. *et al.* Attachment and invasion of *Neisseria meningitidis* to host cells is related to surface hydrophobicity, bacterial cell size and capsule. **Plos One**, v. 8, n. 2. p. e55798, 2013.

BARROSO, D. E.; REBELO, M. C. Recognition of the epidemiological significance of *Neisseria meningitidis* capsular serogroup W-135 in the Rio de Janeiro region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n. 6, p.773-5, 2007.

BATISTA-DHUARTE, A. *et al.* An approach to local immunotoxicity induced by adjuvanted vaccines. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 526-36, 2013.

BERGFELD, A. K. *et al.* The polysialic acid-specific O-acetyltransferase OatC from *Neisseria meningitidis* serogroup C evolved apart from other bacterial sialate O-acetyltransferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 1, p. 6-16, 2009.

BERRY, D. S. *et al.* Effect of O acetylation of *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide on development of functional immune responses. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3707-13, 2002.

BHATTACHARJEE, A. K. *et al.* Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 5, p. 1926-32, 1975.

BIDMOS, F.A. *et al.* Persistence, replacement, and rapid clonal expansion of meningococcal carriage isolates in a 2008 university student cohort. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 506-12, 2011.

BIJLSMA, M. W. *et al.* Epidemiology of invasive meningococcal disease from 1960 through 2012: a study of national surveillance data from the Netherlands. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. 805-12, 2014.

BELO, E. F.; FARHAT, C. K.; GASPARI, E. N. Comparison of dot-ELISA and standard ELISA for detection of *Neisseria meningitidis* outer membrane complex-specific antibodies. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 14, n. 1, p. 35-40, 2010.

BOISIER, P. *et al.* Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. **Clinical of Infectious Disease**, v. 44, n. 5, p.657-63, 2007.

BOOY, R. *et al.* Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine PRP-T. **Lancet**, 344, p. 362-6, 1994.

BORROW, R. *et al.* Prevalence of de-O-acetylated serogroup C meningococci before the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, p. 189-219, 2000.

BORROW, R. Advances with vaccination against *Neisseria meningitidis*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 12, p. 1478-91, 2012.

BORROW, R. *et al.* The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 4, p. 313-28, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Imunizações**. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/pni/o-que-e.html#acontent>. Acesso em: 01 dez. 2018.

BRANDTZAEG, P. *et al.* *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, n. 6, p.401-20, 2001.

BREHONY, C. *et al.* Distribution of Bexsero® Antigen Sequence Types (BASTs) in invasive meningococcal disease isolates: Implications for immunization. **Vaccine**, v. 34, n. 39, p. 4690-97, 2016.

BROKER, M. Development of new vaccines against meningococcal disease. **Arzneimittelschung**, v. 53, n. 12, p. 805-13, 2003.

BROKER, M.; BERTIB, F.; CONSTANTINO, P. Factors contributing to the immunogenicity of meningococcal conjugate vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 7, p.1808–24, 2016.

BURRAGE, M. *et al.* Effect of vaccination with carrier protein on response to meningococcal C conjugate vaccines and value of different immunoassays as predictors of protection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4946-54, 2002.

CARDOSO, C. W. *et al.* Effectiveness of meningococcal C conjugate vaccine in Salvador, Brazil: a case-control study. **PlosOne**,. v. 10, n. 4, p. e0123734, 2015.

CASTIÑEIRAS, T. M. P. P. *et al.* Capsular Switching in Invasive *Neisseria meningitidis*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n. 8, 2012.

CASTRO, J. D. Regulação em saúde: análise de conceitos fundamentais. **Sociologias**, v. 4, n. 7, p. 122-36, 2002.

CAUGANT, D.A. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: Importance for the epidemiology of meningococcal disease. **Infection, Genetics and Evolution**,v. 8, n. 5, p. 558-65, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Meningococcal disease: epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. *In*: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **The Pink Book: Course Textbook**. 13. ed. 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/mening.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2019.

CLAUS, H. *et al.* Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 227-39, 2004.

COMANDUCCI, M. *et al.* NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 4217–23, 2004.

CONSTANTINO, P. *et al.* Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. **Vaccine**, v. 10, p. 691-8, 1992.

CORDEIRO, S. M. Hospital-based surveillance of meningococcal meningitis in Salvador, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 11, p. 1147–53, 2007.

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

COSTA, E. A.; FERNANDES, T. M.; PIMENTA, T. S. A vigilância sanitária nas políticas de saúde no Brasil e a construção da identidade de seus trabalhadores (1976-1999). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 995-1004, 2008.

DATASUS. **Informações de Saúde (TABNET)**. 2019. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso em: 07 mar. 2019.

DE FILIPPIS, I. *et al.* Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid by one step polymerase chain reaction of the nspA gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 2, p. 85-90, 2005.

DE FILIPPIS, I. *et al.* PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. **Infection and Immunity**, v.75, n. 7, p. 3682-85, 2007.

DE FILIPPIS, I. *et al.* Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup B in Brazil. **Plos One**, v.7, n. 3, p. e33016, 2012.

DE FILIPPIS, I. *et al.* The 2010 Meningococcal outbreak in Bahia, Brazil, was caused by two different STs belonging to clonal complex ST-103. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 21-4, 2013.

DE SETA, M. H. **A construção do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária: uma análise das relações intergovernamentais na perspectiva do federalismo**. 2007. 188 f. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) – Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

DIENE, S.M. *et al.* Comparative genomics of *Neisseria meningitidis* strains: new targets for molecular diagnostics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 568.e1-568.e7, 2016.

DOLAN-THOMAS, J. *et al.* SodC-based real-time PCR for detection of *Neisseria meningitidis*. **Plos One**, v. 6, n.5, e.19361, 2011.

DWILOW, R.; FANELLA, S. Invasive meningococcal disease in the 21st century—an update for the clinician. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.15, n.3, p. 2, 2015.

ECDC. **Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe 2012**. Stockholm: ECDC, 2015.

EDMOND, K. *et al.* Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Disease**, v. 10, n. 5, p.317–28, 2010.

FLETCHER, L. D. *et al.* Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. **Infectious and Immunity**, n.72, n.4, p. 2088-100, 2004.

FINNE, J.; LEINONEN, M.; MÄKELÄ, P. H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: implications for vaccine development and pathogenesis. **Lancet**, v. 2, p. 355–357, 1983.

FORATINNI, O. P. Ecologia, epidemiologia e sociedade. 2. ed. São Paulo: **Artes Médicas**, p. 405-408, 2004.

FRASCH, C. E. Production and Control of *Neisseria meningitidis* vaccines. **Advances in Biochemical Processes**, v. 13, p.123-45, 1990.

FUSCO, P. C. *et al.* Protective meningococcal capsular polysaccharide epitopes and the role of O-acetylation **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 577–84, 2007.

GANDHI, A., BALMER, P., YORK, L. J. Characteristics of a new meningococcal serogroup B vaccine, bivalent rLP2086 (MenB-FHbp; Trumenba®). **Postgraduated Medicine**, v. 128, n. 6, p. 548-556, 2016.

GARCÍA-OJEDA, P. A. *et al.* Murine immune response to *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide: analysis of monoclonal antibodies generated in response to a thymus-independent antigen and a thymus-dependent toxoid conjugate vaccine. **Infection and Immunity**, v. 68, n.1, p. 239-46, 2000.

GLODE, M. P. *et al.* Comparative immunogenicity of vaccines prepared from capsular polysaccharides of group C *Neisseria meningitidis* O-acetyl-positive and O-acetyl-negative variants and *Escherichia coli* K92 in adult volunteers. **Journal of Infectious Disease**, v. 139, p. 52–9, 1979.

GORLA, M. C. O. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* associated with an outbreak in Bahia, Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 2, p. 56-9, 2012.

GORLA, M. C. O. *et al.* Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive cases in Brazil from 2009 to 2016. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67 p. 750-756, 2018.

GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y.; ARTENSTEIN, M. Human immunity to the meningococcus. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 129, p. 1349-65, 1969.

GRANOFF, D. M.; FEAVERS, I. M.; BORROW, R. Meningococcal vaccines. **Vaccines**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, p. 959-988, 2004.

GUDLAVALLETI, S. *et al.* The *Neisseria meningitidis* Serogroup A Capsular Polysaccharide O-3 and O-4 Acetyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 41, p. 42765–42773, 2004.

GUDLAVALLETI, S. K. *et al.* Comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-

acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p.7972-80, 2007.

HALPERIN, S. A. *et al.* The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 30, n. Suppl 2, p. B26–B36, 2012.

HARRISON, L.H. *et al.* The global meningococcal initiative: recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 29, n. 18, p. 3363–71, 2011.

HARRISON, O. B. *et al.* Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, n. 4, p. 566-73, 2013.

HESTRIN, S. Acylation reactions mediated by purified acetylcholine esterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, n. 2, p. 879-81, 1949.

IBARZ-PAVÓN, A.B. *et al.* Laboratory-based surveillance of *Neisseria meningitidis* isolates from disease cases in Latin American and Caribbean countries, SIREVA II 2006-2010. **Plos One**, v.7, n. 8, p. 44102, 2012.

INCQS. **POP 65.3230.001**: produção e preservação de bactérias ca CBRVS pelo método de liofilização. Rev. 06. Rio de Janeiro: INCQS, 2019.

JACOBSSON, S. *et al.* Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. **Vaccine**, v. 24, n. 12, p. 2161-68, 2006.

JENNINGS, H. J. *et al.* Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Infectious Disease**. v. 136, n. Supl., p. S78-S83, 1977.

JOLLEY, K.A. *et al.* Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 89-96, 2007.

JONES, C., LEMERCINIER, X. Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine manufacture. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 4, p. 1233-1247, 2002.

KLEIN, A.; ROUSSEL, P. O-acetylation of sialic acids. **Biochimie**, v. 80, n. 1, p. 49-57, 1998.

KILCOYNE, M. *et al.* Molecular origin of two polysaccharides of *Campylobacter jejuni* 81116. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 263, p. 214-222, 2006.

LEMOS, A. P. S. *et al.* Clonal Distribution of Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup C Strains Circulating from 1976 to 2005 in Greater São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p. 1266–73, 2007.

LEMOS, A. P. S. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. **Journal of Infection**, v. 60, n. 3, p. 209-17, 2010.

LEWIS, L. A.; RAM, S. Meningococcal disease and the complement system. **Virulence**, v. 5, p. 98–126, 2014.

LEWIS, C.; CLARKE, S. C. Identification of *Neisseria meningitidis* serogroups Y and W135 by *siaD* nucleotide sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2697-99, 2003.

LI, S. *et al.* Molecular signature of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. **Nature immunology**, v. 15, p. 195-204, 2014.

LIU, T.Y. Studies on the meningococcal polysaccharides. I. Composition and chemical properties of the group A polysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p.2849–58, 1971.

LOBATO, L. V. C.; GIOVANELLA, L. Sistemas de saúde: origens, componentes e dinâmica. *In*: GIOVANELLA, L.; ESCOREL, S.; LOBATO, L.V.C.; NORONHA, J.C.; CARVALHO, A.I. (org.). **Políticas e sistema de saúde no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2013. p. 89-120.

LONGWORTH, E. *et al.* O-Acetylation status of the capsular polysaccharides of serogroup Y and W135 meningococci isolated in the UK. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p. 119-23, 2002.

LUCIDARME, J. *et al.* Characterization of *fHbp*, *nhba(gna2132)*, *nadA*, *porA*, sequence type (ST), and genomic presence of *IS1301* in group B meningococcal ST269 clonal complex isolates from England and Wales. **Journal of Clinical Biology**, v. 47, n. 11, p. 3577–85, 2009.

LUCIDARME, J. *et al.* Characterization of *fHbp*, *nhba (gna2132)*, *nadA*, *porA*, and sequence type in group B meningococcal case isolates collected in England and Wales during January 2008 and potential coverage of an investigational group B meningococcal vaccine. **Clinical and Vaccine immunology**, v. 17, n. 6, p. 919–29, 2010.

LUCIDARME, J. *et al.* Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. **Journal of Infection**, v. 71, p. 544-52, 2015.

MARTINON-TORRES, F. *et al.* Reduced schedules of 4CMenB vaccine in infants and catch-up series in children: immunogenicity and safety results from a randomised open-labeled phase 3b trial. **Vaccine**, v. 35, p. 3548-57, 2017.

MC CARTH, P. C.; SHARYAN, A.; MOGHADDAM, L. S. Meningococcal vaccines: current status and emerging strategies. **Vaccines**, v. 6, n.12, p. pii: E12, 2018.

MAIDEN, M. C. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140-45, 1998.

MASIGNANI, V. *et al.* Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. **Journal of Experimental Medicine**, n. 197, n. 6, p. 789-99, 2003.

MEIRING, S. *et al.* A decade of invasive meningococcal disease surveillance in South Africa: 2003–2012. *In: THE INTERNATIONAL CONGRESS ON INFECTIOUS DISEASES (ICID)*, 16., 2014. Cape Town, South Africa. [Anais ...]. Cape Town, South Africa: International Society for Infectious Diseases, 2014.

MCCARTHY, P. C.; SHARYAN, A.; MOGHADDAM, L.S. Meningococcal. Vaccines: Current Status and Emerging Strategies. **Vaccines**, v. 6, n.12, 2018.

MICHON, F. *et al.* Structure activity studies on group C meningococcal polysaccharide protein conjugate vaccines: effect of *O*-acetylation on the nature of the protective epitope. **Developmental Biology**, v. 103, p. 151–160, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 5, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2006/prt0005\\_21\\_02\\_2006.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2006/prt0005_21_02_2006.html). Acesso em: 24 mar. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 3.252, de 22 de dezembro de 2009. Aprova as diretrizes para execução e financiamento das ações de Vigilância em Saúde pela União, Estados, Distrito Federal e Municípios e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p 65-69, 23 jan. 2009a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7. ed. Brasília, 2009b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação**. 3. ed. Brasília, DF, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da doença meningocócica, Brasil 2007-2013. **Boletim epidemiológico da Doença Meningocócica**, v. 47, n. 29, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atuação da Vigilância em Saúde. 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br>. Acesso em: 11 mar. 2018.

NADEL, S.; NINIS, N. Invasive meningococcal disease in the vaccine era. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, article 321, 2018.

PATH. Program for Appropriate Technology in Health. Disponível em: <http://www.path.org/publication>, 2014. Acesso em: 24 jun. 2018.

PESSUTI, F.; SORIANO, D.; MACIEL, B. B. Doença meningocócica: características epidemiológicas do Hospital Municipal Souza Aguiar no Rio de Janeiro/RJ, Brasil entre 2010-2014. **Revista de Epidemia e Controle de Infecções**, v. 6, n. 2, p. 81-84, 2016.

PRESA, J.V.; ALMEIDA R. S.; SPINARDI, J.; REGAZZINI, C. A. Epidemiological burden of meningococcal disease in Brazil: a systematic literature review and database analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 80, p. 137–46, 2018.

RICHMOND, P. *et al.* Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1569– 72, 1999a.

RICHMOND, P. *et al.* Safety and immunogenicity of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine in healthy adults. **Vaccine**, v. 18, p. 641-6, 1999b.

RICHMOND, P. *et al.* Evaluation of de-O-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: reactogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against O-acetylated and de-O-acetylated serogroup C strains. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2378-82, 2001.

RODRIGUES, C. M. C. Genomic surveillance of 4CMenB vaccine antigenic variants among disease-causing *Neisseria meningitidis* isolates, United Kingdom, 2010–2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 673-682, 2018.

ROSENSTEIN, N.E. *et al.* Meningococcal disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1378–88, 2001.

ROTMAN, E; SEIFERT, H. S. The genetics of *Neisseria* species. **Annual Review of Genetics**, v. 48, p. 405-431, 2014.

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

RUBISNTEIN, L. J. *et al.* Murine immune responses to *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide and a thymus-dependent toxoide conjugate vaccine. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5450-54, 1998.

RUBISTEIN, L. J.; STEIN, K. E. Murine immune response to the *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide II. Specificity. **The Journal of Immunology**, v. 141, p. 4357-4362, 1988.

RUTTIMANN, R.W. *et al.* A consensus statement: meningococcal disease among infants, children and adolescents in Latin America. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 3, p. 284-90, 2014.

SADARANGANI, M.; POLLARD, A. J. Serogroup B meningococcal vaccines—an unfinished story. **Lancet Infectious Disease**, v. 10, p. 112-24, 2010

SADARANGANI, M. *et al.* The impact of the meningococcal serogroup C conjugate vaccine in Canada between 2002 and 2012. **Clinical Infectious Diseases Advance**, v. 59, n. 9, p. 1208-15, 2014.

SÁFADI, M. A. P.; BARROS, A. P. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 35-44, 2006.

SÁFADI, M. A. P.; CINTRA, O. A. L. Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention. **Neurological Research**, v. 32, n. 3, p. 263-71, 2010.

SÁFADI, M.A. *et al.* Carriage rate and effects of vaccination after outbreaks of serogroup c meningococcal disease, Brazil, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 806-11, 2014.

SARDINHA, G. *et al.* Replacement of *Neisseria meningitidis* C cc11/ET-15 variant by a cc103 hypervirulent clone, Brazil 2005-2011. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 524-25, 2013.

SILVA JR, J. B. **Epidemiologia em serviço: uma avaliação de desempenho do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde**. 2004. 318 f. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2004.

SEIB, K. *et al.* *Neisseria meningitidis* factor H-binding protein fHbp: a key virulence factor and vaccine antigen. **Expert Review Vaccines**, v. 14, n. 6, p. 841-59, 2015.

SERRUTO, D. *et al.* The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. **Vaccine**, v. 30, n. Supl 2, p. B87–97, 2012.

SES. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. **Vigilância Epidemiológica das Meningites**. Pernambuco, 2013.

SSESP. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. **Imunobiológicos especiais e suas indicações**. São Paulo, 2013.

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

SPINOSA, M. *et al.* The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. **Infection and immunity**. v. 75, n.7, p. 3594-603, 2007.

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

STEPHENS, D. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 27, n. Suppl 2: B71–7, 2009.

SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. Portal da Saúde. **Calendários de vacinação:** calendário básico de vacinação da criança. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2012.

SZU, C. C. *et al.* Relation between structure and immunologic properties of the vi capsular polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4555-61, 1991.

TAHA, M. Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 855-7, 2000.

TEIXEIRA, C.; COSTA, E. Vigilância da saúde e vigilância sanitária: concepções, estratégias e práticas. *In*: SEMINÁRIO TEMÁTICO DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 20. Brasília, 2003. [Anais...]. Brasília: ISC/ANVISA . (Cooperação Técnica ISC/ANVISA). Texto preliminar elaborado para debate .

THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2016.

THOMPSON, E. A. L. *et al.* Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. **Microbiology**, v. 149, p. 1849-58, 2003.

TIKKANEN, C. *et al.* Immunoblot analysis of bacterial polysaccharides: application to the type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis* and *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Immunological Methods**, v. 187, n.2, p. 233-44, 1996.

TZANAKAKI, G. *et al.* Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 31-6, 2003.

TZENG, Y., THOMAS, J., STEPHENS, D. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 759-72, 2015.

URWIN, R. Nucleotide sequencing of antigen genes of *Neisseria meningitidis*. **Meningococcal Disease: Methods and Protocols**, v. 67, p. 157–172, 2001.

VACCA, I. *et al.* Neisserial heparin binding antigen (NHBA) contributes to the adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. **Plos One**, v. 25, n. 11, p. e016878, 2016.

VIMR, E. *et al.* Diversity of microbial sialic acid metabolism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n.1, p. 132–53, 2004.

VON GOTTBURG, A. *et al.* Emergence of endemic serogroup W135 meningococcal disease associated with a high mortality rate in South Africa. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 377–386, 2008.

VOGEL, U. *et al.* Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (cni). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2898-901, 2004.

WEIDLICH, L. *et al.* High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. **Journal of Infection**, v. 57, n. 4, p. 324-31, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Meningococcal meningitis. 2014. **Media Centre**. Disponível em: <http://www.who.int/ith/vaccines/meningococcal/en/>. Acesso em: 20 jan. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Meningococcal meningitis fact sheet**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/#>. Acesso em: 03 fev. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine**. Annex 2, 2004.

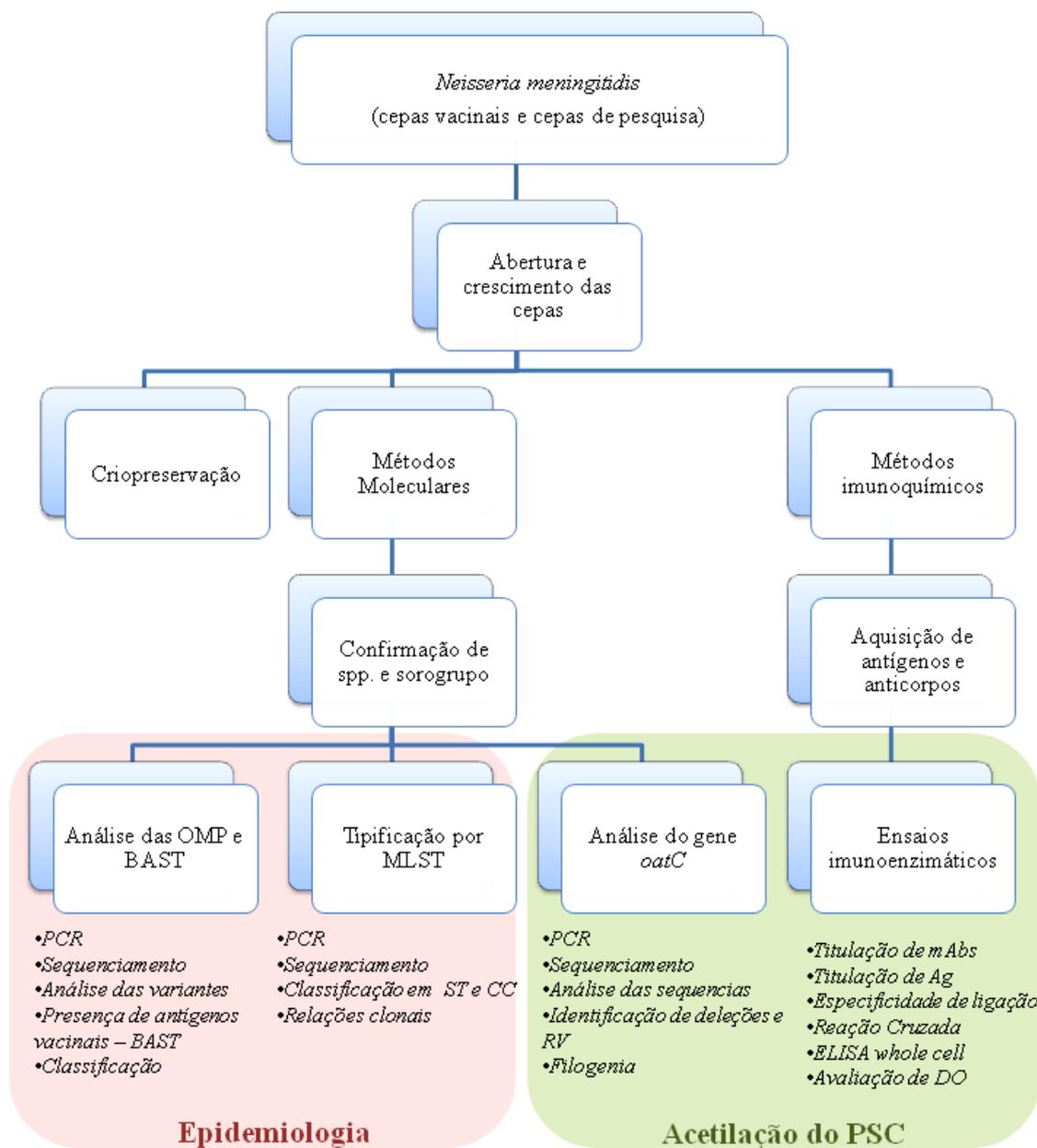
YAZDANKHAH, S. P.; CAUGANT, D. A. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 821-32, 2004.

YAZDANKHAH, S. P.; LINDSTEDT, B. A.; CAUGANT, D. A. Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1699–705, 2005.

## APÊNDICE A - PROTOCOLO DE REMOÇÃO DOS GRUPOS O-ACETIL DO POLISSACARÍDEO SOROGRUPO C NATIVO

Uma massa de 1g de polissacarídeo foi adicionado a 30 mL de solução 0,1 mol/L de NaOH e aquecida a 37°C em termo bloco, por 4 h. A solução foi resfriada e neutralizada com ácido acético 0,4 mol/L. O material foi dialisado em cassete com membrana de 3.500 Da de cut-off e posteriormente liofilizado. A confirmação da estrutura química do polissacarídeo desacetilado foi confirmada por RMN-H, na plataforma de Farmanguinhos. Observou-se a ausência dos sinais H7 e H8 em torno de 5 ppm, indicando a eliminação dos grupos O-acetilados nestas posições e também se observou a coalescência dos sinais de H-3 equatorial. Na região relativa aos sinais das metilas dos grupos O, *N*-acetilados (1,9 a 2,1 ppm), somente se verificou um único sinal relativo a metila do grupo *N*-acetilado.

## APÊNDICE B - FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS PROPOSTAS NESTE ESTUDO



**APÊNDICE C – REPRESENTAÇÃO DE UMA PLACA DE ELISA DEMONSTRANDO A TITULAÇÃO EM DUPLICATAS DE ANTICORPOS DE CAPTURA, IgG ANTI-PSC E ANTÍGENO UTILIZADOS NO ELISA SANDUÍCHE.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5µg/mL 1:8000 5µg/mL	5µg/mL 1:8000 5µg/mL	10µg/mL 1:8000 5µg/mL	10µg/mL 1:8000 5µg/mL	20µg/mL 1:8000 5µg/mL	20µg/mL 1:8000 5µg/mL	5µg/mL 1:8000 5µg/mL	5µg/mL 1:8000 5µg/mL	10µg/mL 1:8000 5µg/mL	10µg/mL 1:8000 5µg/mL	20µg/mL 1:8000 5µg/mL	20µg/mL 1:8000 5µg/mL
B	5µg/mL 1:8000 10µg/mL	5µg/mL 1:8000 10µg/mL	10µg/mL 1:8000 10µg/mL	10µg/mL 1:8000 10µg/mL	20µg/mL 1:8000 10µg/mL	20µg/mL 1:8000 10µg/mL	5µg/mL 1:8000 10µg/mL	5µg/mL 1:8000 10µg/mL	10µg/mL 1:8000 10µg/mL	10µg/mL 1:8000 10µg/mL	20µg/mL 1:8000 10µg/mL	20µg/mL 1:8000 10µg/mL
C	5µg/mL 1:8000 20µg/mL	5µg/mL 1:8000 20µg/mL	10µg/mL 1:8000 20µg/mL	10µg/mL 1:8000 20µg/mL	20µg/mL 1:8000 20µg/mL	20µg/mL 1:8000 20µg/mL	5µg/mL 1:8000 20µg/mL	5µg/mL 1:8000 20µg/mL	10µg/mL 1:8000 20µg/mL	10µg/mL 1:8000 20µg/mL	20µg/mL 1:8000 20µg/mL	20µg/mL 1:8000 20µg/mL
D	5µg/mL 1:4000 5µg/mL	5µg/mL 1:4000 5µg/mL	10µg/mL 1:4000 5µg/mL	10µg/mL 1:4000 5µg/mL	20µg/mL 1:4000 5µg/mL	20µg/mL 1:4000 5µg/mL	5µg/mL 1:4000 5µg/mL	5µg/mL 1:4000 5µg/mL	10µg/mL 1:4000 5µg/mL	10µg/mL 1:4000 5µg/mL	20µg/mL 1:4000 5µg/mL	20µg/mL 1:4000 5µg/mL
E	5µg/mL 1:4000 10µg/mL	5µg/mL 1:4000 10µg/mL	10µg/mL 1:4000 10µg/mL	10µg/mL 1:4000 10µg/mL	20µg/mL 1:4000 10µg/mL	20µg/mL 1:4000 10µg/mL	5µg/mL 1:4000 10µg/mL	5µg/mL 1:4000 10µg/mL	10µg/mL 1:4000 10µg/mL	10µg/mL 1:4000 10µg/mL	20µg/mL 1:4000 10µg/mL	20µg/mL 1:4000 10µg/mL
F	5µg/mL 1:4000 20µg/mL	5µg/mL 1:4000 20µg/mL	10µg/mL 1:4000 20µg/mL	10µg/mL 1:4000 20µg/mL	20µg/mL 1:4000 20µg/mL	20µg/mL 1:4000 20µg/mL	5µg/mL 1:4000 20µg/mL	5µg/mL 1:4000 20µg/mL	10µg/mL 1:4000 20µg/mL	10µg/mL 1:4000 20µg/mL	20µg/mL 1:4000 20µg/mL	20µg/mL 1:4000 20µg/mL
G	5µg/mL 1:2000 10µg/mL	5µg/mL 1:2000 10µg/mL	10µg/mL 1:2000 10µg/mL	10µg/mL 1:2000 10µg/mL	20µg/mL 1:2000 10µg/mL	20µg/mL 1:2000 10µg/mL	5µg/mL 1:2000 10µg/mL	5µg/mL 1:2000 10µg/mL	10µg/mL 1:2000 10µg/mL	10µg/mL 1:2000 10µg/mL	20µg/mL 1:2000 10µg/mL	20µg/mL 1:2000 10µg/mL
H	5µg/mL 1:8000 PBS+5% SFB	5µg/mL 1:8000 PBS+5% SFB	10µg/mL 1:8000 PBS+5% SFB	10µg/mL 1:8000 PBS+5% SFB	20µg/mL 1:4000 PBS+5% SFB	20µg/mL 1:4000 PBS+5% SFB	5µg/mL 1:4000 PBS+5% SFB	5µg/mL 1:4000 PBS+5% SFB	10µg/mL 1:2000 PBS+5% SFB	10µg/mL 1:2000 PBS+5% SFB	20µg/mL 1:2000 PBS+5% SFB	20µg/mL 1:2000 PBS+5% SFB

**APÊNDICE D - PROTOCOLO DE ELISA *WHOLE-CELL* DE ACORDO COM RUBISTEIN E STEIN (1988), COM ADAPTAÇÕES.**

As placas Immulux (Dynex®) foram cobertas com o conjugado polissacarídeo (célula inativada) + albumina metilada (5 µg/mL), diluídos em tampão PBS; seguido de lavagem das placas com PBS 3 vezes, bloqueio dos sítios de ligação com PBS com 1% de BSA por 1 h em temperatura ambiente e lavagem 3 vezes com PBS. O anticorpo primário foi diluído em PBS-BSA, com diluição inicial de 1/10 e adicionado 50 µL em cada poço; permanecendo em incubação por 24 h a 4°C. Após este período, 5 lavagens foram realizadas com PBS, seguido da adição de 50 µL do anticorpo secundário diluído em PSC e incubação por 4 h em temperatura ambiente. Novas lavagens com PBS (3 vezes) e água destilada (3 vezes) foram realizadas. Incubação com substrato ABTS 1:1 por 15 min e adição de solução de parada: SDS 1%. O substrato ABTS desenvolve uma cor verde azulada na presença do conjugado marcado com peroxidase. A leitura dos padrões de absorbância foi feita pelo *software* SoftMax Pro 5.0.1 no Espectrofotômetro de Elisa, Leitora LMR-96.

**APÊNDICE E - RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DO PERFIL CLONAL POR MLST E DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMP) DAS 115 AMOSTRAS ANALISADAS.**

ID	Região	Ano	MLST									OMP						
			<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	CC	PorA VR1	PorA VR2	FetA	fHbp	NHBA	NadA	BAST
P2848	PE	2007	276	4	9	17	5	18	2	3779	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P2851	PE	2007	276	4	6	17	5	18	2	5122	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P2861	RJ	2007	8	10	5	9	6	3	8	639	32	19-36	15-69	F1-61	166	45	1	3135
P2914	PE	2007	276	4	6	17	5	18	2	5122	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P2941	RJ	2007	8	10	5	9	6	3	8	639	32	7-1	1	F1-30	671	24	0	3148
P2955	RJ	2007	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	19-36	15-39	F5-1	189	24	1	3138
P2987	PE	2007	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	995	24	0	3155
P3039	PE	2007	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-41	25	22	0	3072
P3040	PE	2007	2	3	4	3	8	4	6	11	11	5-1	10-8	F3-6	41	24	1	3134
P3074	PE	2008	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-11	F3-9	25	24	0	3063
P3076	PE	2008	276	4	9	17	5	18	2	3779	103	22	14-11	F3-9	25	24	0	3063
P3087	PE	2008	2	3	4	3	8	4	456	6974	11	5-1	10-8	F3-6	269	43	0	3142
P3095	RJ	2008	276	4	9	141	5	425	29	10782	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3100	BA	2008	276	4	9	17	452	17	357	9695	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3103	BA	2008	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P3105	BA	2008	276	4	9	17	5	17	2	9682	103	22	14-6	F3-9	158	42	0	3136
P3110	BA	2008	8	10	5	4	6	3	8	33	NA	19-36	15-39	F5-1	229	24	0	3139
P3111	BA	2008	276	10	9	17	5	18	2	11614	32	19-36	15-39	F3-9	1	42	0	3116
P3112	BA	2008	2	3	4	3	8	4	6	11	11	5	2	F3-9	1	43	0	3117

ID	Região	Ano	<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	CC	PorA VR1	PorA VR2	FetA	fHbp	NHBA	NadA	BAST
P3119	BA	2008	276	4	9	17	5	17	357	9690	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3132	BA	2008	276	4	9	17	5	17	357	9690	NA	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P3137	BA	2008	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3138	BA	2008	276	10	9	17	5	18	2	11614	103	22	14-6	F3-9	143	24	0	3137
P3139	BA	2008	276	4	9	17	5	17	357	9690	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3279	PE	2008	276	4	9	166	5	425	357	10779	NA	22	14-6	F3-9	25	22	0	3073
P3283	BA	2008	276	4	9	17	5	18	2	3779	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3289	BA	2009	2	3	4	3	8	4	200	9723	11	5	2	F3-6	19	43	0	3128
P3290	BA	2009	2	4	4	3	8	4	6	1189	11	5	2	F3-6	19	24	0	3129
P3292	BA	2009	276	4	6	17	5	18	475	9728	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3293	BA	2009	8	10	5	187	6	465	248	9729	NA	19-15	15	F5-21	1	511	1	3122
P3294	BA	2009	2	3	4	3	8	4	200	9723	11	5	2	F3-6	24	43	0	3131
P3295	BA	2009	4	10	47	307	6	2	12	3771	35	7-2	13-1	F1-7	16	61	0	3071
P3297	BA	2009	2	3	4	3	8	4	6	11	11	5-11	10-4	F3-6	1	691	0	3118
P3300	BA	2009	2	3	7	2	8	5	340	4860	8	18-8	3	F3-9	19	839	0	3130
P3301	BA	2009	8	10	5	4	6	3	8	33	32	5	2	F5-1	1	94	0	3119
P3303	BA	2009	2	3	4	3	8	4	200	9723	11	7-2	13-1	F3-6	25	691	0	3115
P3307	BA	2009	2	3	4	3	8	4	200	9723	11	5-11	10-4	F3-6	25	827	0	3109
P3310	BA	2009	8	10	5	4	6	455	248	9745	32	18-8	3	F5-1	25	639	0	3108
P3357	PE	2009	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3358	PE	2009	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3365	PE	2009	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073

ID	Região	Ano	<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	CC	PorA VR1	PorA VR2	FetA	fHbp	NHBA	NadA	BAST
P3369	PE	2009	276	4	9	141	140	425	357	10780	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3370	PE	2009	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3371	PE	2009	276	4	9	17	140	18	357	9701	NA	5-11	10-22	F3-9	25	42	0	3110
P3475	BA	2009	276	4	4	9	5	18	2	8436	103	5-11	10-62	F3-9	25	42	0	3111
P3476	BA	2009	276	4	4	9	5	18	2	8436	103	5-11	10-62	F3-9	25	42	0	3111
P3477	BA	2009	276	4	4	9	5	6	2	8437	NA	5-11	10-62	F3-9	25	989	0	3114
P3478	BA	2009	276	4	4	9	5	18	2	8436	103	5-11	10-62	F3-9	497	42	0	3143
P3479	BA	2009	276	4	4	9	5	18	2	8436	103	5-11	10-62	F3-9	25	42	0	3111
P3480	BA	2009	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3497	PE	2009	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3554	PE	2010	276	4	9	141	5	425	29	10782	NA	22	14-6	F3-9	891	989	0	3156
P3557	PE	2010	276	4	9	141	5	425	29	10782	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3558	PE	2010	276	4	9	141	5	425	29	10782	NA	22	14-6	F5-1	25	42	0	3073
P3637	RJ	2010	8	10	5	9	6	3	490	13597	32	7-42	1-10	F3-9	1	45	0	3120
P3667	RJ	2010	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3668	RJ	2010	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3670	RJ	2010	276	4	9	17	5	18	2	3779	103	22	14-6	F3-9	277	24	0	3144
P3712	RJ	2010	276	4	9	9	5	18	357	13598	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3733	PE	2010	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F5-1	25	42	0	3073
P3766	RJ	2010	8	548	5	9	6	3	8	13599	32	7-1	1-10	F3-9	1	45	0	3121
P3776	PE	2010	276	4	9	166	5	425	357	10779	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3777	PE	2010	276	4	9	141	5	425	357	10781	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073

ID	Região	Ano	<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	CC	PorA VR1	PorA VR2	FetA	fHbp	NHBA	NadA	BAST
P3778	PE	2010	276	4	9	141	140	425	357	10780	NA	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3791	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3792	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3800	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3841	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	42	0	3073
P3842	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F1-7	25	42	0	3073
P3858	PE	2011	276	7	4	242	22	18	28	13600	NA	5-1	10-13	F3-9	3	24	0	3124
P3978	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	801	25	0	3149
P3979	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	1034	125	0	3157
P3986	PE	2011	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	25	0	3067
P4005	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	25	0	3067
P4007	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P4029	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	789	25	0	3152
P4030	PE	2012	276	4	6	17	5	18	2	5122	103	22	14-6	F3-9	25	25	0	3067
P4031	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	25	0	3067
P4032	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	25	0	3067
P4056	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	25	0	3067
P4072	PE	2012	276	4	9	492	5	18	2	8098	103	22	14-6	F1-1	169	24	0	3140
P4073	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	9	0	3066
P4075	PE	2012	276	4	9	9	26	18	2	8730	NA	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P4077	PE	2012	276	4	6	17	5	18	2	5122	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P4132	PE	2012	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	2	24	0	3123

ID	Região	Ano	<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	CC	PorA VR1	PorA VR2	FetA	fHbp	NHBA	NadA	BAST
P4133	RJ	2012	8	4	6	17	5	320	2	4079	103	22	14-6	F3-9	5	25	0	3125
P4144	PE	2012	276	4	9	9	5	247	340	9464	NA	22	14-6	F3-51	25	24	1	3107
P4146	PE	2012	276	4	9	410	5	18	340	13601	NA	22	14-6	F3-9	25	24	1	3106
P4247	PE	2013	276	4	9	410	5	18	340	13601	NA	22	14-6	F3-9	264	24	0	3145
P4248	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	264	24	0	3145
P4250	PE	2013	276	4	9	17	5	18	2	3779	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P4274	PE	2013	276	4	9	17	5	18	2	3779	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P4277	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	789	125	0	3151
P4322	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P4329	RJ	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	125	0	3070
P4330	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-7	F3-9	264	25	0	3145
P4331	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	7-4	1	F3-9	169	125	0	3141
P4333	PE	2013	276	4	9	410	5	18	340	13601	103	22	14-6	F3-9	25	125	0	3070
P4334	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	25	0	3067
P4335	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	789	24	0	3152
P4336	PE	2013	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	7-4	1	F3-9	25	24	0	3074
P4338	PE	2014	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F1-7	25	24	0	824
<b>P4344</b>	RJ	2014	67	5	6	3	3	11	13	345	NA	22	14-6	F3-9	892	24	1	3158
P4352	PE	2013	276	4	9	410	5	18	340	13601	NA	22	14-6	F3-9	1035	24	0	3159
P4400	UK	2014	2	3	4	887	8	4	6	11	11	22	14-6	F1-1	13	24	1	-
P4431	PE	2014	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	8	24	0	3126
P4464	SP	2014	276	4	9	9	26	18	2	8730	NA	22	14-6	F3-9	25	24	0	824

ID	Região	Ano	<i>abcZ</i>	<i>adK</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdH</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>	ST	CC	PorA VR1	PorA VR2	FetA	fHbp	NHBA	NadA	BAST
P4466	RJ	2014	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P4480	PE	2015	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	735	24	0	3154
P4531	PE	2015	276	4	9	9	26	18	2	8730	NA	21	16-36	F3-9	8	24	0	3127
P4534	RJ	2015	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	41	24	0	3132
P4615	RJ	2015	8	10	154	17	26	21	340	14233	NA	21	16-36	F3-9	25	24	0	3065
P4950	RJ	2016	276	4	9	17	5	18	2	3779	103	22	14-6	F3-9	25	24	0	824
P5174	PE	2016	276	4	9	9	5	18	2	3780	103	22	14-6	F3-9	41	101	0	3132
P5523	PE	2016	12	5	12	35	60	22	17	461	461	19-1	13-1	F3-9	669	24	0	3069

Em NadA, 0: ausência, 1: presença; BAST: *Bexsero Antigen System Type*.