

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

Debora Ribeiro De Souza Santos

**ESTRATÉGIA GENÔMICA PARA CONTROLE EPIDEMIOLÓGICO DE  
*Neisseria meningitidis* POR MEIO DE TIPIFICAÇÃO GENÉTICA BASEADA  
NO PERFIL DE DISSOCIAÇÃO DE DNA DE ALTA RESOLUÇÃO E  
SEQUENCIAMENTO GENÔMICO: IMPLICAÇÕES NAS AÇÕES DE VIGILÂNCIA  
EM SAÚDE DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

Rio de Janeiro

2022

Debora Ribeiro de Souza Santos

**ESTRATÉGIA GENÔMICA PARA CONTROLE EPIDEMIOLÓGICO DE  
*Neisseria meningitidis* POR MEIO DE TIPIFICAÇÃO GENÉTICA BASEADA  
NO PERFIL DE DISSOCIAÇÃO DE DNA DE ALTA RESOLUÇÃO E  
SEQUENCIAMENTO GENÔMICO: IMPLICAÇÕES NAS AÇÕES DE VIGILÂNCIA  
EM SAÚDE DE DOENÇAS INFECCIOSAS.**

Tese apresentada ao curso de Doutorado Acadêmico 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 obtenção título de Doutor em Ciências.

Orientador: Ivano R. V. de Filippis Capasso.  
Coorientador: Alberto Martín Rivera Dávila.

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na Fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Santos, Debora Ribeiro de Souza

Estratégia genômica para controle epidemiológico de *Neisseria meningitidis* por meio de tipificação genética baseada no perfil de dissociação de DNA de alta resolução e sequenciamento genômico. Implicações nas ações de vigilância em saúde para doenças infecciosas. / Debora Ribeiro de Souza Santos. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

147 f. : il. ; fig. ; 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, 2022.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso.

Co-orientador: Alberto Martín Rivera Dávila.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Neisseria meningitidis*. 2. HRM. 3. Genoma. 4. Controle Epidemiológico. 5. Clones hipervirulentos. I. Título.

Genomic strategy for epidemiological control of *Neisseria meningitidis* through genetic typing based on high resolution DNA dissociation profile and genomic sequencing. Implications in health surveillance actions for infectious diseases..

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Debora Ribeiro de Souza Santos

**ESTRATÉGIA GENÔMICA PARA CONTROLE EPIDEMIOLÓGICO DE  
*Neisseria meningitidis* POR MEIO DE TIPIFICAÇÃO GENÉTICA BASEADA  
NO PEFIL DE DISSOCIAÇÃO DE DNA DE ALTA RESOLUÇÃO E  
SEQUENCIAMENTO GENÔMICO. IMPLICAÇÕES NAS AÇÕES DE VIGILÂNCIA  
EM SAÚDE DE DOENÇAS INFECCIOSAS.**

Tese apresentada ao curso de Doutorado Acadêmico 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 obtenção título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dra. Ana Carolina da Silva Carvalho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso - Orientador  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Alberto Martín Rivera Dávila - Coorientador  
Fundação Oswaldo Cruz

Dedico com todo amor e carinho aos  
meus filhos João Vitor, Luiza e Beatriz.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus por todas as bênçãos em minha vida, por iluminar meu caminho, ter me dado coragem e forças para seguir sempre em frente, apesar dos obstáculos e, por ter conquistado mais esse sonho.

Aos meus pais, em especial a minha querida mãe Therezinha, que não está mais aqui em nosso meio, mas que viverá para sempre dentro de mim. Agradeço imensamente por todos os seus ensinamentos, pelo exemplo e lições de vida, pela educação que me deu e por todos os esforços que sempre fez para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço ao meu marido Adilson, pela ajuda, apoio incondicional, companheirismo e parceria em todos os momentos. Aos meus filhos João Vitor, Luiza e Beatriz, por todo apoio, ajuda, compreensão e incentivo, sempre torcendo pelas minhas conquistas.

À Fiocruz e ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde por me permitirem estudar, aprimorar meus conhecimentos e concluir esse trabalho.

Aos meus orientadores, em especial ao Dr. Ivano de Filippis, por ter me aceitado como aluna, pelo respeito, confiança no meu trabalho, por todo o apoio, enorme paciência e pelos conhecimentos compartilhados. Meu muito obrigada pela ajuda de sempre e disponibilidade para sanar minhas dúvidas em todos os momentos que precisei.

Agradeço também ao Prof. Dr. Sérgio Fracalanza, por ter aceitado participar de todas as bancas no decorrer desses quatro anos de doutorado e por ter contribuído, tão gentilmente, com todo o seu conhecimento para a versão final dessa tese.

Ao grande amigo Marlei Gomes, do laboratório de Micobactérias da UFRJ, pela sua ajuda no meu projeto de Qualificação, por seus ensinamentos, pela sua enorme paciência, disponibilidade e generosidade. Tenho muito respeito e admiração pela sua ética, seu conhecimento e pela maneira simples e humilde de se relacionar com alunos, professores e demais colegas de trabalho.

À Dra Ana Carolina Carvalho, pela convivência no laboratório de Micobactérias da UFRJ na época do mestrado e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Cleber N. do Carmo, do departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde da ENSP, por me ajudar com seus conhecimentos em estatística.

Ao Dr. Kayo Bianco pela convivência no laboratório e pela ajuda no sequenciamento, montagem e anotação dos genomas. Agradeço, de forma muito especial, pela enorme ajuda na análise desses resultados, por toda a sua atenção e paciência.

À Dra Maysa Mandetta que revisou esta tese e contribuiu de forma muito positiva para a versão final.

Ao Gabriel Vitor pela amizade, convivência no laboratório, companhia de almoço no INCQS, pelas conversas e palavras de incentivo.

A todos os integrantes do laboratório e colegas do departamento de microbiologia do INCQS pelos momentos compartilhados e experiências trocadas.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste estudo, o meu eterno agradecimento!

“Nunca desista de um sonho só por causa do tempo que levará para realizá-lo. O tempo passará de qualquer maneira”.

Earl Nightingale.

## RESUMO

*Neisseria meningitidis* (Nm) ou meningococo é o agente causador da doença meningocócica. Diferenças na composição da sua cápsula polissacarídica permitem a classificação da Nm em 12 sorogrupos distintos. A caracterização genética de isolados de meningococos é extremamente importante para o monitoramento epidemiológico da doença meningocócica (DM), através da identificação de clones epidêmicos circulantes, a fim de subsidiar ações específicas de Vigilância Sanitária para contenção de surtos. Esse monitoramento epidemiológico é realizado em diferentes países através da técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). No Brasil, o MLST não é realizado rotineiramente devido ao seu custo elevado. No entanto, métodos baseados na qPCR podem ser utilizados para o mesmo fim, com redução dos custos e maior facilidade de processamento quando comparados ao sequenciamento de DNA. O objetivo desse estudo é estabelecer uma estratégia para o controle epidemiológico da Nm através da detecção de assinaturas genéticas em genes do MLST pelo método de *high-resolution DNA melting analysis* (HRM) para identificar os principais clones hipervirulentos circulantes no país. No total, 920 reações de qPCR-HRM foram realizadas no termociclador *Thermo Fisher QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems* e 1.082 reações foram realizadas no *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems*. Os genes testados foram *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh* e *pdhC* e os resultados obtidos foram semelhantes nos dois equipamentos. A porcentagem na detecção dos alelos testados para cada complexo clonal ficou entre 77% e 100% de acerto. Após busca ativa no PubMLST verificou-se que ao inserir nesse banco de dados resultados de ao menos quatro alelos, foi possível determinar o complexo clonal em 99% a 100% das amostras depositadas no banco. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que é possível identificar os complexos clonais de Nm através da análise da temperatura das curvas de melting (TM) geradas por HRM. Também foi realizado o sequenciamento do genoma de três cepas do cc11/ET15 e duas do sorogrupo W a fim de avaliar os genes de virulência apresentados por essas cepas. Os resultados encontrados revelam a presença de fatores de resistência, elementos genéticos móveis e fatores de virulência não encontrados em cepas não ET-15 que poderiam explicar as altas taxas de letalidade atribuídas a essa variante e também ao sorogrupo W. Essas informações podem

auxiliar na vigilância epidemiológica e nas estratégias de vacinação para evitar a disseminação de novos clones hipervirulentos.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*. HRM. Genoma. Controle epidemiológico. Clones hipervirulentos.

## ABSTRACT

*Neisseria meningitidis* (Nm) or meningococcus is the causative agent of meningococcal disease. Differences in the composition of its polysaccharide capsule allow the classification of Nm into 12 distinct serogroups. The genetic characterization of meningococcal isolates is extremely important for the epidemiological monitoring of meningococcal disease (DM), through the identification of circulating epidemic clones, with the purpose of supporting specific actions of Health Surveillance to contain outbreaks. This epidemiological monitoring is carried out in different countries through DNA sequencing by Multilocus Sequence Typing (MLST). In Brazil, MLST is not routinely performed due to its high cost. However, qPCR-based methods can be used for the same purpose, with reduced costs and easier processing, when compared to DNA sequencing. The objective of this work is to determine a strategy for the epidemiological control of Nm through the detection of genetic signatures in MLST genes, by the method of high-resolution DNA melting analysis (HRM), to identify the main hypervirulent clones circulating in the country. In total, 920 reactions were performed in *Thermo Fisher QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems* and 1,082 in *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems*. The genes tested were *abcZ*, *adk*, *aroE*, *gdh* and *pdhC* and the results obtained were similar in both tested equipment, with only minor differences in the detection of some alleles. The percentage in the detection of alleles tested for each clonal complex was between 77% and 100% correct. After an active search in PubMLST, it was found that by inserting results from at least four alleles in this database, it was possible to determine the clonal complex in 99% to 100% of the samples deposited in this database. The results obtained in this study suggest that it is possible to identify the Nm clonal complexes by analyzing the temperature of the melting curves (TM) generated by HRM. Genome sequencing of three strains of cc11/ET15 and two serogroup W was also performed in order to evaluate the virulence presented by these strains. The results found reveal the presence of resistance factors, mobile genetic elements and virulence factors not found in non-ET-15 strains and, therefore, could explain the high lethality rates attributed to this variant and also to the W serogroup. This information can help in epidemiological surveillance and vaccination strategies to prevent the spread of new hypervirulent clones.

Keywords: *Neisseria meningitidis*. HRM. Genome. Epidemiological control.  
Hypervirulent clones.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial dos sorogrupos e complexos clonais de Nm, no ano de 2019.....	31
Figura 2 - Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene <i>abcZ</i> .....	52
Figura 3 - Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene <i>adk</i> .....	53
Figura 4 - Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene <i>aroE</i> .....	54
Figura 5 - Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene <i>fumC</i> .....	55
Figura 6 - Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene <i>gdh</i> .....	56
Figura 7 - Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene <i>pdhC</i> .....	57
Figura 8 - Alinhamento do gene <i>fumC</i> da variante ET-15.....	59
Figura 9 - Distribuição do sorogrupo B, cc32 e cc41 e do sorogrupo C, cc103 e cc11 no Brasil e no mundo.....	66
Figura 10 - Teste qPCR-HRM com iniciadores do MLST para os genes <i>adk</i> , <i>aroE</i> , <i>gdh</i> e <i>pdhC</i> .....	76
Figura 11 - Gráfico de amplificação do alelo <i>abcZ</i> -276 no QS7.....	80
Figura 12 - Curva de <i>melting</i> do gene <i>aroE</i> no QS7.....	81
Figura 13 - Alinhamento genômico das cepas do cc11 usando o algoritmo <i>Neighbor joining</i> no software <i>CLC genomics</i> .....	98
Figura 14 - Árvore filogenômica utilizando 58 isolados ET-15/ST-11 usando o algoritmo <i>Neighbor joining</i> no software <i>CLC genomics</i> .....	100
Figura 15 - Alinhamento do gene <i>fumA</i> . .....	102
Figura 16 - Alinhamento do gene <i>fumC</i> .....	103
Figura 17 - Árvore filogenética do <i>fumA</i> . .....	104
Figura 18 - Árvore filogenética do <i>fumC</i> .....	105
Figura 19 - Árvore filogenômica comparando genomas de cepas do sorogrupo W usando o algoritmo <i>Neighbor joining</i> no software <i>CLC genomics</i> ...	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista dos iniciadores desenhados utilizados no estudo .....	60
Tabela 2 -	Protocolo da reação <i>MeltDoctor</i> .....	62
Tabela 3 -	Parâmetros da reação com o <i>MeltDoctor</i> .....	63
Tabela 4 -	Perfil alélico do ST central dos genes do MLST.....	67
Tabela 5 -	Ocorrência dos alelos mais frequentes para cada ST central do cc no mundo.....	69
Tabela 6 -	Ocorrência dos alelos mais frequentes para cada ST central do cc no Brasil.....	70
Tabela 7 -	Resultados de TM dos alelos obtidos com fluoróforos distintos no QS5.....	73
Tabela 8 -	Resultados obtidos com temperaturas de anelamento distintas para os genes <i>pdhC</i> , <i>gdh</i> , <i>aroE</i> e <i>adk</i> .....	74
Tabela 9 -	Resultados obtidos no QS5 com o <i>MeltDoctor</i> .....	78
Tabela 10 -	Alelos que apresentaram os melhores resultados para a determinação dos cc e a porcentagem de detecção de cada alelo, entre as cepas da coleção de pesquisa do LMR do INCQS, no QS5 .....	79
Tabela 11 -	Resultados obtidos no QS7 com o <i>MeltDoctor</i> .....	82
Tabela 12 -	Alelos que apresentaram os melhores resultados, no QS7, na determinação dos cc e a porcentagem de detecção de cada alelo, entre as cepas testadas.....	83
Tabela 13 -	Probabilidade de determinação do cc103 (com 1 alelo mais frequente no Brasil).....	85
Tabela 14 -	Probabilidade de determinação do cc103 (com 2 alelos mais frequente no Brasil) .....	85
Tabela 15 -	Probabilidade de determinação do cc32 (com 1 alelo secundário) .....	85
Tabela 16 -	Probabilidade de determinação do cc41/44 (com 1 alelo mais frequente no Brasil) .....	86
Tabela 17 -	Comparação dos resultados do complexo clonal obtidos por HRM e por MLST (continua) .....	87

Tabela 17 - Comparação dos resultados do complexo clonal obtidos por HRM e por MLST (continuação) .....	88
Tabela 17 - Comparação dos resultados do complexo clonal obtidos por HRM e por MLST (conclusão) .....	89
Tabela 18 - Comparação entre os resultados obtidos por HRM e pelo sequenciamento <i>Sanger</i> entre as cepas do cc11.....	91
Tabela 19 - Principais características genômicas dos isolados do complexo clonal 11 subclone .....	92
Tabela 20 - Fatores de resistência nos genomas das cepas do cc11 anotados no database CARD.....	92
Tabela 21 - Elementos genéticos moveis nos genomas das cepas do cc11 anotados no database <i>MobileElementFinder</i> .....	93
Tabela 22 - Fatores de virulência detectados nas cepas do cc11 anotados no database VFDB. (continua) .....	95
Tabela 22 - Fatores de virulência detectados nas cepas do cc11 anotados no database VFDB. (continuação) .....	96
Tabela 22 - Fatores de virulência detectados nas cepas do cc11 anotados no database VFDB. (conclusão).....	97
Tabela 23 - Lista de genes comuns entre cepas ET-15 e não ET-15 apresentando alelos específicos .....	101

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>abcZ</i>	<i>putative ABC transporter</i>
<i>adk</i>	<i>adenylate kinase</i>
<i>aroE</i>	<i>shikimate dehydrogenase</i>
cc	Complexo clonal
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DM	Doença meningocócica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>fumC</i>	<i>fumarate hydratase</i>
<i>gdh</i>	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
HRM	<i>High resolution Melt</i>
LACEN	Laboratório Central
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LMR	Laboratório de Microrganismos de Referência
MenB	Meningococo sorogrupo B
MenC	Meningococo sorogrupo C
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
Nm	<i>Neisseria meningitidis</i>
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
<i>pdhC</i>	<i>pyruvate dehydrogenase subunit</i>
<i>pgm</i>	<i>phosphoglucomutase</i>
PNI	Programa Nacional de Imunização
QS5	Termociclador <i>QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems</i>
QS7	Termociclador <i>QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
ST	<i>Sequence type</i> (Tipo sequencial)
SUS	Sistema Único de Saúde
TM	<i>Temperature melting</i>
Visa	Vigilância Sanitária
WHO	Organização Mundial de Saúde
μM	Micromolar
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 <i>Neisseria meningitidis</i></b> .....	<b>18</b>
1.1.1 Genoma.....	19
1.1.2 Virulência.....	20
1.1.3 Cápsula .....	20
1.1.4 Lipooligossacarídeo (LOS) .....	21
1.1.5 Proteínas de membrana externa ( <i>outer membrane proteins</i> - OMP) .....	21
<b>1.2 Doença meningocócica</b> .....	<b>23</b>
1.2.1 Sintomatologia da DM .....	23
1.2.2 Transmissão.....	24
1.2.3 Fatores de risco para doença invasiva .....	25
1.2.4 Susceptibilidade do hospedeiro à DM .....	25
1.2.5 Patogenicidade.....	26
<b>1.3 Epidemiologia</b> .....	<b>26</b>
<b>1.4 Diagnóstico</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5 Tratamento/Quimioprofilaxia</b> .....	<b>34</b>
<b>1.6 Prevenção</b> .....	<b>34</b>
<b>1.7 Tipificação molecular de <i>Neisseria meningitidis</i></b> .....	<b>37</b>
1.7.1 <i>Multilocus Sequence Typing</i> .....	37
<b>1.8 PCR em tempo real (qPCR)</b> .....	<b>38</b>
1.8.1 Taqman .....	39
1.8.2 <i>High-resolution DNA melting analysis</i> .....	39
1.8.3 qPCR-HRM .....	41
<b>1.9 Sequenciamento do genoma completo</b> .....	<b>42</b>
<b>1.10 Vigilância em saúde</b> .....	<b>45</b>
<b>1.11 Justificativa e relevância</b> .....	<b>47</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>49</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1 Amostragem</b> .....	<b>50</b>

<b>3.2</b>	<b>Reativação das cepas .....</b>	<b>50</b>
<b>3.3</b>	<b>Extração do DNA genômico .....</b>	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Determinação da sequência tipo (ST) e dos complexos clonais (cc).....</b>	<b>51</b>
<b>3.5</b>	<b>Determinação das assinaturas genéticas .....</b>	<b>51</b>
3.5.1	Detecção da variante ET-15 do cc11 .....	58
<b>3.6</b>	<b>Desenho dos iniciadores .....</b>	<b>59</b>
<b>3.7</b>	<b>Determinação dos genes do MLST selecionados .....</b>	<b>61</b>
<b>3.8</b>	<b>qPCR-HRM .....</b>	<b>61</b>
<b>3.9</b>	<b>Protocolo de reação .....</b>	<b>61</b>
<b>3.10</b>	<b>Sequenciamento, montagem e anotação de genomas da variante ET-15..</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>Determinação dos complexos clonais (cc) mais frequentes.....</b>	<b>66</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação genes do MLST selecionados.....</b>	<b>68</b>
<b>5.3</b>	<b>qPCR-HRM .....</b>	<b>72</b>
5.3.1	Teste com fluoróforos distintos.....	72
5.3.2	Teste com temperaturas de anelamento distintas.....	74
5.3.3	Teste com os iniciadores do MLST .....	75
5.3.4	Resultados obtidos no QS5 com <i>MeltDoctor</i> .....	76
5.3.5	Resultados obtidos no QS7 com <i>MeltDoctor</i> .....	80
5.3.6	Análise estatística...: .....	84
5.3.6.1	<i>Desvio padrão dos resultados apresentados</i> .....	86
5.3.7	Comparação dos resultados do HRM com o MLST .....	86
5.3.8	Resultados da detecção do ET-15 por HRM.....	90
5.3.8.1	<i>Sequenciamento Sanger das amostras ET-15</i> .....	90
<b>5.4</b>	<b>Genoma das variantes ET-15 .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>CRONOGRAMA .....</b>	<b>124</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>
	<b>ANEXO A – LISTAGEM DAS CEPAS UTILIZADAS NO ESTUDO .....</b>	<b>137</b>

<b>ANEXO B – LISTAGEM DOS GENOMAS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE ET-15.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO C – LISTAGEM DOS GENOMAS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE W.....</b>	<b>144</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Neisseria meningitidis*

O gênero *Neisseria* pertence ao domínio *Bacteria*, filo *Proteobacterium*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Neisseriales*, família *Neisseriaceae* e inclui 40 espécies com base nas informações da sequência do gene 16S rRNA (LPSN, 2021), das quais *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae* são as únicas espécies que são patógenos obrigatórios nos seres humanos.

*Neisseria meningitidis* (Nm) ou meningococo é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, imóvel, não esporulada, podendo ser encapsulada ou não, que se apresenta sob a forma de diplococo, cujo único hospedeiro é o homem. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), acredita-se que 5 a 10% da população albergue a Nm, assintomaticamente, em algum momento ou por período prolongado e essa taxa pode aumentar em situações epidêmicas (WHO, 2021). As taxas de incidência de portadores são maiores entre adolescentes e adultos jovens e em camadas socioeconômicas menos privilegiadas. O meningococo pode colonizar assintomaticamente o trato respiratório superior humano e ocasionalmente invadir a corrente sanguínea causando septicemia ou meningococemia e a partir do sangue, pode atravessar a barreira hematoencefálica e infectar as meninges causando meningite, com significativa morbidade e mortalidade no mundo todo (AMBROSIO *et al.*, 2019; BRASIL, 2016; CRUM-CIANFLONE *et al.*, 2016; KREMER *et al.*, 2020; TZENG; STEPHENS, 2021; WHO, 2017; WHO, 2018; WHO, 2021).

Os meningococos são classificados em 12 diferentes sorogrupos: A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y e Z baseados em propriedades antigênicas da cápsula de polissacarídeos (AZEVEDO *et al.*, 2020; TZENG; STEPHENS, 2021; WHO, 2021). Os meningococos mais invasivos pertencem aos sorogrupos A, B, C, W, X e Y, sendo esses os principais responsáveis pela ocorrência de epidemias. A distribuição geográfica e o potencial epidêmico diferem de acordo com o sorogrupo (HARRISON *et al.*, 2013; WHO, 2017; WHO, 2018; WHO, 2021).

A classificação adicional em sorosubtipo, sorotipo e imunotipo é realizada com base na estrutura da *PorA*, *PorB* e lipooligolissacarídeo (LOS), respectivamente (BRASIL, 2016; ROSENSTEIN *et al.*, 2001). São classificadas em sequências tipo

(ST) e agrupadas em complexos clonais (cc) por *Multilocus Sequence Type* (MLST) (FONSECA *et al.*, 2017; MAIDEN *et al.*, 1998).

### 1.1.1 Genoma

Com base no sequenciamento de vários genomas de Nm, o seu cromossomo tem entre 2,0 e 2,2 megabases de tamanho e contém cerca de 2.000 genes. Uma reconstrução filogenética, baseada no genoma, sugere que *N. meningitidis* emergiu como um comensal humano não encapsulado de um ancestral comum com *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria lactamica* e que depois adquiriu os genes responsáveis pela síntese da cápsula, via transferência horizontal de genes (SCHOEN *et al.*, 2008).

Nm compartilha cerca de 90% de homologia com *N. gonorrhoeae* e *N. lactamica*. Elementos genéticos móveis, incluindo elementos IS e as sequências profago constituem até aproximadamente 10% do genoma. A transferência de DNA ocorre entre meningococos, gonococos, espécies comensais de *Neisseria spp* e com outras bactérias (DAVIDSEN; TONJUM, 2006). Várias sequências repetitivas e regiões polimórficas estão presentes, geralmente em grandes matrizes heterogêneas, sugerindo áreas ativas de recombinação genética.

O núcleo do genoma que codifica para funções metabólicas essenciais representa cerca de 70% do genoma. Grandes ilhas genéticas estão presentes em diferentes cepas e codificam proteínas de superfície e fatores de virulência (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

O meningococo compartilha cerca de 90% de homologia genética com *N. gonorrhoeae* ou *N. lactamica*. Elementos genéticos móveis, incluindo elementos IS e sequências profago compõem cerca de 10% do genoma. A transferência de DNA ocorre entre meningococos, gonococos e *Neisseria spp.* assim como com outras bactérias, como o *Haemophilus*. Várias sequências repetitivas e regiões polimórficas estão presentes, geralmente em grandes arranjos heterogêneos, sugerindo áreas ativas de recombinação genética. Outra característica do genoma meningocócico é a presença de múltiplos “interruptores” genéticos (responsáveis por “shifts” em sequências gênicas), contribuindo para a expressão de genes associados a patógenos. Em suma, uma característica central na evolução do meningococo é a plasticidade do seu genoma e a capacidade criada por esta plasticidade para a diversidade fenotípica (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

### 1.1.2 Virulência

Os determinantes de virulência de *N. meningitidis* incluem a expressão da cápsula de polissacarídeo, a expressão de proteínas de superfície (proteínas de membrana externa incluindo pili, porinas *PorA* e *PorB*, moléculas de adesão Opa e Opc), mecanismos de captação de ferro e endotoxina (lipooligossacarídeo - LOS). Nm também possui mecanismos genéticos, que facilitam a transferência horizontal de genes, variação antigênica e mimetismo molecular, permitindo ao organismo se ligar às superfícies mucosas e invadir o hospedeiro. Além disso, a troca de cápsula, devido a troca alélica de genes de biossíntese de cápsulas por transformação, permite que o meningococo escape da detecção imunológica (STEPHENS, 2009).

### 1.1.3 Cápsula

*N. meningitidis* pode ser encapsulada ou não. No entanto, cepas de Nm que causam doença invasiva e são isoladas de sítios estéreis, como sangue ou LCR, são sempre encapsuladas. A cápsula é essencial para a sobrevivência do microrganismo, pois possui propriedades antifagocíticas que aumentam sua sobrevivência na corrente sanguínea ou no sistema nervoso central. Meningococos que não expressam polissacarídeos capsulares raramente, ou nunca, causam doença invasiva. A cápsula permite que o meningococo evite a lise mediada por complemento e fagocitose e é a base para a classificação em sorogrupos, fundamentada nas propriedades antigênicas de seus polissacarídeos (STEPHENS *et al.*; 2007).

Os principais polissacarídeos capsulares dos meningococos associados à doença invasiva são compostos por derivados do ácido siálico, como o ácido N acetilneuramínico (Neu5Ac), exceto a cápsula do sorogrupo A, que consiste em unidades de repetição de N-acetil-manosamina-1-fosfato. O Neu5Ac é a forma mais comum de ácido siálico em humanos e desempenha um papel importante no reconhecimento intercelular e/ou intermolecular. A incorporação de Neu5Ac em cápsulas meningocócicas permite que o meningococo se torne menos visível para o sistema imunológico do hospedeiro, devido ao mimetismo molecular (HOBB *et al.*, 2010). Como é observado na cápsula do sorogrupo B, que apresenta na sua estrutura um homopolímero de ácido siálico idêntico à molécula de adesão celular neural fetal

humana. Essa semelhança é responsável pela resposta imunológica particularmente fraca gerada contra cápsula do sorogrupo B por humanos (HOBBS *et al.*, 2010; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A Nm tem a capacidade de permutar o material genético que é responsável pela produção de cápsula e, com isso, alterar o seu sorogrupo (BRASIL, 2016). Os genes capsulares estão localizados em um único *locus cps* dentro da ilha de virulência IHT-AI 24 kb que é dividido em três regiões A, B e C. A região A contém genes responsáveis pela síntese e a polimerização do polissacarídeo. As regiões B e C contêm genes responsáveis pela translocação do polissacarídeo do citoplasma para a superfície. A troca de cápsula ocorre devido à identidade genética de partes dos loci da cápsula e é o resultado da troca horizontal por transformação e recombinação no locus do sorogrupo de genes específicos da biossíntese de cápsulas (HARRISON *et al.*, 2010; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A troca de cápsulas é um outro mecanismo de escape de imunidade protetora natural ou induzida por vacina e um mecanismo de virulência mostrado por outros patógenos bacterianos encapsulados (por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*). O surgimento de W-135 como causa de surtos entre 2000 e 2002 foi devido à disseminação de cepas ET-37 (ST-11) de W-135 intimamente relacionadas às cepas ET-37 (ST-11) do sorogrupo C. O fenômeno de troca de cápsula levantou preocupações sobre a pressão imunológica que programas de vacinação baseados em cápsulas podem causar. No entanto, a troca de cápsulas não tem causado problemas mesmo após a introdução da vacina meningocócica conjugada (HARRISON *et al.*, 2010; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

#### 1.1.4 Lipooligossacarídeo (LOS)

Os LOS (endotoxina) desempenham um importante papel na aderência dos meningococos e na ativação do sistema imune inato. São responsáveis por grande parte da atividade biológica e toxicidade da endotoxina meningocócica (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

#### 1.1.5 Proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* - OMP)

*PorA* e *PorB* são proteínas de membrana externa, duas porinas distintas, através das quais pequenos nutrientes hidrofílicos se difundem na bactéria via seleção de cátions ou ânions. Essas porinas são também envolvidas em interações com as células hospedeiras e como alvos para anticorpos bactericidas (TZENG; STEPHENS, 2000). *PorB* é a principal porina de membrana externa que se insere nas membranas, induz o influxo de  $Ca^{2+}$  e ativa TLR2 e apoptose celular (MASSARI *et al.*; 2003). *PorA* é o principal componente das vacinas baseadas em vesículas de OMP e alvo para anticorpos bactericidas (VERMONT *et al.*; 2003).

As proteínas de captação do ferro são importantes, pois o ferro é um fator crucial de crescimento para os meningococos durante a colonização e a doença. As proteínas meningocócicas, que competem com as nossas proteínas para captar ferro, incluem *HmbR* (hemoglobina), *TbpA* e *TbpB* (transferrina), *HbpA* e *HbpB* (lactoferrina), *HpnA* e *HpnB* (complexo hemoglobina-haptoglobina) e possíveis homólogos de sideróforos (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A identificação do sorogrupo é feita por meio de ensaios de aglutinação em lâmina ou reação em cadeia da polimerase (PCR), enquanto a tipificação meningocócica é realizada usando anticorpos monoclonais ou PCR e sequenciamento dos genes que codificam a síntese das OMP (VOGEL *et al.*, 2010).

Avanços no desenvolvimento da vacina MenB ocorreram usando justamente proteínas conservadas da membrana externa com ou sem OMV (vesículas da membrana externa) como alvos da vacina. As OMV podem aumentar a resposta imunológica, funcionando como um conjugado complexo de proteínas ou, melhor, um complexo de adjuvantes. Novos alvos foram identificados por meio de sequenciamento do genoma: *Neisserial adhesin A* (NadA) – que promove aderência e invasão das células epiteliais; antígeno de ligação à heparina de *Neisseria* (NHBA) - que está presente em praticamente todas as cepas de *Neisseria*, liga-se à heparina e pode aumentar a resistência sérica das bactérias; e proteína de ligação ao fator H (fHbp) – que se liga ao fator H e permite com que a bactéria sobreviva no sangue, bloqueando assim a via alternativa do sistema complemento (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018; GASPARINI *et al.*, 2015).

## 1.2 Doença meningocócica

A doença meningocócica (DM) é uma infecção bacteriana aguda que quando se apresenta na forma de doença invasiva, caracteriza-se por uma ou mais síndromes clínicas, sendo a meningite meningocócica (MM) a mais frequente delas e a meningococemia (MC) a forma mais grave. Podem ocorrer isoladamente ou associadas (BRASIL, 2019b). Pode causar dano cerebral grave e é fatal em quase 50% dos casos, se não for tratada. Mesmo sendo diagnosticada precocemente e o tratamento adequado iniciado, cerca de 5 a 10% dos pacientes acometidos por DM, vão a óbito, dentro de 24 a 48 horas após o início dos sintomas (BRASIL, 2016; WHO, 2017; WHO, 2018; WHO, 2021). A taxa de letalidade média da doença no Brasil está em torno de 20% nos últimos anos. Na forma mais grave, a MC, a letalidade chega a quase 50% (BRASIL, 2019b).

É uma doença de notificação compulsória imediata, realizada em até 24 horas para as vigilâncias municipais e estaduais (Portaria de Consolidação nº 4, de 28 setembro de 2017 e Portaria nº 1.061, de 18 de maio de 2020), sendo responsabilidade dos serviços de saúde, públicos ou privados e profissionais de saúde da área de assistência ou vigilância, notificarem todo caso suspeito. A notificação deve ser registrada no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), por meio do preenchimento da Ficha de Investigação de Meningite (BRASIL, 2019a).

### 1.2.1 Sintomatologia da DM

A DM pode apresentar um amplo espectro clínico, que varia desde bacteremia transitória a choque séptico, com a morte do paciente em poucas horas após o início dos sintomas (BRASIL, 2019b; DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

Na MM ocorre um processo inflamatório das membranas que recobrem o cérebro e a medula espinhal. É uma doença devastadora e continua sendo um grande desafio para a saúde pública (WHO, 2021). O quadro de meningite pode se instalar em algumas horas, iniciando com intensa sintomatologia, ou mais lentamente, em alguns dias, acompanhado de outras manifestações, geralmente indistinguíveis de outras meningites bacterianas. A síndrome mais comum é a meningite bacteriana aguda com febre, dor de cabeça, rigidez de nuca, fotofobia, confusão e vômitos. Associa-se, em cerca de 60% dos casos, à presença de lesões cutâneas petequiais

bastante características. Como complicação, as convulsões estão presentes em 20% das crianças. A MM ainda pode causar danos cerebrais, perda de audição ou dificuldade de aprendizado em 10 a 20% dos sobreviventes (BRASIL, 2019b; STEPHENS, 2018; WHO, 2017; WHO, 2021).

Nos casos de MC, o coma pode sobrevir em algumas horas. Está associado a elevadas taxas de letalidade, geralmente acima de 40%, sendo a grande maioria dos óbitos nas primeiras 48 horas do início dos sintomas (BRASIL, 2019b; WHO, 2017). Em 10 a 20% dos pacientes com DM, identificam-se formas de evolução muito rápidas, geralmente fulminantes, devido somente à MC ou septicemia meningocócica, sem meningite, e que se manifestam por sinais clínicos de choque, necrose das glândulas suprarrenais e coagulação intravascular disseminada com falência múltipla dos órgãos (síndrome de Waterhouse-Friderichsen). É um quadro de instalação repentina, que se inicia com febre, cefaleia, mialgia e vômitos, seguidos de palidez, sudorese, hipotonia muscular, taquicardia, pulso fino e rápido, queda de pressão arterial, oligúria e má perfusão periférica. Um *rash* maculopapular, não petequisal, difícil de distinguir de um exantema de origem viral e geralmente de curta duração, pode estar presente no início do quadro em até 15% das crianças com MC e até 50% desses casos resultam em óbito (BRASIL, 2019b; STEPHENS, *et al.*, 2007).

Sequelas de longo prazo da DM, incluindo déficits neurológicos, deficiência de desenvolvimento ou isquemia e necrose de membros, ocorrem em 10 a 20% dos pacientes com MM e MC (BRASIL, 2019b; STEPHENS *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Transmissão

A transmissão ocorre por contato direto pessoa a pessoa, por meio de secreções respiratórias de pessoas infectadas, assintomáticas ou doentes, e atinge principalmente as faixas etárias mais jovens. O período de incubação é em torno de 3 a 4 dias, podendo variar de 2 a 10 dias (WHO, 2021). Após a colonização da nasofaringe, a probabilidade de desenvolver doença meningocócica (DM) dependerá da virulência da cepa, da imunidade do hospedeiro e da capacidade de eliminação do agente da corrente sanguínea, pela ação de anticorpos séricos com atividade bactericida mediada pela ativação do complemento (BRASIL, 2019b; WHO, 2017). O período de transmissibilidade persiste até que a Nm desapareça da nasofaringe. Em geral, isso ocorre após 24 horas de antibioticoterapia adequada (BRASIL, 2019b).

### 1.2.3 Fatores de risco para doença invasiva

Os anticorpos bactericidas e as vias do complemento intactas são os principais correlatos da proteção contra a DM, com a opsonização e a morte por fagócitos contribuindo secundariamente. Os anticorpos geralmente aparecem no soro 2 semanas após a colonização meningocócica da nasofaringe. Indivíduos com deficiências congênitas ou adquiridas de imunoglobulinas ou complemento, pessoas com asplenia anatômica ou funcional e pessoas com HIV apresentam um maior risco de desenvolvimento de DM (DRETTLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). As pessoas com tais condições clínicas, em função da incapacidade de provocar a morte intracelular da bactéria, também apresentam maior risco de episódios recorrentes de DM e, portanto, são consideradas grupos prioritários para profilaxia com vacinas (BRASIL, 2019b).

Dentre os principais fatores de risco associados à DM, estão: infecções respiratórias virais recentes (especialmente por influenza), condições socioeconômicas menos privilegiadas e contato íntimo com portadores. O risco de desenvolver DM entre contatos domiciliares de um doente é cerca de 500 a 800 vezes maior que na população geral. Por isso, populações com risco aumentado incluem indivíduos que compartilham o mesmo dormitório, em quartéis, acampamento militar ou em alojamentos de estudantes universitários, por exemplo. Entre os fatores ambientais estão o tabagismo (ativo ou passivo), baixa umidade, meses de inverno em climas temperados, exposição ao ar seco e à poeira, como ocorre, por exemplo, na África Subsaariana (vento Harmatã), e aglomerações em geral. Outros fatores de risco são microbiologistas que trabalham regularmente com isolados de Nm e viajantes para o cinturão da meningite na África Subsaariana, para o Hajj ou Umrah na Arábia Saudita (DRETTLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

### 1.2.4 Susceptibilidade do hospedeiro à DM

A susceptibilidade é geral, entretanto, o grupo etário de maior risco são as crianças menores de 5 anos, principalmente as menores de 1 ano.

A DM acomete indivíduos de todas as faixas etárias, porém aproximadamente 30% dos casos notificados ocorrem em crianças menores de 5 anos de idade. Os

maiores coeficientes de incidência da doença são observados em lactentes, no primeiro ano de vida. Nos surtos e epidemias, observam-se mudanças nas faixas etárias afetadas, com aumento de casos entre adolescentes e adultos jovens. A DM ocorre primariamente em pessoas susceptíveis, recentemente colonizadas por uma cepa patogênica (BRASIL, 2019b).

### 1.2.5 Patogenicidade

A DM resulta da interação de: (1) fatores microbianos que influenciam a virulência do organismo, (2) condições ambientais que facilitam a exposição e aquisição, e (3) fatores de susceptibilidade do hospedeiro que favorecem a aquisição bacteriana, colonização, invasão e sobrevivência.

Nas eras de terapia pré-sérica e pré-antibióticos, 70 a 85% dos casos de DM eram fatais. Atualmente, a taxa de mortalidade geral na DM ainda permanece elevada, em torno de 10%. A DM também está associada a acentuada morbidade, incluindo perda de membros, perda auditiva, disfunção cognitiva, deficiência visual, dificuldades educacionais, atrasos no desenvolvimento, déficits no nervo motor, convulsões e problemas comportamentais (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

Várias bactérias podem causar meningite, porém a Nm é a única que tem potencial para causar grandes epidemias. Portanto, as infecções por Nm são um grande problema para a saúde global. (MARIN *et al.*, 2017; WHO, 2017; WHO, 2021).

## 1.3 Epidemiologia

A DM foi descrita em 1805, quando um surto varreu Genebra, na Suíça. No entanto a Nm, agente causador da MM, só foi identificada em 1887 por Anton Weichselbaum (1845-1920) a partir de uma amostra de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) de um paciente com meningite. Desde 1909 foram relatadas epidemias no continente africano e foram também observados surtos durante as duas guerras mundiais e (WHO, 2017).

Os maiores e mais recorrentes surtos ocorreram na área semiárida da África subsaariana (WHO, 2017). Esta área ao norte da África, conhecida como “cinturão da meningite”, que vai do Senegal até a Etiópia, é frequentemente acometida por epidemias causadas por Nm. Nessa região, a DM ocorre em ciclos epidêmicos que

duram entre 8 e 15 anos. As epidemias ocorrem nos ciclos sazonais entre o final de novembro e o final de junho, dependendo da localização e do clima do país, e diminuem rapidamente com a chegada da estação chuvosa. De modo geral, a sazonalidade da doença caracteriza-se pelo predomínio das meningites bacterianas no inverno (WHO, 2017; WHO, 2021).

A Ásia teve algumas grandes epidemias de DM nos últimos 30 anos (China 1979 e 1980, Vietnã 1977, Mongólia 1973-1974 e 1994-1995, Arábia Saudita 1987, Iêmen 1988). Também ocorreram epidemias na Europa e nas Américas nos últimos anos, mas não atingiram níveis de incidência de epidemias muito altos em outras partes do mundo (WHO, 2017; WHO, 2021).

No Brasil, a DM é endêmica, com ocorrência de surtos esporádicos e a *Nm* é o principal agente etiológico da meningite bacteriana.

Uma das mais importantes epidemias de meningite enfrentadas no Brasil ocorreu entre os anos de 1971 e 1974 durante o período da ditadura militar. Isso porque o Brasil foi vítima não de um, mas de dois sorogrupos de meningococos (BERNARDO, 2020). Durante esse período o Brasil vivia o auge do seu milagre econômico, e divulgar para toda população que se iniciava um surto de meningite bacteriana causada por *N. meningitidis* estava fora de questão. A demora das autoridades competentes em escutar os profissionais da saúde e tomarem as medidas cabíveis levaram a ocorrência de dois surtos simultâneos da enfermidade, começando com um surto em abril de 1971 pelo sorogrupo C, e antes que o mesmo tivesse fim, ocorreu outro surto com início em maio de 1974, causado pelo sorogrupo A, que apresenta potencial epidêmico maior que o C. Essa junção de dois surtos simultâneos desencadeou uma epidemia sem precedentes que até hoje ainda tem seus números de infectados e óbitos imprecisos. Estima-se que no decorrer da epidemia a proporção era de 200 casos por 100 mil habitantes. Tal número de casos assemelhou-se ao observado em surtos no chamado “Cinturão Africano da Meningite”, área endêmica da doença que compreende 15 países e se estende do Senegal até a Etiópia (BARATA, 2000; SCHNEIDER; TAVARES; MUSSE, 2015). Esse período pode ser considerado como a maior epidemia de meningite meningocócica da história do Brasil. Além desses, o país também passou por dois outros surtos importantes da doença, em 1923 e em 1945, mas nenhum deles apresentou um número de casos e óbitos tão elevados com os da década de 1970 (BERNARDO, 2020).

Somente em 1974 com a situação completamente fora de controle e com um número registrado de 67 mil casos em pelo menos sete estados brasileiros, 40 mil deles só em São Paulo, a verdade veio à tona causando um grande impacto e pânico na população. Somente então, medidas sanitárias de isolamento, higienização, proibição de contato e fechamento de escolas foram finalmente tomadas. Os jogos Pan-Americanos de 1975, que estavam marcados para acontecer em São Paulo, tiveram que ser transferidos para a Cidade do México. Hospitais, como o Instituto de Infectologia Emílio Ribas, ficaram superlotados. Não houve quarentena porque o período de incubação da meningite é muito curto. Neste mesmo ano, e sem poder esconder a epidemia que tomava conta do país, foi assinado um acordo com o Instituto Pasteur Mérieux, para importação de 80 milhões de doses da vacina contra a meningite. De acordo com o historiador Carlos Fidelis, o laboratório francês precisou construir uma nova fábrica porque a que existia não comportava uma produção tão grande (BERNARDO, 2020).

Em 1975, então, o Brasil deu início a campanha nacional de vacinação contra a meningite meningocócica, com a vacina polissacarídica contra os sorogrupos A e C. A partir desse momento, o governo passou a divulgar os números da doença, para estimular a ida da população em massa aos postos de saúde (BERNARDO, 2020). Somente após a promoção dessa extensa campanha de vacinação, é que o avanço da epidemia foi detido, mas ainda passaram 24 meses para a epidemia ser realmente controlada (BARATA, 2000).

Foi a partir dessa emergência que se criou, em 1976, na Fiocruz, a fábrica de fármacos, Farmanguinhos, e a de vacinas, Bio-Manguinhos (BERNARDO, 2020). Nesse mesmo ano foi assinado, entre a Fiocruz e o Instituto Mérieux, o contrato de transferência de tecnologia para a produção da vacina meningocócica AC e Bio-Manguinhos passou a produzir e fornecer a vacina A/C para o PNI e outros países (FIOCRUZ, 2022).

Ainda nos anos de 70 e 80, ocorreram epidemias em várias cidades do país causadas pelos sorogrupos C e A e, posteriormente, pelo B.

A partir da década de 90, houve uma diminuição proporcional do sorogrupo B e aumento progressivo do sorogrupo C, quando a partir de 2005 o número de casos causados pelo sorogrupo C superou o de sorogrupo B (BRASIL, 2019b). Devido a este cenário epidemiológico, a vacina conjugada contra o sorogrupo C foi introduzida no Brasil em 2010 (SÁFADI *et al.*, 2014). No entanto os casos e surtos causados pelo

sorogrupo C (MenC) continuam sendo relatados no país (BRASIL, 2019b; MARIN *et al.*, 2017).

De acordo com dados do Boletim epidemiológico MS/SVS/SINAN 2016, entre os anos de 2007 e 2013, foram confirmados 18.756 casos, com taxas médias de incidência de 1,4 caso por 100 mil habitantes/ano e de mortalidade de 0,3 por 100 mil habitantes/ano. No entanto, os coeficientes de incidência têm sido reduzidos nos últimos anos, com registro de menos de um caso para cada 100.000 habitantes, entre os anos de 2014 e 2016 (BRASIL, 2019b).

Entre as cepas caracterizadas que causaram doenças até 2014 no Brasil, o sorogrupo C, complexo clonal ST-103 (cc103), correspondeu a mais de 74% dos casos, sendo o clone hipervirulento mais prevalente no país. O restante dos casos de DM foi causado pelo sorogrupo B, ST-32 (cc32) com cerca de 20% e sorogrupo W135, ST-11 (cc11) com apenas 5% (BASTOS *et al.*, 2015; DE FILIPPIS *et al.*, 2012; GORLA *et al.*, 2012; IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012; SÁFADI *et al.*, 2013; SARDINHA *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Fonseca e colaboradores (2017), demonstrou uma linhagem de MenC cc103 com susceptibilidade reduzida a penicilina causando meningite em diferentes regiões geográficas brasileiras entre os anos de 2011 e 2015, o que demonstra sua persistência e capacidade de disseminação por expansão clonal no país. Azevedo e colaboradores (2020) sugerem que o cc103 ainda é um importante cc hipervirulento em circulação no Brasil e que o ST-3780 está se espalhando por todo o país mesmo após a vacinação contra o MenC.

Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil (DATASUS), no período de 2010 a 2020, foram notificados 187.431 casos de meningite. Dentre as notificações com a etiologia confirmada, Nm foi responsável por 18.169 casos, sendo 6.336 casos do sorogrupo C (70%), seguido pelos sorogrupos B com 1.871 casos notificados (20%), W135 com 619 (7%) e Y com 224 (2%). Os sorogrupos A e X foram responsáveis por menos de 1% do total de casos notificados, com 30 casos para o sorogrupo A e 5 casos para o sorogrupo X (BRASIL, 2021).

A epidemiologia mundial de MenC tem sido dinâmica considerando a distribuição espaço-temporal de complexos clonais distintos. Na Europa, este sorogrupo foi o segundo mais difundido, e o MenC cc11 tem sido responsável por surtos em vários países, mesmo após a introdução da vacina conjugada contra o sorogrupo C (STEFANELLI *et al.*, 2016).

Uma variante do cc11, chamada ET-15, foi descrita pela primeira vez no ano de 1986 no Canadá e, posteriormente, em diferentes países da Europa e nos Estados Unidos, e foi associada a surtos com altas taxas de letalidade. O que determina essa variante é a mutação de um único nucleotídeo no gene *fumC* (WHALEN *et al.*, 1995; KACZMARSKI *et al.*, 1997; KRESMASTINOUS *et al.*, 1999; GARNIER *et al.*, 2011; JELFS *et al.*, 2000). Alguns isolados do estado da Bahia apresentaram essa variante, com maior ocorrência entre os anos de 1996 a 2000, quando o cc11 era o mais frequente. Surtos na região Nordeste do Brasil de 2005 a 2011, causados por meningococos do sorogrupo C, também foram associados ao surgimento da variante ET-15 de cc11 (SARDINHA *et al.*, 2013). Depois disso, o cc11 foi sendo substituído pelo cc103 e a variante ET-15 não foi mais encontrada no país.

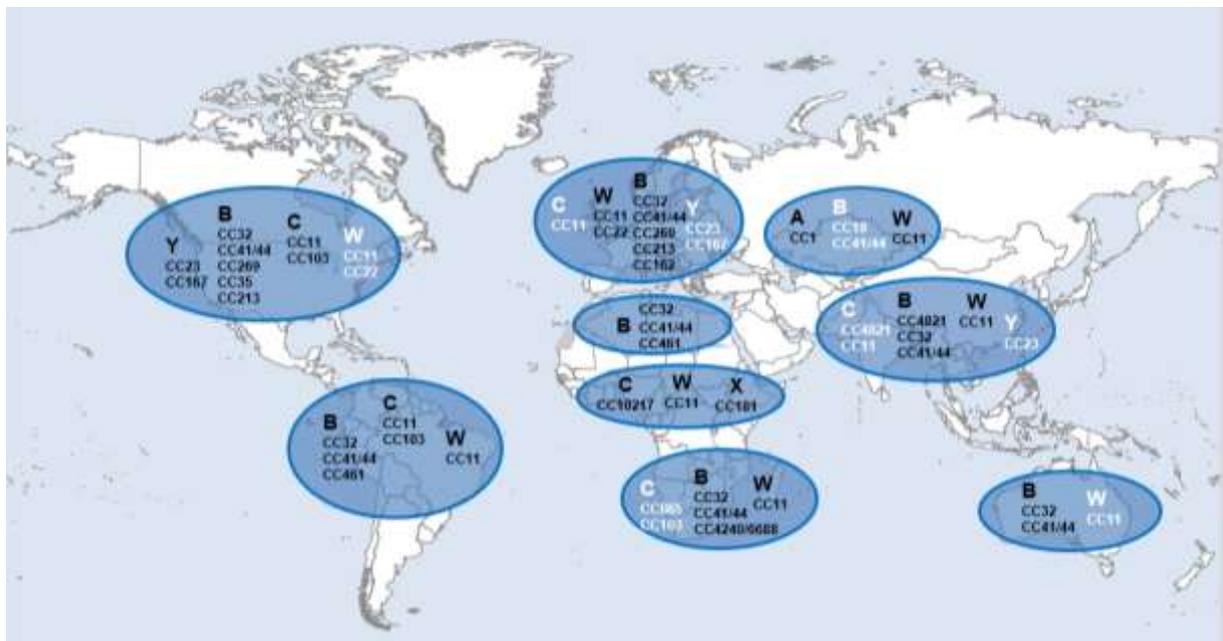
Na América Latina, na última década, observou-se um aumento na incidência de casos invasivos do sorogrupo W. O sorogrupo W:cc11 tornou-se predominante no Chile, desde 2011 e está associado a elevada mortalidade, apesar da baixa incidência total de casos invasivos no país (RUBILAR *et al.*, 2018; TZENG; STEPHENS, 2021). No Paraguai, a DM é relativamente infrequente, mas análises da distribuição de sorogrupos mostram que o mais frequente é o sorogrupo B e que nos 2 últimos anos também aumentaram os casos de DM pelos sorogrupos C e W (LEÓN *et al.*, 2019).

De um modo geral, a vigilância meningocócica na América Latina difere entre os países, e a maioria dos sistemas é baseada na vigilância sentinela passiva. Presa e colaboradores (2019) realizaram uma revisão sistemática da literatura, onde trinta e nove estudos, publicados entre 2008 e 2018, foram selecionados. De acordo com essa revisão, em 2006, a taxa de incidência de DM por 100.000 habitantes foi maior no Brasil (1,9), seguido pelo Uruguai (1,3), Chile (0,8), Argentina (0,7), Colômbia e Venezuela (0,3 cada) e México (0,06). O Brasil apresentou a maior taxa de letalidade (20%), seguido pelo Uruguai (15%), Chile (11%), Venezuela (10%) e Argentina (10%). Em 2012, a taxa de letalidade no Chile aumentou para aproximadamente 27%. Os sorogrupos mais frequentes entre os casos de DM foram o sorogrupo C no Brasil (2007-2010) e México (2005-2016), W no Chile (2012-2018) e B na Argentina (2012-2015). Acredita-se, no entanto, que as taxas de DM na América Latina estejam subestimadas devido, provavelmente, à subnotificação de casos (PRESA *et al.*, 2019).

A DM é um problema de saúde global e ocorre de forma esporádica ou sob a forma de surtos ou epidemias (figura 1). Apresenta taxas de incidência que variam de 1 a 1.000 casos por 100.000 habitantes em diferentes partes do mundo. O número de

casos pode variar amplamente ao longo do tempo e entre áreas geográficas, de acordo com a faixa etária e/ou sorogrupos. A epidemiologia da doença é dinâmica e sofre constantes mudanças de incidência, sendo o mesmo observado em relação aos sorogrupos (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). A epidemiologia da DM também é influenciada pelo uso de vacinas anti-meningocócicas e, mais recentemente, a partir de 2020-2021, pelas medidas de contenção da pandemia COVID-19 (TZENG; STEPHENS, 2021).

Figura 1: Distribuição mundial dos sorogrupos e complexos clonais de Nm, no ano de 2019



Fonte: WHO, 2021 (disponível em: [https://www.who.int/health-topics/meningitis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/meningitis#tab=tab_1))

Legenda: A, B, C, W, X, Y: sorogrupos de Nm. A cor da fonte indica a relativa frequência do sorogrupo nas sub-regiões. Preto: mais frequente. Branco: menos frequente. CC: complexo clonal

#### 1.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da DM inclui o reconhecimento de sinais como febre, estado neurológico alterado, “rash” cutâneo e petéquias. No entanto, esse diagnóstico pode ser dificultado pela semelhança entre os sintomas causados por outros agentes, necessitando do diagnóstico diferencial. Por isso, deve-se realizar a confirmação por métodos laboratoriais. O Informe Técnico da Secretaria de Saúde, de 25 de junho de 2019: “Orientações para diagnóstico laboratorial das meningites e da doença meningocócica”, reforça que nos casos suspeitos de meningite e de DM é obrigatória

a coleta de material clínico do paciente para a confirmação do diagnóstico etiológico. De acordo com o Guia de Vigilância em Saúde de 2019, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2019b, p.36-37), os principais exames para o esclarecimento de casos suspeitos são:

- Bacterioscopia direta – que deve ser realizada a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros fluidos corpóreos normalmente estéreis e de raspagem de petéquias. A coloração do espécime clínico pelo método de Gram permite, ainda que com baixo grau de especificidade, caracterizar morfológica e corologicamente diplococos Gram-negativos.
- Cultura – realizada de fluidos corporais, principalmente LCR, sangue e raspado de lesões petequiais. É considerada padrão ouro para diagnóstico da DM, por ter alto grau de especificidade. O objetivo do cultivo é isolar a bactéria para identificação da espécie (BRASIL, 2019b). No entanto, *Nm* é uma bactéria fastidiosa, que necessita de meios enriquecidos para seu crescimento, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura ótima entre 35°C a 37°C.

A inoculação do espécime clínico para o crescimento de *Nm* deve ser feita em meios como o ágar sangue (ágar Mueller-Hinton, ágar triptona de soja, agar chocolate ou ágar Colúmbia acrescido de 5% de sangue de coelho ou equino). Essa placa é incubada em temperatura e atmosfera adequadas, por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, as colônias se apresentam de forma convexa, brilhantes e com aproximadamente 1 mm de diâmetro.

A confirmação da espécie deve ser feita pela observação de diplococos Gram-negativos por microscopia, teste positivo para catalase, oxidase e utilização da glicose e maltose (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Essa identificação pode levar até 36 horas, o que inviabiliza o sucesso do tratamento. Além disso menos de 35% dos casos clínicos são diagnosticados pelos métodos convencionais, levando a necessidade de utilização de métodos que não dependam de cultivo.

- Exame quimiocitológico do LCR – esse exame permite a contagem e a diferenciação das células, além de dosar a glicose e as proteínas do LCR. Traduz a intensidade do processo infeccioso e orienta a suspeita clínica, mas não deve ser utilizado para conclusão do diagnóstico final, pelo baixo grau de especificidade.

- Aglutinação pelo Látex – é utilizado para detectar o antígeno bacteriano em amostras de LCR e soro, ou outros fluidos biológicos. Partículas de látex, sensibilizadas com antissoros específicos, permitem, por técnica de aglutinação rápida, detectar o antígeno bacteriano nas amostras. Pode dar resultado falso-positivo, em indivíduos portadores do fator reumatóide ou reações cruzadas com outros agentes.
- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – detecta o DNA de meningococos presente nas amostras clínicas (LCR, soro e sangue total). Também permite a classificação dos sorogrupos de Nm. A PCR em tempo real (qPCR) é uma evolução da técnica tradicional de PCR que identifica o DNA alvo com maior sensibilidade e especificidade e menos tempo (BRASIL, 2019b).

Métodos fenotípicos e genotípicos podem ser empregados para a identificação de Nm, tanto na sua forma isolada através da cultura ou diretamente do espécime clínico (DE FILIPPIS *et al.*, 2016). Portanto, nas últimas décadas, devido às limitações anteriormente citadas e na tentativa de acelerar o diagnóstico, a identificação molecular desse patógeno por meio da técnica de qPCR vem sendo muito empregada, com a utilização de genes específicos para a detecção a nível de espécie e para identificação de alguns sorogrupos predominantes (CORLESS *et al.*, 2001)

A caracterização genética de isolados de meningococos pode ser realizada por diferentes métodos moleculares e é usada para monitorar a epidemiologia da DM, permitindo a identificação de clones epidêmicos (BRASIL, 2016).

As doenças causadas por Nm apresentam evolução rápida, o que requer intervenção imediata. Por isso, o diagnóstico rápido e preciso do agente etiológico é imprescindível para a adoção da terapia correta e para conter o surgimento de possíveis surtos. O monitoramento da disseminação de clones hipervirulentos e do surgimento de novos clones, é importante para observar a epidemiologia da DM e para subsidiar ações específicas de Vigilância em Saúde para contenção de surtos. Esse monitoramento epidemiológico já é realizado em diferentes países da Europa e nos EUA através de métodos moleculares, como o sequenciamento de DNA pelo *Multilocus Sequence Typing* (MLST). No Brasil essa tecnologia não está disponível nos hospitais públicos devido ao seu custo elevado. No entanto, métodos baseados na qPCR podem ser utilizados para o mesmo fim, com diminuição dos custos e maior facilidade de processamento quando comparados ao sequenciamento de DNA.

## 1.5 Tratamento/Quimioprofilaxia

A DM é potencialmente fatal e deve sempre ser vista como uma emergência médica. A admissão em hospital ou centro de saúde é necessária. O tratamento com antibiótico apropriado deve ser iniciado o mais rápido possível e, de preferência, após a punção lombar e a coleta de sangue para hemocultura (BRASIL, 2019b; WHO, 2017; 2018; 2021).

O uso de antibiótico deve ser associado a outros tipos de tratamento de suporte, como reposição de líquidos e cuidadosa assistência. Uma série de antibióticos podem tratar a infecção, incluindo penicilina, ampicilina, cloranfenicol e ceftriaxona, que são utilizados em todo o mundo. Sob condições epidêmicas na África, em áreas com pouca infraestrutura e recursos de saúde limitados, a ceftriaxona é a droga de escolha (BRASIL, 2019b; WHO, 2017; 2018; 2021).

O antibiótico de escolha para a quimioprofilaxia é a rifampicina, que deve ser administrada em dose adequada e simultaneamente para todos os contatos próximos, preferencialmente, até 48 horas da exposição à fonte de infecção (doente), considerando o prazo de transmissibilidade e o período de incubação da doença. Alternativamente, outros antibióticos como a ceftriaxona e o ciprofloxacina podem ser utilizados para a quimioprofilaxia (BRASIL, 2019b).

## 1.6 Prevenção

A vacinação, a partir da administração das vacinas sorogrupo específicas, é considerada a forma mais eficaz na prevenção da DM. As vacinas licenciadas contra a DM estão disponíveis há mais de 40 anos e a proteção que conferem tem duração variável, dependendo do tipo utilizado (BRASIL, 2019b; WHO, 2021). Na década de 1970 foram introduzidas as vacinas polissacarídicas monovalentes contra o sorogrupo C e depois contra o sorogrupo A. A partir da década de 1980 foram introduzidos mais três tipos de vacinas polissacarídicas contra Nm, disponibilizadas nas formas bivalentes (sorogrupos A e C), trivalentes (sorogrupos A, C e W) ou tetravalentes (sorogrupos A, C, W e Y) para controlar a doença. Essas vacinas polissacarídicas estimulam uma resposta T-independente e memória transitória em crianças menores de 2 anos de idade, ou seja, não são eficazes nessa faixa etária. Possuem pouco ou

nenhum efeito em portadores e a proteção conferida é de duração limitada, em torno de 3 anos mesmo na população adulta e, portanto, não são capazes de induzir memória imunológica. Por isso, as vacinas polissacarídicas não são usadas rotineiramente, mas ainda são utilizadas, devido ao seu baixo custo para controlar surtos, principalmente na África (DAZING, 2004; SÁFADI; BARROS, 2006; WHO, 2021).

No final do século 20, o sucesso das vacinas conjugadas de proteína-polissacarídeo contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) forneceu um modelo para o desenvolvimento da vacina meningocócica conjugada. A partir de então, esforços para o desenvolvimento de uma vacina meningocócica se concentraram em melhorar a resposta imune mediada por células T por meio da conjugação do polissacarídeo a uma proteína. Essa conjugação de polissacarídeos às proteínas carreadoras (toxina diftérica ou o toxóide tetânico) altera a resposta imune humana de células T-independentes para células T-dependentes, pois faz com que o organismo humano reconheça o alvo vacinal como uma proteína. Dessa forma, as células B reconhecem o polissacarídeo, processam o carreador proteico conjugado e apresentam os epítopos peptídicos às células T-CD4+. Esse complexo antigênico induz a produção de níveis elevados de anticorpos, inclusive em lactentes jovens, maior avidéz dos anticorpos e maior atividade bactericida sérica. Induzem, ainda, a formação de populações de linfócitos B de memória, de duração prolongada, propiciando uma excelente resposta em casos de reexposição. Além disso, essas vacinas têm a capacidade de reduzir a colonização nasofaríngea, diminuindo o número de portadores entre os vacinados e a transmissão da doença na população, conferindo a população uma imunidade de rebanho (DRETLEER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018; SÁFADI; BARROS, 2006).

Atualmente a estratégia vacinal é a utilização das vacinas meningocócicas conjugadas, que utilizam o polissacarídeo capsular de Nm associado a uma proteína (toxóide tetânico ou diftérico). O objetivo é aumentar a imunogenicidade da vacina e promover uma resposta T-dependente, conferindo assim, memória imunológica ao vacinado (SÁFADI; BARROS, 2006).

Desde 1999, vacinas conjugadas contra o MenC estão disponíveis e são amplamente utilizadas. No Brasil, o Programa Nacional de Imunização (PNI), que tem suas atribuições estabelecidas na Lei nº 6.259/75 e no Decreto 78.231/76, incorporou

a vacina conjugada contra o MenC no calendário de vacinação, no ano de 2010 (BRASIL, 2019b).

A partir de 2005 as vacinas conjugadas tetravalentes (A, C, W e Y) foram licenciadas para uso em crianças e adultos e atualmente o controle da DM é abordado em todo o mundo com vacinação contra esses 4 sorogrupos (CRUM-CIANFLONE *et al.*, 2016). Essa vacina também foi incorporada ao PNI, no Brasil, no ano de 2020 para adolescentes entre 11 e 12 anos.

Apesar da eficácia das vacinas contra os sorogrupos A, C, W e Y, vacinas polissacarídicas não podem ser desenvolvidas contra o sorogrupo grupo B, devido ao polissacarídeo B presente na cápsula bacteriana apresentar em sua estrutura o ácido  $\alpha$ 2-8 *N*-acetilneuramínico (ácido polisiálico), de estrutura homóloga aos ácidos siálicos presentes nas células nervosas do tecido neural humano, o que poderia causar um mimetismo antigênico com essas células. Além disso, a utilização de uma vacina contendo o polissacarídeo B poderia induzir doenças autoimunes (TAN *et al.*, 2010). Na tentativa de desenvolver novas vacinas, especialmente para o sorogrupo B, a partir da utilização de componentes da membrana externa, em 2014 foi lançada a primeira vacina contra o sorogrupo B, produzida a partir de uma combinação de 4 componentes (NadA, NHBA, fHbp, OMV), de proteínas externas do meningococo. A escolha dos antígenos incluídos na vacina foi possível graças a uma nova estratégia baseada em estudos de genômica chamada “Vacinologia Reversa” (RAPPUOLI, 2000). Essa metodologia envolve a identificação de antígenos para a vacina não da maneira clássica, isto é, dos componentes da bactéria, mas sim dos genes que expressam as proteínas com as melhores características para serem bons antígenos para a vacina, através da aplicação de softwares de bioinformática complexa (GASPARINI *et al.*, 2015). Existem atualmente disponíveis duas vacinas meningocócicas contra o sorogrupo B que utilizam as proteínas consideradas bons antígenos vacinais pela vacinologia reversa: a MenB-4C (Bexsero®) e a vacina MenB-FHp (Trumenba®) (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

No entanto, os desafios para a pesquisa de vacina meningocócica permanecem, incluindo o desenvolvimento de vacinas combinadas contendo os sorogrupos ACWY (X) e B, determinando os esquemas de reforço ideais para as vacinas conjugadas e MenB e abordando questões de eficácia decrescente (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018).

## 1.7 Tipificação molecular de *Neisseria meningitidis*

### 1.7.1 *Multilocus Sequence Typing*

Em 1998, Maiden e colaboradores desenvolveram um método de tipificação molecular a partir do *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) chamado *Multilocus Sequence Typing* ou MLST. O MLST é utilizado para a caracterização de espécies bacterianas e envolve o sequenciamento e análise de fragmentos internos de 7 genes constitutivos ou *housekeeping genes* que codificam funções essenciais ou proteínas metabólicas da célula. Pela natureza conservada do alvo genético, os resultados obtidos permitem identificar a estrutura genética das subpopulações bacterianas assim como a existência de grupos clonais evolutivamente relacionados (DE FILIPPIS; VICENTE, 2005; JOLLEY; MAIDEN, 2013; MACCANNELL, 2013; MAIDEN *et al.*, 1998; UNEMO; DILLON, 2011).

Os genes de Nm analisados são: *abcZ* (*putative ABC transporter*), *adk* (*adenylate kinase*), *aroE* (*shikimate dehydrogenase*), *fumC* (*fumarate hydratase*), *gdh* (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*), *pdhC* (*pyruvate dehydrogenase subunit*) e *pgm* (*phosphoglucomutase*). São utilizados, aproximadamente, 450 pb de cada gene, podendo ser sequenciados em ambas as fitas, com um sequenciador automático de DNA. Para cada gene, as diferentes sequências presentes em cada isolado são designadas como alelos distintos e, para cada isolado, os alelos de cada um dos 7 *locus* definem perfil alélico ou tipo sequencial (ST) do isolado. Cada isolado de uma espécie é, portanto, indistintamente caracterizado por uma série de 7 números inteiros que correspondem aos alelos dos 7 genes constitutivos (ANDERSSON *et al.*, 2012; DE FILIPPIS; VICENTE, 2005; MAIDEN *et al.*, 1998). Isolados que apresentam total relação genética entre si, possuem ST idênticos e os que possuem ST diferentes, mas apresentam até 4 alelos iguais são classificados no mesmo complexo clonal (cc). Por exemplo: um isolado com o perfil alélico *abcZ*=276 *adk*=4 *aroE*=9 *fumC*=17 *gdh*=5 *pdhC*=18 *pgm*=2, foi submetido ao banco de dados sendo identificado pelo curador como ST-3779, pertencendo ao complexo clonal ST-103 por possuir semelhança alélica em 4 ou mais genes com o ST central do complexo clonal que é o ST-103.

O MLST é utilizado em diversos países para monitorar a disseminação das linhagens de meningococos, chamadas de hipervirulentas ou hiperinvasivas, durante os últimos anos (DE FILIPPIS; VICENTE, 2005; LAW *et al.*, 2015; KRONE *et al.*, 2019;

SILVA *et al.*, 2018; TZENG; STEPHENS, 2021). Essa metodologia permitiu o desenvolvimento de um grande banco de dados, com milhares de sequências de genes, não só de *N. meningitidis*, como também de outras espécies bacterianas. Esse banco de dados pode ser acessado livremente para a determinação dos ST e complexos clonais, e está disponível em <http://pubmlst.org/neisseria> (JOLLEY; MAIDEN, 2013).

Embora o MLST seja capaz de gerar informações genéticas suficientes para discriminar facilmente cepas e genótipos, é um método que requer grande trabalho, é demorado e possui alto custo de reagentes e equipamentos (JOLLEY; MAIDEN, 2013).

### **1.8 PCR em tempo real (qPCR)**

A PCR em tempo real ou qPCR é uma evolução da técnica de PCR convencional. É um método de amplificação de regiões específicas do DNA, pela reação em cadeia da polimerase e detecção dos fragmentos gerados. Essa técnica permite à amplificação, a detecção e a quantificação de DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações. A possibilidade de monitorar, ao longo da reação, a quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e quantificar esse produto durante a sua fase de formação, confere maior sensibilidade e especificidade a qPCR quando comparado com a PCR convencional (ESPY *et al.*, 2006; HEID *et al.*, 1996; KHUMALO *et al.*, 2017; KLEIN, 2002).

Após uma série de surtos que ocorreram com o sorogrupo B (MenB) em estudantes universitários nos Estados Unidos, no contexto de alta cobertura da vacina meningocócica conjugada quadrivalente (A C W Y) e antes do uso disseminado de vacinas meningocócicas do contra o MenB entre adolescentes, Breakwell *et al.* (2017) utilizaram a qPCR para caracterizar a prevalência do meningococo entre esses estudantes. Os resultados dessa avaliação demonstraram que a maior parte da colonização meningocócica nessa população é devido a espécies não grupáveis, com baixa prevalência de colonização pelo sorogrupo B e quase ausência dos sorogrupos cobertos pela vacina conjugada quadrivalente (A C W Y). No entanto, surtos de DM causados pelo MenB continuam sendo uma preocupação de saúde pública nas universidades dos EUA. Esses achados reforçaram a necessidade de uma avaliação

da colonização pelo MenB e a dinâmica da doença, a fim direcionar uma política de vacinação de rotina e medidas de controle de surtos nessa população.

A detecção rápida e precisa de surtos permite que as autoridades de saúde pública respondam rapidamente e implementem medidas de controle apropriadas. A qPCR também é muito útil para diagnóstico de surtos de etiologia desconhecida (PATEL *et al.*, 2017).

### 1.8.1 Taqman

A qPCR, através o sistema *Taqman*®, utiliza em conjunto um par de iniciadores e pelo menos uma sonda. A amplificação de uma determinada região é acompanhada pela hibridização dessa sonda específica ao fragmento amplificado, que emite fluorescência de acordo com o número de cópias amplificadas. Dessa forma, permite a determinação quantitativa da região alvo, além de sua detecção, sem a necessidade da visualização em gel de eletroforese (PARASHAR *et al.*, 2006).

A utilização da qPCR tem sido expandida para diversas aplicações como, acompanhamento de eficácia do tratamento medicamentoso, genotipagem para detectar resistência a antibióticos, além da identificação de espécies e subespécies de diferentes organismos (PARASHAR *et al.*, 2006). Jatou e colaboradores (2010), obtiveram resultados falso negativos para detecção de meningococos em cultura negativa de líquido, conflitando com os resultados da coloração de Gram que apresentavam diplococos Gram-negativos, sendo a detecção baseada na PCR do gene *ctrA*. Após a amplificação e sequenciamento do gene completo, concluiu-se que a não detecção deste gene foi devido a um raro polimorfismo do gene *ctrA* presente em algumas cepas de *Neisseria meningitidis*, na região de anelamento dos iniciadores utilizados para a PCR. Para evitar esse problema, a qPCR poderia ser utilizada, desenhando-se sondas específicas para a detecção de regiões polimórficas do gene. No entanto, o alto custo dessa metodologia é um importante fator limitante para a sua utilização, sobretudo em países mais pobres e com alta incidência de DM.

### 1.8.2 High-resolution DNA melting analysis

O *High-Resolution DNA Melting analysis* (HRM) é um método para análise da dissociação do DNA em alta resolução, que foi introduzido em 2002 através da

colaboração entre acadêmicos da Universidade de Utah e da indústria Idaho Technology, nos EUA, como uma solução mais simples para genotipagem, observação de mutações e análise de sequências (REED *et al.*, 2007). O HRM tem por objetivo discriminar produtos específicos da PCR, através da temperatura de dissociação da fita dupla. Sequências distintas apresentam domínios genéticos distintos e requerem temperaturas diferenciadas para a sua dissociação, alterando a forma da curva de *Melting* e conseqüentemente, a temperatura de *Melting* (TM). O padrão de dissociação de uma sequência dependerá das características das sequências estudadas, como o teor do conteúdo de GC e do tamanho do fragmento em análise (RANJBAR *et al.*, 2014; REED *et al.*, 2007; SOUZA; FALCÃO, 2012).

O HRM apresenta várias vantagens em relação a outros métodos de genotipagem, sendo um método relativamente barato, preciso e rápido. Não requer nenhum processamento da amostra e ainda possui um custo mínimo, quando comparado com outras metodologias de sequenciamento (CAI *et al.*, 2013; REED *et al.*, 2007; SOUZA; FALCÃO, 2012). Por ser uma detecção de alta resolução, é possível determinar padrões para vários cc de Nm, discriminados pela emissão de fluorescência durante a curva de dissociação do DNA. A reação pode utilizar um agente intercalante fluorescente como o *EvaGreen*<sup>®</sup>, que apresenta custo mais baixo que o sistema *Taqman*<sup>®</sup>, onde são utilizadas sondas. O *EvaGreen*<sup>®</sup> é um corante intercalante de DNA com características que o tornam superior para análise de HRM. Além de ter espectros semelhantes, *EvaGreen*<sup>®</sup> tem três características importantes que o distingue de *SYBR*<sup>®</sup> Green: *EvaGreen*<sup>®</sup> tem muito menos ação de inibição da PCR, é um corante extremamente estável e tem se mostrado não mutagênico e não citotóxico. *EvaGreen*<sup>®</sup> é compatível com todos os equipamentos comuns de qPCR - basta selecionar as configurações padrão para *SYBR*<sup>®</sup> Verde ou FAM.

O HRM também pode utilizar, como agente intercalante do ácido nucleico, o fluoróforo Syto9, que assim como o *Evagreen*, apresenta custo mais baixo que o sistema *Taqman*<sup>®</sup>. O *MeltDoctor*<sup>™</sup> *HRM Dye* apresenta uma forma estável do SYTO9 fluorescente<sup>®</sup> que se liga ao ácido nucleico de fita dupla.

Portanto, devido à sua simplicidade, facilidade de execução, eficiência e rapidez, o HRM pode ser muito útil como um método rápido e barato para uso em laboratórios de microbiologia e auxiliar no direcionamento das ações preventivas da Vigilância em Saúde. (CAI *et al.*, 2013; REED *et al.*, 2007; SOUZA; FALCÃO, 2012).

### 1.8.3 qPCR-HRM

Essa metodologia é capaz de identificar mutações pontuais chamadas *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), através da amplificação por PCR de fragmentos com tamanho aproximado de 150 pb até, no máximo, 250 pb. No caso de Nm, esses SNPs são assinaturas genéticas específicas para cada clone hipervirulento e podem ser detectados pelas diferenças de suas temperaturas de *melting* (TM) pela PCR em Tempo Real seguida de *High-Resolution DNA Melting analysis* (qPCR-HRM). Embora o poder de resolução seja um pouco inferior ao MLST, o índice Simpsons de diversidade fornecido por esse método em relação ao MLST fica em torno de 0,98. O qPCR-HRM é realizado em uma única etapa de qPCR, não requer reagentes específicos como sondas, utiliza iniciadores de PCR não marcados, demora em torno de duas horas e seu custo é menor do que o do MLST (ANDERSSON *et al.*, 2012).

Donà *et al.* (2016) desenvolveram e validaram um protocolo de qPCR, seguido da análise por HRM, para detecção de mutações associadas à resistência a antibióticos, comumente utilizados para o tratamento da gonorreia. Demonstraram que utilização dessa metodologia, para detecção de determinantes de resistência a antimicrobianos, tem grande importância para a vigilância e estudos epidemiológicos.

Essa metodologia também foi utilizada para determinação da resistência à colistina em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com os achados, as cepas de *P. aeruginosa* resistentes à colistina foram identificadas com alta sensibilidade e especificidade pela técnica de HRM (TAHMASEBI; DEHBASHI; ARABESTANI, 2020).

Klafke e colaboradores (2019) utilizaram o qPCR-HRM para detectar SNPs associados a resistência à piretróides em carrapatos *Rhipicephalus microplus*. Mutações previamente descritas associadas à resistência foram detectadas com sucesso em diferentes genótipos e confirmadas por sequenciamento. De acordo com o estudo realizado, esta técnica pode ser adaptada para triagem, detecção e descoberta de mutações de alelos, em surtos de carrapatos em gado, para auxiliar estratégias de erradicação nos EUA (KLAFKE *et al.*, 2019).

O método de análise baseado em HRM vem sendo utilizado em trabalhos em todo o mundo com diversos microrganismos, como por exemplo, na determinação de SNPs em *Yersinia pseudotuberculosis* (SOUZA; FALCÃO, 2012); para discriminação e identificação de ST de *Klebsiella pneumoniae* de importância clínica para a saúde

pública (ANDERSOSON *et al.*, 2012); na detecção e genotipagem de *Cronobacter spp* em fórmulas infantis em pó (CAI *et al.*, 2013); para detecção precoce das mutações mais frequentes, associadas à resistência aos azóis em *Aspergillus fumigatus* (BERNAL-MARTÍNEZ, *et al.*, 2017); em entre outros.

Apesar de ser menos discriminatório do que o MLST, qPCR-HRM é um método rápido, simples e econômico. Produz resultados que podem ser interpretados de forma rápida, fácil e direta, através das curvas de *melting* geradas pela reação (ANDERSSON *et al.*, 2012; DONÀ *et al.*, 2016; KUGELMAN *et al.*, 2009; SOUZA; FALCÃO, 2012; CAI *et al.*, 2013). Além disso, o qPCR-HRM é um método conveniente para varredura de genes, bem como genotipagem de SNPs, individuais e múltiplos (SŁOMKA *et al.*, 2017).

A análise da curva de *melting* por HRM pode ser utilizada como um método de triagem para detectar os clones hipervirulentos de Nm mais frequentes que circulam em nosso país. No entanto, ainda não há na literatura trabalhos utilizando essa metodologia para detecção de cc específicos de Nm.

## 1.9 Sequenciamento do genoma completo

O sequenciamento do genoma completo ou *whole genome sequencing* (WGS) oferece a possibilidade de analisar todos os genes e proteínas preditas da espécie sequenciada, fornecendo acesso a toda a informação genética, seja para inferências e análises adicionais ou verificação dos achados por MLST ou HRM.

Krauland *et al.* (2012) utilizaram o WGS para investigar o surgimento do cc 23 entre cepas de Nm do sorogrupo Y nos Estados Unidos. As cepas foram analisadas por filogenia onde foi observada a similaridade com o cc 23. A abordagem do genoma inteiro permite a investigação de alvos conhecidos e facilita a identificação de novos genes, cuja importância e até mesmo função não foram previamente determinadas (KRAULAND *et al.*, 2012).

A implementação da vigilância molecular da DM é recomendada em todo o mundo. O método do sequenciamento do genoma completo fornece possibilidades para uma caracterização mais detalhada da Nm e possibilita a integração de todas as abordagens convencionais de sequenciamento em um único método. Seis isolados de Nm de 2013 a 2015, caracterizados previamente pelo sequenciamento de amplificação de Sanger, foram selecionados para serem estudados pelo novo método

WGS. A análise dos dados do WGS confirmou a precisão deste método na determinação de marcadores epidemiológicos, e sugere a possibilidade da implementação do WGS na vigilância molecular da DM na República Tcheca (VACKOVÁ *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Křížová e colaboradores (2018), foram utilizadas 20 cepas de *N. meningitidis* isoladas de casos de DM, em 2015, na República Tcheca. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial do sequenciamento do WGS na identificação de genes e proteínas variantes de Nm e comparar esses resultados com outros resultados de métodos de sequenciamento convencionais. O sequenciamento do genoma foi realizado usando a plataforma Illumina MiSeq. Os dados WGS foram processados pelo *software Velvet de novo Assembler*, e os contigs do genoma foram submetidos ao banco de dados do PubMLST de *Neisseria* contendo dados alélicos e genômicos sobre cepas desse gênero. Os genomas foram analisados e comparados usando o *BIGSdb Genome Comparator*, que faz parte do banco de dados PubMLST. Os dados WGS foram comparados em vários níveis de resolução: MLST, rMLST (l MLST ribossomal), cgMLST (core genoma MLST) e "todos os loci", ou seja, todos os genes de Nm definidos no banco de dados PubMLST em 6 de novembro de 2017 (3028 loci). Essa metodologia também foi utilizada para caracterizar detalhadamente os genes de antígenos envolvidos em vacinas contra Nm do sorogrupo B. De acordo com os resultados obtidos, o método WGS apresentou maior potencial de discriminação e permitiu a determinação mais precisa das características genéticas de Nm. Sendo, então, sugerido a implementação do método WGS na vigilância molecular de rotina da DM na República Tcheca, conforme mencionado no estudo de Vacková e colaboradores (2017) citado acima.

O WGS foi utilizado em um outro estudo para avaliar a incidência da DM causada pelo sorogrupo W na Suécia e comparar as linhagens isoladas com as linhagens das amostras circulantes no país, para verificar a necessidade da introdução da vacinação geral contra esse sorogrupo (ERIKSSON *et al.*, 2018).

Como *Neisseria meningitidis* raramente é resistente à penicilina, TSANG e colaboradores (2019) descreveram a análise WGS de *N. meningitidis* resistente à penicilina coletada de um caso de doença meningocócica invasiva. A  $\beta$ -lactamase foi detectada por cefalosporina cromogênica (*nitrocefim*) e as concentrações mínimas inibitórias (MIC) foram determinados por Etest e diluição em ágar. O sequenciamento dos genomas de *N. meningitidis* foi realizado na plataforma Illumina MiSeq e os dados

do genoma foram analisados usando o *Bacterial Isolate Genome Sequence Database* (BIGSdb) no site PubMLST Neisseria (<https://pubmlst.org/neisseria/>). A análise WGS identificou uma cópia completa do gene *bla<sub>ROB-1</sub>* que codifica a síntese de um tipo  $\beta$ -lactamase, que estava contido em um elemento de inserção de 1719 bp com um conteúdo G + C de 41,7% (versus um conteúdo G + C de *N. meningitidis* de 51,7%), sugerindo que o gene *bla<sub>ROB-1</sub>* veio de uma espécie bacteriana diferente. Uma análise no *GenBank* da inserção do gene *bla<sub>ROB-1</sub>* encontrou 99,77% de identidade com um segmento de DNA encontrado no plasmídeo pB1000 de *Haemophilus influenzae*. A transformação de uma cepa sensível à penicilina com o gene *bla<sub>ROB-1</sub>* conferiu atividade de  $\beta$ -lactamase e resistência à penicilina. Através do WGS foi possível verificar que a cepa de *N. meningitidis* sorogrupo Y, ST3587 foi capaz de transportar e expressar o gene *bla<sub>ROB-1</sub>*, levando à resistência à penicilina, sendo altamente provável que o isolado de *N. meningitidis* adquiriu o gene *bla<sub>ROB-1</sub>* de *H. influenzae* (TSANG *et al.*, 2019).

O estudo de TSANG e colaboradores (2019) destacou a importância do teste de sensibilidade aos antibióticos e da caracterização molecular de cepas na vigilância da DM, identificando um isolado de Nm com um gene *bla<sub>ROB-1</sub>* responsável pela resistência à penicilina. A comparação dos dados WGS identificou outro isolado muito semelhante do mesmo ST no Reino Unido que também possui um gene *bla<sub>ROB-1</sub>* cromossômico. Este tipo de análise molecular é particularmente relevante para vigilância, a fim de monitorar o surgimento de cepas com genes alterados da proteína de ligação à penicilina que podem afetar a suscetibilidade à penicilina. Este relato de caso também ilustra a utilidade da análise WGS para a vigilância global de DM e da resistência a antibióticos (TSANG *et al.*, 2019).

A doença meningocócica continua sendo uma importante causa de morbidade e morte em todo o mundo, apesar do desenvolvimento e do aumento da implementação de vacinas eficazes. A eliminação da doença é dificultada pela enorme diversidade e variabilidade antigênica do agente causador, *Neisseria meningitidis*, uma das bactérias mais variáveis da natureza. Essas características são obtidas principalmente por meio de altas taxas de transferência horizontal de genes e alteração da expressão de proteínas por meio da variação de fase (CAUGANT; BRYNILDSDRUD, 2020). A recente disponibilidade de sequenciamento do genoma completo (WGS) de coleções em grande escala de isolados de *N. meningitidis* de várias origens, bancos de dados para facilitar o armazenamento e compartilhamento

de dados WGS e o desenvolvimento concomitante de ferramentas de bioinformática eficazes levaram a um entendimento muito mais completo da diversidade das espécies, sua evolução e estrutura populacional e como os fatores de virulência podem surgir. A implementação do WGS já está contribuindo para o aprimoramento da vigilância epidemiológica e é essencial para verificar o impacto das estratégias de vacinação (CAUGANT; BRYNILDSRUD, 2020).

O sequenciamento do genoma completo (WGS) revolucionou a microbiologia molecular, permitindo que a biologia da população de patógenos bacterianos seja examinada com maior precisão e detalhes. O estudo de isolados de Nm, em particular, se beneficiou da disponibilidade de dados WGS permitindo a determinação de surtos, circulação de linhagens hiperinvasivas, epidemiologia molecular e cobertura vacinal (BRATCHER; HARRISON; MAIDEN, 2019).

### **1.10 Vigilância em saúde**

De acordo com a Constituição Federal de 1998, a Vigilância em Saúde está incluída no campo de ação do Sistema Único de Saúde (SUS) e desenvolve programas relevantes de prevenção e controle, devendo ser utilizada para o estabelecimento de prioridades, alocação de recursos e orientação programática, em várias esferas.

A Lei nº 8.080/90 (Lei Orgânica da Saúde), estabelece as competências do SUS para cada esfera, que deverão guiar suas decisões e ações e permitir a sua complementariedade. Dentre essas ações estão a execução de vigilância sanitária, vigilância epidemiológica, saúde do trabalhador e assistência terapêutica integral, inclusive farmacêutica.

A vigilância epidemiológica, conforme estabelecido pela Lei 6.259/75, realiza um conjunto de atividades que proporciona a obtenção de informações fundamentais para o conhecimento, a detecção e a prevenção de qualquer mudança que possa ocorrer nos fatores que determinam e condicionam o processo saúde-doença, em nível individual ou coletivo, com objetivo de recomendar e adotar de forma oportuna as medidas de prevenção e controle dos agravos.

De acordo com a Lei nº 6.360/76, as ações de Vigilância Sanitária (Visa) devem promover e proteger a saúde da população e serem capazes de eliminar, diminuir ou

prevenir riscos à saúde e abrangem a vigilância de produtos, ambientes, serviços e processos de trabalho.

A Lei nº 9.782/99, define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e institui as suas competências. Entre elas, as coordenações das ações de vigilância sanitária realizadas por todos os laboratórios, que fazem análises relacionadas com medicamentos, saneantes, equipamentos e materiais médico-hospitalares, kits de diagnósticos, imunobiológicos e quaisquer produtos que envolvam a possibilidade de risco à saúde. Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) tem a missão de promover ações de vigilância em saúde na área laboratorial, prestando serviços de qualidade para a população e coordenar a rede estadual de laboratórios de saúde pública.

De acordo com o trabalho de Stephens (2009), os Sistemas de Vigilância para DM, principalmente em países em desenvolvimento, precisam ser aprimorados. O teste de PCR ou outros testes, sem a necessidade de cultivo, podem ser muito úteis no diagnóstico, especialmente, em regiões onde os pacientes frequentemente recebem antibióticos antes de chegar aos hospitais. Os relatórios atuais da OMS podem subestimar o real número de casos da doença, pois a bacteremia e a doença grave (fatal) frequentemente não são reportadas, provavelmente, devido a recursos limitados para estabelecer um diagnóstico. Em muitos, mas não em todos os países em desenvolvimento, pelo menos um laboratório está disponível para a vigilância da DM, mas limitações na disponibilidade de diagnósticos e os métodos de tipificação podem resultar ainda em dados subestimados da doença. A vigilância permanece como um componente importante antes e depois da introdução de novos medicamentos e vacinas meningocócicas. Uma vigilância adequada pode fornecer informações importantes sobre a DM e aumentar a rentabilidade de programas de vacinação meningocócica (STEPHENS, 2009).

Nesse contexto esse trabalho tem fundamental importância para a vigilância em saúde, uma vez que reunirá informações para o monitoramento da DM e poderá auxiliar na prevenção de novos casos, com a integração das vigilâncias epidemiológica e sanitária.

### 1.11 Justificativa e relevância

A DM é uma doença bacteriana aguda, grave e de rápida evolução. No Brasil, apresenta uma taxa de mortalidade média em torno de 20% e ainda pode deixar sequelas clínicas graves em sobreviventes dentro de 24 a 48 horas, a partir dos primeiros sintomas. Cerca de 10% da população carrega a Nm, assintomaticamente, na nasofaringe e essa colonização representa uma condição crítica para o início da doença, pois é o primeiro passo para a transmissão (BRASIL, 2016; WHO, 2017). Além disso, altos níveis de colonização podem promover a recombinação genética entre diferentes linhagens de Nm, levando ao desenvolvimento de novas variantes patogênicas. A DM é um problema de saúde mundial, mesmo em países desenvolvidos (BRASIL, 2016; KHUMALO *et al.*, 2017; WHO, 2017; WHO, 2018; WHO, 2021) e é dever do Estado o controle e a prevenção deste agravo (BRASIL, 1988).

O diagnóstico clínico da DM nem sempre é possível devido aos sintomas iniciais que, na maioria das vezes, são inespecíficos e nem sempre estão presentes. Portanto a confirmação laboratorial é fundamental. O diagnóstico microbiológico através da cultura e identificação da Nm apresenta sensibilidade limitada, especialmente se os antibióticos foram administrados antes da punção lombar. A Nm é um microorganismo fastidioso e por isso necessita de meios enriquecidos para o seu crescimento, além de atmosfera e temperatura específicas. O resultado final pode demorar em torno de 36 horas, o que inviabilizaria o sucesso do tratamento. Além disso menos de 35% dos casos clínicos são diagnosticados pelos métodos convencionais, levando à necessidade de utilização de métodos que não dependam de cultivo. Para diminuir o tempo de diagnóstico e aumentar sua especificidade e sensibilidade, têm sido desenvolvidos métodos moleculares baseados na amplificação de regiões específicas do DNA do microrganismo pela PCR. A vantagem desses métodos é a possibilidade de serem utilizados diretamente em amostras clínicas, mesmo quando o cultivo é negativo (DE FILIPPIS *et al.*, 2005). No entanto, a maioria dos métodos moleculares, apresenta alto custo e utiliza equipamentos sofisticados, normalmente disponíveis apenas em laboratórios de pesquisa. A DM é potencialmente fatal e deve ser vista sempre, como uma emergência médica. Portanto, o diagnóstico rápido e preciso é fundamental para o tratamento adequado e para o bloqueio de possíveis surtos.

Esse estudo é um desdobramento de um projeto de pesquisa do Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR) do INCQS que visa desenvolver um teste simultâneo para a detecção e caracterização das cepas de Nm circulantes em nosso país, através da utilização da técnica de HRM. A abordagem proposta, poderá fornecer um resultado confiável, de forma mais rápida e com menor custo de reagentes e equipamentos. O desenvolvimento de um método rápido e de baixo custo para detectar clones epidêmicos e hipervirulentos poderá contribuir com dados epidemiológicos para as estratégias de prevenção, que apesar da eficácia da antibioticoterapia ainda continua sendo a melhor estratégia no combate à doença.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estabelecer uma estratégia genômica para controle epidemiológico de *Neisseria meningitidis* por meio de tipificação genética através de análise de alta resolução e sequenciamento total do genoma com objetivo de identificar os principais clones hipervirulentos circulantes no Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar as assinaturas genéticas de um número mínimo de alelos dos clones cc32 e cc41 do sorogrupo B e cc11 e cc103 do sorogrupo C, das cepas circulantes no Brasil.
- Desenhar iniciadores específicos para cada assinatura dos alelos dos clones epidêmicos mencionados.
- Testar os iniciadores pelo sistema qPCR-HRM e determinar o perfil de TM de cada clone.
- Testar o sistema com outros clones para confirmar a especificidade do método.
- Sequenciar o genoma da variante ET-15 do cc11 para avaliar a virulência apresentada por cepas desse clone.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Amostragem

Foram selecionadas 147 cepas previamente caracterizadas por MLST, sendo: 49 cepas de meningococos do sorogrupo B, 95 do sorogrupo C e 3 cepas do sorogrupo W. Dessas, 38 cepas pertenciam ao cc32, 8 ao cc41, 65 ao cc103 e 19 ao cc11, incluindo 3 cepas da variante ET-15 do cc11. Essa variante foi detectada na Bahia e está associada a surtos de DM agressiva no Canadá (TSANG *et al.*, 2004; TYRRELL *et al.*, 2002). Essas cepas fazem parte da coleção de pesquisa do Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR) do INCQS onde encontram-se preservadas por liofilização em ampolas seladas à vácuo a - 20°C. Essas cepas foram isoladas durante os anos de 1999 a 2019 de pacientes com meningite meningocócica ou meningococemia.

### 3.2 Reativação das cepas

As linhagens liofilizadas preservadas na coleção de pesquisa do Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR) do INCQS foram hidratadas em caldo TSB (triptona de soja) e em seguida foi realizado o cultivo em placa com meio de cultura ágar chocolate (ágar Columbia ou ágar GC + 5% de sangue de equino lisado). A placa foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por, aproximadamente, 24 a 48 horas a 37°C ± 1°C. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi coletado com o auxílio de uma alça bacteriológica com volume de 10µl para a extração do DNA genômico.

### 3.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das amostras foi extraído e purificado utilizando o kit *DNEasy® tissue 250* da marca *Invitrogen*, seguindo o protocolo do fabricante. A integridade do DNA extraído foi observada por eletroforese em gel de agarose a 0,7% por meio do digitalizador de imagens *ImageQuant 300* (GE). A quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop® 2000 Thermo Scientific®*. Após a dosagem, o DNA foi armazenado a - 20°C.

### 3.4 Determinação da sequência tipo (ST) e dos complexos clonais (cc)

Todas as 147 cepas incluídas no estudo tiveram a determinação do ST e/ou cc através do MLST. Praticamente todas as cepas já tinham esse dado disponível no banco de dados da coleção de microrganismos de pesquisa do LMR do INCQS e para as que ainda não tinham (apenas 3) também foi realizado o MLST, com o sequenciamento dos genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*. O protocolo da reação da PCR e os iniciadores utilizados para a amplificação e o sequenciamento dos fragmentos dos genes se encontram disponíveis no banco de dados em <http://pubmlst.org/neisseria/info/>. Os produtos dessa reação foram purificados utilizando kit *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante e em seguida, enviados para sequenciamento na plataforma de sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ. A reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar no aparelho *ABI PRISM 3730 DNA Analyzer* (APPLIED BIOSYSTEMS) usando o kit *Big Dye Terminator* (LIFE TECHNOLOGIES).

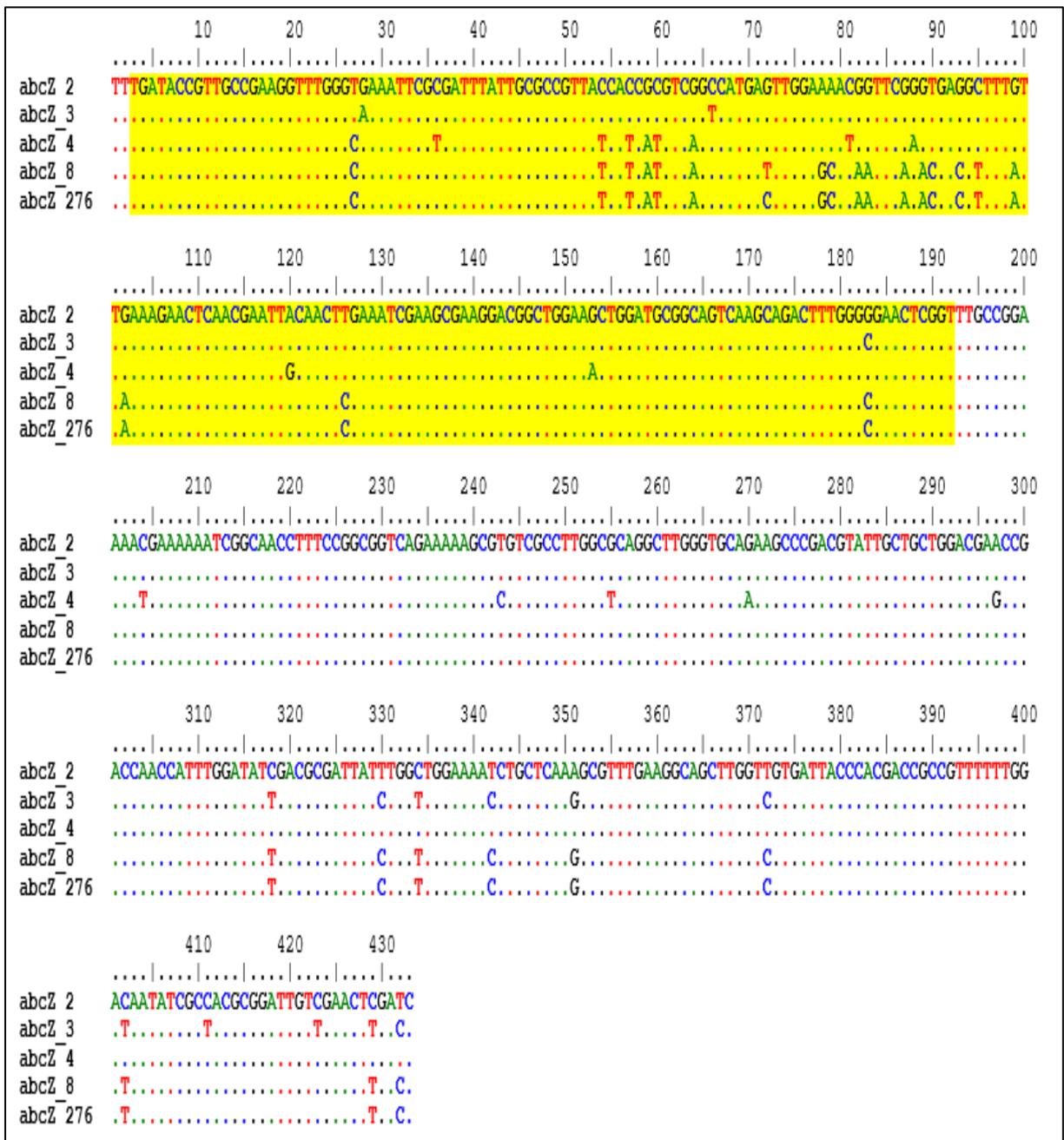
As sequências obtidas foram analisadas pelos programas *Sequencher 5.0* (*Gene Codes Corporation*, Ann Harbor, MI) e *Bioedit 7.0* e submetidas ao banco de dados do MLST. Todas as informações relevantes referentes as cepas incluídas nesse estudo estão descritas no anexo A.

### 3.5 Determinação das assinaturas genéticas

As sequências dos alelos de cada um dos genes do MLST foram obtidas por *download* no banco de dados <http://pubmlst.org/neisseria/info/> e alinhadas com o software *Bioedit®* disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.

A determinação da região das assinaturas genéticas foi realizada através alinhamento dos principais alelos (mais frequentes) de cada gene selecionado para os cc estudados com o objetivo de encontrar a melhor região para o desenho dos iniciadores, em regiões conservadas e ao mesmo tempo, na região do SNP ou polimorfismo que determina o alelo. Esses alinhamentos e suas respectivas assinaturas genéticas são mostrados nas figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 a seguir.

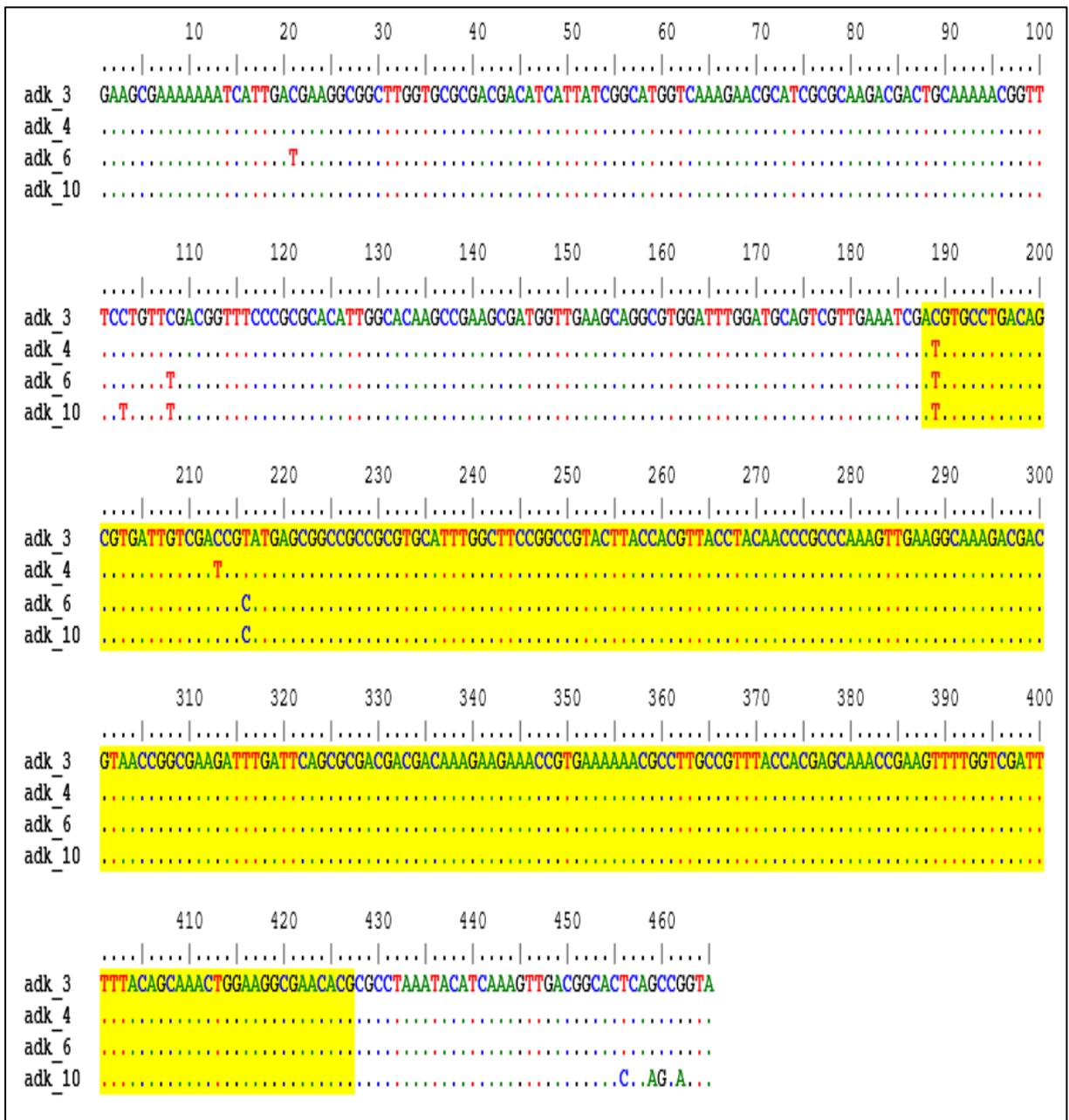
Figura 2: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene *abcZ*.



Fonte: (Do autor, 2020)

Legenda: A região marcada de amarelo refere-se a assinatura genética dos alelos do gene *abcZ*.

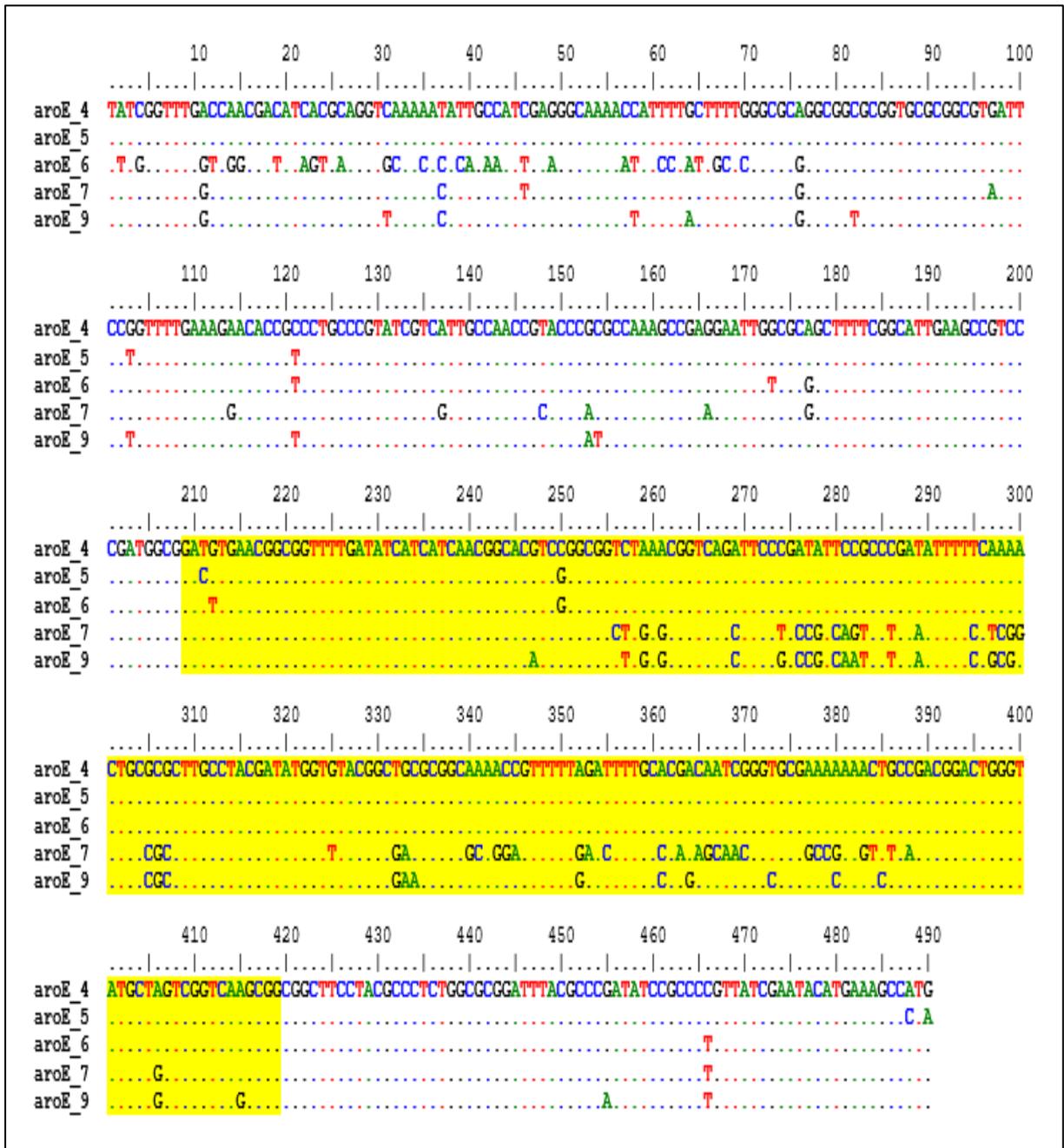
Figura 3: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene *adk*.



Fonte: (Do autor, 2020)

Legenda: A região marcada de amarelo refere-se a assinatura genética dos alelos do gene *adk*.

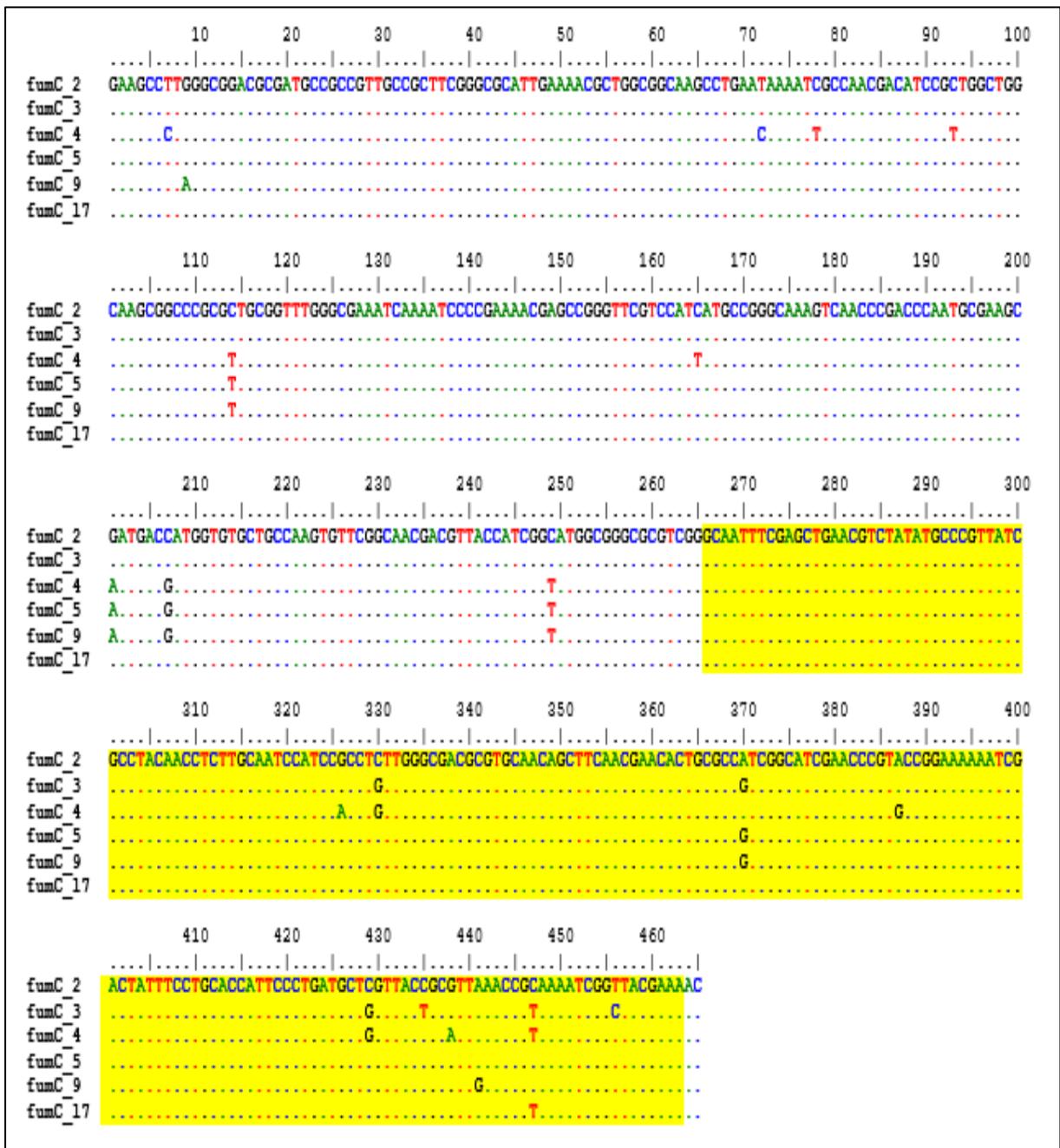
Figura 4: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene *aroE*.



Fonte: (Do autor, 2020)

Legenda: A região marcada de amarelo refere-se a assinatura genética dos alelos do gene *aroE*.

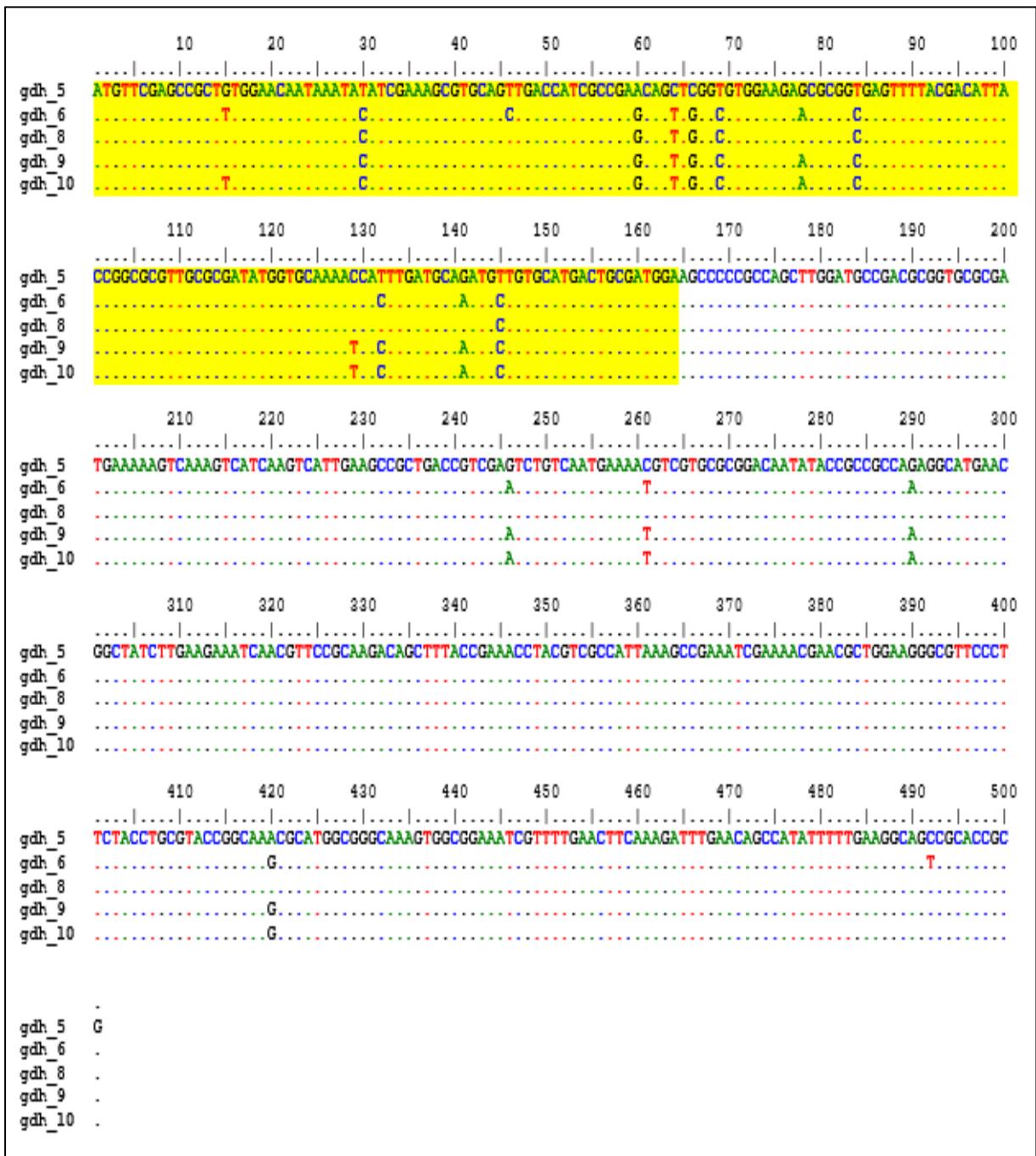
Figura 5: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene *fumC*.



Fonte: (Do autor, 2020)

Legenda: A região marcada de amarelo refere-se a assinatura genética dos alelos do gene *fumC*.

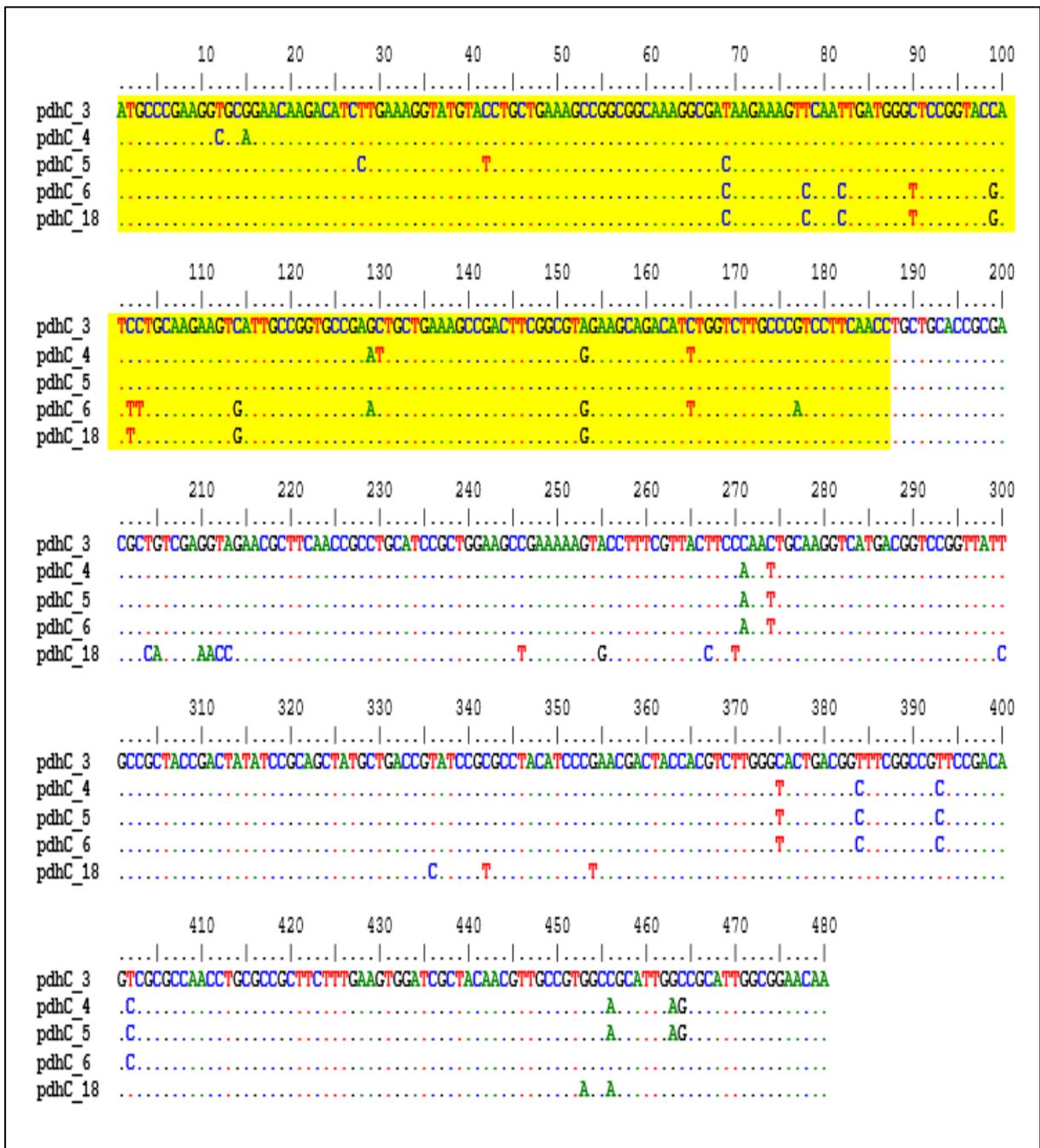
Figura 6: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene *gdh*.



Fonte: (Do autor, 2020)

Legenda: A região marcada de amarelo refere-se a assinatura genética dos alelos do gene *gdh*.

Figura 7: Alinhamento e determinação das assinaturas genéticas dos alelos do gene *pdhC*.



Fonte: (Do autor, 2020)

Legenda: A região marcada de amarelo refere-se a assinatura genética dos alelos do gene *pdhC*.

### 3.5.1 Detecção da variante ET-15 do cc11

Para a detecção da variante ET-15 foi realizada uma análise adicional nas cepas identificadas como pertencentes ao cc11. Essa variante que pode ser considerada como um subclone do cc11 apresenta um SNP no gene *fumC*, de 1389bp, com a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 667. Essa substituição não altera o alelo *fumC*-3 que é o mesmo para as cepas ET-15 ou não ET-15. O fragmento do gene *fumC* analisado pelo MLST vai da posição 793 a 1257 do gene completo. O SNP que caracteriza o subclone ET-15 portanto, não pode ser detectado durante a análise do MLST, mas apenas pelo sequenciamento de todo o gene para a correta identificação do SNP que caracteriza essa variante. Para a identificação do subclone, portanto, desenhamos novos primers (ET-15-F e ET-15-R descritos na tabela 1) direcionados para a região do gene onde está localizado o SNP que caracteriza o ET-15. As cepas do sorogrupo C que apresentam perfil cc11, foram então submetidas a análise do gene *fumC* com os novos primers para detecção dessa variante por qPCR-HRM.

Para a confirmação dos resultados encontrados através da análise do HRM, foi realizado o Sequenciamento *Sanger* dessas amostras, com os primers ET-15-F: GCG CTT AAA GAC TTG TAT e o *fumC*-P2B: GCC CGT CAG CAA GCC CAAC. O protocolo da reação utilizado foi o mesmo para o gene *fumC*, descrito no banco de dados <http://pubmlst.org/neisseria/info/>. Os produtos dessa reação foram purificados utilizando kit *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante e, em seguida, quantificados por espectrofotometria no Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (*Thermo Scientific*). A reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar no aparelho SeqStudio (*Thermo Fisher*) usando o kit *Big Dye Terminator* (LIFE TECHNOLOGIES). A figura 8 mostra um alinhamento do gene *fumC* com a posição do SNP e do fragmento analisado pelo MLST.



foi simulada *in silico* através do site <http://insilico.ehu.es/>, onde todos os iniciadores amplificaram bandas específicas e dentro do tamanho esperado.

Tabela 1: Lista dos iniciadores desenhados utilizados no estudo.

Iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
abc-F: TGA TAC CGT TGC CGA AGG abc-R: ACC GAG TTC GCC CAA AGT	190
adk-F: ATG TGC CTG ACA GCG TGA adk-R: CGT GTT CGC CTT CCA GTT	240
aro-F: GAT GTG AAC GGC GGT TTT aro-R: CCG CTT GAC CGA CTA GCA	211
fum-F: GCA ATT TCG AGC TGA ACG fum-R: TTT CGT AGC CGA TTT TAC GG	198
pdh-103-F: CCT GCT GCA CCG C pdh-103-G: GGA TAT AGT CGG TAG CG	134
gdh-103-F: ATG TTC GAC CCG CTG gdh-103-R: TCC ATC GCA GTC ATG	164
pdhC-64-F: ATC CGG ATA TGC CCG AAG pdhC-257-R: GTT GAA GGA CGG GCA AGA	194
pdhC-35-F: TCG CCG TCA TCG TAC AAG pdhC-279-R: GTC GGC TTT CAG CAG CTC	245
fum-F-2020: GCG ACG CGT GCA ACA fum-R-2020: GGC GGT TTT GGC GAC T	155
gdh-F-2020: TCG AGC CGC TGT GGA gdh-R-2020: ACG GTC AGC GGC TTC A	238
ET-15-F: GCG CTT AAA GAC TTG TAT ET-15-R: CGC GCT GAC AAA CG	132
fumC-P2B: GCC CGT CAG CAA GCC CAAC	

Fonte: (Do autor, 2021).

### 3.7 Determinação dos genes do MLST selecionados

Foram selecionados de 4 a 5 genes de cada cc estudado, para posterior determinação das suas respectivas assinaturas genéticas por qPCR-HRM. Os genes cujos alelos centrais apresentavam frequência  $\geq 70\%$  foram analisados e foram desenhados iniciadores para detecção das assinaturas genéticas presentes nos alelos. A detecção desses alelos centrais por qPCR-HRM nos permite classificar a cepa estudada quanto ao seu cc.

### 3.8 qPCR-HRM

Para os experimentos de qPCR foram utilizados os termocicladores *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems (QS5)* e *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems (QS7)*, ambos da *Thermo Fisher*, no Departamento de Microbiologia do INCQS. Para a visualização dos resultados e análises dos parâmetros das reações, foi utilizado o software HRM do próprio equipamento. No início dos experimentos, foi utilizado o termociclador *Rotor-Gene Q 5-plex HRM* da *Qiagen*, também no Departamento de Microbiologia do INCQS, no entanto, não obtivemos resultados estáveis com esse equipamento.

### 3.9 Protocolo de reação

O protocolo de reação foi realizado seguindo as especificações do fabricante de cada kit. Primeiramente, foi testado o fluoróforo *Evagreen®* e depois o *Syto9 MeltDoctor*, a fim de encontrar o fluoróforo que fornecia os melhores resultados. Foram amplificados um número mínimo de genes dos cc103, cc11, cc32 e cc41 com o propósito de encontrar as assinaturas genéticas capazes de definir o cc.

Para o corante *Evagreen®* da SOLIS, foi utilizado um volume final de reação de 20  $\mu\text{L}$ , contendo: 4,0  $\mu\text{L}$  de master mix 5x, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (na concentração de 10  $\mu\text{M}$ ) e 1,0  $\mu\text{L}$  do DNA da amostra (10 a 20 ng/ $\mu\text{L}$ ), conforme indicado pelo fabricante.

Nas reações com o fluoróforo SYTO9, foi utilizado o *MeltDoctor™ HRM Master Mix* e foram preparadas, de acordo com as instruções do fabricante, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Protocolo da reação *MeltDoctor*

Componentes da Reação	Volume para 1 reação (QS5)	Volume para 1 reação (QS7)
Master Mix ( <i>MeltDoctor</i> )	10,0 µL	5,0 µL
Primer 1 (5µM)	1,2 µL	0,6 µL
Primer 2 (5µM)	1,2 µL	0,6 µL
DNA (10 a 20 ng/µL)	1,0 µL	1,0 µL
Água <i>DNase/RNase</i> livre	6,6 µL	2,8 µL
Volume Total	20,0 µL	10,0 µL

Fonte: (Do autor, 2020)

O protocolo inicial para os testes com o fluoróforo *Evagreen*® da SOLIS, foi realizado com os seguintes parâmetros: um ciclo de desnaturação a 95°C por 12 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, anelamento a 60°C durante 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguido de uma rampa de HRM entre 65°C e 95°C, com aquisição da fluorescência a cada 0,01°C.

Para o fluoróforo Syto9 (*MeltDoctor*) foi utilizado o protocolo definido pelo fabricante (tabela 3): um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e anelamento a 60°C durante 1 minuto. Na etapa de dissociação para a curva de *Melting*: uma etapa de desnaturação com temperatura de 95°C por 10 segundos, anelamento a 60°C durante 1 minuto, seguido da etapa de HRM a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C durante 15 segundos. Com aquisição da fluorescência a cada 0,01°C. Posteriormente esse protocolo foi adaptado, com a redução do número de ciclos, passando para 30 ciclos apenas.

Tabela 3: Parâmetros da reação com o *MeltDoctor*.

Estágio	Passo	Temperatura	Tempo
<i> Holding </i>	Ativação da Enzima	95°C	10 min
Ciclagem (40 ciclos)	Desnaturação	95°C	15 seg
	Anelamento	60°C	1 min
Dissociação/ Curva de <i>Melting</i>	Desnaturação	95°C	10 seg
	Anelamento	60°C	1 min
	HRM	95°C	15 seg
	Anelamento	60°C	15 seg

Fonte: (Bula *MeltDoctor™ HRM Master Mix* - Applied Biosystems, 2020)

### 3.10 Sequenciamento, montagem e anotação de genomas da variante ET-15

Foram sequenciados 5 representantes da variante ET-15 do CC-11 com uma cobertura mínima de 100X. Foi utilizado cerca de 1 ng de DNA para construção das bibliotecas, com o *Illumina Nextera XT library preparation kit*, seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado no equipamento *MiSeq System* de acordo com o protocolo *MiSeq Reagent Kit v.3* na plataforma *MiSeq®* (Illumina, EUA).

A qualidade das sequências foi checada utilizando o programa *FastQC* (ANDREWS, 2010) e a filtragem de sequências com qualidade média igual ou superior a 30 foi realizada pelo programa *PRINSEQ* (SCHMIEDER; EDWARDS, 2012). A montagem dos genomas foi realizada pelo programa *Unicycler* (WICK *et al*, 2017). A qualidade dos genomas montados foi avaliada usando *QUAST 2.0* (GUREVICH, 2013).

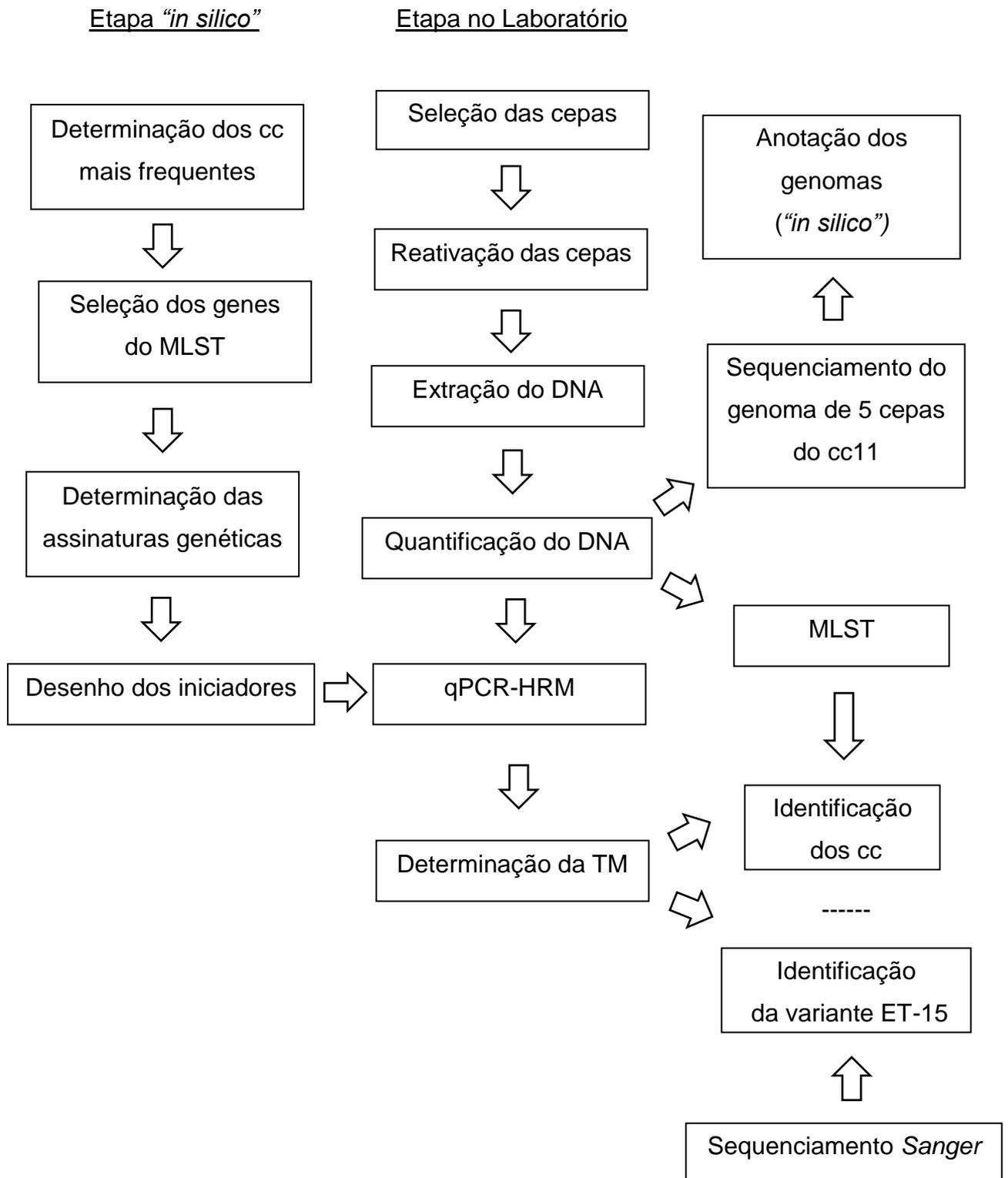
Os perfis de MLST dos genomas montados foram confirmados através do PubMLST (JOLLEY; BRAY; MAIDEN, 2018). A avaliação genômica da resistência antimicrobiana foi realizada usando o RGI (*Resistance Gene Identifier*) do CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (ALCOCK, 2020) para investigar a presença de ARGs adquiridos e ResFinder (BORTOLAIA, 2020; ZANKARI 2017) para avaliar mutações que induzem resistência.

A presença de plasmídeos foi avaliada através do programa *PlasmidFinder v2.1* (CARATTOLI, 2014). Os elementos genéticos móveis também foram avaliados

usando MobileElementFinder v1.0.3 (JOHANSSON, 2021). Para verificar a patogenicidade e fatores de virulência PathogenFinder v1.1 (COSENTINO, 2013) e VirulenceFinder 2.0 (JOENSEN, 2014) foram usados, respectivamente. Fatores de virulência também foram anotados através do *Virulence Factor Database* (VFDB) (LIU *et al.*, 2019).

Os genomas das cepas P2140, P2141, P2183, P2774 e P2779 foram depositados no banco de dados do PubMLST e receberam a identificação (ID) de 115310, 115311, 115312, 115313 e 115314, respectivamente.

#### 4 FLUXOGRAMA DE TRABALHO



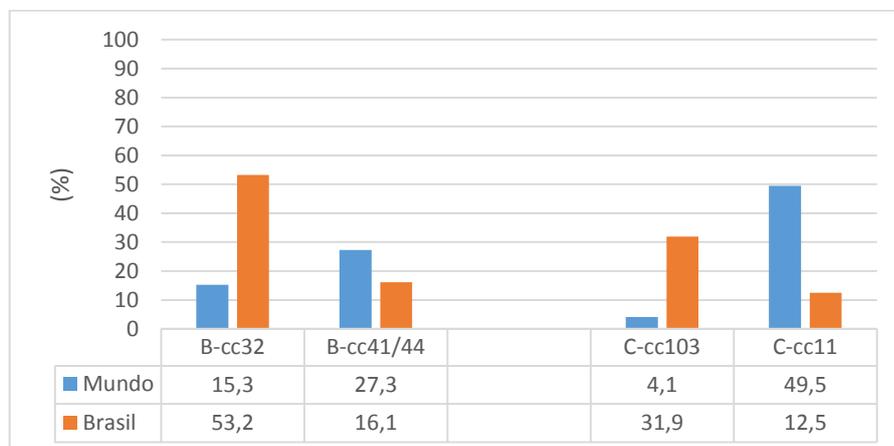
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação dos complexos clonais (cc) mais frequentes

Para definir os cc utilizados no estudo, foi realizada uma busca no banco de dados do PubMLST para a determinação, dentre as sequências depositadas nesse site, dos cc mais frequentes no Brasil e no mundo. De acordo com os dados obtidos nesse banco de dados, o sorogrupo B, com 23.716 isolados, sendo 15,3% do cc32 e 27,3% do cc41/44, é o que possui o maior número de depósitos no mundo, seguido pelos sorogrupos A (17.777), C (7.468), W (5.716) e Y (4.228). Dentre os isolados do Brasil, o maior número de depósitos também é do sorogrupo B, com 267 isolados, seguidos pelos sorogrupos C (248), Y (45) e W (42). O sorogrupo A, dentre os isolados do Brasil, teve apenas 3 isolados depositados no PubMLST.

É importante frisar que esses dados foram extraídos do banco de dados de MLST, onde as informações depositadas são apenas das cepas que foram submetidas ao MLST. De modo que esses dados não refletem a real distribuição dos sorogrupos no mundo. Quanto aos ST e cc, no entanto, o banco de MLST é a fonte mais segura, pois todas as cepas que são analisadas por MLST devem ser depositadas nesse banco. Portanto, os sorogrupos selecionados para esse estudo foram o sorogrupo B, com os complexos clonais cc32 e cc41/44 e o sorogrupo C, com cc103 e cc11, conforme demonstrado na figura 9.

Figura 9: Distribuição do sorogrupo B, cc32 e cc41 e do sorogrupo C, cc103 e cc11 no Brasil e no mundo.



Fonte: (Do autor, 2021)

O perfil alélico do ST central dos genes do MLST foi verificado através de uma busca no banco de dados PubMLST e está representado na tabela 4.

Tabela 4: Perfil alélico do ST central dos genes do MLST

cc	Alelos						
	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>
ST-103	8	4	6	17	5	18	2
ST-11	2	3	4	3	8	4	6
ST-32	4	10	5	4	6	3	8
ST-41/44	3	6	9	5	9	6	9

Fonte: (Do autor, 2021)

O banco de dados da coleção de pesquisa do LMR do INCQS foi consultado para o levantamento dos sorogrupos e cc mais frequentes, dentre as cepas da coleção. A maioria das cepas pertencem ao sorogrupo C, com 61% dos isolados, seguido do sorogrupo B, com 34%. Em seguida, foram analisados o perfil alélico desses isolados, que foi obtido através do resultado do MLST previamente realizado, e foram selecionadas, inicialmente 80 cepas para serem incluídas nesse estudo. Posteriormente, 67 cepas foram adicionadas ao estudo, a fim de aumentar o número de representantes de alguns alelos, sendo que destas, 3 cepas foram recebidas pela coleção, no decorrer desse estudo, para identificação do sorogrupo e tipificação, e foram também incluídas nesse estudo após a realização do MLST. No total 147 cepas, de 1999 a 2019, foram incluídas nesse trabalho, sendo: 49 cepas de meningococos do sorogrupo B, 95 do sorogrupo C e 3 cepas do sorogrupo W. Dessas, 38 cepas pertenciam ao sorogrupo B, cc32; 8 cepas ao sorogrupo B, cc41/44; 65 cepas do sorogrupo C, cc103; 17 cepas do sorogrupo C, cc11; incluindo 3 cepas da variante ET-15 do cc11, e 2 cepas do sorogrupo W também da variante ET-15 do cc11. Em 15 cepas não foi possível identificar o cc e outras 2 cepas pertencem a outros cc (ST-1136 e ST-865), conforme demonstrado no anexo A.

## 5.2 Determinação genes do MLST selecionados

Para cada cc foram selecionados, no mínimo, 4 genes de cada, seguindo a própria definição de cc, em que é necessário que pelo menos quatro alelos tenham 100% de similaridade entre si, para que duas ou mais cepas possam pertencer ao mesmo cc. A escolha dos alelos utilizados para detecção nesse estudo, foi feita de acordo com a sua porcentagem de frequência dentro dos ST que compreendem o cc, dentre todos os isolados daquele cc existentes no banco de dados do PubMLST (tabelas 5 e 6). Foram preferencialmente escolhidos, os genes que apresentavam alelos com frequência acima de 70% e que também apresentavam SNPs adequados para desenho dos iniciadores.

Nas tabelas 5 e 6 estão listados os genes do MLST e a porcentagem de frequência dos alelos mais encontrados, de acordo com os dados obtidos no PubMLST no mundo e no Brasil, respectivamente

Tabela 5: Ocorrência dos alelos mais frequentes para cada ST central do cc no mundo.

		Genes					
ST-103	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>
Alelo central	8 (72%)	4 (87%)	6 (73%)	17 (88%)	5 (84%)	18 (80%)	2 (70%)
Alelo Brasil	276 <sup>a</sup> (10%)	-	9 (19%)	-	-	-	-
Total	82%	87%	92%	88%	84%	80%	70%
ST-11	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>
Alelo central	2 (97%)	3 (99%)	4 (98%)	3 (97%)	8 (98%)	4 (98%)	6 (98%)
Alelo Brasil	-	-	-	-	-	-	-
Total	97%	99%	98%	97%	98%	98%	98%
ST-32	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>
Alelo central	4 (54%)	10 (96%)	5 (86%)	4 (89%)	6 (80%)	3 (95%)	8 (93%)
Alelo Brasil	8 <sup>b</sup> (42%)	-	-	-	-	-	-
Total	96%	96%	86%	89%	80%	95%	93%
ST-41/44	<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>
Alelo central	3 (48%)	6 (89%)	9 (83%)	5 (51%)	9 (76%)	6 (82%)	9 (76%)
Alelo Brasil	9 <sup>b</sup> (22%)	-	-	9 <sup>b</sup> (29%)	-	-	-
Total	70%	89%	83%	80%	76%	82%	76%

Fonte: (Do autor, 2022)

Nota: <sup>a</sup>alelo mais frequente no Brasil; <sup>b</sup>alelo 2<sup>ário</sup>

Tabela 6: Ocorrência dos alelos mais frequentes para cada ST central do cc no Brasil.

		Genes						
<b>ST-103</b>	<b><i>abcZ</i></b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>aroE</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>pdhC</i></b>	<b><i>pgm</i></b>	
Alelo central	8 (9%)	4 (97%)	6 (16%)	17 (42%)	5 (98%)	18 (88%)	2 (95%)	
Alelo Brasil	276 <sup>a</sup> (88%)	-	9 <sup>a</sup> (72%)	-	-	-	-	
Total	97%	97%	88%	42%	98%	88%	95%	
<b>ST-11</b>	<b><i>abcZ</i></b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>aroE</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>pdhC</i></b>	<b><i>pgm</i></b>	
Alelo central	2 (95%)	3 (94%)	4 (97%)	3 (94%)	8 (97%)	4 (97%)	6 (88%)	
Alelo Brasil	-	-	-	-	-	-	-	
Total	95%	94%	97%	94%	97%	97%	88%	
<b>ST-32</b>	<b><i>abcZ</i></b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>aroE</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>pdhC</i></b>	<b><i>pgm</i></b>	
Alelo central	4 (14%)	10 (88%)	5 (92%)	4 (51%)	6 (85%)	3 (82%)	8 (82%)	
Alelo Brasil	8 <sup>b</sup> (82%)	-	-	9 <sup>b</sup> (36%)	-	-	-	
Total	96%	88%	92%	87%	85%	82%	82%	
<b>ST-41/44</b>	<b><i>abcZ</i></b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>aroE</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>pdhC</i></b>	<b><i>pgm</i></b>	
Alelo central	3 (40%)	6 (84%)	9 (87%)	5 (9%)	9 (91%)	6 (64%)	9 (64%)	
Alelo Brasil	9 <sup>b</sup> (29%)	-	-	9 <sup>b</sup> (69%)	-	-	-	
Total	69%	84%	87%	78%	91%	64%	64%	

Fonte: (Do autor, 2022)

Nota: <sup>a</sup>alelo mais frequente no Brasil; <sup>b</sup>alelo 2<sup>ário</sup>

Após análise da ocorrência dos alelos mais frequentes para cada ST central entre os isolados de todo o mundo depositados no banco de dados do PubMLST e posterior comparação da ocorrência dos alelos mais frequentes apenas dos isolados do Brasil, foi verificado que, para o cc103, o alelo central do gene *abcZ* é o *abcZ-8*, sendo encontrado em 72% de todas as cepas depositadas nesse banco. Porém, entre as cepas isoladas no Brasil, este alelo aparece apenas em 9% dos isolados depositados. Se considerarmos apenas as cepas isoladas do Brasil, o alelo do gene *abcZ* mais encontrado é o *abcZ-276* e este representa 88% das amostras depositadas nesse banco. De acordo com o estudo de Azevedo e colaboradores (2020), o alelo *abcZ-276* foi relatado em 98% das cepas analisadas e não foi encontrado entre outras cepas de cc103 em todo o mundo, o que torna esse alelo um importante marcador genético para um novo clone específico atribuído apenas a cepas brasileiras do sorogrupo C (AZEVEDO *et al.*, 2020).

Na coleção de pesquisa do LMR do INCQS o alelo *abcZ-276* representa 95% de todos os isolados do cc103 da coleção, o que sugere que, no Brasil, esse clone apresenta essa característica de possuir alelos distintos dos alelos encontrados mundialmente, especialmente em relação ao gene *abcZ*.

Algo semelhante ocorre com o gene *aroE*. O alelo central do gene *aroE* do cc103 é o *aroE-6* e este é encontrado em 73% de todos os isolados do mundo que foram depositados no PubMLST. Já o alelo *aroE-9*, que é o alelo mais encontrado no Brasil para o cc103, representa 19% dos isolados do mundo. No entanto, entre as cepas isoladas no Brasil, o *aroE-6* aparece somente em 16% dos isolados depositados neste mesmo banco. Quando analisamos apenas as cepas isoladas do Brasil, essas proporções se invertem. O alelo *aroE-9* representa 72% desses isolados e o *aroE-6* é encontrado em apenas 16%.

De acordo com as tabelas 5 e 6, os genes do MLST selecionados para este estudo foram *abcZ*, *adk*, *aroE*, *gdh* e *pdhC*. O gene *fumC* também foi testado apesar de apresentar alguns alelos com uma frequência abaixo de 70% em alguns dos complexos clonais incluídos nesse estudo (cc103, cc32 e cc41/44). O gene *pgm* não foi selecionado, pois é o que apresenta maior diversidade de alelos entre as cepas da coleção, além de não termos encontrado uma região favorável para o desenho de iniciadores.

### 5.3 qPCR-HRM

#### 5.3.1 Teste com fluoróforos distintos

A fim de determinar o fluoróforo que fornecia o melhor resultado, foram testados inicialmente os fluoróforos *Evagreen* de 3 marcas diferentes (5x hot *FIREpol*® *Evagreen*® *HRM Mix* - Solis Biodyne; *RealQPlus 2x Master Mix Green* - Ampliqon e *SensiFAST™ HRM Kit* - Biorline) e o fluoróforo Syto9 (*MeltDoctor™ HRM Master Mix*) que é o kit indicado pelo fabricante dos equipamentos *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems* (QS5) e *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems* (QS7), todos da *ThermoFisher*. Esse teste foi feito com representantes dos genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *gdh* e *pdhC*, com 2 a 4 cepas de cada alelo de cada cc.

Foi verificado que os resultados obtidos variam de acordo com cada master mix, mas, de certa forma, esses resultados são similares (tabela 7). No entanto, optamos por usar o fluoróforo Syto9 *MeltDoctor™ HRM Master Mix* por ser o fluoróforo indicado pelo fabricante do equipamento e por apresentar resultados mais estáveis.

Tabela 7: Resultados de TM dos alelos obtidos com fluoróforos distintos no QS5.

Alelos	Fluoróforos			
	MeltDoctor (Syto9)	Solis (Evagreen)	RealQPlus (Evagreen)	SensiFast (Evagreen)
<i>abcZ-276</i> <sup>a</sup>	81,4 ± 0,1	86,5 ± 0,1	84 ± 0,1	84 ± 0,1
<i>abcZ-2</i>	83,1 ± 0,1	87,8 ± 0,1	85,2	85,1 ± 0,2
<i>abcZ-8</i> <sup>a</sup> (cc32)	81 ± 0,1	86,1	83,7 ± 0,1	83,8 ± 0,1
<i>abcZ-9</i> <sup>a</sup> (cc41)	81,1	86	83,7 ± 0,1	83,7 ± 0,1
<i>adk-4</i>	84,3 ± 0,1	89 ± 0,1	-	86,3
<i>adk-3</i>	84,6 ± 0,1	89 ± 0,1	-	86,2 ± 0,3
<i>adk-10</i>	84,7 ± 0,2	89,2 ± 0,2	-	86 ± 0,7
<i>adk-6</i>	84,9 ± 0,1	89,4	-	86,7 ± 0,1
<i>aroE-6</i> (cc103)	83,1 ± 0,1	87,8	-	85,3 ± 0,1
<i>aroE-9</i> <sup>a</sup> (cc103)	85,4 ± 0,3	90	-	87,4 ± 0,1
<i>aroE-4</i>	82,9 ± 0,1	87,9	-	85,1 ± 0,3
<i>aroE-5</i>	82,8 ± 0,3	87,9	-	85,3 ± 0,1
<i>aroE-9</i> (cc41)	85,7 ± 0,2	90,2 ± 0,2	-	87,7
<i>gdh-5</i>	83,2 ± 0,1	87,8 ± 0,1	-	85,1 ± 0,2
<i>gdh-8</i>	84,2 ± 0,3	88,7	-	86,1 ± 0,1
<i>gdh-6</i>	83,2 ± 0,2	87,6 ± 0,2	-	84,9 ± 0,4
<i>gdh-9</i>	84 ± 0,1	88,4	-	85,9 ± 0,1
<i>pdhC-18</i> <sup>b</sup>	83,2 ± 0,1	87,5 ± 0,2	-	85 ± 0,2
<i>pdhC-4</i> <sup>b</sup>	83 ± 0,2	87,1 ± 0,1	-	84,4 ± 0,1
<i>pdhC-3</i> <sup>b</sup>	83,1 ± 0,1	87 ± 0,2	-	84,1 ± 0,7
<i>pdhC-6</i> <sup>b</sup> (cc41)	83,5 ± 0,1	87,3	-	
<i>pdhC-64</i> <sup>b</sup> (cc41)	83,6	87,4 ± 0,1	-	84,8 ± 0,1
<i>pdhC-18</i> <sup>c</sup>	84,6 ± 0,1	88,7	-	86,2 ± 0,1
<i>pdhC-4</i> <sup>c</sup>	83,5 ± 0,4	87,8 ± 0,1	-	85,1 ± 0,10
<i>pdhC-3</i> <sup>c</sup>	84 ± 0,3	88,2 ± 0,2	-	85 ± 0,7
<i>pdhC-6</i> <sup>c</sup> (cc41)	83,9 ± 0,1	88,2	-	
<i>pdhC-64</i> <sup>c</sup> (cc41)	84,2	88,6 ± 0,1	-	85,9

Fonte: (Do autor, 2021).

Nota: <sup>a</sup>alelo mais frequente no Brasil; <sup>b</sup>iniciador *pdhC*<sub>35</sub>; <sup>c</sup>iniciador *pdhC*<sub>64</sub>.

### 5.3.2 Teste com temperaturas de anelamento distintas

Também foram realizados testes para definir qual seria a melhor temperatura de anelamento utilizada (teste de gradiente). Foram avaliadas as temperaturas de 60°C até 65°C para 4 genes distintos (*adk*, *aroE*, *gdh* e *pdhC*) com alguns representantes de cada cc sendo: 17 cepas do cc103, 12 cepas do cc11, 18 cepas do cc32 e 10 cepas do cc41 (tabela 8). De acordo com os resultados obtidos, a temperatura de 60°C foi a definida como a melhor temperatura de anelamento para todos os genes testados.

Tabela 8: Resultados obtidos com temperaturas de anelamento distintas para os genes *adk*, *aroE*, *gdh* e *pdhC*

<b>Alelos</b>	<b>Temperaturas</b>					
<b><i>adk</i></b>	<b>60°C</b>	<b>61°C</b>	<b>62°C</b>	<b>63°C</b>	<b>64°C</b>	<b>65°C</b>
4 - cc103	88,6	88,5	88,6	88,3	88,6	88,6
3 - cc11	-	-	-	-	-	-
10 - cc32	89,0	89,1	89,1	89,0	89,2	89,1
6 - cc41	89,0	89,1	89,1	88,9	89,1	89,1
<b><i>aroE</i></b>	<b>60°C</b>	<b>61°C</b>	<b>62°C</b>	<b>63°C</b>	<b>64°C</b>	<b>65°C</b>
6 - cc103	-	-	-	-	-	-
4 - cc11	87,4	87,4	87,5	87,2	87,4	87,6
5 - cc32	87,6	87,7	87,7	87,6	87,7	87,7
9 - cc41	89,9	89,9	89,9	89,7	89,9	90,0
<b><i>gdh</i></b>	<b>60°C</b>	<b>61°C</b>	<b>62°C</b>	<b>63°C</b>	<b>64°C</b>	<b>65°C</b>
5 - cc103	87,6	87,5	87,6	87,6	87,7	87,7
8 - cc11	88,3	88,3	88,3	88,1	79,8	87,0
6 - cc32	67,2	63,7	72,2	89,6	90,3	86,3
9 - cc41	88,1	88,2	88,2	88,1	88,2	88,4
<b><i>pdhC</i></b>	<b>60°C</b>	<b>61°C</b>	<b>62°C</b>	<b>63°C</b>	<b>64°C</b>	<b>65°C</b>
18 - cc103	87,9	88,3	88,5	87,2	87,9	85,0
4 - cc11	67,2	87,7	87,6	85,1	86,1	85,1
3 - cc32	87,8	88,1	88,1	88,2	85,1	85,5
6 - cc41	88,2	82,2	88,0	87,1	85,6	85,2

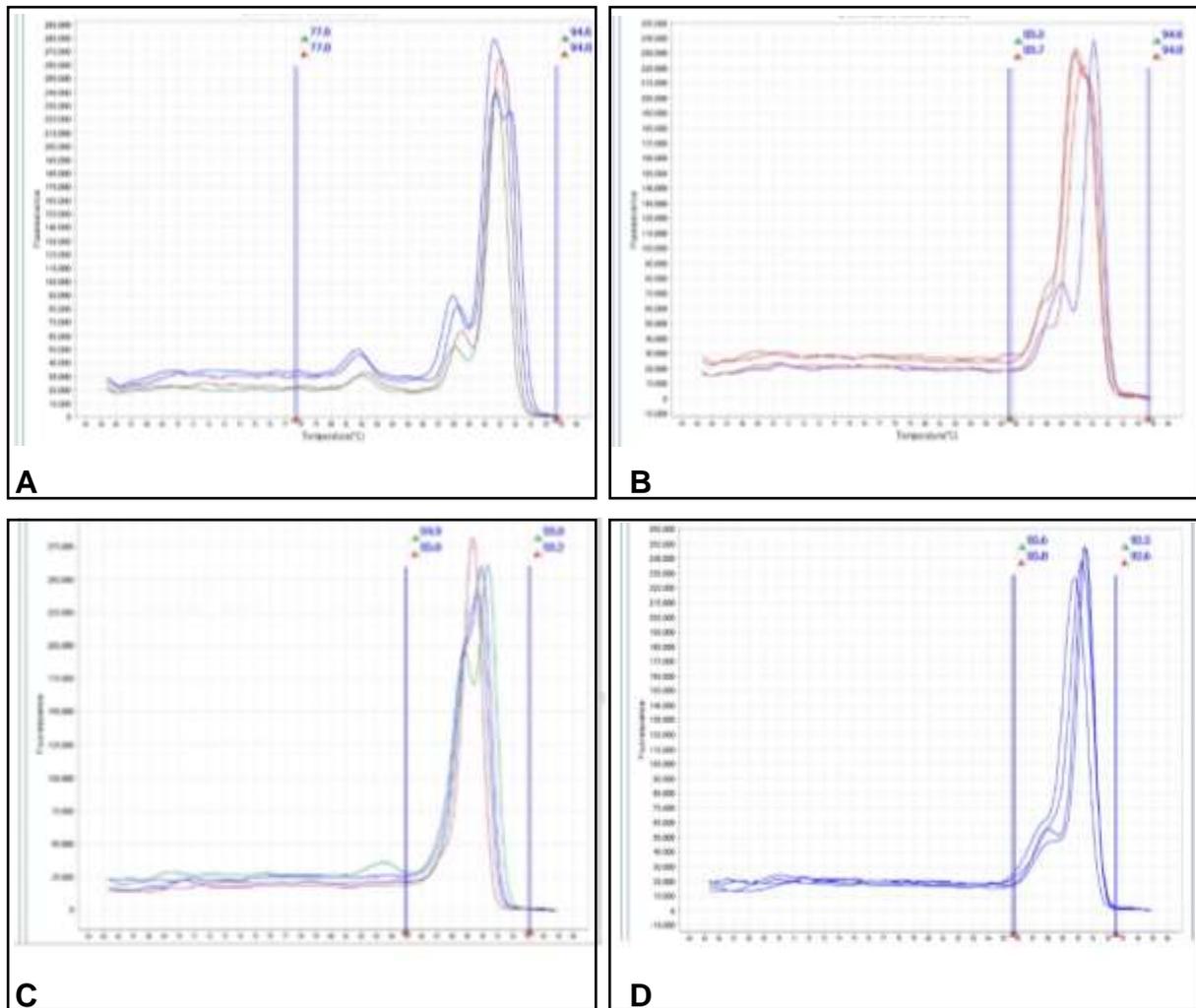
Fonte: (Do autor, 2021).

### 5.3.3 Teste com os iniciadores do MLST

Os iniciadores utilizados no MLST foram testados na reação de qPCR-HRM, com o fluoróforo *Evagreen*, no equipamento QS5, para 4 genes (*adk*, *aroE*, *gdh* e *pdhC*) de cada um dos cc incluídos nesse estudo.

Foram testadas um total de 91 cepas para o gene *adk*, sendo 43 cepas para o alelo *adk-4* (cc103), 13 cepas para o *adk-3* (cc11), 10 cepas para o *adk-6* (cc41) e 25 cepas para o *adk-10* (cc32). Para o gene *aroE* foram testadas 77 cepas: 31 cepas para o alelo *aroE-9* (cc103), 4 para o *aroE-6* (cc103), 13 para o alelo *aroE-4* (cc11), 3 para o *aroE-9* (cc41) e 26 *aroE-5* (cc32). O gene *gdh* foi testado em 81 cepas, sendo 34 cepas para o alelo *gdh-5* (cc103), 11 para o alelo *gdh-8* (cc11), 10 cepas para o *gdh-9* (cc41) e 26 cepas para o alelo *gdh-6* (cc32). O gene *pdhC* foi testado em 65 cepas, sendo 23 cepas para o alelo *pdhC-18* (cc103), 12 para o alelo *pdhC-4* (cc11), 4 cepas para o *pdhC-6* (cc41) e 26 cepas para o alelo *pdhC-3* (cc32). No entanto, ao contrário do que foi observado por Harrison e Hanson (2017), com as cepas de *E. coli*, as reações com as cepas de Nm apresentaram uma certa inespecificidade, com vários picos de TM para o mesmo alelo, conforme mostrado na figura 10.

Figura 10: Teste qPCR-HRM com iniciadores do MLST para os genes *adk*, *aroE*, *gdh* e *pdhC*



Fonte: (Do autor, 2021).

Nota: A: curva de *melting* do gene *adk*; B: curva de *melting* do gene *aroE*; C: curva de *melting* do gene *gdh*; D: curva de *melting* do gene *pdhC*.

#### 5.3.4 Resultados obtidos no QS5 com *MeltDoctor*

Foram testados, para cada gene, no equipamento QS5, com o fluoróforo *MeltDoctor*, vários alelos de cada sorogrupo, de acordo com o número de representantes na coleção de pesquisa do LMR do INCQS. Foram realizadas, nesse equipamento (QS5) mais de 920 reações, uma vez que cada cepa foi testada, pelo menos, duas vezes para o mesmo alelo, a fim de confirmar o resultado encontrado.

Para o gene *abcZ* foram realizadas mais de 200 reações, sendo: 68 cepas testadas para o alelo *abcZ*-276 do cc103 (mais frequente no Brasil); 10 cepas testadas para o alelo *abcZ*-2 do cc11; 29 cepas para o alelo *abcZ*-8 do cc32 (mais frequente

no Brasil); 5 cepas testadas para o alelo *abcZ-9* do cc41 (mais frequente no Brasil) e 2 cepas testadas para o alelo central *abcZ-3* do cc41.

O gene *adk* foi testado em 79 cepas, com representantes dos alelos de cada cc: 42 cepas foram testadas para a detecção do alelo *adk-4* do cc103; 3 cepas para o alelo *adk-3* do cc11; 32 cepas para o alelo *adk-10* do cc32 e 2 cepas foram testadas para o alelo *adk-6* do cc41. Todos os alelos testados do gene *adk* foram os alelos centrais de seus respectivos cc.

Para o gene *aroE* foram testadas 87 cepas, sendo 11 referentes ao alelo central do cc103, que é o *aroE-6* e 31 cepas do alelo mais frequente no Brasil, *aroE-9*, também do cc103; 13 do alelo central, *aroE-4*, do cc11; 29 cepas do alelo central, *aroE-5*, do cc32 e 3 cepas alelo central, *aroE-9* do cc41.

O gene *fumC* foi o que teve o menor número de reações realizadas, pois possui menos representantes na coleção de pesquisa do LMR do INCQS, dos alelos pesquisados, seja o alelo central ou o mais frequente no Brasil. Para esse gene observamos uma grande diversidade de alelos. Portanto, 32 cepas foram testadas para o gene *fumC*, sendo: 8 cepas do alelo *fumC-17* do cc 103; 12 cepas do alelo *fumC-3* do cc11; 5 cepas do alelo *fumC-4* do cc32 e apenas 1 cepa do alelo *fumC-5* do cc 41. Alternativamente foram testadas 2 cepas do alelo *fumC-9* do cc41 e 4 cepas do alelo *fumC-410* também do cc41.

Foram testadas 78 cepas para o gene *gdh*, todas para o alelo central, sendo distribuídas da seguinte forma: 32 cepas para o alelo *gdh-5* do cc103; 11 cepas do alelo *gdh-8* do cc11; 29 cepas do alelo *gdh-6* do cc32 e apenas 6 cepas do alelo *gdh-9* do cc41, pois é a quantidade que tem desse alelo na coleção.

Já para o gene *pdhC* foram testadas 70 cepas dos seguintes alelos: 30 cepas do alelo *pdhC-18* do cc103; 12 cepas do alelo *pdhC-4* do cc11; 25 cepas do alelo *pdhC-3* do cc32 e 3 cepas do alelo *pdhC-6* do cc41. Todas testadas para o alelo central de cada cc. O número reduzido de cepas para o alelo central do cc41 deve-se ao fato de não haver representantes na coleção de pesquisa do LMR do INCQS.

Todos os resultados foram comparados com os resultados obtidos com o MLST, realizado previamente, para a confirmar que a detecção daquele alelo foi realmente eficiente.

Na tabela 9, estão listadas as reações realizadas no QS5, utilizando o *MeltDoctor*, com as temperaturas de *melting* obtidas.

Tabela 9: Resultados obtidos no QS5 com o *MeltDoctor*

cc	Alelos						
<b>ST-103</b>	<b><i>abcZ-276<sup>a</sup></i></b>	<b><i>adk-4</i></b>	<b><i>aroE-6</i></b>	<b><i>aroE-9<sup>a</sup></i></b>	<b><i>fumC-17</i></b>	<b><i>gdh-5</i></b>	<b><i>pdhC-18</i></b>
TM	81,6±0,2	84,4±0,3	83,0±0,1	85,4±0,3	84,0±0,1	83,2±0,3	84,7±0,3
Detecção do alelo	49 (72%)	24 (57%)	-	24 (77%)	10 (100%)	32 (100%)	28 (93%)
Variante <sup>b</sup>	19 (28%)	18 (43%)	1 (10%)	7 (23%)	-	-	2 (7%)
Erro	-	-	9 (90%)	-	-	-	-
Total (n)	68	42	10 <sup>c</sup>	31	10 <sup>c</sup>	32	30
<b>ST-11</b>	<b><i>abcZ-2</i></b>	<b><i>adk-3</i></b>	<b><i>aroE-4</i></b>	<b><i>fumC-3</i></b>	<b><i>gdh-8</i></b>	<b><i>pdhC-4</i></b>	
TM	83,3±0,2	84,5	83,0±0,1	84,5±0,1/82,1±0,1	84,1±0,1	83,6±0,3	
Detecção do alelo	9 (90%)	3 (100%)	6 (46%)	10 (91%)	10 (91%)	8 (67%)	
Variante <sup>b</sup>	-	-	1 (8%)	1 (9%)	1 (9%)	3 (25%)	
Erro	1 (10%)	-	6 (46%)	-	-	1 (8%)	
Total (n)	10	3 <sup>c</sup>	13	11	11	12	
<b>ST-32</b>	<b><i>abcZ-8<sup>a</sup></i></b>	<b><i>adk-10</i></b>	<b><i>aroE-5</i></b>	<b><i>fumC-4</i></b>	<b><i>gdh-6</i></b>	<b><i>pdhC-3</i></b>	
TM	81,2±0,2	84,8±0,3	83,3±0,2	84,2±0,1	84,4±0,2	84,0±0,1	
Detecção do alelo	29 (100%)	27 (84,5%)	20 (69%)	5 (100%)	13 (45%)	21 (84%)	
Variante <sup>b</sup>	-	3 (9,5%)	3 (10%)	-	14 (48%)	2 (8%)	
Erro	-	2 (6%)	6 (21%)	-	2 (7%)	2 (8%)	
Total (n)	29 <sup>c</sup>	32	29 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	29 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	
<b>ST-41/44</b>	<b><i>abcZ-9<sup>a</sup></i></b>	<b><i>abc-3</i></b>	<b><i>adk-6</i></b>	<b><i>aroE-9</i></b>	<b><i>gdh-9</i></b>	<b><i>pdhC-6</i></b>	
TM	81,3±0,1	83,1±0,1	84,8	85,3±0,1	83,6±0,1	84,2	
Detecção do alelo	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	6 (100%)	3 (100%)	
Variante <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	
Erro	-	-	-	-	-	-	
Total (n)	5 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	

Fonte: (Do autor, 2021).

Legenda: <sup>a</sup>alelo mais frequente no Brasil; <sup>b</sup>resultado quando a amostra se afasta, difere, do controle; <sup>c</sup>número reduzido de alelos disponível na coleção.

Nota: Temperaturas em °C.

Alguns alelos foram testados em menor quantidade devido ao número reduzido de representantes na coleção.

De acordo com os resultados da tabela 9, os alelos que apresentaram os melhores resultados para a determinação dos cc no QS5, entre as cepas da coleção de pesquisa do LMR do INCQS, foram os seguintes: *abcZ-276*, *aroE-9*, *fumC-17*, *gdh-5* e *pdhC-18* para o cc103, com detecção acima de 70%; para o cc11 foram os alelos *abcZ-2*, *adk-3*, *fum-3* e *gdh-8*, com detecção superior 90%; para o cc32 *abcZ-8*, *adk-10*, *aroE-5*, *fum-4* e *pdhC-3*, todos com acerto acima de 80% exceto o *aroE-5* que ficou com 69% e para o cc41/44 os alelos *abcZ-3*, *abc-9*, *adk-6*, *aroE-9*, *gdh-9* e *pdhC-6*, todos com 100% de acerto na detecção (tabela 10).

Tabela 10: Alelos que apresentaram os melhores resultados para a determinação dos cc e a porcentagem de detecção de cada alelo, entre as cepas da coleção de pesquisa do LMR do INCQS, no QS5. Entre parênteses os sorogrupos associados ao cc.

cc103 (C)	cc11 (C ou W)	cc32 (B)	cc41/44 (B)
<i>abcZ-276</i> (72%)	<i>abcZ-2</i> (90%)	<i>abcZ-8</i> (100%)	<i>abcZ-3</i> e <i>abcZ-9</i> (100%)
-	<i>adk-3</i> (100%)	<i>adk-10</i> (84,5%)	<i>adk-6</i> (100%)
<i>aroE-9</i> (77%)	-	<i>aroE-5</i> (69%)	<i>aroE-9</i> (100%)
<i>fumC-17</i> (100%)	<i>fumC-3</i> (91%)	<i>fumC-4</i> (100%)	-
<i>gdh-5</i> (100%)	<i>gdh-8</i> (91%)	-	<i>gdh-9</i> (100%)
<i>pdhC-18</i> (93%)	-	<i>pdhC-3</i> (84%)	<i>pdhC-6</i> (100%)

Fonte: (Do autor, 2021).

Todos os genes, com exceção do *aroE* para o cc32, tiveram a detecção correta de seus alelos acima de 70%. Para o cc41 obtivemos resultados com 100% de acerto na detecção para todos os alelos. A estratégia sugerida nesse estudo seria ao receber uma amostra, identificar o sorogrupo e realizar uma triagem com a qPCR-HRM para 4 genes de acordo com o cc associado ao sorogrupo conforme ilustrado na tabela 10. Caso não seja possível identificar um cc com esses 4 genes, seriam testados 1 ou 2 genes adicionais mais adequados para confirmar o cc suspeito. Os genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh* e *pdhC* seriam testados até se encontrar a combinação alélica que identifica o cc. Para as cepas não viáveis o qPCR-HRM também poderá ser realizado direto do material clínico.

### 5.3.5 Resultados obtidos no QS7 com *MeltDoctor*.

De mesma forma que no QS5, foram realizadas várias reações para os diferentes alelos de cada gene para cada cc, no termociclador QS7. Todos os testes foram repetidos, no mínimo, 2 vezes para a confirmação do resultado encontrado.

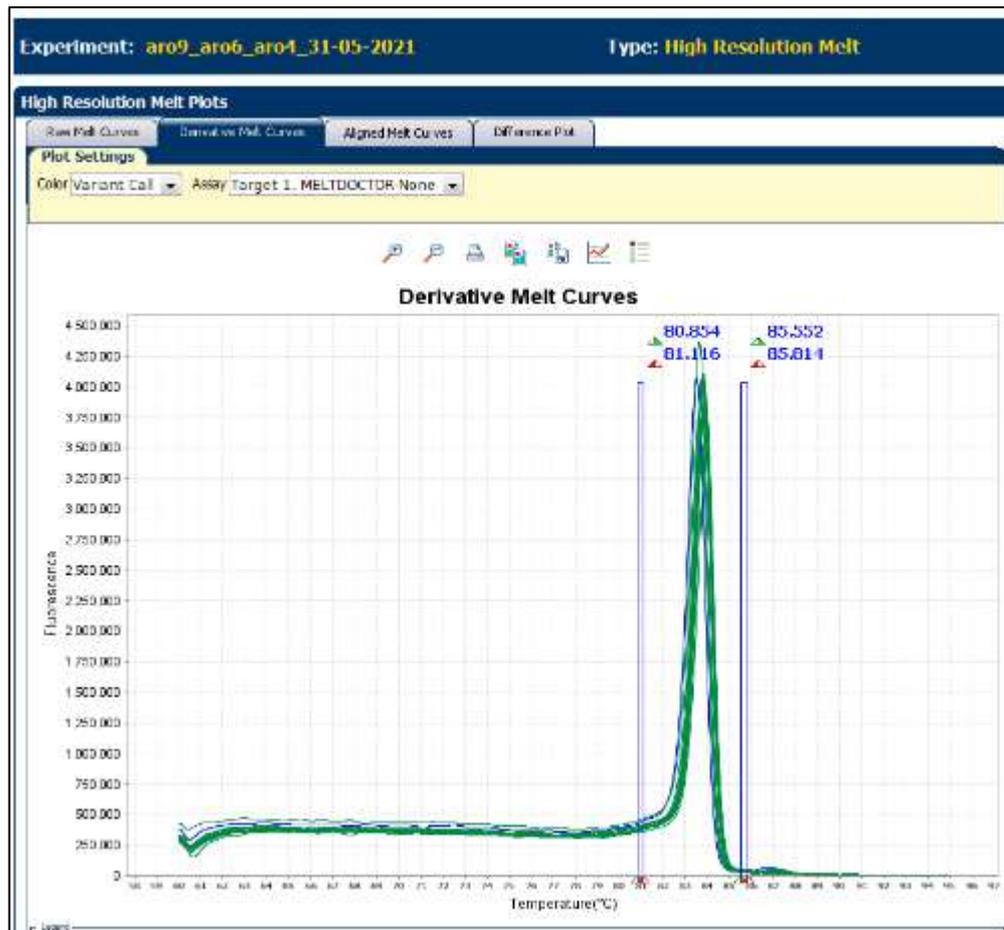
No total, foram realizadas 1.082 reações e foram testados os genes *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh* e *pdhC*. Os resultados obtidos (tabela 11) foram similares aos resultados do QS5, com algumas diferenças na detecção de alguns alelos. Esses resultados também sugerem que o QS7 é mais sensível do que o QS5. Na figura abaixo (figura 11), observa-se um exemplo do gráfico de amplificação de uma das reações realizadas no QS7. A figura 12 mostra um gráfico da curva de *melting* do gene *aroE* do cc11, onde a TM foi de  $83,814^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , referente ao alelo *aroE*-4.

Figura 11: Gráfico de amplificação do alelo *abcZ*-276 no QS7



Fonte: (Do autor, 2021).

Nota: Curva de amplificação do gene *abcZ*.

Figura 12: Curva de *melting* do gene *aroE* no QS7

Fonte: (Do autor, 2021).

Nota: Curva de *melting* do alelo *aroE-4* do cc11 (TM 83,814°C ± 0,2 °C).

Tabela 11: Resultados obtidos no QS7 com o *MeltDoctor*

cc	Alelos						
<b>ST-103</b>	<b><i>abcZ-276<sup>a</sup></i></b>	<b><i>adk-4</i></b>	<b><i>aroE-6</i></b>	<b><i>aroE-9<sup>a</sup></i></b>	<b><i>fumC-17</i></b>	<b><i>gdh-5</i></b>	<b><i>pdhC-18</i></b>
TM	81,539±0,3	84,424±0,1	83,518±1,6	85,567±0,5	82,192±0,1	82,953±0,6	84,503±0,7
Detecção do alelo	45(66%)	20 (48%)	1 (9%)	31 (100%)	9 (90%)	31 (97%)	23 (77%)
Variante <sup>b</sup>	23 (34%)	22 (52%)	10 (91%)	-	1 (10%)	1 (3%)	7 (23%)
Total (n)	68	42	11 <sup>c</sup>	31	10	32	30
<b>ST-11</b>	<b><i>abcZ-2</i></b>	<b><i>adk-3</i></b>	<b><i>aroE-4</i></b>	-	<b><i>fumC-3</i></b>	<b><i>gdh-8</i></b>	<b><i>pdhC-4</i></b>
TM	82,073±0,25	84,739±0,08	83,814±0,2	-	83,144±0,3	84,312±0,3	83,518±0,14
Detecção do alelo	14 (93%)	8 (100%)	17 (94%)	-	14 (88%)	11 (69%)	16 (94%)
Variante <sup>b</sup>	1 (7%)	-	1 (6%)	-	2 (12%)	5 (31%)	1 (6%)
Total (n)	15	8 <sup>c</sup>	18	-	16	16	17
<b>ST-32</b>	<b><i>abcZ-8<sup>a</sup></i></b>	<b><i>adk-10</i></b>	<b><i>aroE-5</i></b>	-	<b><i>fumC-4</i></b>	<b><i>gdh-6</i></b>	<b><i>pdhC-3</i></b>
TM	81,349±0,3	85,121±0,2	83,333±0,3	-	83,015±0,2	3 picos*	83,865±0,3
Detecção do alelo	29 (100%)	30 (94%)	20 (69%)	-	5 (100%)	30 (100%)*	25 (100%)
Variante <sup>b</sup>	-	2 (6%)	9 (31%)	-	-	-	-
Total (n)	29 <sup>c</sup>	32	29 <sup>c</sup>	-	5	30 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>
<b>ST-41/44</b>	<b><i>abcZ-9<sup>a</sup></i></b>	<b><i>abcZ-3</i></b>	<b><i>adk-6</i></b>	<b><i>aroE-9</i></b>	<b><i>fumC-5</i></b>	<b><i>gdh-9</i></b>	<b><i>pdhC-6</i></b>
TM	81,434±0,1	82,867±0,01	85,137±0,1	84,695±0,1 82,374±0,1	83,027	83,931±0,1	84,016±0,1
Detecção do alelo	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	6 (100%)	3 (100%)
Variante <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Total (n)	5 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	1	6 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>

Fonte: (Do autor, 2021).

Legenda: <sup>a</sup>alelo mais frequente no Brasil; <sup>b</sup>resultado quando a amostra se afasta, difere, do controle; <sup>c</sup>número reduzido de alelos disponível na coleção.

\*Todas as 30 cepas testadas (ST-32) tiveram 3 picos de temperaturas, entre 60 °C e 90°C e foram identificadas pelo equipamento como *gdh-6*.

Nota: Temperaturas em °C.

De acordo com os resultados obtidos no QS7 (tabela 11), os alelos que apresentaram os melhores resultados para a determinação dos cc, entre as cepas testadas, da coleção de pesquisa do LMR do INCQS, foram os seguintes: *aroE-9*, *fumC-17* e *gdh-5* para o cc103, com detecção acima de 90% e o alelo *pdhC-18* com uma porcentagem de identificação de 77%. Já a porcentagem de detecção para o alelo *abcZ-276*, entre as cepas do cc103, ficou abaixo dos 70%, com apenas 66% de detecção. Os alelos que apresentaram os melhores resultados para o cc11 foram os alelos *abcZ-2*, *adk-3*, *aroE-4* e *pdhC-4*, todos com detecção superior a 93% e o alelo *fumC-3* com 88% de detecção. Para o cc32 os alelos *abcZ-8*, *fumC-4* e *pdhC-3*, apresentaram 100% de acerto na detecção. O alelo *adk-10* com acerto de 94% e o alelo *aroE-5* com 69% de detecção. O alelo *gdh-6* do cc32 apresentou 100% de detecção, no entanto, todas as cepas testadas apresentaram reações inespecíficas com 3 picos de TM cada, com temperaturas variando entre 60 °C e 90 °C (esse resultado foi repetido e confirmado). Para o cc41/44 os alelos *abcZ-3*, *abc-9*, *adk-6*, *aroE-9*, *gdh-9* e *pdhC-6*, todos os alelos apresentaram 100% de acerto na detecção. No caso do alelo *aroE-9*, também foi observado uma reação inespecífica, com 2 TM para cada cepa testada ( $84,695^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  e  $82,374^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ). O alelo *fumC-5* foi testado, porém só existe uma única cepa na coleção com esse alelo e por isso esse resultado não foi considerado ao analisar os melhores marcadores para o cc41/44. De todos os genes, o *fumC* é o que possui o menor número de representantes dos alelos centrais e secundários dentre todos os complexos clonais das cepas da coleção. Os alelos que apresentaram os melhores resultados na determinação dos cc acima estão listados na tabela 12, juntamente com a porcentagem de detecção de cada alelo.

Tabela 12: Alelos que apresentaram os melhores resultados, no QS7, na determinação dos cc e a porcentagem de detecção de cada alelo, entre as cepas testadas.

cc103	cc11	cc32	cc41/44
<i>abcZ-276</i> (66%)	<i>abcZ-2</i> (93%)	<i>abcZ-8</i> (100%)	<i>abcZ-3</i> e <i>abcZ-9</i> (100%)
-	<i>adk-3</i> (100%)	<i>adk-10</i> (94%)	<i>adk-6</i> (100%)
<i>aroE-9</i> (100%)	<i>aroE-4</i> (94%)	<i>aroE-5</i> (69%)	<i>aroE-9</i> (100%)
<i>fumC-17</i> (90%)	<i>fumC-3</i> (88%)	<i>fumC-4</i> (100%)	-
<i>gdh-5</i> (97%)	-	-	<i>gdh-9</i> (100%)
<i>pdhC-18</i> (77%)	<i>pdhC-4</i> (94%)	<i>pdhC-3</i> (100%)	<i>pdhC-6</i> (100%)

Fonte: (Do autor, 2021).

Os resultados obtidos sugerem que é possível determinar o cc das cepas de Nm através da qPCR-HRM, com a detecção da TM das assinaturas genéticas de cada alelo de cada cc. O esquema preliminar, proposto nesse estudo, para a detecção de complexos clonais de meningococos, por qPCR-HRM, seria através da determinação de 4 a 6 alelos do MLST e posteriormente inserir esses alelos no banco de dados PubMLST para a confirmação do cc do isolado.

Foi realizada uma busca ativa no PubMLST e verificamos que ao inserir nesse banco de dados os alelos [*abcZ-8/aroE-6/gdh-5/pdhC-18*] ou [*abcZ-276/fumC-17/gdh-5/pdhC-18*], 100% das cepas detectadas no banco de dados pertencem ao cc103; Com os alelos [*abcZ-2/adk-3/aroE-4/pdhC-4*], 100% das cepas detectadas no banco de dados do MLST pertencem ao cc11; Ao inserir os alelos [*adk-10/aroE-5/fumC-4, pdhC-3*], 100% das cepas detectadas no banco de dados do MLST pertencem ao cc32; E finalmente com os alelos [*abcZ-3/adk-6/gdh-9/pdhC-6*], também verificamos que 100% das cepas detectadas no banco de dados do MLST pertencem ao cc41.

#### 5.3.6 Análise estatística

A probabilidade das possíveis combinações entre os alelos, para cada cc, foi calculada com base no banco de dados do PubMLST de *Neisseria*. A tabela com os resultados do MLST desse banco foi exportada e foi aplicado o filtro de acordo com cada combinação. Foi calculada a probabilidade da combinação do perfil alélico de pertencer ao cc indicado, entre as cepas depositadas. Se quatro ou mais alelos detectados por HRM corresponderem ao alelo central, a probabilidade das amostras pertencerem ao cc indicado é sempre de 100%. No entanto, se um dos alelos detectados é o alelo secundário ou o mais frequente encontrado no Brasil, a probabilidade pode variar, dependendo da combinação alélica (tabelas 13 a 16). Na maioria dos perfis propostos a probabilidade de detecção fica acima de 90%.

Tabela 13: Probabilidade de determinação do cc103 (com 1 alelo mais frequente no Brasil)\*.

<i>abcZ-276*</i>	<i>aroE-6</i>	<i>fumC-17</i>	<i>gdh-5</i>	<i>pdhC-18</i>	Probabilidade(%)
1	1	1	1	1	100
1	1	1	1	0	100
1	1	1	0	1	0
1	1	0	1	1	0
1	0	1	1	1	100
0	1	1	1	1	100

Nota: 1: Detecção do alelo; 0: Não detecção do alelo; \*alelo mais frequente no Brasil

Tabela 14: Probabilidade de determinação do cc103 (com 2 alelos mais frequentes no Brasil)\*.

<i>abcZ-276*</i>	<i>aroE-9*</i>	<i>fumC-17</i>	<i>gdh-5</i>	<i>pdhC-18</i>	Probabilidade(%)
1	1	1	1	1	100
1	1	1	1	0	80
1	1	1	0	1	25
1	1	0	1	1	90
1	0	1	1	1	100
0	1	1	1	1	100

Nota: 1: Detecção do alelo; 0: Não detecção do alelo; \*alelo mais frequente no BrasilE

Tabela 15: Probabilidade de determinação do cc32 (com 1 alelo secundário)\*.

<i>abcZ-8*</i>	<i>adk-10</i>	<i>aroE-5</i>	<i>fumC-4</i>	<i>pdhC-3</i>	Probabilidade(%)
1	1	1	1	1	100
1	1	1	1	0	98
1	1	1	0	1	97
1	1	0	1	1	99
1	0	1	1	1	94
0	1	1	1	1	100

Nota: 1: Detecção do alelo; 0: Não detecção do alelo; \*alelo secundário

Tabela 16: Probabilidade de determinação do cc41/44 (com 1 alelo mais frequente no Brasil)\*.

<i>abcZ-9*</i>	<i>adk-6</i>	<i>aroE-9</i>	<i>gdh-9</i>	<i>pdhC-6</i>	Probabilidade(%)
1	1	1	1	1	100
1	1	1	1	0	99,6
1	1	1	0	1	99
1	1	0	1	1	98,5
1	0	1	1	1	100
0	1	1	1	1	100

Nota: 1: Detecção do alelo; 0: Não detecção do alelo; \*alelo mais frequente no Brasil

#### 5.3.6.1 Desvio padrão dos resultados das reações de qPCR

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata. Foi verificado o *Cycle Threshold* (CT) de cada isolado e aplicado o teste de desvio padrão a fim de avaliar a reprodutibilidade dos ensaios. A média entre os CT das duplicatas foi de 15,6 e o desvio padrão de 1,6. O que indica que há grande estabilidade entre as medidas, pois os valores estão bem estáveis em torno da média. Esse resultado demonstra que esses ensaios possuem boa reprodutibilidade, podendo ser considerado satisfatório para uma análise estritamente qualitativa.

#### 5.3.7 Comparação dos resultados do HRM com o MLST

Na tabela 17, foram listados os resultados da detecção dos alelos obtidos por HRM e o complexo clonal correspondente para cada cepa testada e a comparação desses resultados com o resultado do complexo clonal obtido através do MLST.

Tabela 17: Comparação dos resultados do complexo clonal obtidos por HRM e por MLST (continua).

<b>Cepa</b>	<b><i>abcZ</i></b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>aroE</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>pdhC</i></b>	<b>cc (MLST)</b>	<b>cc (HRM)</b>
2914	3	1	nd	1	1	nd	103	103
2983	3	1	nd	1	1	nd	103	103
3103	3	1	3	na	1	1	103	103
3105	3	na	3	1	1	na	103	103
3123	3	na	3	1	1	na	103	103
3137	nd	nd	3	1	1	1	103	103
3142	nd	na	3	1	1	1	103	103
3154	3	1	3	na	1	na	103	103
3195	3	1	na	na	1	1	103	103
3264	3	1	3	na	1	na	103	103
3358	3	1	3	na	1	na	103	103
3365	3	1	3	na	1	na	103	103
3370	3	1	3	na	1	na	103	103
3386	3	1	3	na	1	na	103	103
3558	3	1	3	na	1	na	103	103
3564	3	1	3	na	1	na	103	103
3668	3	1	3	na	1	na	103	103
3670	3	1	3	na	1	na	103	103
3733	3	1	3	na	1	na	103	103
3740	3	1	3	na	1	na	103	103
3741	3	1	3	na	1	na	103	103
3776	3	1	3	na	1	na	103	103
3800	3	1	3	na	1	na	103	103
3841	3	1	3	na	1	na	103	103

Tabela 17: Comparação dos resultados do complexo clonal obtidos por HRM e por MLST (continuação).

<b>Cepa</b>	<b><i>abcZ</i></b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>aroE</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>pdhC</i></b>	<b>cc (MLST)</b>	<b>cc (HRM)</b>
2140	1	1	1	1	1	1	11	11
2141	1	1	1	1	1	1	11	11
2183	1	1	1	1	1	1	11	11
2774	1	1	1	1	1	1	11	11
2779	1	1	1	1	1	1	11	11
3087	1	1	1	-	-	1	11	11
3289	1	-	1	nd	1	1	11	11
3290	1	-	1	1	1	-	11	11
3294	1	-	1	1	1	1	11	11
3297	1	-	1	1	1	1	11	11
3303	1	-	1	1	1	-	11	11
3484	-	1	1	1	-	1	11	11
2365	2	1	nd	-	1	1	32	32
2681	2	1	nd	-	1	1	32	32
2686	2	1	nd	-	1	1	32	32
2704	2	1	nd	-	1	1	32	32
2708	2	1	nd	-	1	1	32	32
2710	2	1	nd	-	1	1	32	32
2711	2	1	nd	-	1	1	32	32
2712	2	1	nd	-	1	1	32	32
2713	2	1	1	-	1	1	32	32
2721	2	1	1	-	1	1	32	32
2849	2	1	1	-	1	1	32	32

Tabela 17: Comparação dos resultados do complexo clonal obtidos por HRM e por MLST (conclusão).

<b>Cepa</b>	<b><i>abcZ</i></b>	<b><i>adk</i></b>	<b><i>aroE</i></b>	<b><i>fumC</i></b>	<b><i>gdh</i></b>	<b><i>pdhC</i></b>	<b>cc (MLST)</b>	<b>cc (HRM)</b>
2850	2	1	1	-	1	1	32	32
2915	2	1	1	-	1	1	32	32
2932	2	1	1	-	1	1	32	32
2941	2	1	1	-	1	1	32	32
2990	2	1	1	-	1	1	32	32
3079	2	1	1	-	-	1	32	32
3331	-	1	1	-	1	1	32	32
3362	2	1	1	-	1	1	32	32
3396	2	1	1	-	1	1	32	32
3646	2	1	1	-	1	-	32	32
3738	2	1	1	-	1	-	32	32
4320	2	1	1	-	1	-	32	32
4325	2	1	1	-	1	-	32	32
2824	1	na	na	1	1	1	41/44	41/44

Fonte: (Do autor, 2021)

Legenda: nd: não detectado; na: não se aplica; 1: alelo central; 2: alelo secundário; 3: alelo mais frequente no Brasil; -: não testado.

Das 147 cepas que foram incluídas nesse estudo, apenas 69 cepas compartilham ao menos quatro dos alelos testados nesse estudo e que caracterizam cada cc (cc103, cc11, cc32 e cc41/44). Foram levados em consideração apenas os resultados obtidos com “*match*”. Através da análise do HRM, conseguimos identificar o cc de 86% das cepas, tanto do cc103 quanto do cc32 e, 100% do cc das cepas do cc11 e cc41/44. Portanto, a metodologia proposta nesse estudo foi capaz de identificar o cc em 88% do total das cepas da coleção, listadas na tabela 17.

Nesse estudo foi utilizado um total de 147 cepas a fim de aumentar o número de testes para cada alelo isoladamente e assim poder determinar com maior precisão a TM de cada alelo.

#### 5.3.8 Resultados da detecção do ET-15 por HRM

Foram testadas 19 cepas do cc11 a fim de detectar a mutação no alelo *fumC-3* do subclone ET-15. Dessas, 17 foram identificadas como ET-15 com TM média de  $85,073^{\circ}\text{C} \pm 0,23^{\circ}\text{C}$ . Para confirmar esse resultado, foi realizado o sequenciamento *Sanger* das amostras que ainda não tinham sido analisadas (14 das 19 cepas).

##### 5.3.8.1 Sequenciamento *Sanger* das amostras ET-15

O sequenciamento *Sanger* foi realizado a fim de verificarmos a presença da mutação no alelo *fumC-3* que caracteriza esse subclone do cc11, ou seja, a substituição da base guanina pela adenina (G667A). De acordo com a tabela 18, entre as cepas testadas, a mutação que caracteriza a variante ET-15 foi detectada em 10 cepas. Em quatro cepas não foi encontrada a mutação compatível com a variante ET-15, sendo que em duas dessas cepas esse resultado já era esperado, de acordo com o resultado do HRM e por isso essas cepas foram utilizadas nesse teste como controles negativos (P2635 e P3282). Nas cepas P3294 e P3297 apesar de terem sido identificadas por HRM como cepas ET-15, após análise das sequencias verificamos a presença de várias mutações nessa região, mas não observamos a mutação que caracteriza a cepa ET-15 e apenas nesse caso, o resultado da análise do HRM foi diferente do resultado do sequenciamento provavelmente por causa das outras mutações encontradas na região-alvo. Após a comparação entre os resultados obtidos através do HRM e da análise das sequencias, verificamos uma taxa de concordância entre esses resultados de 85,7%.

Tabela 18: Comparação entre os resultados obtidos por HRM e pelo sequenciamento *Sanger* entre as cepas do cc11

Cepas	<i>fumC</i>	ST	cc	HRM	Sequenciamento
2141	3	2994	11	ET-15 controle positivo	ET-15
2635	9	3778	32	variante (não ET-15) controle negativo	não ET-15
3040	3	11	11	ET-15	ET-15
3087	3	6974	11	ET-15	ET-15
3112	3	9689	11	ET-15	ET-15
3282	3	9719	11	variante (não ET-15) controle negativo	não ET-15
3286	3	9723	11	ET-15	ET-15
3289	3	9723	11	ET-15	ET-15
3290	3	9726	11	ET-15	ET-15
3294	3	9730	11	<b>ET-15</b>	<b>não ET-15</b>
3297	3	9732	11	<b>ET-15</b>	<b>não ET-15</b>
3303	3	9738	11	ET-15	ET-15
3307	3	9742	11	ET-15	ET-15
3985	3	2963	11	ET-15	ET-15

Fonte: (Do autor, 2021)

#### 5.4 Genoma das variantes ET-15

Após análise em diferentes plataformas e softwares, verificamos que as amostras analisadas apresentaram um genoma de aproximadamente 2,1 milhões de bases e conteúdo GC de 51,7% a 51,9% (tabela 19).

Tabela 19: Principais características genômicas dos isolados do complexo clonal 11.

Cepas	Tamanho do Genoma	Conteúdo GC (%)	N50	Nº de contigs	Nº de sequências codificadoras	Nº de RNA
P2140	2.100.832	51,7	50195	109	2.456	52
P2141	2.097.915	51,7	41244	118	2.475	52
P2183	2.079.277	51,8	37884	131	2.444	52
P2774	2.095.915	51,9	44677	187	2.472	54
P2779	2.078.398	51,9	48788	109	2.434	52

Fonte: (Do autor, 2021).

O gene *fumC* das cinco cepas testadas foi alinhado para a confirmação da mutação no alelo *fumC*-3 que caracteriza esse subclone do cc11. No entanto, essa mutação só foi verificada nas cepas P2140, P2141 e P2183. As cepas P2774 e P2779 (sorogrupo W), não apresentam a mutação que caracteriza esse subclone e, portanto, haviam sido depositadas na coleção erroneamente como ET-15.

Conforme demonstrado na tabela 20, foram encontrados dois fatores de resistência nos genomas das cepas do cc11 anotados no database CARD relacionados aos genes 23S rRNA e ao gene *farB*. O gene 23S rRNA, encontrado nas cepas P2140, P2141, P2183, P2774 e P2779, confere resistência a antibióticos macrolídeos através da alteração do alvo do antibiótico. O gene *farB*, que foi encontrado somente nas cepas do sorogrupo W, P2774 e P2779, está relacionado à bomba de efluxo de antibiótico da superfamília do facilitador principal e confere resistência aos ácidos graxos antibacterianos.

Tabela 20: Fatores de resistência nos genomas das cepas do cc11 anotados no database CARD.

Cepas	Genes de resistência antimicrobiana	Mecanismo de resistência	Classes de antibióticos
P2140; P2141; P2183; P2774 e P2779	23S rRNA com mutação que confere resistência a antibióticos macrolídeos	Alteração do alvo do antibiótico	Macrolídeos
P2774 e P2779 (não ET-15)	<i>farB</i> - Bomba de efluxo de antibiótico da superfamília do facilitador principal (MFS)	Efluxo de antibiótico	Ácidos graxos antibacterianos

Fonte: (Do autor, 2021).

Em relação à presença de elementos genéticos móveis (EGM) dos genomas das cepas do cc11 anotados no database MobileElementFinder, verificamos que

todas as 5 cepas analisadas apresentam EGM que não são observados na cepa de referência cc11 não ET-15 (tabela 21).

Tabela 21: Elementos genéticos moveis nos genomas das cepas do cc11 anotados no database MobileElementFinder

Classes	Cepa de Referência cc11 não-ET15	P2140	P2141	P2183	P2774 (MenW)	P2779 (MenW)
ISNme1	0	3	3	2	2	2
ISNme3	0	0	0	0	1	1
ISNme4	0	2	2	2	1	1
ISKki2	0	1	0	0	1	1
cn_8526_ISKki2	0	0	0	0	1	1
ISNgo3	1	1	1	1	1	1
cn_2269_ISNme1	0	1	0	0	0	1

Fonte: (Do autor, 2021)

Legenda: em azul tudo o que é igual a referência; em amarelo tudo que destoa entre as cepas.

De acordo com os fatores de virulência detectados nessas cepas após anotação no database VFDB, observa-se que as cepas analisadas apresentam fatores de virulência não comumente encontrados nas cepas de *Neisseria meningitidis* do cc11 (tabela 22).

Todas as 5 cepas (P2140, P2141, P2183, P2774 e P2779) apresentam uma endotoxina – LOS, similar à encontrada no gênero *Haemophilus*. Para a captação de ferro, possuem o fator de virulência de captação do heme (gene *hpuA*) e também uma proteína de ligação à transferrina (gene *tbpB*).

As cepas ET-15, P2140 e P2141, possuem como fator de virulência para evasão à resposta imune uma cápsula diferenciada com a presença dos genes *siaD/synD* e *synE* enquanto a outra cepa ET-15, P2183, possui apenas o gene *synE*. Esses genes não foram encontrados nas cepas do sorogrupo W, P2774 e P2779 e também não são encontrados em outras cepas de Nm do cc11.

Foi encontrado nas cepas ET-15, P2140, P2141 e P2183, como facilitador da aderência, o gene *lgtG*, responsável pela síntese de LOS e ainda em relação à aderência, o pili tipo IV (gene *pilC*) na cepa P2140.

Nas cepas P2774 e P2779 foi detectado um polissacarídeo capsular encontrado no gênero *Vibrio* (gene *rmIC*) que atua como um antifagocítico. Além disso, na cepa P2774 foram observados 3 genes (*narE*, *frpA* e *frpC*) relacionados à

produção de toxinas em outras espécies bacterianas e que estão, aparentemente, desligados na Nm. Apenas na cepa P2779 foi encontrado um gene associado ao polissacarídeo capsular também encontrado no gênero *Bacillus* e o gene *siaB/synB* relacionado a evasão imune. As cepas não ET-15, P2774 e P2779, também possuem o gene *lgtE* relacionado a síntese de LOS para aderência.

Tabela 22: Fatores de virulência detectados nas cepas do cc11 anotados no database VFDB. (continua)

Classes	Fatores de Virulência	Genes relacionados	Cepa de referência cc11 não-ET15	2140	2141	2183	2774	2779
Antifagocitose	Polissacarídeo Capsular ( <i>Vibrio</i> )	<i>rmlC</i>	-	-	-	-	+	+
Endotoxina	LOS ( <i>Haemophilus</i> )	<i>lpt6</i>	-	+	+	+	+	+
Toxina	Enzima de ribosilação de ADP de <i>Neisseria</i>	<i>narE</i>	-	-	-	-	+	-
	Toxina RTX	<i>frpA</i>	-	-	-	-	+	-
		<i>frpC</i>	-	-	-	-	+	-
Evasão Imune	Polissacarídeo capsular ( <i>Bacillus</i> )	<i>gtaB</i>	-	-	-	-	-	+
	Cápsula	<i>ctrA</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>ctrB</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>ctrC</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>ctrD</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>lipA</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>lipB</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>mynA/sacA</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>mynB/sacB</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>mynC/sacC</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>mynD/sacD</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>siaA/synA</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>siaB/synB</i>	-	-	-	-	-	+
		<i>siaC/synC</i>	+	+	+	+	-	-
		<i>siaD/synD</i>	-	+	+	-	-	-
<i>synE</i>	-	+	+	+	-	-		
Aderência	Proteína de adesão e penetração	<i>app</i>	+	+	+	+	+	+
	Sialilação LOS	<i>lst</i>	+	+	+	+	+	+
	Síntese de LOS	<i>kdtA/waaA</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>lgtA</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>lgtB</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>lgtC</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>lgtD</i>	-	-	-	-	-	-
		<i>lgtE</i>	-	-	-	-	+	+
		<i>lgtF</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>lgtG</i>	-	+	+	+	-	-
		<i>lgtH</i>	+	+	+	+	-	-
<i>rfaC</i>	+	+	+	+	+	+		

Tabela 22: Fatores de virulência detectados nas cepas do cc11 anotados no database VFDB. (continuação)

Classes	Fatores de Virulência	Genes relacionados	Cepa de referência cc11 não-ET15	2140	2141	2183	2774	2779
Aderência	Síntese de LOS	<i>rfaF</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>rfaK</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Neisseria</i> adesão A	<i>nadA</i>	+	+	+	+	+	+
	Modificação de Fosfoetanolamina	<i>lptA</i>	+	+	+	+	+	+
	Pili tipo IV	<i>pilC</i>	-	+	-	-	-	-
		<i>pilD</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilE</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilF</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilG</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilH</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilI</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilJ</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilK</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilM</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilN</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilO</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilP</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilQ</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilS</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilT2</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>pilT</i>	+	+	+	+	+	+
<i>pilU</i>		+	+	+	+	+	+	
<i>pilV</i>		+	+	+	+	+	+	
<i>pilW</i>	+	+	+	+	+	+		
<i>pilX</i>	+	+	+	+	+	+		
<i>pilZ</i>	+	+	+	+	+	+		
Captação de ferro	Transportador ABC	<i>fbpA</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>fbpB</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>fbpC</i>	+	+	+	+	+	+
	Proteína A de transporte de enterobactina férrica / Proteína B reprimida por férrico	<i>fetA/frpB</i>	+	+	+	+	+	+
	Captação do heme	<i>hpuA</i>	-	+	+	+	+	+
<i>hpuB</i>		+	+	+	+	+	+	

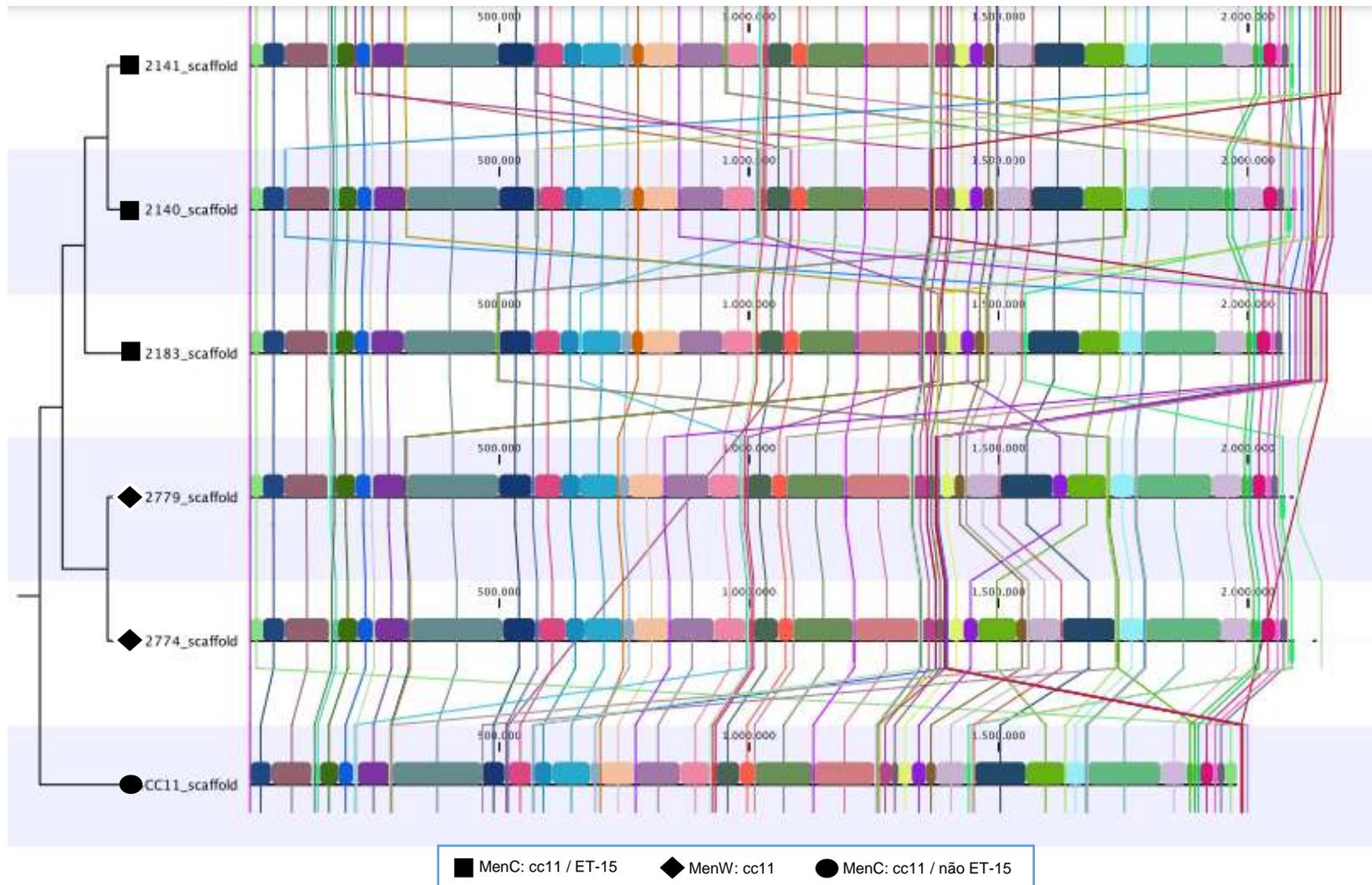
Tabela 22: Fatores de virulência detectados nas cepas do cc11 anotados no database VFDB. (conclusão)

Classes	Fatores de Virulência	Genes relacionados	Cepa de referência cc11 não-ET15	2140	2141	2183	2774	2779
Captação de ferro	Receptor de hemoglobina	<i>hmbR</i>	+	+	+	+	+	+
	Proteína de ligação à lactoferrina	<i>lbpA</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>lbpB</i>	+	+	+	+	+	+
	Sistema ton	<i>exbB</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>exbD</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>tonB</i>	+	+	+	+	+	+
	Proteína de ligação à transferrina	<i>tbpA</i>	+	+	+	+	+	+
<i>tbpB</i>		-	+	+	+	+	+	
Bomba de Efluxo	<i>FarAB</i>	<i>farA</i>	+	+	+	+	+	
		<i>farB</i>	+	+	+	+	+	
	<i>MtrCDE</i>	<i>mtrC</i>	+	+	+	+	+	
		<i>mtrD</i>	+	+	+	+	+	
		<i>mtrE</i>	+	+	+	+	+	
Modulador Imune	Proteína de ligação ao Fator H	<i>fHbp</i>	+	+	+	+	+	
	Proteína A de superfície de <i>Neisseria</i>	<i>nspA</i>	+	+	+	+	+	
Invasão	Proteína de membrana externa de classe 5	<i>opc</i>	-	-	-	-	-	
	Proteína de opacidade	<i>opa</i>	+	+	+	+	+	
	<i>PorA</i>	<i>porA</i>	+	+	+	+	+	
	<i>PorB</i>	<i>porB</i>	+	+	+	+	+	
Protease	IgA protease	<i>iga</i>	+	+	+	+	+	
Adaptação ao estresse	Catalase	<i>katA</i>	+	+	+	+	+	
			+	+	+	+	+	
			+	+	+	+	+	
	Sistema de transporte de manganês	<i>mntA</i>	+	+	+	+	+	
		<i>mntB</i>	+	+	+	+	+	
		<i>mntC</i>	+	+	+	+	+	
	Metionina sulfóxido redutase	<i>msrA/B(pilB)</i>	+	+	+	+	+	
Proteína de reparo recombinacional	<i>recN</i>	+	+	+	+	+		

Fonte: (Do autor, 2021)

Legenda: em azul tudo o que é igual a referência; em amarelo tudo que destoa entre as cepas.

Figura 13: Alinhamento genômico das cepas do cc11 usando o algoritmo *Neighbor joining* no software *CLC genomics*



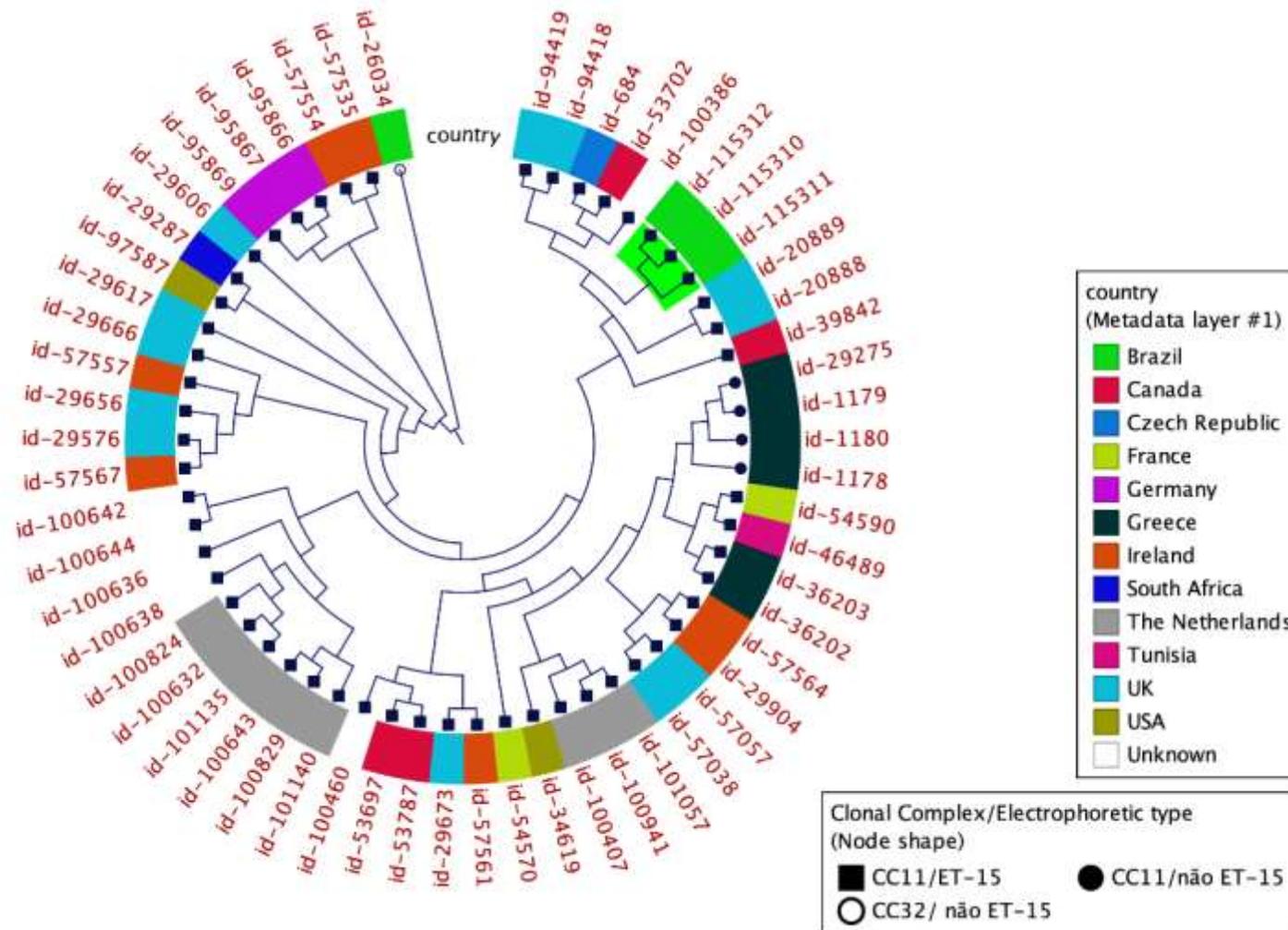
Fonte: (Do autor, 2021)

Através do alinhamento genômico das cepas do cc11, que foi realizado usando o algoritmo *Neighbor joining* no *software CLC genomics* (figura 13), verifica-se que as cinco cepas analisadas foram separadas em dois grupos. O primeiro grupo é formado pelas cepas do sorogrupo W, P2774 e P2779, isoladas do Rio de Janeiro e o segundo grupo é formado pelas cepas ET-15, P2140, P2141 e P2183, isoladas da Bahia, sendo que as cepas P2140 e P2141 são mais próximas e relacionadas entre si do que a cepa P2183.

Ao compararmos essas cepas do cc11 analisadas com a cepa de referência cc11 não ET-15, notamos que as cepas ET-15 (sorogrupo C) isoladas na Bahia e as cepas não ET-15 (sorogrupo W) isoladas no Rio de Janeiro possuem o genoma maior, com fatores de resistência, elementos genéticos móveis e fatores de virulência que não foram observados na cepa de referência cc11 não ET-15.

Foi construída uma árvore filogenômica utilizando 58 genomas de isolados do cc11 / ET-15 recuperados do banco de dados do PubMLST e os três genomas das cepas P2140, P2141 e P2183 (figura 14). A árvore foi construída pelo *software CLC genomic Workbench 22.0* utilizando o algoritmo *Neighbor Joining* (NJ). Nessa árvore que compara cepas do cc11/ET-15 com cepas do cc11 não ET-15 e uma cepa do sorogrupo B do cc32 (não ET-15), é possível notar uma grande similaridade entre as cepas do nosso estudo, isoladas no Brasil, e uma distância maior entre outras cepas ET-15 isoladas em outros países. Apesar dessa distância maior, as cepas do Brasil agruparam em um cluster mais homogêneo que inclui linhagens isoladas no Reino Unido, República Tcheca e Canadá onde o subclone ET-15 foi inicialmente descrito e encontrado no Brasil no mesmo período em que foi reportado naqueles países.

Figura 14: Arvore filogenômica comparando 58 isolados cc11/ET-15, cc11/não ET-15 e cc32/não ET-15, usando o algoritmo *Neighbor joining* no software *CLC genomics*.



Fonte: (Do autor, 2022)

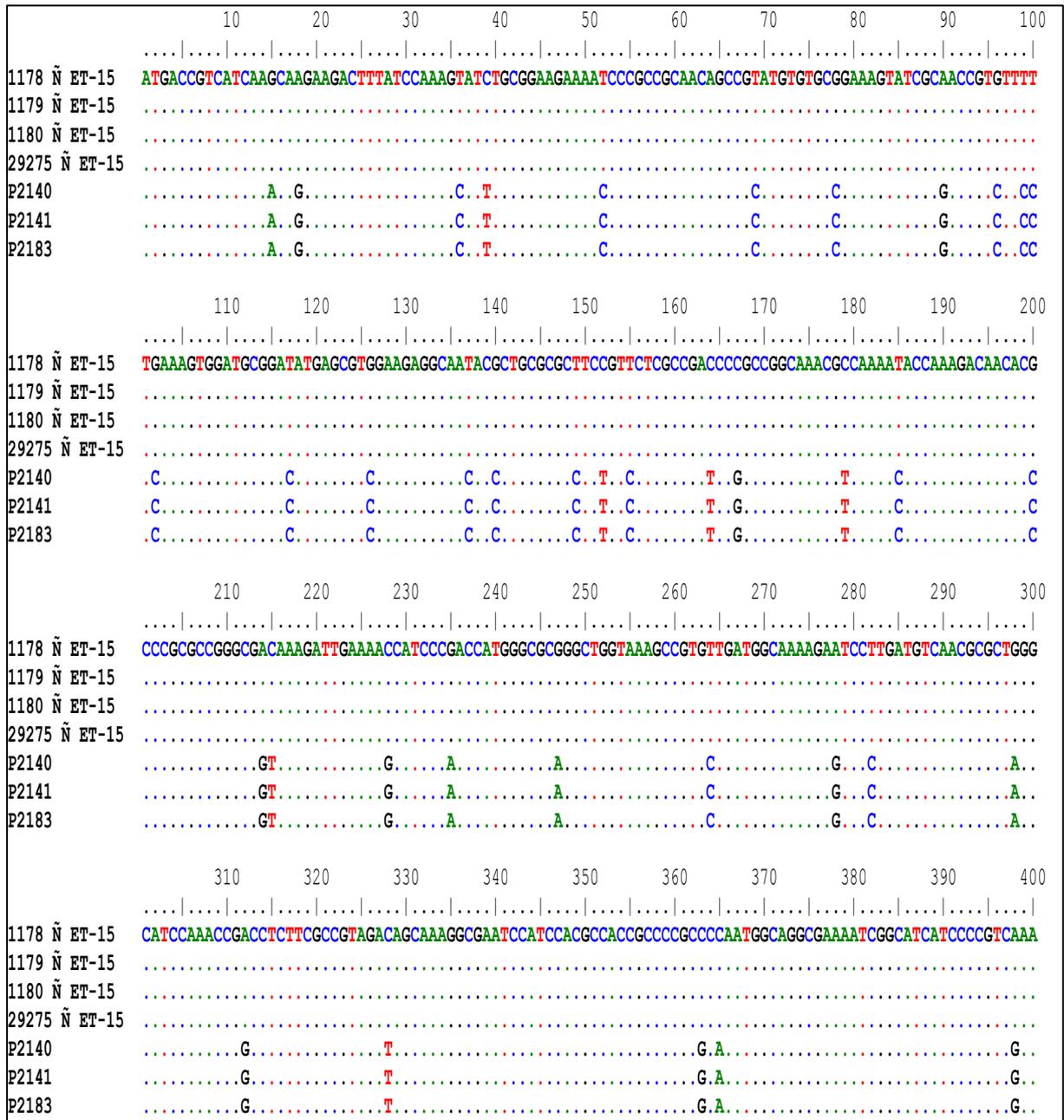
Através da análise genômica, verificamos um grupo de 20 genes que apresentam alelos específicos para as cepas ET-15 e não ET-15. Na tabela 23, estão listados os alelos encontrados nas cepas ET-15 e que não são observados nas cepas não ET-15

Tabela 23: Lista de genes comuns entre cepas ET-15 e não ET-15 apresentando alelos específicos.

Locus	Produto	Alelos	
		Cepas não ET-15	Cepas ET-15
NEIS0018	<i>putative inner membrane protein</i>	182	1
NEIS0261	<i>putative periplasmic protein</i>	193	1
NEIS0398		34	1,3
NEIS0621 (lpxK)	<i>tetraacyldisaccharide 4'-kinase (EC 2.7.1.130)</i>	200	1,65,296
NEIS0761	<i>TetR family transcriptional regulator</i>	186	1,4,44,185
NEIS0762,	<i>UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase</i>	237	1,68,236
NEIS0985	<i>putative oxidoreductase</i>	405	1
NEIS1205	<i>putative periplasmic protein</i>	220	1,43,297
NEIS1371	<i>hypothetical protein</i>	7	1,97
NEIS1372	<i>hypothetical protein</i>	66	1,76,183,486
NEIS1373	<i>iron-sulphur protein</i>	59	1,89
NEIS1397	<i>hypothetical protein</i>	55	1,201
NEIS1513	<i>AraC family transcription regulator</i>	111	1,38
NEIS1530	<i>O-succinylhomoserine sulfhydrylase</i>	245	1
NEIS1531	<i>hypothetical protein</i>	7	1
NEIS1532	<i>hypothetical protein</i>	6	1
NEIS1533	<i>histidine-binding periplasmic protein</i>	66	1
NEIS1534 (fumA)	<i>fumarate hydratase class I (EC 4.2.1.2)</i>	44	1
NEIS1972	<i>phosphoribosylformylglycinamide synthase</i>	462	1,536,2720
NEIS1973	<i>hydroxyacylglutathione hydrolase</i>	6	1,271,856

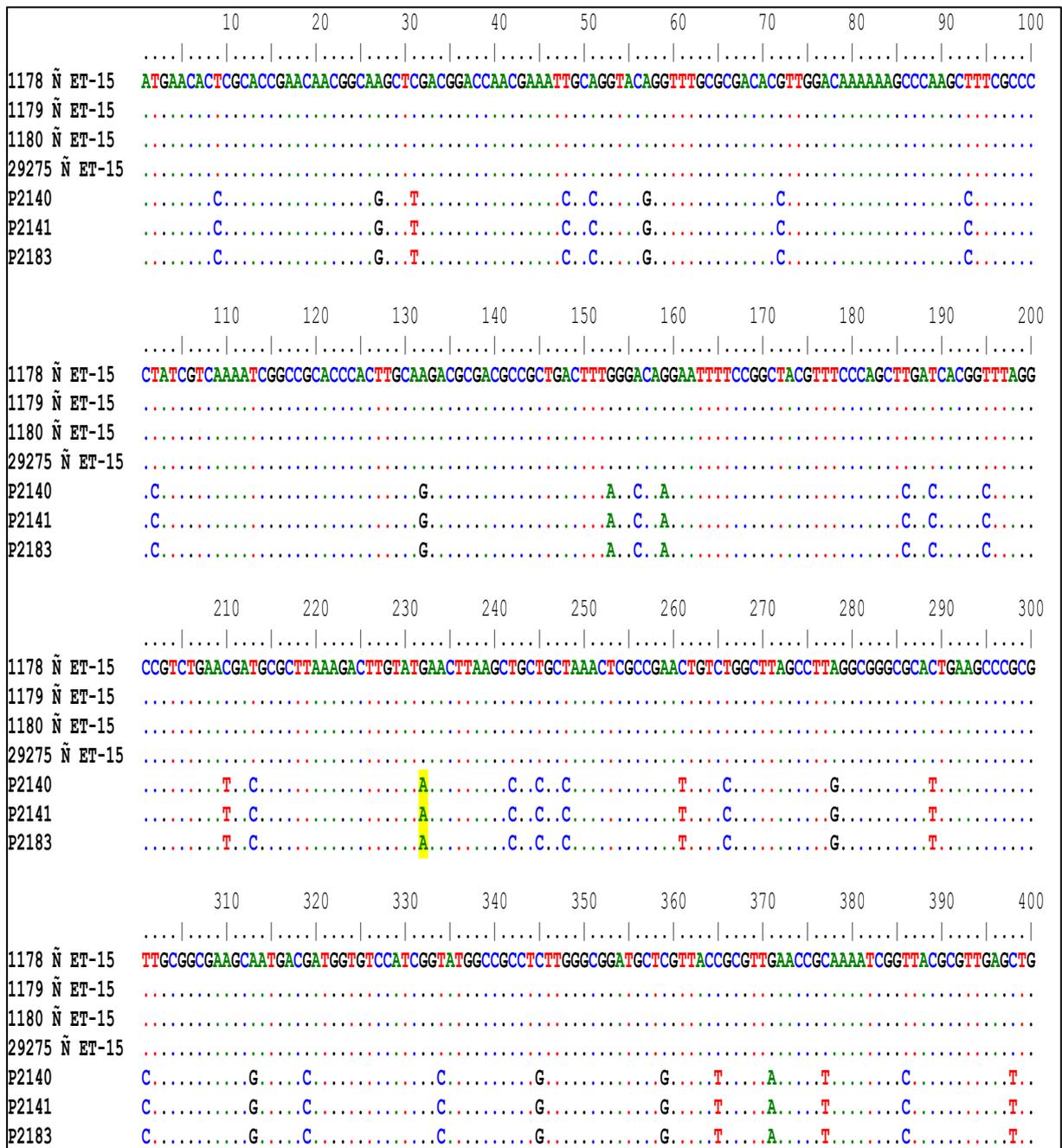
Fonte: (Do autor, 2022)

Foram realizados os alinhamentos dos genes *fumA* e *fumC* para observarmos possíveis diferenças entre as cepas ET-15 (P2140, P2141 e P2183) e não ET-15. Nas figuras 15 e 16 esses alinhamentos foram editados, com cortes nos fragmentos do gene que eram idênticos entre essas cepas, destacando apenas as regiões onde encontramos SNPs. Com isso, constatamos que as cepas ET-15 possuem vários SNPs ao longo da sequência que as diferem das cepas não ET-15, tanto no gene *fumA* (figura 15) quanto no gene *fumC* (figura 16).

Figura 15: Alinhamento do gene *fumA*:

Fonte: (Do autor, 2022)

Nota: o alinhamento foi reduzido para mostrar todas as ilhas de SNPs encontradas nesse gene.

Figura 16: Alinhamento do gene *fumC*:

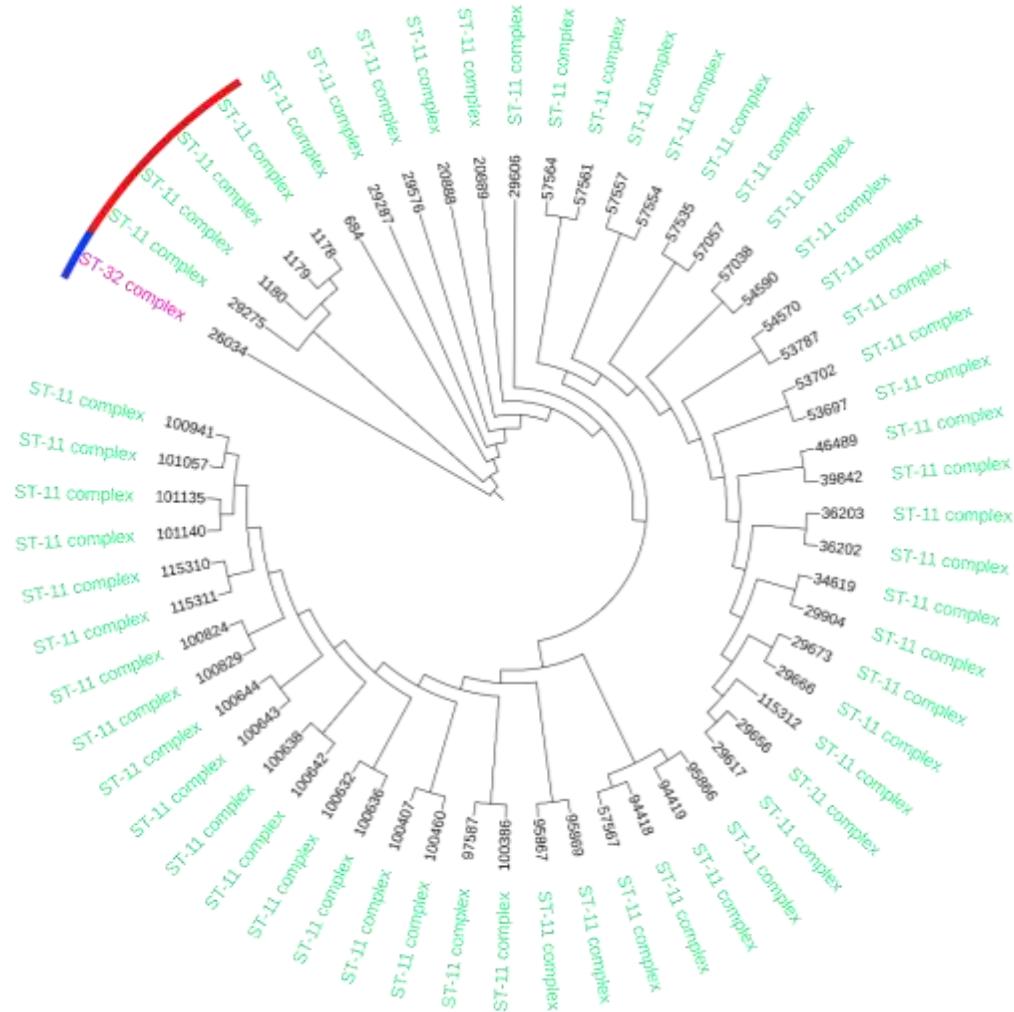
Fonte: (Do autor, 2022)

Nota: o alinhamento foi reduzido para mostrar todas as ilhas de SNPs encontradas nesse gene.

Legenda: Marcado em amarelo o SNP que caracteriza o ET-15, na posição 667 do gene completo.

Após esses alinhamentos, duas árvores filogenéticas foram construídas, uma do gene *fumA* (figura 17) e outra do gene *fumC* (figura 18) a fim de verificarmos a relação de similaridade entre as cepas ET-15, não ET-15 e uma cepa do cc32 (“outgroup”) e percebemos que através da análise desses genes, é possível separar claramente as cepas ET-15 das cepas não ET-15 e da cepa do cc32.

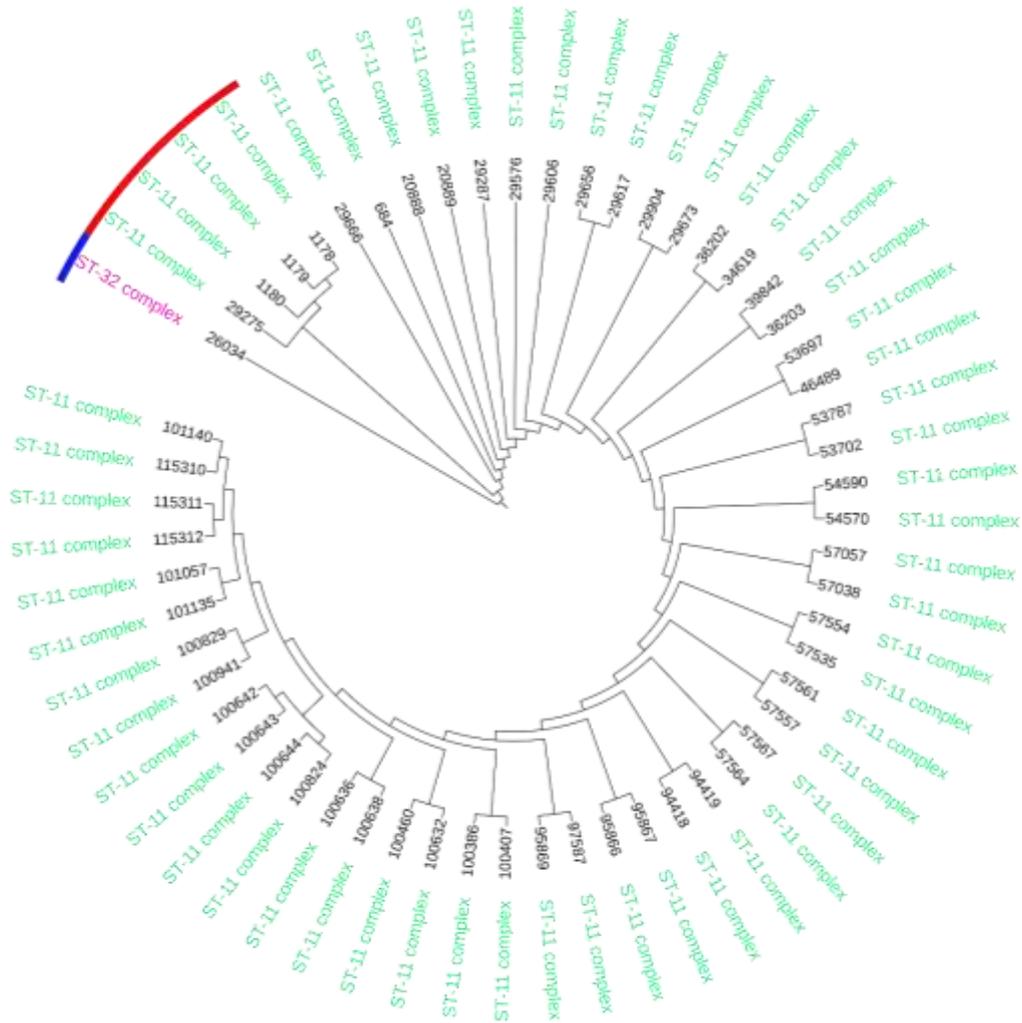
Figura 17: Arvore filogenética do *fumA*, usando o algoritmo *Neighbor joining* no software *CLC genomics*.



Fonte: (Do autor, 2022)

Legenda: Em azul a cepa B cc32, em vermelho as cepas não ET-15, todas as outras cepas são ET-15.

Figura 18: Arvore filogenética do *fumC*, usando o algoritmo *Neighbor joining* no software *CLC genomics*.



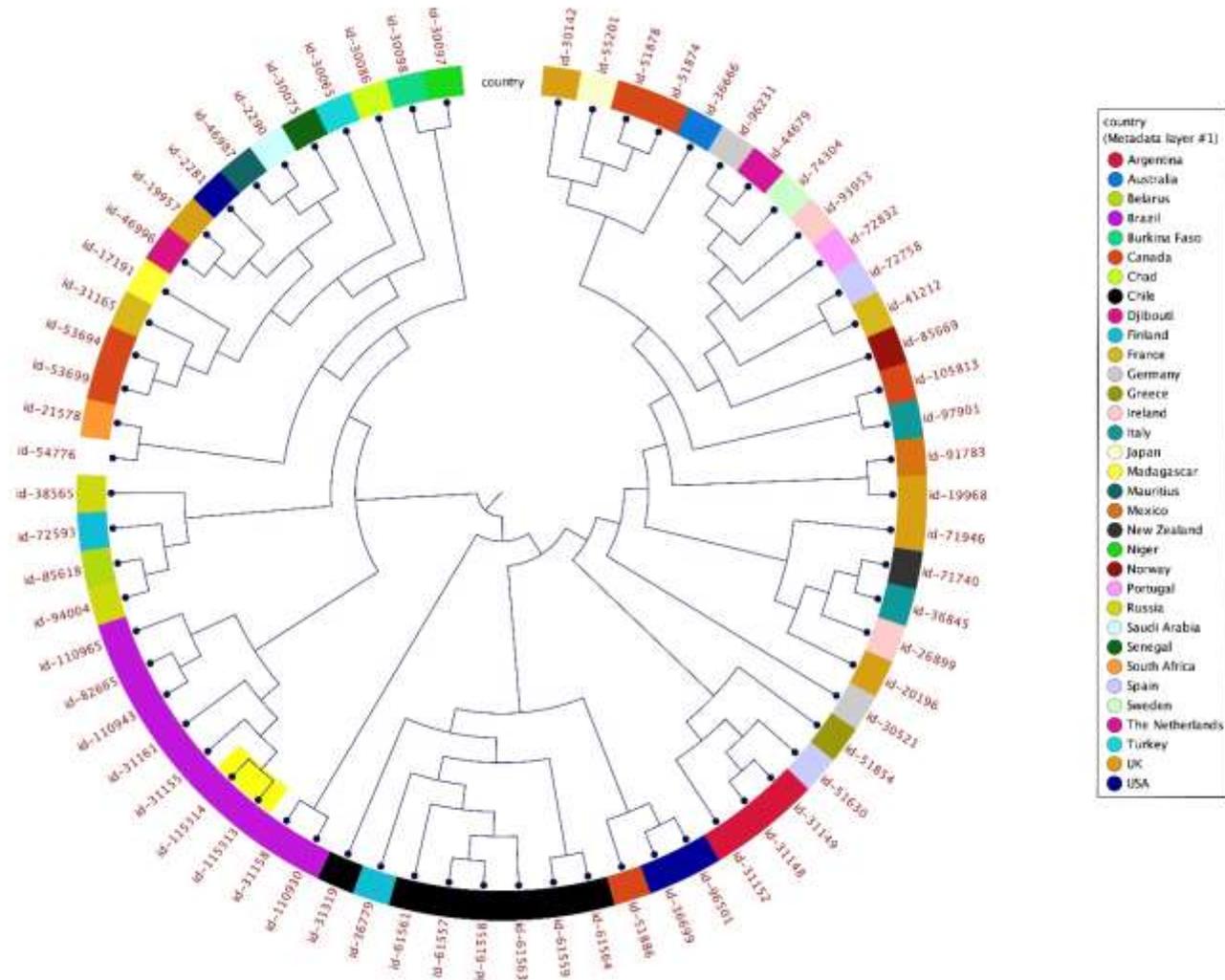
Fonte: (Do autor, 2022)

Legenda: Em azul a cepa B cc32, em vermelho as cepas não ET-15, todas as outras cepas são ET-15

Uma outra árvore filogenômica foi construída utilizando 66 genomas de cepas do sorogrupo W recuperados do banco de dados PubMLST e os 2 genomas das cepas P2774 e P2779 (figura 17). A árvore foi construída pelo *software CLC genomic Workbench 22.0* utilizando o algoritmo *Neighbor Joining* (NJ).

Foram analisados os genomas de cepas isoladas em países onde foram detectadas linhagens associadas à epidemia ocorrida após a peregrinação anual do Hajj à Meca, na Arábia Saudita em 2000 (TAHA *et al*, 2000), que foi atribuída a uma linhagem específica, MenW:cc11, referida como a linhagem Hajj. Nessa análise comparamos cepas do sorogrupo W isoladas em diversos países com os dois isolados do Brasil no mesmo período para verificar uma possível associação desse clone às cepas brasileiras.

Figura 19: Arvore filogenômica comparando cepas do sorogrupo W usando o algoritmo *Neighbor joining* no software *CLC genomics*.



Fonte: (do autor, 2022)

Legenda: Os dois isolados W desse estudo estão destacados em amarelo.

## 6 DISCUSSÃO

A doença meningocócica (DM) é uma doença invasiva, aguda, grave, de rápida evolução e pode atingir todas as faixas etárias. Pode causar dano cerebral grave e é fatal em quase 50% dos casos quando não tratada. A antibioticoterapia, quando iniciada rapidamente, melhora significativamente o prognóstico do paciente. No entanto, o diagnóstico tardio da DM dificulta esta estratégia. Além disso, mesmo quando a DM é diagnosticada precocemente e o tratamento adequado é iniciado, cerca de 5 a 10% dos pacientes vão à óbito nas primeiras 24 a 48 horas do início dos sintomas (WHO, 2021). A vacinação, a partir da administração de vacinas sorogrupo específicas, é considerada a forma mais eficaz para a prevenção e controle da DM (BRASIL, 2019b; WHO, 2021). Todavia, para a determinação da vacina mais adequada a ser utilizada, faz-se necessário o monitoramento epidemiológico das cepas circulantes.

O MLST é atualmente a metodologia mais utilizada para a tipificação molecular das cepas de *N. meningitidis* e o monitoramento da disseminação de linhagens hipervirulentas em diversos países durante os últimos anos (DE FILIPPIS & VICENTE, 2005; LAW *et al.*, 2015; KRONE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018; TZENG; STEPHENS, 2021). No entanto, conforme já citado em literatura internacional, o MLST é um método laborioso e com alto custo, tanto em relação ao sequenciador de DNA quanto aos reagentes, o que restringe sua utilização aos centros de referência e alguns laboratórios de pesquisa. Tudo isso impossibilita a sua implementação em laboratórios públicos para o monitoramento dos clones circulantes de Nm (JOLLEY; MAIDEN, 2013; WHILEY *et al.*, 2013).

A fim de contornar essa limitação, o desenvolvimento de uma estratégia para o controle epidemiológico de cepas de Nm através da utilização do método de análise por qPCR-HRM seria uma alternativa. Esta metodologia apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo um método simples, rápido e de baixo custo que serviria como método de triagem para identificar os principais complexos clonais (cc) de Nm circulantes, com uma taxa de confiabilidade que pode variar de 86% a 100%.

Os cc estão distribuídos entre os sorogrupos de uma maneira relativamente uniforme, ou seja, cada sorogrupo apresenta cc específicos com maior frequência. No Brasil, segundo informações do DATASUS, os sorogrupos B e C, cujos cc mais frequentes são cc32 e cc41/44 (sorogrupo B) e cc103 e cc11 (sorogrupo C), são

responsáveis por cerca de 90% dos casos de DM. De acordo com o banco de dados do MLST, o cc103 foi caracterizado em 4,1% dos isolados do sorogrupo C no mundo, porém foi o mais frequente entre as cepas do sorogrupo C incluídas nesse estudo e representa 31,9% dos casos registrados do Brasil. Já o cc32 foi caracterizado em 15,3% dos isolados do sorogrupo B no mundo e em 53,2% dos isolados do Brasil que foram incluídos no PubMLST. Esses resultados reiteram a importância epidemiológica desses cc dentro do cenário da DM e das cepas hipervirulentas que circulam no Brasil.

Apesar de não haver na literatura referências sobre uso do HRM para tipificação molecular de *Neisseria meningitidis*, Whiley e colaboradores (2013) utilizaram o HRM para tipificar cepas de *Nesseria gonorrhoeae* com a finalidade de contornar os custos e a demora do sequenciamento pelo MLST. O estudo selecionou 14 SNPs entre os 7 genes do MLST de 86 isolados e foram realizados ensaios de qPCR seguidos de análise por HRM. Concluiu-se que a abordagem do perfil de SNPs seria uma alternativa simples e efetiva, e poderia ser utilizada como complemento para esquemas de tipificação de gonococos (WHILEY *et al.*, 2013).

Em 2020, um estudo realizado por Miaomiao e colaboradores (2020) estabeleceu um método de genotipagem de *Salmonella* pelo valor da TM através da análise de HRM, que apresentou diferentes curvas de fusão para *Salmonella* de forma rápida e sensível. As taxas de detecção das amostras utilizadas foram superiores a 90%, destacando a estabilidade e confiabilidade dos resultados obtidos. O método proposto, que foi a análise por HRM, demonstrou ter potencial para aplicação em segurança alimentar e pesquisa sobre a infecção por *Salmonella* (MIAOMIAO, *et al.*, 2020).

Tamburro e Ripabelli descreveram, em 2017, por meio de uma revisão abrangente da literatura, o uso, a aplicação e a utilidade do HRM para a genotipagem de patógenos bacterianos no contexto da vigilância epidemiológica e saúde pública. Métodos de tipificação molecular rápidos, confiáveis e precisos são essenciais para a detecção de surtos e controle de doenças infecciosas, para o monitoramento da evolução e dinâmica das populações microbianas e para uma vigilância epidemiológica eficaz. A introdução de um novo método baseado na análise da temperatura de fusão de produtos amplificados, conhecido como *High Resolution Melting* (HRM) desde 2002, tem encontrado aplicações em estudos epidemiológicos, seja para identificação de espécies bacterianas ou tipificação molecular, bem como o

uso crescente e extenso em muitas áreas de pesquisa (TAMBURRO; RIPABELLI, 2017).

Neste estudo, nós descrevemos e avaliamos a metodologia de qPCR seguida da análise das temperaturas das curvas de melting (TM) geradas por HRM, ainda não descrita na literatura para a tipificação de complexos clonais de *Nm*. Foram utilizados termocicladores distintos e ambos forneceram resultados equivalentes, com alta sensibilidade e especificidade.

Radvanszky e colaboradores (2015) compararam o desempenho de 12 corantes fluorescentes, com propriedades básicas consideradas relevantes para sua possível aplicação em análises de HRM. Essas propriedades incluíram inibição da PCR, intensidade de fluorescência, a capacidade de gerar curvas de *melting* e seu efeito na temperatura de fusão (TM). Sete desses corantes com propriedades promissoras foram então avaliados para possível uso em HRM, como genotipagem de pequenos amplicons, genotipagem de um polimorfismo de inserção/deleção de 1 kb, genotipagem baseada em sonda e triagem de mutações. Cinco corantes não exibiram propriedades promissoras durante a primeira parte do estudo e foram excluídos de outros testes. Dos corantes restantes, SYTO11, SYTO13 e SYTO16 mostraram algumas propriedades inibitórias de PCR e TM em comparação com os corantes comerciais HRM *LCGreen Plus*, *EvaGreen* e *ResoLight*. Os resultados encontrados sugerem que os corantes de melhor desempenho para HRM são aqueles oferecidos comercialmente para análises de HRM. No entanto, o desempenho do SYTO13 e SYTO16 foi comparável aos corantes comerciais testados na maioria dos ensaios realizados, demonstrando assim que eles também são bastante adequados para aplicações em qPCR e HRM (RADVANSZKY, *et al.*, 2015).

Com o objetivo de determinar uma estratégia para a detecção dos cc de *Nm* por HRM, inicialmente também foram testados, em nosso estudo, três corantes (fluoróforos) distintos, oferecidos comercialmente para análises de HRM, para identificar qual seria o mais apropriado e que forneceria resultados mais estáveis. Verificou-se que, dentre os fluoróforos utilizados, todos apresentaram bons resultados e estes foram similares ou equivalentes entre si. No entanto, com pequenas variações para cada fluoróforo. Apesar dos resultados encontrados, o fluoróforo SYTO9 foi o escolhido por ser o indicado pelo fabricante do equipamento utilizado. De certa forma, nossos resultados assemelham-se aos resultados encontrados por Radvanszky e colaboradores (2015), apesar de termos testado apenas três corantes comerciais.

Harrison e Hanson (2017), desenvolveram uma metodologia de triagem de baixo custo e usando análise de alta resolução (HRM) para diferenciar amostras de *Escherichia coli* ST-131 de *Escherichia coli* não ST-131, sem análise das sequências. Isolados de *E. coli* pertencentes ao cc ST-131 são associados à distribuição global da resistência aos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas. A qPCR foi realizada usando os iniciadores de tipificação do MLST. Os tamanhos do amplicons variaram de 630 pb a 737 pb. Os picos de temperatura de fusão (TM) foram determinados realizando análise de HRM, com resolução de 0,1°C de 50°C a 95°C em um sistema *Rotor-Gene Q 5-plex HRM*, mas que pode ser realizado em qualquer laboratório com um instrumento e software de análise compatível com HRM. Essa metodologia foi capaz de distinguir *E. coli* ST-131 de *E. coli* não ST-131 sem o sequenciamento do DNA, sendo uma alternativa rápida e econômica para a identificação de *E. coli* ST-131 (HARRISON; HANSON, 2017). Esse estudo mostrou a utilidade do HRM para a detecção rápida e de baixo custo de clones epidêmicos ou virulentos. Ao tentarmos reproduzir esse experimento, não obtivemos bons resultados. Diferente do que foi observado por Harrison e Hanson (2017), com as cepas de *E. coli*, os resultados das reações com as cepas de Nm foram inespecíficos e apresentaram vários picos de TM para o mesmo alelo. É sabido que as reações da PCR em tempo real (qPCR) seja Taqman ou HRM, funcionam melhor com amplicons de no máximo 200 pb a 250 pb e talvez essa seja a justificativa para não termos obtido êxito ao tentarmos reproduzir esse experimento com as cepas do nosso estudo. Com base nesses achados e de acordo com os estudos de Słomka e colaboradores (2017), os iniciadores utilizados em nosso estudo foram desenhados para que amplificassem fragmentos entre 130 pb a 250 pb, dentro da faixa recomendada para reações de qPCR.

Apesar dos genes sequenciados pelo MLST serem constitutivos e conhecidos como “*housekeeping genes*” e, portanto, apresentarem uma baixa taxa de mutação, cada gene dentro do banco de dados possui de 424 a 675 alelos e uma taxa de 54% a 94% de sítios polimórficos específicos (JOLLEY; MAIDEN, 2013). A ocorrência dessas mutações em determinadas regiões do gene constitui a chamada “assinatura genética”, que determina um alelo específico, permitindo sua detecção por HRM.

Os iniciadores desenhados para esse estudo (tabela 1) apresentaram boa especificidade na detecção dos alelos de cada cc (tabela 17), visto que, das 69 cepas da coleção, com o cc definido por MLST, conseguimos identificar o complexo clonal por HRM em 88% delas. Ao analisarmos cada cc separadamente, o HRM foi capaz

de identificar o cc de 86% das cepas do cc103 e do cc32 e o cc de 100% cepas do cc11 e do cc41/44. Esses resultados são bastante promissores, especialmente, quando levamos em conta o custo-benefício dessa metodologia (qPCR-HRM) quando comparada com o MLST.

As tabelas 13 e 14, contendo a probabilidade de determinação do cc103, com um ou dois alelos mais frequentes no Brasil, mostram que o cc103 é um caso especial por ter um clone específico que circula somente no Brasil e que ainda existem poucas cepas desse clone depositadas no PubMLST. Portanto, ao compararmos o perfil alélico considerando os dois alelos (*abcZ-276* e/ou *aroE-9*) que circulam no nosso país, com as cepas do mundo inteiro, verificamos uma baixa porcentagem de cepas com esse perfil, visto que esses alelos não são frequentemente encontrados nos isolados do mundo. Além disso, notamos que o alelo *gdh-5* é um alelo muito frequente entre as cepas do cc103 e está presente em 84% das cepas depositadas no banco de dados do PubMLST. De modo que, ao excluirmos a possibilidade de detecção deste alelo ou mesmo do alelo *fumC-17*, que está presente em 88% das cepas do cc103 depositadas no PubMLST, a probabilidade de detecção do cc103 reduz consideravelmente. Em contrapartida, ao detectarmos os alelos *abcZ-276* e/ou *aroE-9*, já é um grande indicativo da cepa pertencer ao cc103, visto que, esses dois alelos são marcadores importantes do cc103 no Brasil, principalmente o alelo *abcZ-276*. De acordo com o que já foi publicado por Azevedo e colaboradores (2020), as cepas com o alelo *abcZ-276* fazem parte de um clone específico atribuído apenas a cepas brasileiras. Segundo o banco de dados do PubMLST, de todos os 77 isolados do cc103 que possuem o alelo *abcZ-276*, 76 isolados (98,7%) são de cepas brasileiras. A única exceção é de uma cepa isolada nos EUA (M23083 - id:45109), que tem grande probabilidade de ser uma cepa importada do Brasil.

Atualmente, o HRM vem sendo bastante utilizado para detectar variações genéticas em sequências de ácidos nucleicos em muitos ramos da ciência, medicina e indústria (NIKODEM; CŁAPA; NAROŻNA, 2021a). O HRM encontrou aplicações em diagnósticos, pesquisas laboratoriais e clínicas, pois permite uma análise detalhada dos perfis genéticos, além de possuir alta sensibilidade similar à qPCR Taqman (NIKODEM; CŁAPA; NAROŻNA, 2021b). Graças às suas vantagens, como rapidez, baixo custo, flexibilidade e simplicidade, tem encontrado muitas aplicações, e seu espectro ainda está em expansão. (KLAFKE *et al.*, 2019; NIKODEM; CŁAPA;

NAROŽNA, 2021a; NIKODEM; CŁAPA; NAROŽNA, 2021b; SŁOMKA *et al.*, 2017; TAHMASEBI; DEHBASHI; ARABESTANI, 2020).

De acordo com o estudo de Klafke e colaboradores (2019), a principal vantagem do HRM em comparação com outras metodologias como, por exemplo a qPCR através do sistema *Taqman*, é a sua capacidade de rastrear diferentes variantes em um determinado gene, que seriam indetectáveis usando *primers* e sondas específicas de alelos, pois praticamente qualquer nucleotídeo diferente pode ser detectado em uma sequência usando o HRM, através da análise da TM desses fragmentos. Esse recurso é particularmente interessante para definir amostras a serem analisadas por sequenciamento em estudos para descoberta de SNP (KLAFKE *et al.*, 2019).

Os resultados encontrados em nosso estudo, através da análise das temperaturas das curvas de melting (TM) geradas por HRM, são promissores. Sugerem que o HRM pode ser utilizado como um método de triagem com uma detecção rápida e segura dos principais cc circulantes de Nm e, ainda, com um custo menor do que o MLST. Além disso, em casos de não detecção do cc por HRM, as cepas poderão ainda ser submetidas ao MLST, através do sequenciamento dos 7 genes ou serem simplesmente identificadas, pelo HRM, com grande probabilidade de não pertencerem aos principais complexos clonais circulantes em nosso país (cc11, cc32, cc41/44 e cc103), o que poderia servir de alerta para as autoridades de saúde para a possibilidade de um novo cc circulante, distinto dos que têm sido frequentemente encontrados em nosso meio até os dias de hoje.

Uma hipótese importante seria um surto de meningite meningocócica por um novo clone epidêmico que poderia ser rapidamente detectado com a qPCR-HRM. A persistência de resultados com uma TM diferente das encontradas poderia indicar a emergência de um novo clone, que sendo confirmado por sequenciamento, passaria, posteriormente, a ser também monitorado pela qPCR-HRM.

Concluimos que o HRM é realmente capaz de distinguir os complexos clonais cc103, cc11, cc32 e cc41/44 de meningococos, com a vantagem de ser um método simples, rápido e de baixo custo. Portanto, a metodologia aqui proposta, uma vez implementada, principalmente nos LACENS, onde já existe o equipamento para a realização de qPCR, sendo necessário apenas o software para a análise de HRM, (caso este não esteja disponível no termociclador), poderia trazer algumas vantagens significativas. Além de reduzir o número de amostras a serem sequenciadas, reduziria

também o custo e, principalmente, o tempo necessário para a identificação de um cc conhecido ou de novos cc, contribuindo assim para o monitoramento epidemiológico mais efetivo da DM. Com isso, as autoridades de saúde poderiam ser informadas mais rapidamente sobre os cc hipervirulentos circulantes em nosso país e, com isso, auxiliar no controle de casos e possíveis surtos de DM através do direcionamento das ações de vigilância em saúde a serem tomadas.

O HRM também foi utilizado, em nosso estudo, para identificar cepas do subclone ET-15 do cc11. Entre as cepas analisadas, foram identificadas inicialmente cinco cepas que já haviam sido caracterizadas previamente como pertencentes a esse subclone, sendo três cepas que haviam sido isoladas no estado da Bahia e duas cepas do Rio de Janeiro. Essas cinco cepas e mais 14, todas do cc11, foram submetidas a análise por HRM com a utilização de iniciadores específicos para a região onde é encontrada a mutação que caracteriza a variante ET-15. Destas 19 cepas, 17 foram identificadas como ET-15 por HRM. Para confirmar esse achado, foi realizado o sequenciamento *Sanger* de 14 amostras. Os resultados obtidos nos mostraram, mais uma vez, que o HRM foi sensível e específico o suficiente para identificar o SNP que caracteriza a variante ET-15 entre as amostras testadas, com um percentual de acerto de 85,7%.

Após o sequenciamento genômico das cinco cepas inicialmente identificadas como ET-15 na coleção de bactérias do INCQS, verificamos que duas delas não possuíam a mutação que caracteriza esse subclone. Desse modo, o HRM falhou ao detectá-las como cepas ET-15. Com isso, o percentual de acerto do HRM caiu de 85,7% para 75%, considerando o resultado do WGS das cepas P2774 e P2779.

Em outras duas amostras, o resultado do HRM não coincidiu com o achado após a análise das sequências, o que pode ser justificado pela presença de várias outras mutações pontuais no fragmento analisado, que modificaram o valor da TM e, com isso, resultaram em um falso positivo para a cepa ET-15. O HRM foi sensível na identificação das duas amostras, usadas como controles negativos, que não tinham a mutação característica das cepas ET-15 no fragmento analisado.

Mesmo com quatro resultados divergentes (falso positivos para ET-15), o HRM mostrou-se útil ao identificar corretamente 75% das cepas analisadas, principalmente quando levamos em conta o custo e o tempo gasto para a realização do sequenciamento *Sanger*. No entanto, mais testes, com mais cepas, seriam

necessários para validar a utilização dessa metodologia para a caracterização de cepas da variante ET-15.

A análise do genoma total de cinco cepas do cc11 foi realizada, pois os avanços fornecidos pelos estudos com WGS permitem uma melhor compreensão da biologia de *N. meningitidis* e da epidemiologia da DM (CAUGANT; BRYNILDSRUD, 2020). Como a variante ET-15 do cc11 foi associada a surtos com altas taxas de letalidade tanto em países da Europa, quanto no Canadá e no Brasil, mais especificamente no estado da Bahia, considerou-se importante a análise desses genomas para tentar entender o que tornou essa variante tão virulenta e o que a difere das demais cepas do cc11 não ET-15.

Inicialmente, observamos que as cinco amostras analisadas possuem genoma com aproximadamente 2,1 milhões de bases e conteúdo GC de 51,7% a 51,9%, conforme já descrito na literatura (CAUGANT; BRYNILDSRUD, 2020; TSANG *et al.*, 2019).

O gene *fumC* das cinco cepas testadas foi alinhado para a confirmação da mutação no alelo *fumC*-3 (G667A), que caracteriza esse subclone do cc11 como ET-15. No entanto, essa mutação não foi verificada nas cepas do sorogrupo W, P2774 e P2779, e com isso, constatamos que essas cepas foram depositadas na coleção erroneamente como pertencentes a esse subclone. A mutação no alelo *fumC*-3 (G667A) só foi encontrada nas cepas P2140, P2141 e P2183.

Foram encontrados dois fatores de resistência nos genomas das cepas do cc11 analisadas. Esses fatores estão relacionados aos genes 23S rRNA, que conferem resistência à antibióticos macrolídeos, através da alteração do alvo do antibiótico e ao gene *farB*, que confere resistência aos ácidos graxos antibacterianos, por meio de efluxo do antibiótico. No entanto, esses fatores de resistência não trazem grandes vantagens, uma vez que esses não são antibióticos de escolha para o tratamento da DM. Entre os antibióticos recomendados para tratar essa infecção estão a penicilina, ampicilina, cloranfenicol e ceftriaxona (BRASIL, 2019b; WHO, 2021).

Através do alinhamento genômico das cepas do cc11 (figura 13), que foi realizado com os genomas das linhagens ET-15, das cepas do sorogrupo W e da cepa de referência cc11 não ET-15, percebe-se que as cepas ET-15 isoladas da Bahia e as cepas não ET-15 isoladas do Rio de Janeiro possuem o genoma maior do que a cepa de referência cc11 não ET-15. Essa diferença pode ser atribuída aos fatores de

resistência, elementos genéticos móveis e fatores de virulência que não são encontrados na cepa de referência cc11 não ET-15.

A árvore filogenômica da figura 14 mostra a relação entre cepas ET-15 isoladas no Brasil e em outros países e um pequeno grupo de cepas do cc11 não ET-15 todas isoladas na Grécia. A posição das cepas ET-15 com diferentes origens geográficas sugere que esses isolados, apesar de seu alto potencial epidêmico, não mostram uma relação genética muito próxima, pois linhagens de uma mesma localidade aparecem esparsas em vários pontos da árvore, como por exemplo as cepas isoladas na República Tcheca, UK, Canadá e Irlanda. As cepas ET-15 do Brasil agruparam em único cluster possivelmente por serem apenas três, isoladas em períodos próximos. As cepas não ET-15, todas isoladas em 1977 na Grécia, também agruparam em um único cluster.

A análise genômica desses isolados revelou um grupo de 20 genes que apresentam alelos específicos para as cepas ET-15 e não ET-15 (tabela 23). É interessante notar que nenhum dos alelos desses genes encontrados nas cepas não ET-15, é encontrado nas cepas ET-15, algumas delas com mais de um alelo, mas que nunca é o mesmo alelo da cepa não ET-15. Todos esses genes são constitutivos e não há como inferir, sem experimentação, qualquer associação de sua variabilidade genética com um possível aumento da virulência nas cepas ET-15. Mesmo de forma indireta, por atuação do produto desses genes em processos metabólicos que levem a sínteses de outras moléculas que possam caracterizar uma maior virulência entre essas cepas. No entanto o estudo do genoma dessas linhagens revelou apenas essas diferenças entre elas.

Continuando na análise dos genes das cepas ET-15, na árvore mostrada na figura 14, é importante notar a similaridade genética quando comparamos as cepas isoladas no Brasil (BR), Canadá (CA), Reino Unido (UK) e República Tcheca (CZ), formando um cluster separado de outras cepas ET-15 isoladas em outros países. O subclone ET-15 foi inicialmente descrito no CA no início dos anos 1990 (ASHTON *et al.*, 1991) e depois em surtos em outros países como EUA, Israel, CZ, Islândia, Finlândia, Noruega, UK, Alemanha e Austrália (JELFS *et al.*, 2000). Essa maior similaridade com os isolados de CA, UK e CZ, pode ser devido ao grupo de genes descritos na tabela 23, onde esses países apresentaram menor variabilidade quando comparados a outros. Duas proteínas identificadas como “hypothetical protein” (NEIS1372) e “Iron-sulfur protein” (NEIS1373), no entanto, apresentaram alelos 76 e

89 apenas para as cepas BR, enquanto cepas CZ apresentaram apenas o alelo 1, as UK alelos 1 e 486 e CA apenas alelo 1. Essa diferença fez com que as cepas BR agrupassem em um cluster com alta similaridade entre si.

Em relação aos genes *fumA* e gene *fumC*, após os alinhamentos que foram realizados (figuras 15 e 16) observamos a presença de vários SNPs nas cepas ET-15 quando comparadas com as não ET-15. Através da análise das árvores filogenéticas do *fumA* e do *fumC* (figuras 17 e 18), conseguimos separar as cepas ET-15, das cepas não ET-15 e da cepa do cc32, pois essas cepas agruparam em clusters distintos, diferentemente do que foi observado na árvore filogenômica. Provavelmente pelo fato da mutação que caracteriza o subclone ET-15, ser uma mutação pontual e por isso, ao considerarmos o genoma total, essa pequena alteração não seja suficiente para separar essas cepas. No entanto, ao compararmos apenas os genes *fumA* e *fumC*, verificamos que esses genes apresentam sequências distintas entre as cepas ET-15 e não ET-15, sendo capazes de separá-las na análise filogenética. Portanto, o gene *fumA* poderia ser um alvo alternativo para a diferenciação dessas cepas, que apesar da mutação que caracteriza as cepas ET-15 ter sido descrita no gene *fumC*, observamos vários SNPs também no gene *fumA* das cepas ET-15.

O caminho natural para tentar explicar a maior virulência das cepas ET-15, seriam os genes de proteínas de superfície normalmente associados à mecanismos de escape do sistema imune, aderência, captação de ferro, interferência no sistema complemento, entre outras ações que podem aumentar a virulência das cepas. No entanto, os genes *porA*, *porB*, *fetA*, *NHBA*, *fHbp* e *nadA*, por exemplo, alguns deles incluídos nas vacinas proteicas recentemente lançadas como a Bexsero e Trumemba contra o sorogrupo B, apresentaram os mesmos alelos entre cepas do cc11, ET-15 e não ET-15.

Contudo, através da análise do genoma dessas cepas, constatamos que a variante ET-15 do cc11 possui fatores possivelmente associados a uma maior virulência, não identificados nas cepas não ET-15, o que poderia justificar as altas taxas de letalidade atribuídas a esse subclone.

O mesmo vale para as duas cepas do sorogrupo W que foram analisadas. Os meningococos do sorogrupo W (MenW) eram pouco associados a DM até o ano de 1999. A primeira epidemia global causada pelo sorogrupo W foi detectada em 2000, após a peregrinação anual do Hajj à Meca, na Arábia Saudita (TAHA *et al*, 2000) e foi atribuída a uma linhagem específica, MenW:cc11, referida como a linhagem Hajj

(MAYER *et al.*, 2002). A taxa de ataque da cepa MenW:cc1 foi alta entre os peregrinos e seus contatos domésticos, quando eles retornavam aos seus domicílios. O surgimento de MenW a partir da linhagem cc11 hipervirulenta, provavelmente foi relacionado a eventos de troca de cápsula. Subsequentemente, as cepas MenW continuaram a evoluir e a causar doenças em vários países do mundo (LUCIDARME *et al.*, 2015).

Mulhall e colaboradores (2019) realizaram um estudo de caracterização de cepas invasivas de Nm dos sorogrupos C e W associadas ao aumento da incidência de doenças na República da Irlanda. Através da utilização do WGS, análise desses resultados e a comparação dos isolados usando o cgMLST, foram capazes de mostrar que a maior incidência de DM na República da Irlanda, no final da década de 1990, foi causada por cepas distintas do clone MenC:cc11 ET-15. Essas cepas ainda circulam, mas causaram doenças esporádicas nos últimos anos. Ainda segundo esse estudo, o clone agressivo MenW:cc11 é endêmico na República da Irlanda e responsável pelo recente aumento da incidência de MenW na região. Além disso, esse clone já está estabelecido em vários outros países europeus (MULHALL *et al.*, 2019).

A disseminação global de diversas linhagens cc11 expressando grupos capsulares C, B e W, caracterizados por tipagem genômica, dividiu a linhagem invasiva MenW:cc11 nas sublinhagens Hajj e Sul-americana (LUCIDARME *et al.*, 2015). A sublinhagem Sul-americana, com disseminação no Brasil, Argentina e Chile, surgiu em meados dos anos 2000 (ABAD *et al.*, 2014) e foi dividida em linhagem original do Reino Unido de 2009 (LUCIDARME *et al.*, 2015) e a nova linhagem emergente do Reino Unido de 2013 (LUCIDARME *et al.*, 2016). Atualmente, os sorogrupos W, X e Y têm sido associados com mais frequência à DM, conforme refletido no maior número de isolados invasivos depositados no PubMLST desde 2000, assim como nas informações de vigilância globais e dos países mencionados acima (TZENG; STEPHENS, 2021).

Dados da literatura revelam que, na América Latina, na última década, observou-se um aumento na incidência de casos invasivos causados pelo sorogrupo W. O sorogrupo W:cc11 tornou-se predominante no Chile, desde 2011, e está associado a elevada mortalidade (RUBILAR *et al.*, 2018). Presa e colaboradores (2019) realizaram uma revisão sistemática da literatura e, de acordo com essa revisão, o Brasil apresentou a maior taxa de letalidade (20%), seguido pelo Uruguai (15%), Chile (11%), Venezuela (10%) e Argentina (10%). Em 2012, a taxa de letalidade no Chile

aumentou para aproximadamente 27%, sendo o sorogrupo W o mais frequente entre os casos de DM, no período de 2012 a 2018 (PRESA *et al.*, 2019). Além disso, conforme já descrito na literatura, o sorogrupo W tem sido associado com mais frequência à DM nos últimos anos. Esses dados reforçam a constatação de que cepas do sorogrupo W realmente apresentam uma maior virulência, conforme observado em nosso estudo, através da análise do genoma das cepas P2774 e P2779.

Verificamos também que essas, P2774 e P2779, isoladas no Rio de Janeiro, ainda apresentam um número maior de genes associados à virulência do que as cepas ET-15 do sorogrupo C (P2140, P2141 e P2183), que foram isoladas do surto no estado da Bahia.

Na árvore filogenômica, que compara apenas cepas do sorogrupo W (figura 19), verificamos que as cepas isoladas no Brasil (BR) formaram um cluster separado das cepas de outros países. Essas cepas possuem proximidade genética com as cepas isoladas, principalmente de países da Europa como, Rússia, Belarus e Finlândia, e também com o Chile, na América do Sul.

A disseminação global de diversas linhagens MenW:cc11 pode ser observada na figura 18 e está de acordo com o foi já descrito na literatura (LUCIDARME *et al.*, 2015) e possivelmente as cepas isoladas em nosso país, sejam da sublinhagem Sul-americana, que de acordo com Abad e colaboradores (2014), apresentam disseminação na Argentina, Brasil e Chile. No entanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de esclarecermos melhor essa questão.

Países da América do Sul, como Argentina e Chile são uma rota comum de viagens entre brasileiros e podem ser uma fonte importante de cepas do sorogrupo W, já que nos últimos anos tem-se observado, principalmente no Chile, um aumento no número de casos de DM associados ao sorogrupo W, inclusive com o aumento da taxa de letalidade no país.

A análise do genoma de Nm através do WGS é muito útil para a vigilância da DM e traz informações relevantes, além de auxiliar no monitoramento da resistência a antibióticos (TSANG *et al.*, 2019), conforme amplamente descrito na literatura internacional.

Segundo Caugant e Brynildsrud (2020), o sequenciamento genômico junto com metadados clínicos permitem quantificar a contribuição de variantes genéticas para gravidade da DM. Para estudos futuros, a recomendação é para que haja

colaborações que resultem em mais informações, combinando genômica e dados clínicos de pacientes (CAUGANT; BRYNILDSRUD, 2020).

A transformação genética e recombinação, incluindo transferência de genes entre meningococos, gonococos e *Neisseria spp.* (LINZ *et al.*, 2000; RETCHLESS *et al.*, 2018), além da seleção imunológica, podem resultar no surgimento, diversificação e desaparecimento de clones meningocócicos virulentos. A vigilância contínua, incluindo a caracterização molecular, é a chave para reconhecer a evolução da epidemiologia da DM (TZENG; STEPHENS, 2021). Retchless e colaboradores (2018) destacaram a importância da utilização do sequenciamento do genoma completo (WGS) para a vigilância de doenças, a fim de identificar rapidamente e caracterizar patógenos emergentes e rastrear sua evolução (RETCHLESS *et al.*, 2018).

Nosso estudo mostrou a capacidade do qPCR-HRM de detectar clones hipervirulentos específicos com uma simples reação de PCR. O sequenciamento de Sanger e mais recentemente o sequenciamento do genoma total, trouxeram nova luz sobre as relações genéticas e filogenéticas de cepas com diferentes níveis de patogenicidade e capacidade de disseminação. A complexidade e o custo desses métodos, no entanto, ainda podem ser um obstáculo para as ações de Vigilância Epidemiológica. A possibilidade de se utilizar um método rápido e de baixo custo, podendo ser utilizado em laboratórios centrais, capaz de identificar clones específicos ou indicar possíveis mudanças epidemiológicas, é uma grande vantagem, que possibilita uma triagem bastante acurada, para que apenas casos precariamente elucidados sejam analisados pelo sequenciamento.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que:

- Os resultados obtidos variam de acordo com o fluoróforo utilizado, porém, de certa forma, esses resultados são similares;
- A temperatura de 60°C foi a definida como a melhor temperatura de anelamento e extensão para todos os genes testados;
- Os termocicladores *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems* (QS5) e *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems* (QS7), ambos da *Thermo Fisher*, que foram utilizados nesse estudo, forneceram resultados equivalentes, com boa sensibilidade e especificidade;
- O HRM é um método simples, rápido e de baixo custo, quando comparado com o método de MLST, e pode ser utilizado como um método de triagem para auxiliar estudos epidemiológicos;
- Através da análise das temperaturas das curvas de melting (TM) geradas por HRM é possível distinguir os complexos clonais cc103, cc11, cc32 e cc41/44 dos meningococos;
- A identificação do cc de Nm pode ser definida, na maioria dos casos, com apenas 4 alelos, com uma boa porcentagem de concordância com o MLST (acima de 86%);
- Caso não seja possível identificar um cc através de testes com 4 alelos inicialmente, alelos adicionais poderão ser testados a fim de aumentar as chances de identificação do cc por HRM;
- O subclone ET-15 do cc11 também pode ser detectado através da análise por HRM, com a utilização de um iniciador específico para a região da mutação no alelo *fumC-3* que caracteriza essa variante;
- A análise do genoma das cepas ET-15 demonstrou que esse subclone possui fatores de resistência, elementos genéticos móveis e fatores de virulência não encontrados nas cepas do cc11, o que poderia justificar a alta letalidade verificada nos surtos registrados com essas cepas;
- A análise do genoma das cepas do sorogrupo W, revelou que essas cepas estão amplamente disseminadas em todo o mundo e que também possuem

fatores de resistência, elementos genéticos móveis e fatores de virulência não comumente encontrados em outras cepas do cc11, o que corrobora com a ocorrência de surtos com elevada mortalidade, registrados e atribuídos ao sorogrupo W em países da América Latina, nos últimos anos;

- A estratégia genômica aqui proposta poderá possibilitar maior vigilância epidemiológica da DM no país, através do monitoramento da prevalência de clones hipervirulentos de Nm circulantes, além de auxiliar na avaliação da efetividade das medidas de prevenção e controle da DM.

## 8 PERSPECTIVAS

Dado a importância da Nm como principal agente etiológico da DM bacteriana, que é uma doença de prognóstico grave com taxas de letalidade em torno de 20% e possibilidade de sequelas, esse estudo visa contribuir com a identificação rápida dos clones circulantes e assim auxiliar no direcionamento das ações da vigilância epidemiológica e sanitária.

A padronização de um método rápido de caracterização genética com o HRM, que apresenta baixo custo, elevada especificidade e sensibilidade, e a sua implantação em laboratórios de referência em vigilância epidemiológica e hospitais públicos, é fundamental para direcionar as ações de vigilância em saúde para interromper a transmissão de clones epidêmicos na população.

A implementação dessa metodologia em laboratórios de referência poderá contribuir para o monitoramento dos clones hipervirulentos de Nm circulantes em nosso país e na detecção precoce de possíveis surtos. Além de fornecer dados para a avaliação da efetividade das medidas de prevenção e controle da DM.

Através do sequenciamento do genoma completo a biologia de patógenos poderá ser examinada com maior precisão e detalhes. O uso dessa ferramenta em isolados de Nm auxiliará na determinação de surtos, linhagens hiperinvasivas, epidemiologia molecular e avaliação da cobertura vacinal.

Os resultados desse estudo poderão subsidiar novas pesquisas com a aplicação do HRM para o monitoramento epidemiológico de outras doenças infecciosas, assim como o uso do sequenciamento genômico para o conhecimento mais aprofundado de outros microrganismos.

## 9 CRONOGRAMA

Atividades	2018	2019	2020	2021	1º semestre de 2022
Participação em disciplinas	✓	✓	-	-	-
Seminários II	✓	-	-	-	-
Levantamento bibliográfico	✓	✓	✓	✓	✓
Atividade laboratorial	✓	✓	✓	✓	-
Qualificação	-	✓	-	-	-
Análise dos resultados	✓	✓	✓	✓	✓
Seminários III	-	-	-	✓	-
Participação em eventos científicos	-	✓	-	-	-
Elaboração dos artigos	-	-	-	✓	✓
Submissão do artigo 1	-	-	-	-	✓
Submissão do artigo 2	-	-	-	-	✓
Submissão do artigo 3	-	-	-	-	✓
Elaboração da Tese	✓	✓	✓	✓	✓
Defesa da Tese	-	-	-	-	✓

## REFERÊNCIAS

- ABAD, R. *et al.* Serogroup W meningococcal disease: Global spread and current affect on the Southern Cone in Latin America. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 142, p. 2461-2470, 2014.
- ALCOCK, B.P. *et al.* CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 48, p. D517–D525, 2020.
- AMBROSIO, L. *et al.* Genomic analysis of *Neisseria meningitidis* carriage isolates during an outbreak of serogroup C clonal complex 11, Tuscany, Italy. **P. One**, São Francisco, v. 14, n. 5, p. e0217500, mai 2019
- ANDERSSON, P. *et al.* Minim Typing – A Rapid and Low Cost MLST Based Typing Tool for *Klebsiella pneumoniae*. **P. One**, São Francisco, v. 7, n. 3, p. e33530, mar. 2012.
- ANDREWS, S. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics. Babraham, 2010. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:FastQC+a+quality+control+tool+for+high+throughput+sequence+data.#0>.
- ASHTON, F. E. *et al.* Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. **J. Clin. Microbiol.**, Washington D. C., v. 29, n. 11, p. 2489-2493, nov.1991.
- AZEVEDO, A.C. *et al.* Molecular surveillance of brazilian meningococcal isolates serogroup c in the pre and post-men-c-vaccination period: Emergence of ST-3780. **Infect. Genet. Evol.**, Amesterdã, n. 78, p. 104079, mar. 2020.
- BARATA, R. B. Cem anos de endemias e epidemias. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 333-345, 2000. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-8123200000200008](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-8123200000200008) Acessado em: 03 ago. 2021.
- BASTOS, R. C. *et al.* Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies. **Vaccine**, Amsterdã, v. 33, n. 35, p. 4281-4287, ago. 2015.
- BERNAL-MARTÍNEZ, L. *et al.* Development and Validation of a High-Resolution Melting Assay To Detect Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, Washington D.C., v. 61, n.12, p. e01083-17, nov. 2017.
- BERNARDO, A. Escolas fechadas, hospitais lotados, eventos cancelados e dados censurados: o Brasil da meningite de 1974. **BBC News Brasil**, Rio de Janeiro, 28 mar. 2020. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-52058352> Acessado em: 03 ago. 2021.
- BORTOLAIA, V. *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v. 75, p. 3491–3500, dez. 2020.

BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado; 1988.

BRASIL. Decreto nº 78.231, de 12 de agosto de 1976. Regulamenta a Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, que dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 10731, 13 ago. 1976. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1970-1979/d78231.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1970-1979/d78231.htm). Acessado em: 05 ago. 2018

BRASIL. Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975. Dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 14433, 31 dez. 1975. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L6259.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6259.htm). Acessado em: 05 ago. 2018.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 12647, 24 set. 1976. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/Ccivil\\_03/Leis/L6360.htm](http://www.planalto.gov.br/Ccivil_03/Leis/L6360.htm). Acessado em: 03 ago. 2018.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 18055, 20 set. 1990. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm). Acessado em: 03 ago. 2018.

BRASIL. Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990. Dispõe sobre a participação da comunidade na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) e sobre as transferências intergovernamentais de recursos financeiros na área da saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 25694, 31 dez. 1990. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/CCivil\\_03/leis/L8142.htm](http://www.planalto.gov.br/CCivil_03/leis/L8142.htm). Acessado em: 03 ago. 2018.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L9782.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9782.htm). Acessado em: 03 ago. 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 4, de 28 setembro de 2017. Consolidação das normas sobre os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde. Lista Nacional de Notificação Compulsória, que consta no PRC nº 4, de 28 de setembro de 2017, Anexo 1 do Anexo V (Origem: PRT MS/GM 204/2016, Anexo 1). Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004\\_03\\_10\\_2017.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004_03_10_2017.html) Acessado em: 16 fev. 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Volume único, 3ª edição, Brasília, DF. 2019b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.061, de 18 de maio de 2020. Revoga a Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020, e altera a Portaria de Consolidação nº 4/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir a doença de Chagas crônica, na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, n. 102, p. 229, 29 mai. 2020. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt1061\\_29\\_05\\_2020.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt1061_29_05_2020.html). Acessado em: 16 fev. 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS - Departamento de Informática do SUS. CGDIS - Coordenação-geral de Disseminação de informações em saúde. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/meninbr.def> Acessado em: 31 mar. 2021

BRATCHER, H. B.; HARRISON, O. B.; MAIDEN, M. C. J. Genome Sequencing and Interrogation of Genome Databases: A Guide to *Neisseria meningitidis* Genomics. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v. 1969, p. 51-82, mar. 2019.

BREAKWELL, L. *et al.* Meningococcal carriage among a university student population - United States, 2015. **Vaccine**. Amsterdã, v. 36, n. 1, p. 29-35, jan. 2018.

CAI, X. Q. *et al.* Rapid Detection and Simultaneous Genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula Using Real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) Analysis. **P. One**, São Francisco, v. 8, n. 6, p. e67082, jun. 2013.

CARATTOLI, A. *et al.* In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Oxford, v. 58, p.3895-3903, 2014.

CAUGANT, D. A.; BRYNILDSRUD, O. B. *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, Paris, 18(2):84-96. Fev. 2020.

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

COSENTINO, S., *et al.* PathogenFinder - Distinguishing Friend from Foe Using Bacterial Whole Genome Sequence Data. **P. One**, São Francisco, v. 8, 2013.

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

DANZIG, L. Meningococcal vaccines. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Filadélfia, v. 23, n. 12, p. 285 – 92, 2004.

DAVIDSEN, T.; TONJUM, T.; Meningococcal genome dynamics. **Nat. Rev. Microbiol.**, Londres, v. 4, p. 11–22, jan. 2006.

DE FILIPPIS I. *et al.* Genetic diversity of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil, evaluated by multilocus enzyme electrophoresis. **Lett. Appl. Microbiol.**, Londres, v. 39, n. 3, p. 232-239, jul. 2004.

DE FILIPPIS I. *et al.* Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid by one-step polymerase chain reaction of the *nspA* gene. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, Amsterdã, v. 51, n. 2, p. 85-90, fev. 2005.

DE FILIPPIS I.; VICENTE A. C. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, Amsterdã, v. 53, n. 3, p. 161-167, nov. 2005.

DE FILIPPIS I. *et al.* Molecular Epidemiology of *Neisseria meningitidis* Serogroup B in Brazil. **P. One**, São Francisco, v. 7, n. 3, p. e33016, mar. 2012.

DE FILIPPIS, I. *et al.* Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 20, n. 4, p. 335-341, ago. 2016. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702016000400335](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702016000400335). Acessado em: 04 abr. 2021.

DONÀ, V. *et al.* Multiplex Real-Time PCR Assay with High-Resolution Melting Analysis for Characterization of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington D.C., v. 54, n. 8, p. 2074-2081, ago. 2016.

DRETLE, A. W.; ROUPHAEL, N. G.; STEPHENS, D. S. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for future vaccine development. **Hum. Vaccin. Immunother.**, Abingdon-on-Thames, v. 14, n. 5, p. 1146-1160, mai. 2018.

FIOCRUZ / BIOMANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos/Fiocruz. Disponível em <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/home/historia>. /. Acessado em: 07 abr. 2022

ERIKSSON, L. *et al.* Whole-Genome Sequencing of Emerging Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup W in Sweden. **J. Clin. Microbiol.**, Washington D.C., v. 56, n. 4, p. e01409-17, mar. 2018.

ESPY, M. J. *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clin. Microbiol. Rev.**, São Francisco, v. 19, n. 1, p. 165-256, jan. 2006. doi: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006 Review. Erratum in: **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 595, jul. 2006

FONSECA, É. L. *et al.* The invasive MenC cc103 lineage with penicillin reduced susceptibility persisting in Brazil. **Int. J. Med. Microbiol.**, Amsterdã, v. 307, n. 6, p. 287-290, set. 2017.

GASPARINI, R. *et al.* How the Knowledge of Interactions between Meningococcus and the Human Immune System Has Been Used to Prepare Effective *Neisseria meningitidis* Vaccines. **J. Immunol. Res.**, Rockville, v. 2015, p. 189153, ago. 2015.

GORLA, M. C. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* associated with an outbreak in Bahia, Brazil. **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.**, Amsterdã, v. 30, n. 2, p. 56-59, fev. 2012.

GUREVICH, A. *et al.* QCAST: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, p.1072–1075, 2013.

HARRISON, L. B.; HANSON, N. D. High-Resolution Melting Analysis for Rapid Detection of Sequence Type 131 *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington D.C, p. 61, v. 6:e00265-17, mai. 2017.

HARRISON, L. H. *et al.* Population structure and capsular switching of invasive *Neisseria meningitidis* isolates in the pre-meningococcal conjugate vaccine era-United States, 2000–2005. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 201, n. 8, p. 1208-1224, abr. 2010.

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

HEID, C. A. *et al.* Real Time Quantitative PCR. **Genome Res.**, Cold Spring Harbor, v. 6, p. 986-994, out. 1996.

HOBB, R. I. *et al.* S. Requirement of NMB0065 for connecting assembly and export of sialic acid capsular polysaccharides in *Neisseria meningitidis*. **Microbes Infect.**, Paris, v. 12 n. 6, p. 476–87, jun. 2010.

- 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. **P. One**, São Francisco, v. 7, n. 8, p. e44102, ago. 2012.
- JELFS, J. *et al.* Sequence variation in the *porA* gene of a clone of *Neisseria meningitidis* during epidemic spread. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, D.C, v. 7, n. 3, p. 390-395, mai. 2000.
- JOENSEN, K.G., *et al.* Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D.C, v. 52, p. 1501–1510, mai. 2014.
- JOHANSSON, M.H.K., *et al.* Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v. 76, n. 1, p.101–109, jan. 2021.
- JOLLEY, K.; MAIDEN, M. Automated extraction of typing information of bacterial pathogens from whole genome sequence data: *Neisseria meningitidis* as an exemplar. **Euro Surveill.**, Solna, v. 18, n. 4, p. 20379, jan 2013.
- JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. **Wellcome Open Res.**, Londres, v. 3, p. 1–20, set. 2018.
- KHUMALO, J. *et al.* Diagnostic accuracy of two multiplex real-time polymerase chain reaction assays for the diagnosis of meningitis in children in a resource-limited setting. **P. One**, São Francisco, v. 12, n. 3, p. e0173948, mar. 2017.
- KLAFKE, G. M. *et al.* High-resolution melt (HRM) analysis for detection of SNPs associated with pyrethroid resistance in the southern cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist.**, Amsterdã, v. 9, p. 100-11, abr. 2019.
- KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **Trends Mol. Med.**, Amsterdã, v. 8, n. 6, p. 257-260, jun. 2002
- KRAULAND, M. G. *et al.* Whole genome sequencing to investigate the emergence of clonal complex 23 *Neisseriameningitidis* serogroup Y disease in the United States. **P. One**, São Francisco, v. 7, n. 4, p. e35699, abr. 2012.
- KREMER, P. H. C., *et al.* Genetic Variation in *Neisseria meningitidis* Does Not Influence Disease Severity in Meningococcal Meningitis. **Front. Med.**, Lausanne, nov. 2020.
- KŘÍŽOVÁ, P. *et al.* Surveillance of invasive meningococcal disease based on whole genome sequencing (WGS), Czech Republic, 2015. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.**, Praga, v. 67, n. 2, p. 64-73, 2018.

KRONE, M. *et al.* Increase of invasive meningococcal serogroup W disease in Europe, 2013 to 2017. **Euro Surveill.**, Solna, v. 24, n. 14, p.1800245. abr. 2019.

KUGELMAN, G. *et al.* Simple, rapid, and inexpensive detection of *Neisseria gonorrhoeae* resistance mechanisms using heat-denatured isolates and SYBR green-based real-time PCR. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington D.C., v. 53, n. 10, p. 4211-4216, out. 2009.

LAW, D. K.S. *et al.* Characterization of invasive *Neisseria meningitidis* strains from Québec, Canada, during a period of increased serogroup B disease, 2009-2013: phenotyping and genotyping with special emphasis on the non-carbohydrate protein vaccine targets. **BMC Microbiol.**, Londres, v. 15, v. 143, p. 1-12, jul. 2015.

LEÓN, M.E. *et al.* Genotipos de *Neisseria meningitidis* aislados de pacientes con enfermedad meningocócica en Paraguay, 1996–2015. **Pan Am. J. of Public Health**, Washington D.C., v. 43, p. e10, fev. 2019.

LINZ, B. *et al.* Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, Hoboken, v.,36, p. 1049–1058, mai 2000.

LIU B. *et al.* VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 47, n. D1, p. D687-D692, jan. 2019.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/neisseria>. Acessado em: 15/04/2021.

LUCIDARME, J. *et al.* Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. **J. Infect.**, Amsterdã, v. 71, p. 544-552, 2015.

LUCIDARME, J. *et al.* An international invasive meningococcal disease outbreak due to a novel and rapidly expanding serogroup W strain, Scotland and Sweden, July to August 2015. **Euro surveill.**, Solna, v. 21, 2016.

MACCANNELL, D. Bacterial Strain Typing. **Clin. Lab. Med.**, Amsterdã, v. 33, n. 3, p. 629-650, sep. 2013.

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

MARIN, M. A. *et al.* The invasive *Neisseria meningitidis* MenC CC103 from Brazil is characterized by an accessory gene repertoire. **Sci. Rep.**, Londres, v. 7, n. 1, p. 1617, mai. 2017.

MASSARI, P. *et al.* The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 87–93, fev. 2003.

MAYER, L. W. *et al.* Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: Not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 185, p. 1596-1605, 2002.

MIAOMIAO, H. U. *et al.* A novel high-resolution melting analysis-based method for Salmonella genotyping. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdã, v. 172, p. 105806, mai 2020.

MULHALL, R. M., *et al.* cgMLST characterisation of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C and W strains associated with increasing disease incidence in the Republic of Ireland. **P. One**, São Francisco, v. 14, n. 5, p. e0216771, mai 2019.

NIKODEM, D.; CŁAPA, T.; NAROŻNA, D. High Resolution Melting Analysis (HRM-PCR) - method and its application. **Postepy Biochem.**, Varsóvia, v. 67, n. 1, p. 54-58, mar 2021a.

NIKODEM, D., CŁAPA, T., NAROŻNA, D. HRM-PCR in medical diagnostic. **Postepy Biochem.**, Varsóvia, v. 67, n. 1, p. 59-63, mar 2021b.

PARASHAR, D. *et al.* Applications of Real Time PCR technology to mycobacterial research. **Indian. J. Med. Res.**, Mumbai, v. 124, n. 4, p. 385-398, out 2006.

PATEL J. C. *et al.* Rapid Laboratory Identification of *Neisseria meningitidis* Serogroup C as the Cause of an Outbreak - Liberia, 2017. **MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 66, n. 42, p. 1144-1147, out. 2017.

PRESA, J. V. *et al.* Epidemiological burden of meningococcal disease in Latin America: A systematic literature review. **Int. J. Infect. Dis.**, Brookline, n. 85, p. 37-48, mai. 2019.

RADVANSZKY, J., *et al.* Comparison of different DNA binding fluorescent dyes for applications of high-resolution melting analysis. **Clin. Biochem.**, Amsterdã, v. 48, n. 9, p. 609-616, jun 2015.

RANJBAR, R. *et al.* Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **New Microbiol.**, Bolonha, v. 37, n. 1, p. 1-15, jan. 2014.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Curr. Opin. Microbiol.**, Amsterdã, v. 3, n. 5, p. 445-450, out. 2000.

REED, G. H.; KENT, J. O.; WITTEWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacog.**, Londres, v. 8, n. 6, p. 597-608, jun. 2007.

RETCHLESS, A.C., *et al.* Expansion of a urethritis-associated *Neisseria meningitidis* clade in the United States with concurrent acquisition of *N. gonorrhoeae* alleles. **BMC Genom.**, Londres, v. 19, p. 176, mar. 2018.

RIO DE JANEIRO. Secretaria de Saúde. Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Gerência de Doenças Imunopreveníveis e de Transmissão Respiratória. Área Técnica Estadual da Vigilância Epidemiológica das Meningites. **Orientações para Diagnóstico Laboratorial das Meningites e da Doença Meningocócica**. Rio de Janeiro, jun.2019. Disponível: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=ZDbE3ykl0nE%3D> Acessado em: 04/04/2021.

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

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

RUBILAR, P. S *et al.* Increase of *Neisseria meningitidis* W:cc11 invasive disease in Chile has no correlation with carriage in adolescents. **P. One.**, São Francisco; v. 13, n. 3, p. e0193572, mar. 2018.

SÁFADI, M. A. *et al.* Carriage Rate and Effects of Vaccination after Outbreaks of Serogroup C Meningococcal Disease, Brazil, 2010. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 20, n. 5, p.806-811, mai. 2014.

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

SÁFADI, M. A.; BARROS, A. P. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. **J. Pediatr.**; Rio de Janeiro, v. 82, n. 3 Suppl, p.35-44, jul. 2006.

SARDINHA, G. *et al.* Replacement of *Neisseria meningitidis* C cc11/ET-15 variant by a cc103 hypervirulent clone, Brazil 2005–2011. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, Amsterdã, v. 76, n. 4, p. 524-525, ago. 2013.

SCHNEIDER, C.; TAVARES, M.; MUSSE, C. O retrato da epidemia de meningite em 1971 e 1974 nos jornais O Globo e Folha de S. Paulo. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 9, n. 4, p. 1-13, out. 2015. Disponível em: <https://www.reciis.icict.fiocruz.br/index.php/reciis/article/view/995>. Acessado em: 03 ago. 2021

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future microbiol.**, Londres, v. 7, n. 1, p. 73-89, jan. 2012.

SCHOEN, C. *et al.* Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington D.C., v. 105, n. 9, p. 3473 – 3478, mar. 2008.

SELANDER, R. K. *et al.* Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington D.C., v. 51, n. 5, p. 873-884, mai. 1986.

SILVA, L. A. *et al.* *Neisseria meningitidis* disease-associated clones in Amazonas State, Brazil. **Infect. Dis.**, Londres, v. 50, n. 9, p. 697–704, set. 2018.

SŁOMKA, M. *et al.* High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping- Limitations and Caveats in Practical Case Studies. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 18, n. 11, p. 2316, nov. 2017.

SOUZA, R. A.; FALCÃO, J. P. A novel high-resolution melting analysis-based method for *Yersinia pseudotuberculosis* genotyping. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdã, v. 91, n. 3, p. 329-335, dez. 2012.

STEFANELLI, P. *et al.* Genome-based study of a spatio-temporal cluster of invasive meningococcal disease due to *Neisseria meningitidis* serogroup C, clonal complex 11. **J. Infect.**, Amsterdã, v. 73, n. 2, p. 136-144, ago. 2016.

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

STEPHENS, D. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, Amsterdã, v. 27 Suppl 2(Suppl 2), p. B71-77, jun. 2009.

TAHA, M. K. *et al.* Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. **Lancet**, Londres, v. 356, p. 2159, 2000.

TAHMASEBI, H.; DEHBASHI, S.; ARABESTANI, M. R. New approach to identify colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by high-resolution melting curve analysis assay. **Let. Appl. Microbiol.**, Londres, v. 70, n. 4, p. 290-299, abr. 2020.

TAMBURRO, M.; RIPABELLI, G. High Resolution Melting as a rapid, reliable, accurate and cost-effective emerging tool for genotyping pathogenic bacteria and enhancing molecular epidemiological surveillance: a comprehensive review of the literature. **Ann. Ig.**, Roma, v. 29, n. 4, p. 293-316, jul-ago 2017.

TAN, L. K.; CARLONE, G. M.; BORROW, R. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. **The New Engl. J. of Med.**; Waltham, v. 362, n. 16, p.1511-1520, abr. 2010.

TSANG, R. S. *et al.* Phenotypic and genetic characterization of a unique variant of serogroup C ET-15 meningococci (with the antigenic formula C:2a:P1.7,1) causing invasive meningococcal disease in Quebec, Canada. **J. Clin. Microbiol.**, Washington D.C., v. 42, n. 4, p. 1460-1465, abr. 2004.

TSANG R. S. W. *et al.* WGS analysis of a penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* strain containing a chromosomal ROB-1  $\beta$ -lactamase gene. **J. Antimicrob. Chemother**, Oxford, v. 74, n.1, p. 22-28, jan. 2019.

TYRRELL, G. J. *et al.* Outbreak of *Neisseria meningitidis*, Edmonton, Alberta, Canada. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 8, n. 5, p. 519-521, mai. 2002.

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

TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. A Narrative Review of the W, X, Y, E, and NG of Meningococcal Disease: Emerging Capsular Groups, Pathotypes, and Global Control. **Microorganisms.**, Basel, v. 9, n. 3, p. 519, mar. 2021.

UNEMO, M.; DILLON, J. A. Review and International Recommendation of Methods for Typing *Neisseria gonorrhoeae* Isolates and Their Implications for Improved Knowledge of Gonococcal Epidemiology, Treatment, and Biology. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington D.C., v. 24, n. 3, p. 447-458, jul. 2011.

VACKOVÁ, Z. *et al.* The possibilities for the implementation of whole genome sequencing (WGS) of *Neisseria meningitidis* in molecular surveillance of invasive meningococcal disease in the Czech Republic. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.**, Praga, v. 66, n. 1, p. 50-52, 2017. [Article in Czech]

VERMONT, C. L. *et al.* Cross-reactivity of antibodies against PorA after vaccination with a meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, Washington, D. C., v. 71, p.1650-1655. abr. 2003.

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

WHILEY, D.M. *et al.* Real-time PCR genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using 14 informative single nucleotide polymorphisms on gonococcal housekeeping genes. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 322-328, fev. 2013.

WICK, R. R., *et al.* Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, São Francisco, v. 13, n. 6, p. e1005595. Jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Emergencies preparedness, response. Pandemic and Epidemic Diseases (PED). Meningococcal disease. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/meningococcal/en/>. Acessado em: 18 ago. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Emergencies. Meningococcal meningitidis. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/diseases/meningitis/en/>. Acessado em: 25 jul. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Health Topics. Meningitis. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/meningitis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/meningitis#tab=tab_1) Acessado em: 31 mar. 2021.

ZANKARI, E., R. *et al.* PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, p. 72, p.2764–2768, out. 2017.

## ANEXO A – LISTAGEM DAS CEPAS UTILIZADAS NO ESTUDO

A tabela abaixo apresenta os complexos clonais encontrados entre os 147 isolados tipificados pelo MLST, que foram utilizados em nosso estudo.

Tabela: Sorogrupo, ano de isolamento e cc das cepas estudadas

Cepa	Sorogrupo	Ano	Origem	cc
P2140	C	1999	BA	ST-11/ET-15
P2141	C	1996	BA	ST-11/ET-15
P2183	C	1996	BA	ST-11/ET-15
P2365	B	2001	RJ	ST-32/ET-5
P2635	B	2003	PE	ST-11/ET-7
P2681	B	2004	PE	ST-32/ET-5
P2686	B	2004	PE	ST-32/ET-5
P2688	B	2004	?	ST-32/ET-5
P2701	B	2004	AM	ST-41/44
P2704	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2705	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2708	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2709	B	2004	AM	ST-1136
P2710	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2711	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2712	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2713	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2720	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2721	B	2004	AM	ST-32/ET-5
P2730	B	2004	RJ	ST-41/44
P2774	W135	2004	RJ	ST-11/ET-15
P2779	W135	2004	RJ	ST-11/ET-15
P2824	B	2006	RJ	ST-41/44
P2846	C	2006	PE	ST-103
P2849	B	2006	PE	ST-32/ET-5
P2850	B	2006	PE	ST-32/ET-5
P2851	C	2006	PE	ST-103
P2914	C	2006	PE	ST-103
P2915	B	2006	PE	ST-32/ET-5
P2921	B	2006	PE	ST-32/ET-5
P2931	B	2006	PE	ST-103
P2932	B	2006	PE	ST-32/ET-5
P2941	C	2007	RJ	ST-32/ET-5

<b>Cepa</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Ano</b>	<b>Origem</b>	<b>cc</b>
P2964	B	2007	PE	ST-41/44
P2983	C	2007	PE	ST-103
P2987	C	2007	PE	ST-103
P2990	B	2007	PE	ST-32/ET-5
P3036	B	2007	PE	ST-32/ET-5
P3039	C	2007	PE	ST-103
P3040	C	2007	PE	ST-11/ET-37
P3068	C	2008	PE	ST-103
P3074	C	2008	PE	ST-103
P3076	C	2008	PE	ST-103
P3079	B	2008	PE	ST-32/ET-5
P3087	C	2008	PE	ST-11/ET-37
P3095	C	2008	RJ	ST-103
P3101	C	2008	BA	ST-103
P3103	C	2008	BA	ST-103
P3112	C	2008	BA	ST-11/ET-37
P3121	C	2008	BA	ST-103
P3124	C	2008	BA	ST-103
P3126	C	2008	BA	?
P3130	C	2008	BA	?
P3132	C	2008	BA	ST-103
P3136	C	2008	BA	ST-103
P3137	C	2008	BA	ST-103
P3139	C	2008	BA	ST-103
P3142	C	2008	BA	ST-103
P3143	C	2008	BA	?
P3146	C	2008	BA	ST-103
P3152	B	2008	PE	ST-32/ET-5
P3154	C	2008	PE	ST-103
P3192	C	2008	PE	ST-103
P3194	C	2008	PE	ST-103
P3195	C	2008	PE	ST-103
P3197	C	2008	PE	ST-103
P3264	C	2008	RJ	ST-103
P3279	C	2009	PE	ST-103
P3282	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3286	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3289	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3290	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3292	C	2009	BA	ST-103

<b>Cepa</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Ano</b>	<b>Origem</b>	<b>cc</b>
P3294	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3297	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3303	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3307	C	2009	BA	ST-11/ET-37
P3331	B	2009	RJ	ST-32/ET-5
P3355	C	2009	PE	ST-103
P3357	C	2009	PE	ST-103
P3358	C	2009	PE	ST-103
P3362	B	2009	PE	ST-32/ET-5
P3364	C	2009	PE	ST-103
P3365	C	2009	PE	ST-103
P3366	B	2009	PE	ST-41/44
P3370	C	2009	PE	ST-103
P3386	C	2009	PE	ST-103
P3388	B	2009	PE	?
P3396	B	2009	RJ	ST-32/ET-5
P3451	B	2009	RJ	ST-32/ET-5
P3475	C	2009	BA	ST-103
P3476	C	2009	BA	ST-103
P3477	C	2009	BA	?
P3478	C	2009	BA	ST-103
P3479	C	2009	BA	ST-103
P3480	C	2009	BA	ST-103
P3484	C	2009	PE	ST-11/ET-37
P3487	C	2009	PE	ST-103
P3496	B	2009	RJ	ST-32/ET-5
P3497	C	2009	PE	ST-103
P3556	B	2010	PE	ST-32/ET-5
P3558	C	2010	PE	ST-103
P3560	C	2010	PE	?
P3563	C	2010	PE	?
P3564	C	2010	PE	ST-103
P3637	C	2010	RJ	ST-32/ET-5
P3645	C	2010	PE	ST-103
P3646	B	2010	PE	ST-32/ET-5
P3647	B	2010	PE	ST-41/44
P3667	C	2010	RJ	ST-103
P3668	C	2010	RJ	ST-103
P3670	C	2010	RJ	ST-103
P3733	C	2010	PE	ST-103

<b>Cepa</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Ano</b>	<b>Origem</b>	<b>cc</b>
P3738	B	2010	PE	ST-32/ET-5
P3739	C	2010	PE	ST-103
P3740	C	2010	PE	ST-103
P3741	C	2010	PE	ST-103
P3776	C	2010	PE	ST-103
P3777	C	2010	PE	ST-103
P3778	C	2010	PE	ST-103
P3791	C	2011	PE	ST-103
P3800	C	2011	PE	ST-103
P3841	C	2011	PE	ST-103
P3842	C	2011	PE	ST-103
P3843	B	2011	PE	ST-32/ET-5
P3883	B	2011	PE	ST-41/44
P3884	B	2011	PE	?
P3941	B	2011	RJ	ST-32/ET-5
P3942	B	2011	RJ	ST-32/ET-5
P3969	C	2011	PE	?
P3976	C	2011	PE	?
P3985	W135	2011	PE	ST-11/ET-37
P4006	B	2012	PE	ST-32/ET-5
P4007	C	2012	PE	ST-103
P4032	C	2012	PE	ST-103
P4233	C	2012	PE	?
P4320	B	2013	PE	ST-32/ET-5
P4325	B	2013	PE	ST-32/ET-5
P4330	C	2013	PE	ST-103
P4332	C	2013	PE	?
P4335	C	2013	PE	ST-103
P4995	C	2015	RJ	?
MCRJ171	B	2017	RJ	ST-41/44
MCRJ353	C	2018	RJ	ST-865
BioMang	C	?	RJ	?
P6280	C	2019	PE	ST-103
L7421	C	2019	?	?

Fonte: (Do autor, 2021)

## ANEXO B - LISTAGEM DOS GENOMAS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE ET-15

<b>Id. do Genoma</b>	<b>Isolado MLST</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Doença</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>ST</b>	<b>Complexo clonal</b>	<b>PorA VR1</b>	<b>PorA VR2</b>	<b>FetA VR</b>
<a href="#">95866</a>	DE9388	Alemanha	2003	meningite	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">95867</a>	DE9400	Alemanha	2003	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">95869</a>	DE9781	Alemanha	2004	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29287</a>	2666	África do Sul	2005	meningite	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">115310</a>	P2140	Brasil	1999	meningite	C	1026	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">115311</a>	P2141	Brasil	1996	meningite	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">115312</a>	P2183	Brasil	1996	meningite	C	1026	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">39842</a>	M04874	Canadá	1997	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">53697</a>	NMLW114	Canadá	2001	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">53702</a>	NMLW047	Canadá	2002	Invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">53787</a>	NMLC311	Canadá	2007	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">34619</a>	NM126	EUA	1996	Invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">97587</a>	M21641	EUA	2010	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">54570</a>	LNP13122abd	França	1994	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">54590</a>	LNP19020abd	França	2001	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">36202</a>	BM48	Grécia	1996	Invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">36203</a>	BM48a	Grécia	1996	portador	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29904</a>	M98 251593	Irlanda	1998	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">57561</a>	3003-98	Irlanda	1998	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6

<b>Id. do Genoma</b>	<b>Isolado MLST</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Doença</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>ST</b>	<b>Complexo clonal</b>	<b>PorA VR1</b>	<b>PorA VR2</b>	<b>FetA VR</b>
<a href="#">57564</a>	3067-98	Irlanda	1998	Invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">57567</a>	3095-98	Irlanda	1998	Invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">57557</a>	12148-00	Irlanda	2000	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">57554</a>	12094-01	Irlanda	2001	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">57535</a>	12018-03	Irlanda	2003	Invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100386</a>	2842STDY5881140	-	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100407</a>	2842STDY5881162	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100460</a>	2842STDY5881215	-	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100632</a>	2842STDY5881609	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100636</a>	2842STDY5881618	-	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100638</a>	2842STDY5881623	-	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100642</a>	2842STDY5881635	-	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100643</a>	2842STDY5881637	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100644</a>	2842STDY5881640	-	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100824</a>	910333	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100829</a>	920619	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">100941</a>	2012278	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">101057</a>	2012278_II	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">101135</a>	910333_II	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">101140</a>	920619_II	Países Baixos	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">57038</a>	OX9931231	Reino Unido	1999	portador	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">57057</a>	OX9931282	Reino Unido	1999	portador	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">20888</a>	PM6TS	Reino Unido	-	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6

<b>Id. do Genoma</b>	<b>Isolado MLST</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Doença</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>ST</b>	<b>Complexo clonal</b>	<b>PorA VR1</b>	<b>PorA VR2</b>	<b>FetA VR</b>
<a href="#">20889</a>	PM6B	Reino Unido	-	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29656</a>	M99 241594	Reino Unido	1999	-	C	11	ST-11		2	F3-6
<a href="#">29666</a>	M00 241348	Reino Unido	2000	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29673</a>	M01 241306	Reino Unido	2001	-	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29576</a>	M04 240065	Reino Unido	2004	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29606</a>	M05 240972	Reino Unido	2005	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29617</a>	M06 240375	Reino Unido	2006	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">94418</a>	M19 240113	Reino Unido	2019	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">94419</a>	M19 240114	Reino Unido	2019	Invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">684</a>	0259/93	República Checa	1993	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">46489</a>	2507	Tunísia	2010	invasiva (não especificada)	C	11	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">29275</a>	W72c	Grécia	1997	-	C	211	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">1179</a>	W72a	Grécia	1997	portador	C	211	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">1180</a>	W72b	Grécia	1997	portador	C	211	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">1178</a>	W72	Grécia	1997	Invasiva (não especificada)	C	211	ST-11	5	2	F3-6
<a href="#">26034</a>	27/86	Brasil	1986	-	B	33	ST-32	19	15	F5-1

Fonte: (Do autor, 2022)

## ANEXO C - LISTAGEM DOS GENOMAS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE W

Identificação do Genoma	Isolado MLST	País	Ano	Doença	Sorogrupo	ST	Complexo clonal	PorA-VR1	PorA-VR2	FetA-VR
<a href="#">21578</a>	SA_sorogrupo W_NM6	África do Sul	2004	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">30521</a>	IBD-916	Alemanha	2011	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">96231</a>	DE14704	Alemanha	2020	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">2290</a>	M7124	Arábia Saudita	2000	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31148</a>	M14 240411	Argentina	2008	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31149</a>	M14 240412	Argentina	2010	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31152</a>	M14 240415	Argentina	2012	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">36666</a>	EXNM652	Austrália	2014	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">85618</a>	N.m090	Belarus	2016	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">115313</a>	P2774	Brasil	2004	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">115314</a>	P2779	Brasil	2004	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31155</a>	M14 240416	Brasil	2011	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">54034</a>	M37104	Brasil	2014	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">110965</a>	N.151/19	Brasil	2019	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31161</a>	M14 240422	Brasil	2008	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31158</a>	M14 240419	Brasil	2010	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">82665</a>	N.28/18	Brasil	2018	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1

Identificação do Genoma	Isolado MLST	País	Ano	Doença	Sorogrupo	ST	Complexo clonal	PorA-VR1	PorA-VR2	FetA-VR
<a href="#">110930</a>	N.15/16	Brasil	2016	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">110943</a>	N.6/17	Brasil	2017	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">30098</a>	2004264	Burkina Faso	2004	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">51878</a>	NMLW051	Canadá	2016	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">105813</a>	2021-011	Canadá	2021	meningite e septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">51874</a>	NMLW115L	Canadá	2015	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">51886</a>	NMLW144	Canadá	2011	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">53694</a>	NMLW099	Canadá	2000	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">53699</a>	NMLW234	Canadá	2001	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">30086</a>	2001068	Chade	2001	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">61557</a>	M-014-16	Chile	2016	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31319</a>	M10208	Chile		invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">61558</a>	M-016-16	Chile	2016	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">61559</a>	M-018-16	Chile	2016	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">61561</a>	M-064-16	Chile	2016	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">61563</a>	M-079-16	Chile	2016	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">61564</a>	M-092-16	Chile	2016	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">46996</a>	M22801	Djibuti	2004	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">51630</a>	20169	Espanha	2011	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">72758</a>	Nmen146	Espanha	2020	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">2281</a>	M7089	EUA	2000	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">36699</a>	M27940	EUA	2013	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1

Identificação do Genoma	Isolado MLST	País	Ano	Doença	Sorogrupo	ST	Complexo clonal	PorA-VR1	PorA-VR2	FetA-VR
<a href="#">96501</a>	M41761	EUA	2017	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">36779</a>	107507	Finlândia	2015	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">72593</a>	114776	Finlândia	2020	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">31165</a>	M14 240444	França	2000	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">41212</a>	LNP28388	França	2016	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">51854</a>	W-5899	Grécia	2016	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">26899</a>	12003_2013	Irlanda	2013	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">93953</a>	IE18Nm48	Irlanda	2018	meningite e septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">36845</a>	2685	Itália	2015	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">97901</a>	Nmiss3185	Itália	2019	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">55201</a>	NIID601	Japão	2015	portador	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">17191</a>	18581	Madagáscar	2001	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">46987</a>	M22718	Maurício	2001	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">91783</a>	15 MEX	México	2018	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">71740</a>	NZ19MI0003	Nova Zelândia	2018	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">30097</a>	2003055	Níger	2003	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">85669</a>	N18-16	Noruega	2016	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">44679</a>	2160364	Países Baixos	2016	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">72832</a>	Nm_75-19	Portugal	2019	septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">19957</a>	M00 241317	Reino Unido	2000	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">30142</a>	M13 240666	Reino Unido	2013	não informado	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">19968</a>	M10 240514	Reino Unido	2010	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1

Identificação do Genoma	Isolado MLST	País	Ano	Doença	Sorogrupo	ST	Complexo clonal	PorA-VR1	PorA-VR2	FetA-VR
<a href="#">71946</a>	SMG-20-104	Reino Unido	2020	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">20196</a>	M11 240035	Reino Unido	2011	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">38565</a>	M1057LII/13	Rússia	2014	meningite e septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">94004</a>	M3_64/2019	Rússia	2019	meningite e septicemia	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">30075</a>	2000081	Senegal	2000	meningite	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">74304</a>	20-235	Suécia	2020	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1
<a href="#">30065</a>	M14 240067	Turquia	2006	invasiva (não especificada)	W	11	ST-11	5	2	F1-1

Fonte: (Do autor, 2022)