

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Dhian Renato Almeida Camargo

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DETECÇÃO DE MECANISMOS
DE RESISTÊNCIA DE *Neisseria meningitidis* ISOLADAS NO
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE MINAS GERAIS,
2017-2019**

Belo Horizonte

2021

Dhian Renato Almeida Camargo

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DETECÇÃO DE MECANISMOS
DE RESISTÊNCIA DE *Neisseria meningitidis* ISOLADAS NO
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE MINAS GERAIS,
2017-2019**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães

Coorientadora: Dra. Marluce Aparecida Assunção Oliveira

Belo Horizonte

2021

043 Camargo, Dhian Renato Almeida.
Caracterização genética e detecção de mecanismos de resistência de
Neisseria meningitidis isoladas no laboratório central de saúde pública de Minas
Gerais, 2017-2019 [manuscrito] / Dhian Renato Almeida Camargo. – 2021.

115 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a. Dra. Paula Prazeres Magalhães. Co-orientadora: Dra.
Marluce Aparecida Assunção Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Neisseria meningitidis. 3. Infecções meningocócicas. 4.
Resistência às penicilinas. 5. Resistência a antimicrobianos. I. Magalhães, Paula
Prazeres. II. Oliveira, Marluce Aparecida Assunção. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **DHIAN RENATO ALMEIDA CAMARGO**

Nº REGISTRO: **2018718422**

Às 14:00 horas do dia **03 de dezembro de 2021**, reuniu-se, de forma remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Cláudio José Augusto (FUNED), Dr. Paulo Eduardo de Souza da Silva (FUNED), Jovita Eugenia Gazzinelli Cruz Madeira (FUNED), Simone Gonçalves Santos-Key (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães (orientadora) e a Dra. Marluce Aparecida A. de Oliveira (coorientadora), para julgar o trabalho final "**Caracterização genética e detecção de mecanismos de resistência de *Neisseria meningitidis* isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, 2017-2019**", do aluno **Dhian Renato Almeida Camargo**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma. Belo Horizonte, 03 de dezembro de 2021.

Membros da Banca:

Dra. Simone Gonçalves Santos-Key

Dr. Cláudio José Augusto

Dr. Paulo Eduardo de Souza da Silva

Dra. Jovita Eugenia Gazzinelli Cruz Madeira

De acordo:

Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães

(Orientadora)

Dra. Marluce Aparecida A. de Oliveira

(Coorientadora)

Profa. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação)

em Microbiologia)

Documento assinado eletronicamente por **Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira, Usuário Externo**, em 09/12/2021, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 09/12/2021, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Prazeres Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 09/12/2021, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 09/12/2021, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Eduardo de Souza da Silva, Usuário Externo**, em 22/12/2021, às 23:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio José Augusto, Usuário Externo**, em 23/12/2021, às 08:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marluce Aparecida Assunção Oliveira, Usuário Externo**, em 28/12/2021, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0983472** e o código CRC **D687AAC1**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que compartilham da minha busca há anos, Elio, Marta, Renan, Marília e Daniela que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e a todos que contribuíram para sua realização. Feliz são os membros que possuem familiares como vocês.

AGRADECIMENTOS

Em especial, quero agradecer as minhas orientadoras, Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães e a Dra Marluce Aparecida Assunção Oliveira, muito obrigado pelo apoio, incentivo, ensinamentos, dedicação e atenção mais que especial nas revisões e sugestões para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, aos meus pais Elio Renato de Almeida e Maria Marta Camargo Almeida, ao meu irmão Renan Henning Camargo Almeida, a minha esposa Marília Pereira da Costa e a minha filha Daniela Costa Camargo pelo incentivo e carinho.

À Fundação Ezequiel Dias, por tornar possível a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências biológicas e ao Departamento de microbiologia pela oportunidade ofertada.

Aos colegas do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas/FUNED, em especial Carmem Dolores Faria, Fabiana Cardoso da Silva, Paulo Eduardo de Souza da Silva, Luciana Soares Salomon, Vanda Lúcia Fagundes de Souza e Max Assunção Correia.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do ICB/UFMG, em especial ao Dr. Luiz de Macêdo Farias, Dra. Simone Gonçalves dos Santos, Dra. Natália Rocha Guimarães, Cássia, Carolina e demais colaboradores.

Aos membros das bancas de defesa de projeto, qualificação e tese, Dr. Cláudio José Augusto, Dra. Natália Rocha Guimarães, Dr. João Fernando Gonçalves Ferreira, Dr. Paulo Eduardo de Souza da Silva, Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond, Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias, Dra. Mireille Ângela Bernardes Sousa. Por aceitarem os convites de participação nas bancas em meio a tantos outros afazeres e, principalmente, pelas ótimas contribuições dadas que tanto melhoraram nosso trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia pela sua excelência no ensino e reflexão em suas disciplinas e aos técnicos administrativos do ICB que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

Aos colegas de classe, em especial à Gisele, Carlos, Matheus, Lauren, Hortência, Natália, Flávia, Rachel pela amizade e rica troca de experiências.

À Deus pela sua infinita bondade e amor.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

A infecção por *Neisseria meningitidis* está associada a taxas elevadas de morbidade e mortalidade em crianças e adultos jovens em todo o mundo. No Brasil, a doença meningocócica é endêmica e 1037 casos confirmados foram relatados em 2019. Este estudo mostrou a caracterização genética e detecção de mecanismos de resistência a antimicrobianos de 35 amostras de *N. meningitidis* isoladas no LACEN-MG entre 2017 e 2019. As amostras foram geneticamente caracterizadas por *multilocus sequence typing* (MLST) e *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). O perfil de sensibilidade a antimicrobianos foi determinado usando Etest[®] e o mecanismo de resistência foi analisado através do sequenciamento do gene *penA*. A ocorrência em pacientes do gênero feminino foi de 57,1% e 28,6% dos pacientes tinham até 14 anos. A maioria das amostras era proveniente das regionais de saúde de Belo Horizonte (11/35) e Uberlândia (11/35). Os grupos mais frequentes por tipo/subtipo (grupo:tipo:subtipo) foram a C:23:P1.14-6 (n=11), B:4,7:P1.19,15 (n=3), W:2a:P1.2 (n=2) e Y:4:nt (n=1). PFGE identificou oito pulsotipos (A-H), enquanto, MLST identificou 14 clones, sendo que os três mais prevalentes foram ST12020, ST11 e ST3780. Os tipos sequenciais foram agrupados em oito complexos clonais (cc), sendo o cc103 (48,6%), pertencente ao PFGE pulsotipo B, o mais frequente e associado à *N. meningitidis* grupo C fenótipo [23:P1.14-6, nt:ST12020, ST3780, ST8730]. Todas as amostras foram sensíveis a ceftriaxona, ciprofloxacina e rifampicina, enquanto uma amostra foi resistente à penicilina (CIM=0,5 µg mL⁻¹) e 20 apresentaram sensibilidade intermediária à penicilina (pen^I) (CIM entre 0,09 e 0,25 µg mL⁻¹). A partir das amostras com perfil de resistência, cinco alelos do gene *penA* foram identificados e o alelo *penA14* foi o mais prevalente. No geral, os alelos *penA* identificados apresentaram polimorfismos associados com o fenótipo pen^I. Nosso estudo mostrou que houve um predomínio da linhagem invasiva NmC:23:P1.14-6:ST12020:cc103:penA14, com sensibilidade reduzida à penicilina, e que não foi detectada resistência a ceftriaxona, ciprofloxacina e rifampicina.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*; doença meningocócica; resistência a antimicrobianos; resistência à penicilina.

ABSTRACT

The infection by *Neisseria meningitidis* is associated with high levels of morbidity and mortality in children and young adults worldwide. In Brazil, the meningococcal disease is endemic and 1037 confirmed cases had been reported in 2019. This study showed the genetic characterization and detection of antimicrobial resistance mechanisms in 35 strains of *N. meningitidis* isolated in the LACEN-MG between 2017 and 2019. The isolates were genetically characterized by multilocus sequence typing (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The antimicrobial sensitivity pattern was determined using Etest[®] and the resistance mechanism was analyzed by sequencing of the *penA* gene. The occurrence in female patients was 57.1%, and 28.6% of these patients were up to 14 years old. The majority of the isolates came from the health region of Belo Horizonte (11/35) and Uberlândia (11/35). The most frequent groups per type/subtype (group:type:subtype) were C:23:P1.14-6 (n=11), B:4.7: P1.19.15 (n=3), W:2a:P1.2 (n=2) and Y:4:nt (n=1). PFGE identified eight pulsotypes (A-H), while MLST identified 14 clones. The most prevalent clones were ST12020, ST11 and ST3780. The sequence types were grouped into eight clonal complexes (cc). The cc103 (48.6%), belonging to the PFGE pulsotype B, was the most frequent and associated with *N. meningitidis* group C phenotype [23:P1.14-6, nt:ST12020, ST3780, ST8730]. All strains were sensitive to ceftriaxone, ciprofloxacin and rifampicin, while one strain was resistant to penicillin (MIC = 0.5 µg mL⁻¹) and 20 showed intermediate sensitivity to penicillin (pen^I) (MIC between 0.09 and 0.25 µg mL⁻¹). From the strains with resistance profile, five alleles of the *penA* gene were identified and the *penA14* allele was the most prevalent. In general, the identified *penA* alleles had polymorphisms associated with the pen^I phenotype. Our study showed that there was a predominance of the invasive lineage NmC:23:P1.14-6:ST12020:cc103:penA14 with reduced sensitivity to penicillin, and that resistance to ceftriaxone, ciprofloxacin and rifampicin was not detected.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, meningococcal disease, drug resistance, penicillin resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da superfície celular de <i>Neisseria meningitidis</i>	24
Figura 2 - Estrutura bioquímica dos polissacarídeos capsulares de <i>Neisseria meningitidis</i>	25
Figura 3 - Organização genética do locus cps entre os sorogrupos de <i>Neisseria meningitidis</i>	26
Figura 4 - Distribuição mundial da incidência de sorogrupos de <i>Neisseria meningitidis</i> em 2018.	32
Figura 5 - Distribuição de casos de doença meningocócica por faixa etária entre 2017 e 2019, Funed, MG, Brasil.	56
Figura 6. Incidência de casos acumulados de doença meningocócica distribuídos ao longo dos meses, entre 2017 e 2019, Funed, MG, Brasil.	57
Figura 7 - Mapa de Minas Gerais mostrando as regiões de origem das amostras bacterianas de <i>Neisseria meningitidis</i>	59
Figura 8 - Distribuição de <i>Neisseria meningitidis</i> classificadas como grupo:tipo:subtipo por ano.	60
Figura 9 - Distribuição dos tipos sequenciais (ST) de <i>Neisseria meningitidis</i> por ano.....	61
Figura 10 - Árvores geradoras mínimas (Minimum Spanning Trees - MST) de 35 amostras de <i>Neisseria meningitidis</i> baseadas nos resultados do MLST.....	65
Figura 11 - Árvore filogenética mostrando a diversidade das sequências concatenadas dos genes do MLST de 35 amostras bacterianas de meningococo, MG, Brasil.	66
Figura 12 - Representação esquemática do dendograma de similaridade entre os 35 perfis de restrição gerados pela enzima NheI no PFGE.	68
Figura 13 - Árvore filogenética mostrando a diversidade de alelos do gene penA de 21 amostras bacterianas de meningococo, Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais, Brasil.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cálculo do tamanho da amostra para a frequência em uma população.....	41
Tabela 2 – Amostras bacterianas analisadas.....	43
Tabela 3 - Iniciadores empregados para MLST de <i>Neisseria meningitidis</i>	48
Tabela 4 - Critérios de interpretação das CIM dos antimicrobianos testados.	52
Tabela 5 - Iniciadores para amplificação do gene <i>penA</i> de <i>Neisseria meningitidis</i>	53
Tabela 6 - Distribuição dos casos de doença meningocócica invasiva segundo região de abrangência das macrorregiões de saúde de Minas Gerais, entre 2017 e 2019, Funed, MG, Brasil.....	58
Tabela 7 - Identificação dos perfis alélicos de cada amostra bacteriana de <i>Neisseria meningitidis</i>	63
Tabela 8 - Caracterização das amostras bacterianas de <i>Neisseria meningitidis</i> isoladas no LACEN-MG entre 2017 e 2019.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual que
≥	Maior ou igual que
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
A	Adenina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina bovina sérica
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
C	Citosina
Cc	Complexo clonal
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
Cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbônico
CRM197	Proteína mutante não tóxica da toxina diftérica
CTA	<i>Cystine tryptic agar</i>
DM	Doença meningocócica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América

EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
f.	Folha
FetA	Proteína de membrana externa regulada por ferro
FHbp	Proteína de ligação ao fator H
Funed	Fundação Ezequiel Dias
G	Guanina
G	Força g
G	Grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Kb	Kilobase
L	Litro
LA	Aglutinação do Látex
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LOS	Lipooligosacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
MAbs	Anticorpos monoclonais
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i>
Men	Meningococo
Mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
mL	<i>Mililitro</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mM	Milimolar
MST	<i>Minimum spanning trees</i> ou Árvore geradora mínima
N	Número
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NAdA	Adesina A de <i>Neisseria</i>
Ng	Nanograma
NHBA	Antígeno de ligação de <i>Neisseria</i> com Heparina

Nm	<i>Neisseria meningitidis</i>
NT	Não tipável
Nt	Não tipável
OMP	Proteína de membrana externa
OPS	Organização Pan-Americana da Saúde
Pb	Pares de bases
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pen ^I	Penicilina intermediária
pen ^R	Penicilina resistente
pen ^S	Penicilina sensível
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PNI	Programa Nacional de Imunização
PorA	Porina A
PorB	Porina B
Profa.	Professora
qPCR	Reação de polimerização em cadeia quantitativa (em tempo real)
QRDR	Região determinante de resistência a quinolona
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIREVA	Sistema Regional de Vacinas
SRS	Superintendência Regional de Saúde
ST	<i>Sequence type</i> ou Tipos sequenciais
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tris-EDTA
TT	Toxina tetânica
U	Unidade

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VR	Região variável
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>Neisseria meningitidis</i>	21
1.2	MICROBIOLOGIA DO MENINGOCOCO	21
1.3	CLASSIFICAÇÃO DE <i>N. meningitidis</i>	23
1.3.1	Sorogrupos (antígeno capsular).....	23
1.3.2	Sorotipos.....	27
1.3.3	Sorosubtipos	27
1.3.4	Imunotipos.....	28
1.4	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	29
1.5	DOENÇA MENINGOCÓCICA.....	30
1.5.1	Prevenção e controle.....	33
1.5.2	Tratamento e resistência bacteriana.....	35
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	MODELO DE ESTUDO	40
4.2	LOCAL DE ESTUDO	40
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	41
4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	41
4.5	CÁLCULO AMOSTRAL.....	41
4.6	ANÁLISE EXPERIMENTAL.....	42
4.6.1	População do estudo	42
4.6.2	Conservação das amostras bacterianas	44
4.6.3	Identificação bacteriana.....	44
4.6.3.1	Cultivo das amostras bacterianas.....	44

4.6.3.2	Identificação bioquímica.....	44
4.6.3.3	Identificação molecular.....	44
4.6.4	Classificação bacteriana	45
4.6.4.1	Classificação em sorogrupos.....	45
4.6.4.2	Classificação em sorotipos e subtipos.....	45
4.6.5	Caracterização genotípica.....	45
4.6.5.1	Extração do DNA.....	46
4.6.5.2	<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	47
4.6.5.3	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	49
4.6.6	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	51
4.6.7	Amplificação e sequenciamento do gene <i>penA</i> associado a fenótipo de resistência.....	52
4.6.7.1	Amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR)	53
4.6.7.2	Protocolo de eletroforese dos produtos amplificados por PCR	53
4.6.7.3	Sequenciamento do gene <i>penA</i>	54
4.6.7.4	Análise das sequências de DNA do gene <i>penA</i>	54
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4.8	REQUISITOS LEGAIS	55
5	RESULTADOS	56
5.1	CASOS DE DOENÇA MENINGOCÓCICA IDENTIFICADOS NO LACEN-MG.....	56
5.2	IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO BACTERIANA	58
5.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	60
5.4	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	68
5.4.1	Análise genética do gene <i>penA</i> associado ao fenótipo de resistência a penicilina.....	71
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÕES	81

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9	ANEXOS	93
	Anexo I. Parecer do Comitê de ética em Pesquisa.....	93
	Anexo II. Declaração de manuseio de material biológico.	97
	Anexo III. Certificado de participação em simpósio.	98
	Anexo IV. Certificado de apresentação de trabalho científico em simpósio.....	99
	Anexo V. Artigo científico.	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis, comumente denominada meningococo, é uma bactéria classificada como patógeno para seres humanos. É o agente da doença meningocócica (DM), a qual pode apresentar as seguintes formas clínicas: meningite, meningite com septicemia ou septicemia (também denominada meningococemia) (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Epidemias de doença meningocócica são conhecidas desde o início do século 19, sendo primeiramente descrita por Vieusseux, em Geneve, Suíça, em 1805 (VIEUSSEUX, 1805). O agente etiológico só foi descrito em 1884, quando os patologistas italianos Ettore Marchiafava e Angelo Celli descreveram micrococcos intracelulares em exsudatos meníngeos (MANCHANDA; GUPTA; BHALLA, 2006). Em 1887, na Suíça, Anton Weichselbaum isolou o microrganismo em cultura pura, denominando-o *Diplococcus intracellularis meningitidis*. O pesquisador foi o primeiro a descrever suas características e a estabelecer o papel etiológico em seis pacientes com meningite aguda (WEICHSELBAUM, 1887). Adicionalmente, Kiefer, em 1896, e Albrecht, em 1901, demonstraram a existência do estado de portador assintomático em indivíduos sadios (PROCOP; KONEMAN, 2016).

No Brasil, os primeiros casos de doença meningocócica foram descritos no município de São Paulo, em 1906. Desde então, essa enfermidade vem se mantendo no País sob a forma endêmica, com a ocorrência esporádica de surtos e epidemias ao longo do tempo (IVERSSON, 1976; DE FILIPPIS *et al.*, 2012; SÁFADI *et al.*, 2013; CORDEIRO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

1.2 MICROBIOLOGIA DO MENINGOCOCO

N. meningitidis é uma bactéria que pertence ao domínio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Neisseriales*, família *Neisseriaceae*, gênero *Neisseria*. As bactérias desta espécie são cocos Gram-negativos arredondados ou ovalados, organizados aos pares (diplococos reniformes ou na forma de grão de feijão), medindo, aproximadamente, 0,6 a 1,0 μm de diâmetro (HOLT *et al.*, 1994). São imóveis,

frequentemente capsuladas, apresentam *pili* e são anaeróbias facultativas, apresentando as reações de oxidase e catalase positivas. Seu metabolismo é do tipo heterotrófico, requerendo sais minerais, lactato, alguns aminoácidos e ácido glutâmico como fontes de carbono. A cistina é requerida por, aproximadamente, 10% das amostras, sendo que algumas podem utilizar sais de amônio como única fonte de nitrogênio. Sua multiplicação é estimulada por dióxido de carbono (CO₂) e umidade. A transferência gênica ocorre por conjugação e transformação (HOLT *et al.*, 1994; GARRITY; BELL; LILBURN, 2004; PROCOP; KONEMAN, 2016).

N. meningitidis é uma bactéria fastidiosa, que morre em poucas horas quando em superfícies inanimadas. A temperatura ótima de multiplicação é de 35-37°C, com atmosfera de CO₂ entre 5 e 10% e umidade (50%). A bactéria é, habitualmente, cultivada em meios suplementados com sangue, nos quais formam colônias acinzentadas, redondas, convexas, úmidas e brilhantes, com uma borda claramente definida e não hemolíticas (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

A virulência de uma linhagem meningocócica pode ser definida pelo número de casos de doença que ocorrem em uma população após colonização (STEPHENS, 2007). Alguns grupos clonais meningocócicos são caracterizados por altas taxas de doença após colonização da nasofaringe, especialmente quando introduzidos pela primeira vez em uma população. Por exemplo, membros do complexo clonal ST-11, podem causar doença meningocócica invasiva em uma a 20 pessoas a cada 400 colonizações (RAYMOND *et al.*, 1997).

A identificação clássica do meningococo é realizada pelo exame microscópico após coloração de Gram e visualização de diplococos Gram-negativos e por reações de oxidase e catalase positivas. A confirmação é feita pelo teste de utilização de carboidratos (metabolização de glicose e maltose, mas não de sacarose e lactose) (HOLT *et al.*, 1994). É possível, também, empregar sistemas automatizados de identificação atualmente disponíveis. Basicamente, os sistemas automatizados baseiam-se na utilização de um painel de provas bioquímicas ou no espectro de massas por MALDI-TOF e comparação com uma base de dados de referência (VALENZA *et al.*, 2007; BISHOP *et al.*, 2018).

Adicionalmente, técnicas de genética molecular e sistemas de detecção de antígenos capsulares também podem ser empregados para identificação do microrganismo. Neste sentido, a detecção dos genes *ctrA* e *sodC* por PCR e o sequenciamento do rDNA 16S e do

gene *rplF* podem ser utilizados (SACCHI *et al.*, 2002; DOLAN THOMAS *et al.*, 2011; SACCHI *et al.*, 2011; BENNETT *et al.*, 2014). O teste de aglutinação de látex (LA) é o método de detecção de antígeno capsular mais frequentemente utilizado (BOREL *et al.*, 2006).

1.3 CLASSIFICAÇÃO DE *N. meningitidis*

A classificação de *N. meningitidis* é baseada na diversidade dos antígenos presentes no envelope celular e é utilizada nas investigações epidemiológicas. Com base nos esquemas de tipagem, o meningococo é classificado em grupos, tipos, subtipos e imunotipos, de acordo com a estrutura da cápsula polissacarídica, as proteínas de membrana externa (OMP) PorB (Porinas B) e PorA (Porinas A) e lipooligosacarídeos (LOS), respectivamente (Figura 1) (HARRISON *et al.*, 2013; BENNETT *et al.*, 2014; BRATCHER *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018).

1.3.1 Sorogrupos (antígeno capsular)

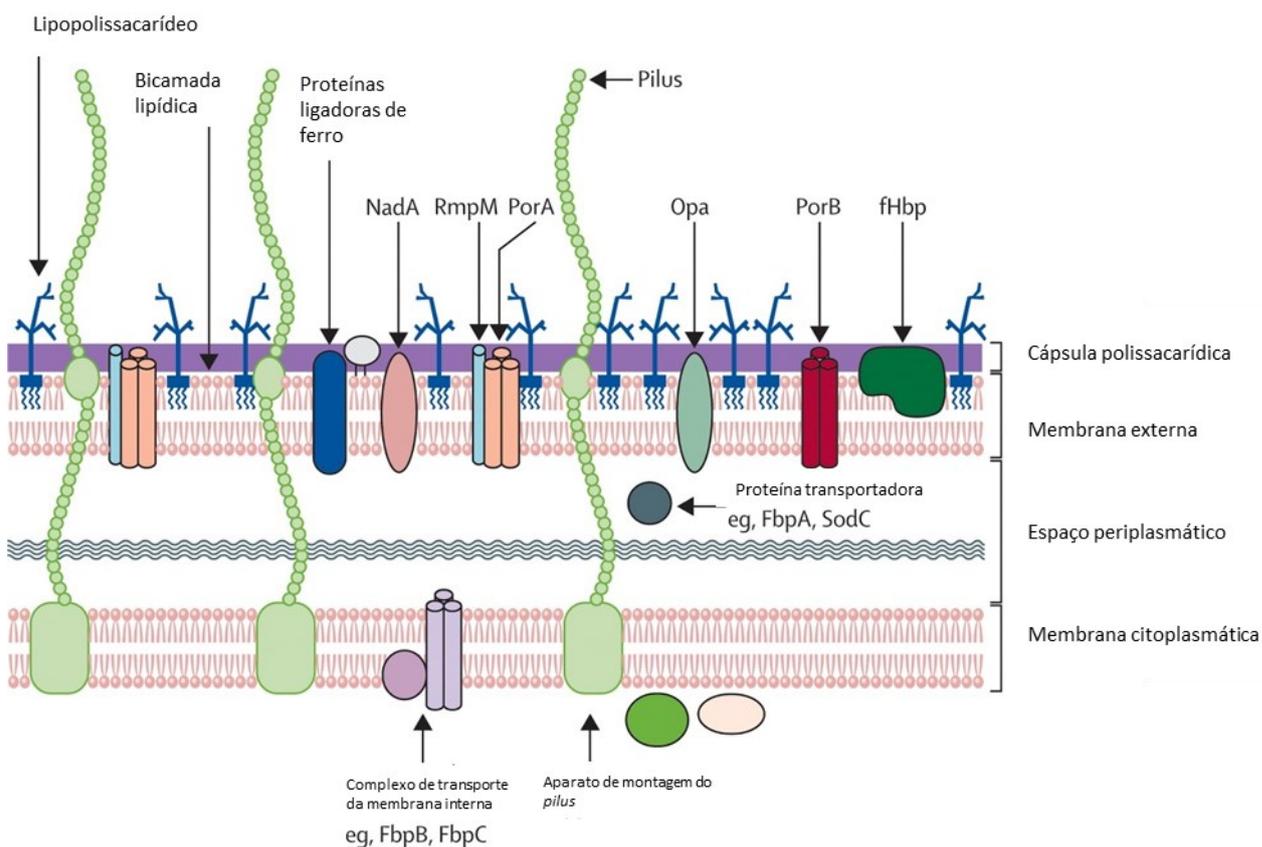
Praticamente todas as amostras clínicas de meningococo e cerca de 50% daquelas isoladas de indivíduos portadores assintomáticos são capsuladas. A cápsula é composta por uma longa cadeia de carboidratos, denominados polissacarídeos capsulares. Além de ser um mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, a capsula serve como proteção contra a dessecação (STEPHENS, 2007; HARRISON *et al.*, 2013; TZENG; THOMAS; STEPHENS, 2016).

Os polissacarídeos capsulares são a base para a classificação de *N. meningitidis* em sorogrupos. Doze cápsulas polissacarídicas foram descritas, com base em diferenças sorológicas (A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y, Z) e as estruturas responsáveis pela especificidade dos sorogrupos foram determinadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Figura 2). Desses 12 sorogrupos, seis (A, B, C, W, X e Y) causam doença meningocócica invasiva. As cápsulas polissacarídicas dos sorogrupos A, C, W e Y são a base para as vacinas conjugadas polissacarídicas (HARRISON *et al.*, 2013).

Os mecanismos moleculares envolvidos na síntese dos polissacarídeos capsulares foram elucidados e os genes envolvidos na biossíntese dos polissacarídeos e translocação

para superfície celular estão agrupados em um único *locus* cromossômico, denominado *cps*. No *locus cps*, a organização genética é semelhante em todos os sorogrupos e a região A contém os genes que conferem a especificidade de cada um deles (Figura 3). Transferência genética horizontal de genes do *locus cps* na região A foi evidenciada em amostras dos sorogrupos H, I, K e Z, indicando a aquisição de genes de fontes externas, incluindo de espécies bacterianas como *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mannheimia haemolytica* (HARRISON *et al.*, 2013).

Figura 1 - Estrutura da superfície celular de *Neisseria meningitidis*.



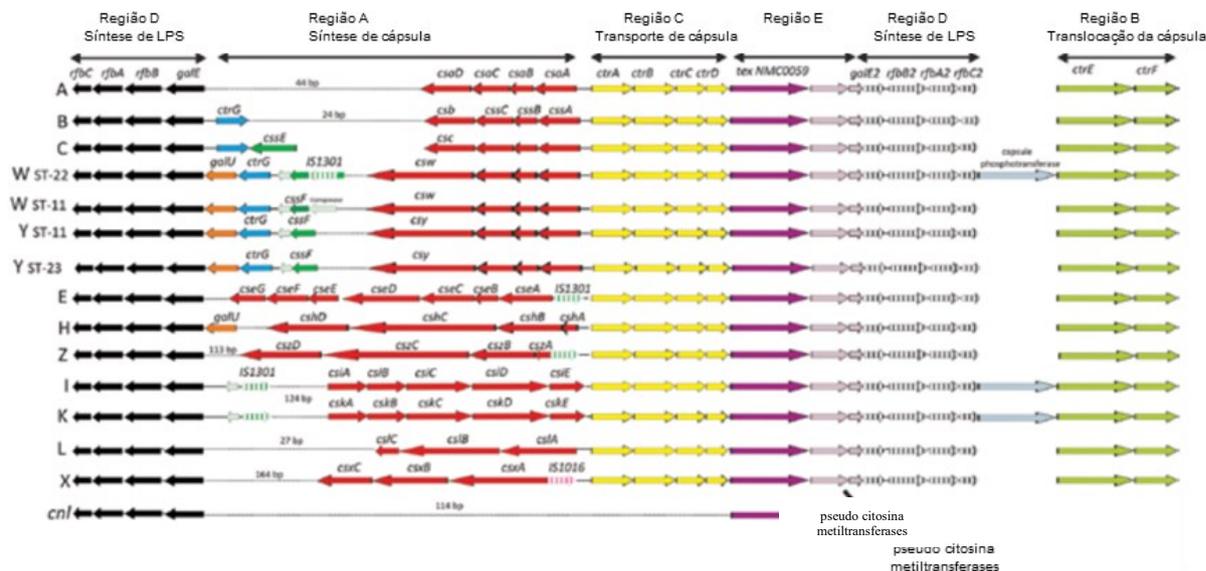
Legenda: A classificação sorológica de *N. meningitidis* baseia-se na cápsula polissacarídica (sorogrupo), nas proteínas da membrana externa PorB (sorotipo) e PorA (sorosubtipo) e lipopolissacarídeos (imunotipo). Outros componentes importantes da membrana externa incluem as proteínas fHbp e NadA. Fonte: adaptado de SADARANGANI; POLLARD, 2010).

Figura 2 - Estrutura bioquímica dos polissacarídeos capsulares de *Neisseria meningitidis*.

Sorogrupo	Unidade estrutural repetida	Acetilação
<u>A</u>	$\begin{array}{c} \text{ManNAc-(1-P} \rightarrow 6\text{)-} \\ \\ 3 \\ \\ \text{OAc} \end{array}$	(+)
<u>B</u>	$\text{NeuNAc-(2} \xrightarrow{\alpha} \text{8)-}$	(-)
<u>C</u>	$\begin{array}{c} \text{NeuNAc-(2} \xrightarrow{\alpha} \text{9)-} \\ \quad \\ 7\text{-OAc} \quad 8\text{-OAc} \end{array}$	(+)
<u>Y</u>	$\begin{array}{c} 6\text{-Glc-(1} \rightarrow 4\text{)- NeuNAc-(2} \rightarrow 6\text{)-} \\ \quad \\ \alpha \quad \text{OAc} \quad \alpha \end{array}$	(+)
<u>W</u>	$\begin{array}{c} 6\text{-Gal-(1} \rightarrow 4\text{)- NeuNAc-(2} \rightarrow 6\text{)-} \\ \quad \\ \alpha \quad \text{OAc} \quad \alpha \end{array}$	(+)
<u>X</u>	$\text{GlcNAc-(1-P} \xrightarrow{\alpha} \text{4)-}$	(-)
E	$\begin{array}{c} \text{GalNAc-(1} \rightarrow 7\text{)-} \beta\text{-KDO - (2} \rightarrow 3\text{)-} \\ \quad \\ \beta \quad 4, \text{5OAc} \quad \alpha \end{array}$	(+)
H	$\alpha\text{-Gal-(1} \rightarrow 2\text{)- Gro-(3-P} \rightarrow 4\text{)-}$	(-)
I	$\alpha\text{-L-GluNAcA-(1} \rightarrow 3\text{)-} \beta\text{-D-ManNAcA-(1} \rightarrow 4\text{)-}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad 4\text{-OAc}$	(+)
K	$\beta\text{-D-ManNAcA-(1} \rightarrow 4\text{)-} \beta\text{-D-ManNAcA-(1} \rightarrow 3\text{)-}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad 4\text{-OAc}$	(+)
L	$\beta\text{-GlcNAc-(1} \rightarrow 3\text{)-} \beta\text{-GlcNAc-(1} \rightarrow 3\text{)- GlcNAc-(1-P-3)-}$	(-)
Z	$\alpha\text{-GalNAc-(1} \xrightarrow{\alpha} \text{1')- Gro-(3'-P} \xrightarrow{\alpha} \text{4)-}$	(-)

Legenda: Patogênicas: negrito sublinhado. Fonte: adaptado de (TZENG; THOMAS; STEPHENS, 2016).

Figura 3 - Organização genética do *locus cps* entre os sorogrupos de *Neisseria meningitidis*.



Fonte: (HARRISON *et al.*, 2013).

Eventos de recombinação gênica influenciam a expressão da cápsula meningocócica. A colonização da nasofaringe por amostras de sorogrupos diferentes e a transferência de material genético dos *clusters cps* resultam em troca capsular *in vivo*. O fenômeno de troca capsular em meningococo foi relatado pela primeira vez em 1997, em um surto de sorogrupo B no Noroeste do Pacífico dos EUA. Meningococos do sorogrupo B complexo clonal cc32 foram inicialmente isolados, mas, depois de vários anos do início do surto, casos associados a amostras do sorogrupo C cc32 passaram a ser detectados. É possível, também, a ocorrência de alterações dos genes de biossíntese capsular em amostras de meningococos, podendo resultar em fenótipos não encapsulados (SWARTLEY *et al.*, 1997; STEFANELLI *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, a classificação fenotípica de *N. meningitidis* é feita por meio de tipagem sorológica. A identificação dos sorogrupos em laboratório é feita empregando-se as técnicas de sorogrupagem (aglutinação em lâmina, padrão-ouro), aglutinação do látex ou PCR (HARRISON; CLAUS; JIANG; BENNETT *et al.*, 2013).

1.3.2 Sorotipos

A classificação do meningococo em sorotipos é baseada na diversidade antigênica das proteínas de membrana externa denominadas PorB de classes 2 (PorB2) ou 3 (PorB3) ou do gene que codifica PorB, nomeado *porB* (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985; HITCHCOCK, 1989; BUTCHER; SARVAS; RUNEBERG-NYMAN, 1991; TANABE; NIMIGEAN; IVERSON, 2010). Essas proteínas foram escolhidas porque todas as amostras de meningococo apresentam uma das duas proteínas, mas não ambas, e, portanto, são ditas classes excludentes. São as classes de proteínas que predominam na membrana externa. Não variam entre amostras relacionadas geneticamente e apresentam alto grau de variação antigênica que se mostra útil no processo de caracterização do grupo. A identificação dos sorotipos é realizada utilizando-se a técnica de *immunoblot*, empregando-se anticorpos monoclonais (MAbs), ou PCR e sequenciamento de DNA (VOGEL, 2010).

1.3.3 Sorosubtipos

Os sorosubtipos são definidos pela análise da variação das proteínas de membrana externa de classe 1 (PorA) e do gene responsável por sua codificação, designado *porA* (BARLOW; HECKELS; CLARKE, 1989; HITCHCOCK, 1989). A identificação dessas variantes permanece importante, pois a proteína PorA é um componente imunogênico de destaque de várias vacinas meningocócicas em desenvolvimento e as características de PorA são usadas para fornecer informações epidemiológicas relevantes. As proteínas de classe 1 têm sido um componente importante na formulação de vacinas contra o sorogrupo B. Assim como os sorotipos, a determinação dos sorosubtipos é realizada utilizando-se a técnica de *immunoblot*, com MAbs, PCR e sequenciamento das regiões *porA* VR1 e VR2 (SACCHI *et al.*, 1998; MAIDEN *et al.*, 1999; RUSSELL *et al.*, 2004; VOGEL, 2010).

A padronização do esquema de sorotipagem dos antígenos de superfície do meningococo foi feita à semelhança do esquema de tipagem de *Escherichia coli* e *Salmonella*. Por conseguinte, uma amostra de *N. meningitidis* identificada como B:4:P1.15, significa que ela pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4, sorosubtipo P1.15. As nomenclaturas designadas como NT e nt, significam, respectivamente, que as proteínas de sorotipo e sorosubtipo não puderam ser caracterizadas pelo painel de anticorpos monoclonais

disponível (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985). Mais recentemente, a nomenclatura do esquema de subtipagem foi revisto, devido ao avanço das técnicas de subtipagem molecular, e, atualmente, quando um protótipo de VR familiar ou a primeira sequência pertencente a uma família é identificado, nenhum número variante é usado. Por exemplo, uma proteína VR1 da família 5, variante 3 e um protótipo de VR2 da família 10 seria escrita como: P1.5-3,10. Este esquema foi, então, usado para renomear todas as variantes examinadas (RUSSELL *et al.*, 2004). Um banco de dados foi disponibilizado para subsidiar o procedimento (disponível em <http://neisseria.org/nm/typing/pora>).

1.3.4 Imunotipos

As amostras de *N. meningitidis* expressam uma gama diversificada de lipopolissacarídeos (LPS) ou lipooligossacarídeos (LOS) localizadas na parede celular, que foram classificados em 12 imunotipos (L1-12). Uma característica do LPS meningocócico é a reversibilidade, ocasionada pela alta frequência de troca de expressão (variação de fase) de estruturas do LPS terminal (troca entre imunotipos). Por isso, uma limitação do atual sistema de imunotipagem é que uma estirpe particular é tipificada com base no imunotipo que está sendo expresso no momento da avaliação. O potencial de uma dada amostra alternar entre imunotipos (seu repertório de variação de fase) não pode ser determinado por este ensaio imunológico. Assim, uma célula bacteriana pode apresentar um ou mais determinantes de imunotipos ou, ainda, simplesmente não expressar nenhum, o que fez com que a classificação em imunotipos não fosse utilizada como marcador epidemiológico. A imunotipagem é realizada empregando um painel de MAbs ou sequenciamento de DNA (ZUGHAIER *et al.*, 2004; PLANT *et al.*, 2006; ZUGHAIER *et al.*, 2007).

O tipo de estrutura de LPS expressa é um fator chave na interação com o hospedeiro. Por exemplo, amostras que expressam a adesina Opc e o LPS do imunotipo L3 não são invasivas; já bactérias que expressam o imunotipo L8 o são (MAIDEN *et al.*, 1999).

1.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

A tipagem molecular pode ser realizada por múltiplas técnicas, incluindo *multilocus sequence typing* (MLST) e *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). MLST é a técnica padrão ouro para tipagem molecular e identificação de complexos clonais hipervirulentos. Os meningococos são geneticamente classificados em *sequence types* (ST) pelo MLST e ST similares são agrupados no mesmo complexo clonal (cc) (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). O MLST é usado para monitorar a epidemiologia da doença meningocócica e comparação global entre amostras de meningococo através de banco de dados internacional (<https://pubmlst.org/neisseria/>). O MLST permite a identificação de clones epidêmicos, assim como a ocorrência de permuta capsular entre amostras, pois o ST é independente do sorogrupo (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012; HARRISON *et al.*, 2013; MOWLABOCCUS *et al.*, 2017; BRASIL, 2019).

A técnica PFGE tem sido utilizada para determinar o quão relacionadas são amostras suspeitas de ocasionar surtos/epidemias, além de ser capaz de identificar subclones de um mesmo clone e, por isso, vem sendo usada para caracterizar amostras de *N. meningitidis* isoladas de surtos ou estudos locais/regionais (TENOVER *et al.*, 1995). Frequentemente, PFGE e MLST são usados combinados. Assim, PFGE pode detectar diferenças sutis entre amostras de um mesmo clone identificado pelo MLST e há excelente correlação entre os dados epidemiológicos e os *clusters* obtidos. Assim, PFGE é particularmente útil para estudos de epidemiologia regional ou rastreamento da disseminação de clones durante surtos/*clusters* de casos (POPOVIC *et al.*, 2001; BREHONY; JOLLEY; MAIDEN, 2007; CORDEIRO *et al.*, 2018).

Tipagens moleculares adicionais das porinas A e B (PorA e PorB) e da enterobactina regulada por ferro (FetA) são usadas para refinar a tipagem, enquanto que caracterização da proteína de ligação ao fator H (FHbp), adesina A de *Neisseria* (NadA) e antígeno de ligação à heparina de *Neisseria* (NHBA) são utilizadas para fornecer informações sobre a cobertura conferida pelas vacinas meningocócicas MenB-4C (*Bexsero*, Novartis Vaccines) e MenB-FHbp (*Trumenba*, Wyeth Pharmaceuticals) (RUSSELL *et al.*, 2004; JOLLEY; BREHONY; MAIDEN, 2007; MUSTAPHA *et al.*, 2015).

1.5 DOENÇA MENINGOCÓCICA

N. meningitidis é o agente etiológico da doença meningocócica, caracterizada por sepse e/ou meningite bacteriana. A doença meningocócica está associada à alta letalidade (até 50% quando não tratada) e alta frequência (mais de 10%) de sequelas graves. Em 2017, mais de 400.000 casos e quase 30.000 mortes foram atribuídas à meningite meningocócica no mundo. O tratamento precoce com antimicrobianos é a medida mais importante para salvar vidas e reduzir complicações (SERRA *et al.*, 2020).

O microrganismo é observado na nasofaringe humana. *N. meningitidis* é transportada de forma assintomática por uma proporção importante da população humana e é transmitida entre indivíduos através de secreções respiratórias. A maior parte dos indivíduos será portadora assintomática e apenas uma pequena proporção dos indivíduos infectados desenvolve doença grave (BRYNILDSDRUD *et al.*, 2018; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012).

O perfil epidemiológico da DM é variável de acordo com a localidade e ao longo do tempo (TAHA *et al.*, 2000). Essas variações são devidas a vários fatores, incluindo as características patogênicas da bactéria, o sorogrupo circulante, a idade do paciente, o comportamento social do indivíduo (consumo de álcool, tabagismo, uso de drogas, frequentadores de boates, discotecas e bares), o estado imunitário prévio, a situação epidemiológica local, a porta de entrada do foco séptico inicial, a existência de aglomerados populacionais, instituições educacionais e militares e as características socioeconômicas da população e do meio ambiente. As características de patogenicidade são baseadas no seu genoma transformável e na expressão de antígenos capsulares e não capsulares (OMP) (TAHA *et al.*, 2000; RAM, 2014; LEWIS; YEZLI *et al.*, 2016; BRASIL, 2019).

A transmissão ocorre de pessoa a pessoa através das vias respiratórias, por contato íntimo com gotículas e secreções da nasofaringe. O percentual da população que se apresenta como portador assintomático intermitente do meningococo varia bastante, entre 1 e 40%, e a duração do estado de portador depende da idade do indivíduo e do comportamento social e não segue a sazonalidade da doença. A doença, geralmente, ocorre de 1 a 10 dias após a exposição e apresenta-se como meningite em $\geq 50\%$ dos casos (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Os sinais e sintomas mais frequentemente encontrados nos casos de doença meningocócica são febre, cefaleia intensa, vômito, náusea, rigidez de nuca, sinal de kernig e brudzinski (BRASIL, 2019). Nas septicemias, podem ocorrer presença de petéquias e

sufusões hemorrágicas; neonatos podem não apresentar manifestações específicas, o que leva à necessidade de se observar a presença de febre, irritabilidade ou agitação, grito meníngeo ou recusa alimentar, acompanhada ou não de vômito, convulsão e abaulamento da fontanela (READ, 2014; SPENCE DAVIZON *et al.*, 2018).

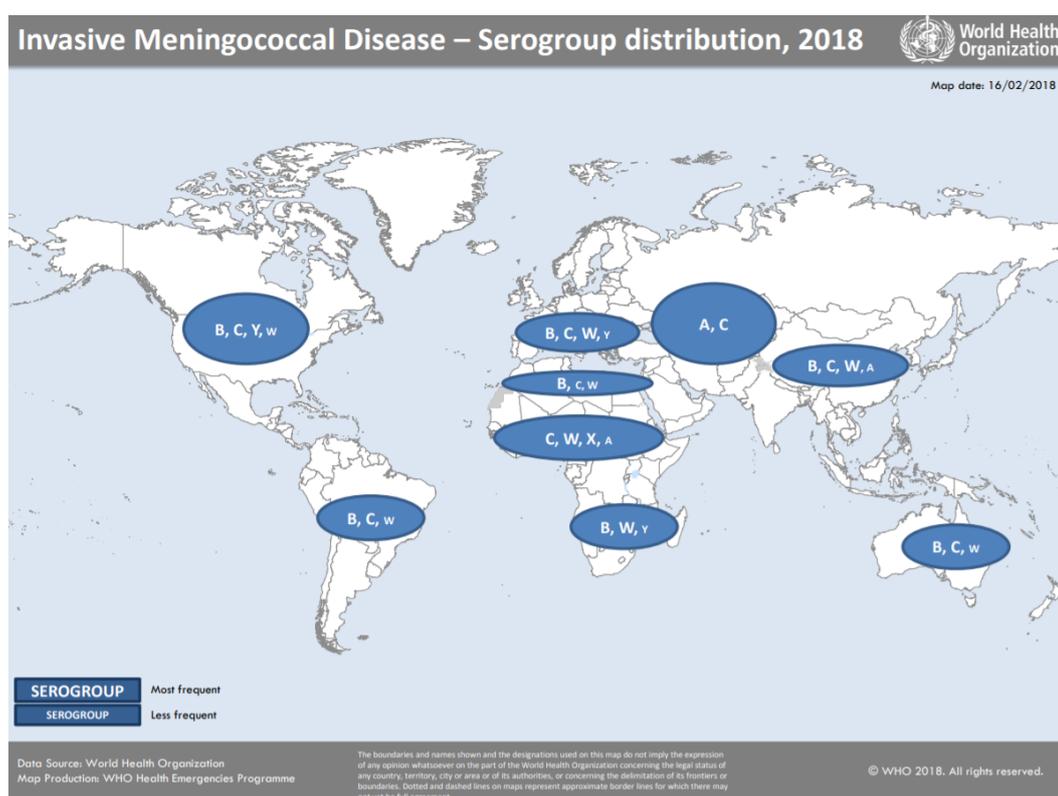
A maioria dos pacientes evolui para a cura quando há diagnóstico e tratamento precoces. A presença de sequelas pode ocorrer, sendo, as mais comuns, perda de audição, distúrbio de linguagem, retardo mental, anormalidade motora e distúrbios visuais. A imunidade após a infecção meningocócica é sorogrupo-específica (IVERSSON, 1976). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda que a antibioticoterapia seja instituída o mais precocemente possível, de preferência, logo após a punção lombar e a coleta de sangue para hemocultura. O uso de antimicrobianos deve ser associado a outros tipos de tratamento de suporte, como reposição de líquidos e assistência cuidadosa. Uma variedade de fármacos antimicrobianos pode ser empregada para tratamento dos pacientes, incluindo penicilina, ampicilina e ceftriaxona (BRASIL, 2019). O diagnóstico laboratorial é, geralmente, feito pelo isolamento de *N. meningitidis* a partir de cultura do líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou sangue, coloração de Gram, detecção de antígenos no LCR e/ou soro pelo teste de aglutinação do látex e pela detecção de DNA do meningococo por qPCR (IVERSSON, 1976; SPENCE DAVIZON *et al.*, 2018).

No Brasil, a doença meningocócica é endêmica e sua incidência é alta, aproximadamente 1,6 casos por 100.000 habitantes, com a ocorrência de surtos relatada em diferentes regiões (SÁFADI *et al.*, 2013). Os sorogrupos A, B, C, Y, W e X são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de doença invasiva e, portanto, de surtos/epidemias em todo o mundo, conforme pode ser observado na Figura 4. No que se refere à classificação genética em ST, poucos estudos foram conduzidos no Brasil, inclusive, considerando-se surtos/epidemias e períodos pré e pós introdução da vacinação (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012; HARRISON *et al.*, 2013; MOWLABOCCUS *et al.*, 2017; BRASIL, 2019).

Nas últimas décadas, o Brasil passou por períodos epidêmicos. Entre os anos de 1920 e 1940, os casos de DM por *N. meningitidis* sorogrupo A predominaram. Já na década de setenta, houve uma sobreposição de duas epidemias, uma causada por amostras do sorogrupo C, que começou em 1971, e uma maior, ocasionada pelo sorogrupo A, que começou em 1974 (DE LEMOS *et al.*, 2007). Após uma campanha de vacinação contra os sorogrupos A

e C, a incidência da doença meningocócica caiu, sendo esta queda seguida por aumento da incidência da doença pelo sorogrupo B, em 1977. Esta mudança no perfil de incidência dos sorogrupos ocasionada pela vacinação em massa da população permaneceu até 2002-2003, quando se iniciou a inversão no perfil de incidência dos sorogrupos circulantes. Observou-se aumento na incidência da doença meningocócica ocasionada pelo sorogrupo C, com declínio da incidência da doença associada ao sorogrupo B. Atualmente, o sorogrupo B é a principal causa de DM na Europa e na América do Norte e um dos sorogrupos mais prevalentes na América Latina (DE LEMOS *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2017).

Figura 4 - Distribuição mundial da incidência de sorogrupos de *Neisseria meningitidis* em 2018.



Fonte: <https://www.who.int/emergencies/diseases/meningitis/serogroup-distribution-2018.pdf?ua=1>, acessado em 06/04/2020.

A incidência e a circulação de sorogrupos variam entre as regiões brasileiras. O sorogrupo C tornou-se predominante nas regiões Sudeste (desde 2002-2003), Centro-Oeste (desde 2005-2006), Nordeste (desde 2007-2008), Norte (desde 2008-2009) e, mais recentemente, Sul (desde 2012) (MORAES *et al.*, 2017). Os meningococos invasivos do

sorogrupo C (MenC) vêm aumentando no Brasil, com o complexo clonal cc103 correspondendo a mais de 74% das amostras causadoras de doenças detectadas em 2014. Em 2016, 1119 casos confirmados foram relatados, de acordo com os dados coletados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (MS, 2018). Devido a esse cenário epidemiológico, a vacina conjugada contra o sorogrupo C, fornecida pela Funed, foi introduzida no calendário brasileiro de vacinação em 2010. Apesar disso, casos e surtos causados por MenC cc103 continuaram a ser reportados no Brasil (IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2017; MARIN *et al.*, 2017).

Em nível local, ao longo do ano de 2019, o Brasil registrou 1037 casos de doença meningocócica invasiva, dos quais 463 foram de meningite meningocócica, 286 de sepse e 288 de sepse associada a meningite meningocócica. Minas Gerais registrou 75 casos neste mesmo período, sendo 43 de meningite meningocócica, 21 de meningococemia e 11 de sepse associada a meningite meningocócica. Os municípios de Belo Horizonte (21 casos) e Uberlândia (7 casos) foram responsáveis por notificar 37,3% dos casos em Minas Gerais em 2019 (BRASIL, 2019). Segundo (PRESA *et al.*, 2019), a taxa de incidência da doença meningocócica no estado de Minas Gerais em 2015 era de 0,35 casos/100.000 habitantes. Em 2019, a taxa de incidência em Minas Gerais foi a mesma (BRASIL, 2019).

1.5.1 Prevenção e controle

A imunização é a principal estratégia de prevenção atualmente adotada em centenas de países em todo o mundo. A vacinação, além da prevenção, limita a resistência dos microrganismos a antimicrobianos e propicia atenção e cuidados à saúde de adolescentes, grávidas e recém-nascidos. Existem vacinas efetivas contra cinco dos seis sorogrupos causadores de doença meningocócica (A, B, C, W e Y). As vacinas contra os sorogrupos A, C, W e Y são divididas em polissacarídicas, que são baseadas em combinações de polissacarídeos capsulares grupo-específicos, e conjugadas polissacarídicas, baseadas na conjugação entre o polissacarídeo específico e uma proteína carreadora. As vacinas recombinantes contra o sorogrupo B são formuladas com proteínas de membrana externa (MCCARTHY; SHARYAN; SHEIKHI MOGHADDAM, 2018).

As vacinas polissacarídicas contra *N. meningitidis* disponíveis são seguras e efetivas para indivíduos a partir de dois anos de idade e são recomendadas para a imunização de

rotina de grupos de risco específicos acima desta idade. Elas são, também, recomendadas para uso no controle de epidemias da doença meningocócica através da imunização emergencial em larga escala da população em risco. Atualmente, estão disponíveis a vacina bivalente contra os grupos A e C e a quadrivalente, contra os grupos A, C, W e Y (MCCARTHY; SHARYAN; SHEIKHI MOGHADDAM, 2018).

As vacinas conjugadas polissacarídicas proporcionam uma melhor duração da proteção e memória imunológica, além de serem efetivas em lactentes e jovens. As vacinas conjugadas também interferem na transmissão e reduzem a colonização, resultando em significativa proteção de rebanho (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). Atualmente, estão disponíveis duas opções de vacinas conjugadas polissacarídicas. As vacinas conjugadas monovalentes contra *N. meningitidis* grupo C ou grupo A, que usam as proteínas CRM197 (*diphtheria toxoid* com uma substituição no aminoácido 197) e TT (*tetanus toxoid*) como carreadores e as vacinas conjugadas quadrivalentes contra *N. meningitidis* grupos A, C, Y e W, que usam os carreadores proteicos CRM197, TT ou DT (*diphtheria toxoid*) e dependem da formulação da vacina para a efetividade nas faixas etárias de 2-23 meses, 2-10 anos e 11-55 anos (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018; MCCARTHY; SHARYAN; SHEIKHI MOGHADDAM, 2018).

As vacinas de proteínas recombinantes contra o sorogrupo B são baseadas em proteínas de membrana externa geograficamente específicas (MENTZER; OBERLE; KELLER-STANISLAWSKI, 2018). A vacina adsorvida 4CMenB (*Bexsero*), composta pelas proteínas PorA, FHbp, NHBA e NadA, mostrou-se imunogênica em pacientes pediátricos e foi eficaz, *in vitro*, contra a maioria das amostras do sorogrupo B (efetividade em torno de 81% no Brasil). A vacina bivalente MenB-FHbp (*Trumenba*, MenB-FHbp, *bivalent rLP2086*), composta por quantidades iguais de duas variantes de cada uma das duas subfamílias (subfamílias A e B) imunologicamente diversas de FHbp, foi aprovada para proteção contra a infecção por MenB em pessoas entre 10 e 25 anos de idade nos Estados Unidos e Canadá e para indivíduos com idade ≥ 10 anos na União Europeia e na Austrália (SANTOLAYA *et al.*, 2012; LAW *et al.*, 2014; DONALD *et al.*, 2017; BEESLAAR *et al.*, 2018; MENTZER; OBERLE; KELLER-STANISLAWSKI, 2018).

No Brasil, a vacina conjugada monovalente contra *N. meningitidis* grupo C (MenC), fornecida pela Funed, foi incorporada ao Programa Nacional de Imunização (PNI) em novembro de 2010 e a vacina conjugada tetravalente contra *N. meningitidis* grupos A, C, W

e Y (MenACWY), em abril de 2020. O esquema vacinal infantil é marcado pela administração de três doses da vacina MenC, aos três e cinco meses, uma dose de reforço aos 12 meses de idade e uma segunda dose de reforço entre 11 a 12 anos com a vacina conjugada tetravalente MenACWY. Crianças com 12 a 23 meses no ano de implementação do programa receberam uma dose da vacina MenC. Estudos de avaliação do impacto da introdução da vacina MenC ao PNI verificaram uma redução na incidência da doença meningocócica C no Brasil, na faixa etária alvo, e uma proteção indireta também foi observada. Estimou-se que quase 1000 casos de doença meningocócica C foram evitados após quatro anos do início da vacinação (ANDRADE *et al.*, 2017; MORAES *et al.*, 2017).

O licenciamento recente no Brasil da vacina conjugada quadrivalente (A, C, Y e W) e da vacina proteica contra o meningococo B, em 2016 e 2015, respectivamente, que são consideradas o padrão ouro para prevenção e gestão de surtos, representa, enfim, uma real possibilidade de uma proteção mais abrangente contra a doença meningocócica.

A quimioprofilaxia é a estratégia de controle mais utilizada pelas vigilâncias epidemiológicas para reduzir a morbidade, a mortalidade e prevenir o surgimento de casos secundários a partir de um caso índice (GORLA *et al.*, 2018). Os contatos domiciliares, os colegas de escola e pessoas diretamente expostas às secreções orais de um caso índice de doença meningocócica invasiva apresentam maior risco de adquirir a doença. Após a identificação dos contatos próximos, a quimioprofilaxia antimicrobiana deve ser administrada tão logo possível (idealmente, <24 horas após a identificação do caso índice). No geral, a literatura consultada sugere que o uso em massa da quimioprofilaxia para controle de surtos de doença meningocócica pode fornecer proteção temporária aos indivíduos tratados durante o surto. Os antimicrobianos recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil para a quimioprofilaxia são rifampicina, ceftriaxona e ciprofloxacina, pois são de 90%-95% eficazes na redução de *N. meningitidis* na nasofaringe de seres humanos (TUNKEL *et al.*, 2004; HARCOURT *et al.*, 2015; TELISINGHE *et al.*, 2015; MCNAMARA *et al.*, 2018; BRASIL, 2019).

1.5.2 Tratamento e resistência bacteriana

Embora a penicilina G permaneça sendo o antimicrobiano de escolha para o tratamento de indivíduos com doença meningocócica invasiva em muitos países, amostras

clínicas resistentes ou com resistência intermediária a este medicamento têm sido relatadas em todo o mundo. Em *N. meningitidis*, CIM > 2 mg/L de penicilina está associada à produção da enzima β -lactamase mediada por plasmídeo, mas este fenótipo é extremamente raro (OPPENHEIM, 1997). Já amostras com perfil de resistência intermediária à penicilina (CIM 0,12-0,25 mg/L) eram incomuns no Brasil até 2010 e sua frequência variava de acordo com a região geográfica. Segundo o informe regional SIREVA II, a resistência intermediária à penicilina no Brasil correspondia a 12,6% das amostras analisadas em 2010 (OPS, 2011). Entretanto, em 2016, o percentual reportado no informe regional SIREVA II tinha aumentado significativamente, atingindo 56,5% das amostras testadas (OPS, 2017). O mecanismo de resistência intermediária dessas amostras com suscetibilidade reduzida à penicilina envolve a expressão de formas alteradas de uma das quatro proteínas de ligação à penicilina (PBP) que estão envolvidas na biossíntese do peptidoglicano durante a divisão celular. Todavia, embora o tratamento de pacientes com doença meningocócica invasiva com penicilina ainda seja efetivo contra essas amostras com perfil de suscetibilidade intermediário de resistência à penicilina, regimes de tratamento com baixa dose podem falhar em casos que envolvam amostras resistentes ao antimicrobiano (CIM > 0,5 mg/L) (OPS, 2011; IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012; ZAPUN; MORLOT; TAHA, 2016; OPS, 2017; DI CAPRIO *et al.*, 2017; GORLA *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2018).

A redução da suscetibilidade à penicilina G em *N. meningitidis* tem sido relacionada a alterações na proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2), codificada pelo gene *penA*, especificamente por causa da substituição de cinco aminoácidos (F504L, A510V, I515V, G541N e I566V). O gene *penA* em *N. meningitidis* é composto por 1746-1749 pares de bases, que codifica a proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2) composta por 581-582 aminoácidos. Sendo que o fenótipo de redução da suscetibilidade à penicilina G (fenótipo pen^I) está associado a ocorrência de mutações, que causam substituições de aminoácidos, em uma região de 402 pares de bases do gene *penA* associado ao sítio ativo da proteína. O gene *penA* de amostras suscetíveis apresentam sequências de DNA semelhantes, mas, aquelas com suscetibilidade reduzida à penicilina G apresentam alta variabilidade na sequência do gene *penA* (FONSECA *et al.*, 2017; TAHA *et al.*, 2007).

O tratamento empírico de pacientes com doença meningocócica no Brasil é baseado na utilização de ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração. Recentemente, o fenômeno de resistência à ceftriaxona também vem sendo descrito em algumas regiões do

mundo (África e Europa) (ALEMAYEHU; MEKASHA; ABEBE, 2017). Em amostras resistentes a cefalosporinas de terceira geração foi observada a presença de um novo alelo *penA*, *penA327*, que também foi detectado em amostras obtidas de pacientes com uretrite gonocócica (DEGHMANE; HONG; TAHA, 2017). A vigilância da disseminação dessas amostras resistentes deve ser intensificada, pois elas podem comprometer o uso das cefalosporinas no tratamento de pacientes com doença meningocócica invasiva.

A resistência aos fármacos utilizados na quimioprofilaxia é rara, mas, crescente. Recentemente, no Brasil, foram identificadas amostras resistentes à ciprofloxacina e à rifampicina (GORLA *et al.*, 2018; GORLA *et al.*, 2018). A resistência à ciprofloxacina foi associada a mutações nas regiões determinantes da resistência às quinolonas (QRDRs) dos genes *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima DNA girase, e *parC*, que codifica a enzima topoisomerase IV (CASTANHEIRA *et al.*, 2012). Já a resistência à rifampicina está relacionada à ocorrência de mutações na região central do gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da enzima RNA polimerase (TAHA *et al.*, 2010; MOUNCHETROU *et al.*, 2012).

O significado clínico dessas mudanças na suscetibilidade do microrganismo não é claro. Há um relato na literatura de um caso, nos Estados Unidos, de resistência à rifampicina em uma amostra de *N. meningitidis* isolada de uma criança que contraiu a doença meningocócica do irmão (RAINBOW *et al.*, 2005).

Assim, com o aumento da frequência de amostras de *N. meningitidis* com redução de suscetibilidade à penicilina e da resistência à ceftriaxona, à ciprofloxacina e à rifampicina, antimicrobianos indicados para tratamento e quimioprofilaxia, segundo o Ministério da Saúde, faz-se necessária a pesquisa dos mecanismos moleculares de resistência associados aos fenótipos intermediários ou resistentes das amostras que circulam no estado de Minas Gerais, para uma melhor compreensão da incidência destes mecanismos ao longo do tempo e sua associação com clones emergentes. Este estudo contribui para o melhor conhecimento, ainda escasso, relativo às mudanças nos padrões de suscetibilidade antimicrobiana e a caracterização desses clones no estado de Minas Gerais.

2 JUSTIFICATIVA

A resistência bacteriana a antimicrobianos é, atualmente, um dos problemas de saúde pública mais relevantes em todo o mundo. O desenvolvimento de resistência antimicrobiana é um fenômeno natural e tem sofrido uma expansão muito acelerada devido à utilização inadequada destes fármacos. O fenômeno é responsável por consequências clínicas e econômicas graves, relacionadas com o aumento de morbidade e mortalidade. A resistência antimicrobiana eleva os custos dos cuidados de saúde, o que constitui um problema particularmente relevante, considerando os recursos finitos que sustentam o Sistema Único de Saúde (SUS) e tendo em conta a atual conjuntura de crise econômica e financeira. A doença meningocócica é um grave problema de saúde pública no estado de Minas Gerais e a falta de publicações científicas sobre a epidemiologia da doença em Minas Gerais faz com que as medidas de prevenção e controle sejam adotadas com base em dados de outras regiões. A realização da tipagem molecular das amostras é importante por fornecer informações sobre o monitoramento das mudanças na incidência dos complexos clonais de *N. meningitidis*, o que não pode ser verificado pelos métodos tradicionais de fenotipagem. Neste contexto, com o aumento do número de relatos de amostras clínicas de *N. meningitidis* que apresentam resistência de nível intermediário ou resistência à penicilina G, assim como de amostras resistentes à ciprofloxacina e à rifampicina que ainda não tinham sido descritas no País até 2016, faz-se importante o estudo dos mecanismos moleculares associados a estes fenótipos, que possibilitem compreender o desenvolvimento e a propagação da resistência a antimicrobianos entre amostras do microrganismo. Assim, acreditamos que os resultados deste estudo geram informações epidemiológicas relevantes que podem subsidiar a avaliação de novos protocolos que se façam necessários, visando a prevenção e o controle da doença meningocócica no Estado, contribuindo para tornar a assistência à saúde mais efetiva, por meio do uso adequado de antimicrobianos e da detecção do surgimento de resistência microbiana associada a clones emergentes no estado de Minas Gerais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características e mecanismos de resistência de *N. meningitidis* causadoras de doença meningocócica isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais entre 2017 e 2019.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as amostras de *N. meningitidis* isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais entre 2017 e 2019.
- Analisar os dados secundários dos pacientes, cujas amostras bacterianas foram isoladas, contidos nas fichas de notificação e investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos de uso clínico contra *N. meningitidis* e avaliar a associação da resistência com mutações nos genes *penA*, *gyrA* e *rpoB*, respectivamente.
- Incorporar estas tecnologias para estudo de epidemiologia molecular pela FUNED, como passo essencial para fortalecer a vigilância epidemiológica das meningites bacterianas no estado de Minas Gerais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MODELO DE ESTUDO

Para alcançar os objetivos propostos, foi realizado um estudo retrospectivo, descritivo e epidemiológico de caracterização molecular, por meio das técnicas de *multilocus sequence typing* (MLST), *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), e sequenciamento do gene *penA*, de *N. meningitidis* isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais.

4.2 LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Referência Regional para meningites bacterianas do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças do Instituto Octávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias - Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN-MG) e conta com suporte do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública são as unidades de prestação de serviços que têm como atividade principal a execução de análises laboratoriais para identificação de agentes etiológicos, as análises e monitoramento de produtos e serviços sob controle sanitário, a pesquisa científica e a participação em inquéritos epidemiológicos. Outras atividades de importância são a padronização de métodos e técnicas de diagnóstico e a supervisão e treinamento de recursos humanos. Com relação a vigilância da Doença meningocócica, o LACEN-MG recebe a maioria das amostras biológicas de casos suspeitos de meningite bacteriana da rede pública de saúde de MG para realização de exames laboratoriais e é responsável pela produção e distribuição de kits de coleta de amostras biológicas para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas às unidades de saúde pública de Minas Gerais.

O estudo foi realizado no estado de Minas Gerais, Brasil, que possuía, em 2019, uma população estimada de 21.168.791 habitantes, segundo o IBGE (<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/panorama>, acessado em 04/02/2020).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foi incluída no estudo a coleção de amostras de *N. meningitidis* isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais entre janeiro de 2017 e dezembro de 2019.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Amostras de *N. meningitidis* isoladas de casos de meningite bacteriana e/ou meningococemia no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais entre janeiro de 2017 e dezembro de 2019 que não apresentarem viabilidade após armazenamento.

4.5 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado para amostra não probabilística (amostra de conveniência) conforme descrito na tabela 1.

Tamanho de amostra proposta para a pesquisa para o intervalo de confiança de 95% e período de 3 anos: 35 amostras bacterianas de *N. meningitidis*.

Tabela 1 - Cálculo do tamanho da amostra para a frequência em uma população

Tamanho da população:	21119536
Frequência esperada (<i>p</i>):	1%+/-5
Margem de erro aceitável:	5%
Efeito de desenho:	1
Tamanho da Amostra (<i>n</i>) para vários Níveis de Confiança	
Intervalo de Confiança (%)	Tamanho da amostra
95%	16

Fonte: Número médio de casos de DM em MG, 2017 a 2019 = 71 (Fonte: SINAN acessado em 12/08/2020); População estimada de Minas Gerais (MG) em 2019: 21.168.791 habitantes (Fonte: IBGE acessado em

12/08/2020); Incidência média da doença meningocócica em Minas Gerais entre 2017-2019 = 0,33 casos por 100.000 habitantes. Cálculo software OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto--SSPropor.

4.6 ANÁLISE EXPERIMENTAL

4.6.1 População do estudo

A população do estudo consistiu em 35 amostras bacterianas isoladas de espécimes biológicos (líquido cefalorraquidiano ou sangue) entre 2017 e 2019 (Tabela 2), de casos suspeitos de meningite bacteriana e/ou meningococemia, provenientes da rede pública de saúde do estado de Minas Gerais, Brasil.

O banco de informações utilizado como fonte de dados secundários demográficos, clínicos, epidemiológicos e laboratoriais do estudo foi criado com informações sobre as amostras bacterianas a partir dos dados contidos nas fichas de notificação e investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

Tabela 2 – Amostras bacterianas analisadas.

Registro	Ano	Origem	Material	Idade	Gênero	Bactéria
087/17	2017	Itaúna	LCR	17	M	Nm
287/17	2017	Uberlândia	LCR	21	M	Nm
273/17	2017	São Sebastião do Paraíso	LCR	5	F	Nm
307/17	2017	Belo Horizonte	LCR	30	M	Nm
147/17	2017	Uberlândia	LCR	25	F	Nm
132/17	2017	Uberlândia	LCR	4	M	Nm
163/17	2017	Uberlândia	SANGUE	40	F	Nm
497/17	2017	Belo Horizonte	LCR	2 meses	M	Nm
026/18	2018	Uberlândia	SANGUE	11	M	Nm
102/18	2018	Frutal	LCR	29	M	Nm
085/18	2018	Passos	LCR	1	F	Nm
053/18	2018	Uberlândia	SANGUE	20	M	Nm
063/18	2018	Uberlândia	SANGUE	20	F	Nm
064/18	2018	Uberlândia	SANGUE	50	M	Nm
251/18	2018	Belo Horizonte	LCR	39	F	Nm
261/18	2018	Leopoldina	LCR	7	M	Nm
127/18	2018	Uberlândia	SANGUE	37	F	Nm
307/18	2018	Belo Horizonte	LCR	42	F	Nm
336/18	2018	Uberlândia	LCR	5	F	Nm
342/18	2018	Divinópolis	LCR	67	F	Nm
353/18	2018	Contagem	LCR	23	F	Nm
488/18	2018	Visconde do Rio Branco	LCR	47	F	Nm
492/18	2018	Leopoldina	LCR	3	F	Nm
227/18	2018	Belo Horizonte	LCR	74	F	Nm
26/19	2019	Belo Horizonte	SANGUE	33	M	Nm
87/19	2019	Uberlândia	LCR	42	M	Nm
88/19	2019	Brasília de Minas	LCR	14	F	Nm
146/19	2019	Alfenas	LCR	2 meses	F	Nm
371/19	2019	Belo Horizonte	LCR	50	F	Nm
386/19	2019	Ubá	LCR	23	F	Nm
216/19	2019	Belo Horizonte	SANGUE	53	M	Nm
220/19	2019	Belo Horizonte	SANGUE	76	F	Nm
546/19	2019	Belo Horizonte	LCR	35	M	Nm
554/19	2019	Araxá	LCR	56	M	Nm
672/19	2019	Capelinha	LCR	26	F	Nm

Legenda: LCR: líquido, M: masculino, F: feminino, Nm: *Neisseria meningitidis*.

4.6.2 Conservação das amostras bacterianas

As amostras de *N. meningitidis* foram criopreservadas a -80°C , em criotubos contendo BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescido de 20% de glicerol.

4.6.3 Identificação bacteriana

4.6.3.1 Cultivo das amostras bacterianas

As amostras bacterianas foram manipuladas após cultivo em Ágar Chocolate suplementado com VX (Funed, 2019), em estufa bacteriológica de CO_2 a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em ar contendo 5% de CO_2 por 18-24 horas.

4.6.3.2 Identificação bioquímica

A identificação bioquímica de *N. meningitidis* foi realizada por meio das seguintes provas bioquímico-fisiológicas: reação de oxidase e catalase (positivas), utilização de carboidratos, método Cystine Trypticase Agar (CTA; produção de ácido a partir da metabolização de glicose e maltose), pesquisa de DNase (negativo) e hemólise em ágar sangue (negativo) (HOLT *et al.*, 1994).

4.6.3.3 Identificação molecular

A confirmação da identificação das amostras bacterianas, quando necessária, foi realizada empregando-se método de genética molecular utilizando controles positivo e negativo, pela detecção do gene *ctrA* por qPCR, conforme descrito por Sacchi *et al.*, (2011). O seguinte par de iniciadores e sonda foram utilizados: iniciador senso (F753) TGTGTTCCGCTATACGCCATT; iniciador antisenso (R846) GCCATATTCACACGATATACC; Sonda Pb820i (FAM) AACCTTGAGCAA"TTCCATTTATCCTGACGTTCT. A reação de qPCR foi realizada no

7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) seguindo as seguintes etapas: 50 °C por 2 min; 95° por 10 min; 45 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s.

4.6.4 Classificação bacteriana

4.6.4.1 Classificação em sorogrupos

A sorogrupagem, ou seja, a determinação imunogênica dos sorogrupos de *N. meningitidis*, foi realizada pela técnica de soroaglutinação em lâmina, empregando-se antissoros específicos para quatro sorogrupos patogênicos (A, B, C, W) (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil). Em alguns casos específicos, a genogrupagem do meningococo foi realizada pela detecção dos genes responsáveis pela biossíntese capsular *siaD* (MenB ou MenC), *synG* (MenW) e *synF* (MenY), utilizando-se qPCR (MOTHERSHED *et al.*, 2004).

4.6.4.2 Classificação em sorotipos e subtipos

A classificação das amostras de *N. meningitidis* em sorotipos (PorB) e subtipos (PorA) foi realizada pela técnica de *immunoblot* no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Referência Nacional para meningites bacterianas, empregando-se anticorpos monoclonais específicos (mAbs) (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985). Os conjuntos completos consistiram em mAbs para os sorotipos 1, 2a, 2b, 2c, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 19, 21, 22 e 23 e para os sorosubtipos P1.1, P1.2, P1.3, P1.4, P1.5, P1.7, P1.9, P1.10, P1.12, P1.14, P1.14-6, P1.15, P1.16, P1.19 e P1.22-1. Um conjunto de cepas de referência de cada sorotipo e sorosubtipo foi usado em cada reação como controles positivos e negativos.

4.6.5 Caracterização genotípica

A tipagem molecular das amostras bacterianas foi realizada pelo emprego de duas metodologias que, combinadas, são poderosas ferramentas de análise molecular, quais sejam *multilocus sequence typing* (MLST) e *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Portanto, para alcançar maior poder discriminatório, os dados de MLST foram combinados com os de PFGE, uma vez que o poder de resolução de PFGE permitirá discriminar diferenças sutis, as

quais possivelmente não serão detectadas por MLST. PFGE é particularmente útil para o estudo da epidemiologia regional ou o rastreamento da disseminação de clones durante surtos/*clusters* de casos. Por outro lado, MLST é utilizado para estudos populacionais e de evolução do meningococo (BREHONY; JOLLEY; MAIDEN, 2007).

4.6.5.1 Extração do DNA

O DNA bacteriano de cada amostra foi extraído a partir de cultura bacteriana pura obtida em placa de Ágar Chocolate suplementado com VX (Funed, 2019), utilizando o protocolo para bactérias Gram-negativas do *QIAmp DNA Mini Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*), conforme orientações do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (*Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*) e, posteriormente, armazenadas em microtubos, a -20°C, até sua utilização nas reações de amplificação dos genes componentes do MLST e do gene *penA*.

Para o PFGE, o DNA bacteriano de cada amostra foi extraído a partir de cultura bacteriana pura obtida em placa de Ágar Chocolate suplementado com VX (Funed, 2019), seguindo metodologia descrita previamente por Popovic *et al.* (2001), adaptada para esta pesquisa. Três colônias oriundas da cultura pura foram transferidas para 1 mL de caldo BHI (Funed, 2019). A cultura foi incubada por 16 a 18 horas à 35°C em ambiente enriquecido com 5% de CO₂. A suspensão bacteriana previamente preparada foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C. O *pellet* foi suspenso em 150 µL de tampão de suspensão celular e 5 µL de proteinase K 50 mg/mL. A esta suspensão, foram acrescentados 150 µL de agarose *Seaken Gold* 1% preparada em tampão TE 1X (Tris 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0, SDS 1%) previamente fundida e estabilizada junto com a cultura em banho-maria a 50°C, por 15 minutos. Em seguida, 100 µL da mistura foram dispensados em moldes para plugues de agarose. O moldador com os plugues foi incubado a 4°C por 15 minutos. Após este intervalo, os plugues foram transferidos para tubos de 2 mL contendo 0,5 mL de solução de lise celular + 20 µL de lisozima (20 mg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C em banho-maria por 2 horas. Na etapa seguinte, a solução de lise celular foi descartada e 0,5 mL de tampão da proteinase K contendo 20 µL proteinase K 0,1 mg/mL foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram incubados por 2 horas. Na etapa seguinte, o tampão da proteinase K foi

removido, os plugues foram lavados 4 vezes com 1mL de tampão de lavagem 1X sob agitação, à temperatura ambiente, por 60 minutos cada e 2 vezes com 1mL de água ultrapura, à 50°C, por 15 minutos cada. Ao final, os plugues foram armazenados em microtubos de 1,5 ml com 1 mL de TE 1X a 4°C. A qualidade das extrações foi verificada por eletroforese horizontal em gel de agarose a 0,6% em tampão TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2) sob 4V por centímetro de distância entre os eletrodos, por 1 hora e 30 minutos, em géis de 14 cm de comprimento. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados usando o marcador *Lambda Hind III DNA Ladder* (Promega, Madison, WI).

4.6.5.2 *Multilocus sequence typing* (MLST)

O MLST foi executado utilizando controles positivo e negativo, de acordo protocolo descrito previamente com modificações (TAHA *et al.*, 2004). A técnica consistiu na amplificação e no sequenciamento dos sete genes constitutivos (*housekeeping*) de interesse: *abcZ* (transportador ABC), *adk* (adenilatoquinase), *aroE* (chiquimatodesidrogenase), *fumC* (fumaratohidratase), *gdh* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *pdhC* (piruvatodesidrogenase) e *pgm* (fosfoglicomutase).

4.6.5.2.1 Amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR)

Oligonucleotídeos previamente descritos (Tabela 3) foram utilizados para amplificar os genes do MLST. O protocolo otimizado de PCR continha 1 µL de DNA total extraído (30 ng/µL), 15,85 µL de água ultrapura, 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase a 5U/µL (*Promega*), 5 µL de tampão (*Promega*), 0,5 µL de dNTPs (*deoxyribonucleotide triphosphates, Invitrogen*) a 10 mM, 1,5 µL de cloreto de magnésio a 25 mM (*Promega*) e 0,45 µL de cada iniciador a 10 µM (*Invitrogen*), para um volume final de 25 µL. O ciclo de reação ideal consistiu em um ciclo inicial de 94°C durante 2 minutos, 34 ciclos de 94°C durante 60 segundos, 55°C durante 60 segundos, e 72°C durante 60 segundos, com um passo de extensão final de 72°C por 2 minutos. Ao final da reação, as amostras foram mantidas a 4°C no termociclador. Todas as reações foram realizadas no aparelho Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies, São Paulo, Brasil) usando tubos de 0,2 ml de paredes finas (*Axygen, Tewksbury, MA*). Os produtos foram mantidos a -20°C até a realização do sequenciamento.

Tabela 3 - Iniciadores empregados para MLST de *Neisseria meningitidis*.

Gene	Iniciador	Sequência	Tamanho (pb)
<i>abcZ</i>	abcZ-P1C	5-TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC-3	898
	abcZ-P2C	5-TCCCCGTCGTAAAAACAATC-3	
<i>adK</i>	adk-P1B	5-CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC-3	708
	adk-P2B	5-TGCCCAATGCGCCCAATAC-3	
<i>aroE</i>	aroE-P1B	5-TTTGAAACAGGCGGTTGCGG-3	835
	aroE-P2B	5-CAGCGGTAATCCAGTGCGAC-3	
<i>fumC</i>	fumC-P1B	5-TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG-3	860
	fumC-P2B	5-GCCCGTCAGCAAGCCCAAC-3	
<i>gdh</i>	gdh-P1B	5-CTGCCCCCGGGGTTTTTCATCT-3	677
	gdh-P2B	5-TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG-3	
<i>pdhC</i>	pdhC-P1B	5-CCGGCCGTACGACGCTGAAC-3	818
	pdhC-P2B	5-GATGTCGGAATGGGGCAAACA-3	
<i>pgm</i>	pgm-P1	5-CTTCAAAGCCTACGACATCCG-3	1339
	pgm-P2	5-CGGATTGCTTTCGATGACGGC-3	

Fonte: TAHA *et al.*, 2004.

4.6.5.2.2 Protocolo de eletroforese dos produtos de PCR

Para a visualização dos fragmentos amplificados, foram utilizados 5 µL do produto da PCR adicionado de 1 µL de tampão de corrida, os quais foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com voltagem de 100 volts, por 60 minutos, à temperatura ambiente, em cuba de eletroforese horizontal para géis de 14 cm contendo tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Os tamanhos dos produtos de PCR foram estimados usando o marcador de pares de bases *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Após a eletroforese, os géis foram corados por 20 minutos em 500 mL de água Milli-Q contendo 40 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO*). As imagens dos géis foram eletronicamente capturadas utilizando o fotodocumentador MultiDoc-It (*UVP, Upland, CA*). As imagens capturadas foram armazenadas no formato JPEG ou TIFF.

4.6.5.2.3 Sequenciamento dos genes do MLST

Os reagentes empregados nesta etapa do estudo foram fabricados pela Thermo Fisher Scientific (*Waltham, Massachusetts, EUA*), exceto quando explicitado no texto. O produto amplificado de DNA de cada um dos sete genes do MLST foi misturado em tubo único e sequenciado como descrito a seguir.

A purificação dos produtos amplificados de DNA com *beads* magnéticas (*Agencourt AMPure XP® - Beckman Coulter*) e a quantificação fluorométrica (*Qubit fluorometer, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA*) foram executadas de acordo com os protocolos do fabricante. Os genes do MLST foram sequenciados usando a plataforma de sequenciamento *Ion Torrent PGM™ System*, com um *kit* de leitura para 400 bp e um chip de 314™. A biblioteca foi previamente construída por fragmentação enzimática. As *reads* sequenciadas foram analisadas e a qualidade verificada usando o *software* FastQC v0.11.8 e os fragmentos dos genes do MLST sequenciados foram montados pelo método *map to reference*, usando o *software* Geneious versão 11.1.5 (TATUSOVA *et al.*, 2016).

O consenso das sequências obtidas foi submetido ao banco de dados da plataforma do MLST para *N. meningitidis* (disponível em <http://pubmlst.org/neisseria/>) e, então, foi atribuída uma identificação numérica para cada alelo identificado. A partir das combinações dos alelos identificados, o tipo sequenciado foi determinado (*sequence type - ST*).

Os dados gerados foram analisados contra todos os ST descritos na plataforma do MLST e os complexos clonais (cc) das amostras foram identificados (MAIDEN, 1998).

As sequências obtidas para os genes MLST foram concatenadas e, posteriormente, alinhadas, empregando-se o *software* de alinhamento ClustalW e duas árvores filogenéticas foram construídas, uma com o *software* MEGA7 (máxima verossimilhança) e a segunda com o *software* Phyloviz 2.0, que utilizou o algoritmo goeBURST versão 1.2.1 (*Minimum Spanning Trees - MST*) (FELSENSTEIN, 1985; TAMURA, 1992; FEIL *et al.*, 2004; FRANCISCO *et al.*, 2009; KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4.6.5.3 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

O PFGE foi executado utilizando controles positivo e negativo, de acordo protocolo descrito previamente com modificações por Popovic *et al.* (2001).

4.6.5.3.1 Condições de restrição

Uma porção de 2 milímetros do plugue foi inserida em tampão da enzima (90 μ L de água ultrapura e 10 μ L de tampão da enzima 10X) e posteriormente incubado a 37°C por 15 minutos. Em seguida, o tampão da enzima foi substituído pelo tampão de restrição (174 μ L de água ultrapura, 20 μ L de tampão da enzima 10X e 1 μ L de BSA) contendo 50 U da enzima *NheI* (Promega, Madison, WI). O *mix* da restrição foi incubado por três horas a 37°C. Em seguida, o tampão da enzima foi substituído por 150 μ L de TBE 0,5X.

4.6.5.3.2 Separação dos fragmentos da digestão enzimática por eletroforese de campo pulsado

A porção de 2 milímetros dos plugues anteriormente submetida à reação de restrição foi aplicada no fundo de cada dente de um pente de 15 dentes, empregando-se agarose *Seaken Gold* 1% (Lonza, São Paulo, Brasil) fundida a 56°C. Em seguida, o pente contendo os plugues foi encaixado no berço e 100 mL de agarose *Seaken Gold* a 1 % fundida em TBE 0,5X foi adicionada ao berço até a polimerização do gel. Após a remoção do pente, as canaletas foram seladas com agarose *Seaken Gold* 1% fundida a 56°C e o gel foi colocado na câmara de eletroforese de campo pulsado do equipamento CHEF-DR III (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif*) previamente preenchida com 2,2 litros de TBE 0,5X. As condições de eletroforese foram as seguintes: temperatura 14°C; tempo do *switch* inicial 2,2 segundos; tempo do *switch* final 35 segundos; duração da corrida 18 horas; ângulo 120 graus; gradiente 6 volts/cm com um fator de rampa linear. O padrão de massa molecular usado nas corridas foi o *Lambda PFG Ladder* (*New England Biolabs, Massachusetts, EUA*). Após a eletroforese, os géis foram corados por 40 minutos em 500 mL de água Milli-Q contendo 40 μ L de brometo de etídio (10 mg/mL). As imagens dos géis foram eletronicamente capturadas, utilizando-se o fotodocumentador MultiDoc-It (*UVP, Upland, CA*). As imagens capturadas foram armazenadas no formato TIFF.

4.6.5.3.3 Análise dos dados

Os padrões de identidade genética gerados por PFGE foram analisados de acordo com os critérios descritos por (TENOVER *et al.*, 1995). As imagens dos géis foram normalizadas com auxílio do programa Bionumerics, versão 7.5 (*Applied Maths, Saint-Martens-Latem*, Bélgica). A similaridade dos perfis de restrição obtidos foi estimada utilizando-se o coeficiente de correlação de Dice, com otimização de 1% e tolerância de posição de 1,5% para a distância de migração das bandas. Todos os padrões foram inspecionados visualmente após análise por computador. O agrupamento das amostras em *clusters* foi realizado pelo método de *unweighted-pair group method and arithmetic averages* (UPGMA) e as amostras com similaridade $\geq 80\%$ foram consideradas epidemiologicamente relacionadas (MORENO *et al.*, 2020).

4.6.5.3.4 Avaliação da reprodutibilidade dos perfis experimentais

Experimentos usando réplicas técnicas foram realizados para avaliar a reprodutibilidade dos ensaios para obtenção dos perfis experimentais e para a determinação da variação intra- e inter-gel nos valores estimados das massas moleculares dos fragmentos de restrição obtidos para uma mesma amostra.

Os perfis experimentais foram obtidos, no mínimo, duas vezes para uma mesma amostra, para avaliar a reprodutibilidade da técnica.

4.6.6 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos indicados para a terapia dos pacientes e para a quimioprofilaxia dos contatos, quais sejam, penicilina G, ceftriaxona, ciprofloxacina e rifampicina (ZALMANOVICI TRESTIOREANU *et al.*, 2013), foram determinados.

O método de gradiente de concentração, Etest[®] (*bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France*), foi empregado para determinar os valores das CIM para as amostras bacterianas. Os testes de sensibilidade foram executados de acordo as instruções do fabricante.

Todos os testes foram realizados em placa de *Ágar Mueller-Hinton* suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Funed, 2019). Cada placa de 90 mm de diâmetro foi inoculada com o auxílio de um *swab* de algodão estéril embebido em uma suspensão bacteriana preparada em salina fisiológica estéril ajustada para obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland. Depois da superfície da placa ter secado, foram colocadas duas fitas em sentido inverso. As placas foram, em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em ar contendo 5% de CO_2 por 16-20 horas. A amostra de referência *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 foi incluída como controle de qualidade.

A interpretação dos resultados das CIM obtidas foi realizada de acordo os pontos de corte definidos no guia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Tabela 4) (CLSI, 2021).

Tabela 4 - Critérios de interpretação das CIM dos antimicrobianos testados.

Categoria	Pontos de corte para CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	Penicilina	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Rifampicina	
interpretativa					
Sensível	$\leq 0,06$	$\leq 0,12$	$\leq 0,03$	$\leq 0,5$	CLSI 2021
	$\leq 0,25$	$\leq 0,125$	$\leq 0,03$	$\leq 0,25$	BrCAST 2021
Intermediário	0,12 - 0,25	-	0,06	1	CLSI 2021
	-	-	-	-	BrCAST 2021
Resistente	$\geq 0,5$	-	$\geq 0,12$	≥ 2	CLSI 2021
	$> 0,25$	$>0,125$	$>0,03$	$> 0,25$	BrCAST 2021

4.6.7 Amplificação e sequenciamento do gene *penA* associado a fenótipo de resistência

Para identificar alterações de aminoácidos na proteína PBP₂, associada à redução de suscetibilidade à penicilina G, uma região altamente variável do gene *penA* (402 pb) foi amplificada e sequenciada (TAHA *et al.*, 2007). As amostras de *N. meningitidis* que

exibiram fenótipo intermediário ou resistente à penicilina G foram submetidas ao procedimento descrito a seguir.

4.6.7.1 Amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR)

Oligonucleotídeos previamente publicados (Tabela 5) foram utilizados para amplificar o gene *penA* (TAHA *et al.*, 2007). A reação de amplificação ótima continha 1 µL de DNA total extraído (30 ng/µL), 15,75 µL de água ultrapura, 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL (*Promega*), 5 µL de tampão (*Promega*), 0,5 µL de dNTPs (*deoxyribonucleotide triphosphates*) (*Invitrogen*) 10 mM, 1,5 µL de cloreto de magnésio 25 mM (*Promega*) e 0,5 µL de cada iniciador 10 µM (*Invitrogen*), para um volume final de 25 µL. O ciclo de reação ideal consistiu em um ciclo inicial de 94°C durante 2 minutos, 34 ciclos de 94°C durante 60 segundos, 55°C durante 60 segundos e 72°C durante 60 segundos, com um passo de extensão final de 72°C por 2 minutos. Ao final da reação, as amostras foram mantidas a 4°C no termociclador. Todas as reações foram realizadas em aparelho Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies, São Paulo, Brasil) usando microtubos de 0,2 ml de paredes finas (Axygen, Tewksbury, MA). Os produtos foram mantidos a -20°C até a realização do sequenciamento.

Tabela 5 - Iniciadores para amplificação do gene *penA* de *Neisseria meningitidis*.

Gene	Nome do iniciador	Sequência	Tamanho (pb)
<i>penA</i>	penA1F	5'-ATCGAACAGGCGACGATGTC-3'	500
	penA1R	5'-GATTAAGACGGTGTGTTTTGACGG-3'	

Fonte: TAHA *et al.*, 2007.

4.6.7.2 Protocolo de eletroforese dos produtos amplificados por PCR

Para a visualização dos fragmentos amplificados, foram utilizados 5 µL do produto da PCR adicionado de 1 µL de tampão de corrida, os quais foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com voltagem de 100 volts, por 60 minutos, à temperatura ambiente, em cuba de eletroforese horizontal para géis de 14 cm contendo tampão TBE 1X (Tris 89

mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Os tamanhos dos produtos de PCR foram estimados usando o marcador *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*.

Após a eletroforese, os géis foram corados por 20 minutos em 500 mL de água Milli-Q contendo 40 µL de brometo de etídio (10 mg/mL). As imagens dos géis foram eletronicamente capturadas utilizando o fotodocumentador MultiDoc-It. As imagens capturadas foram armazenadas no formato JPEG ou TIFF.

4.6.7.3 Sequenciamento do gene *penA*

Os produtos amplificados de DNA do gene *penA* foram sequenciados em conjunto com os genes do MLST como descrito no item 4.6.5.2.3.

4.6.7.4 Análise das sequências de DNA do gene *penA*

As sequências de DNA da região do gene *penA* associados a perfis de resistência à penicilina G foram comparados com sequências publicadas no *Bacterial Isolate Genome Sequence Database - BIGSdb* (<http://pubmlst.org/software/database/bigfdb/>). Análises adicionais das sequências de DNA foram executadas usando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). As definições utilizadas para os alelos *penA* foram as determinadas pelo esquema de tipagem de *Neisseria* em <http://pubmlst.org/neisseria/>.

As sequências obtidas para o gene *penA* foram alinhadas empregando-se o *software* de alinhamento ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) e uma árvore filogenética (máxima verossimilhança) foi construída com o *software* MEGA7 (FELSENSTEIN, 1985; TAMURA, 1992; KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

As análises *in silico* foram fundamentais para predição das principais mutações no gene *penA* associadas à resistência nas amostras invasivas de *N. meningitidis* estudadas.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram inseridos em banco de dados do programa Epi Info™ versão 7.2.3.1 (CDC/USA) e analisados com índice de confiança de 95% (P<0,05). Os

resultados sistematizados foram expressos por distribuição de frequências absolutas e percentuais. Para as representações gráficas foi utilizado o programa Microsoft Excel.

4.8 REQUISITOS LEGAIS

O projeto foi aprovado pelo CEP da Universidade de Federal de Minas Gerais - UFMG no CAAE 02069918.2.0000.5149 (Anexo I) e cadastrado no SisGen nº AD959BB. A Fundação Ezequiel Dias concedeu autorização para utilização da coleção de *N. meningitidis* nesta tese (Anexo II).

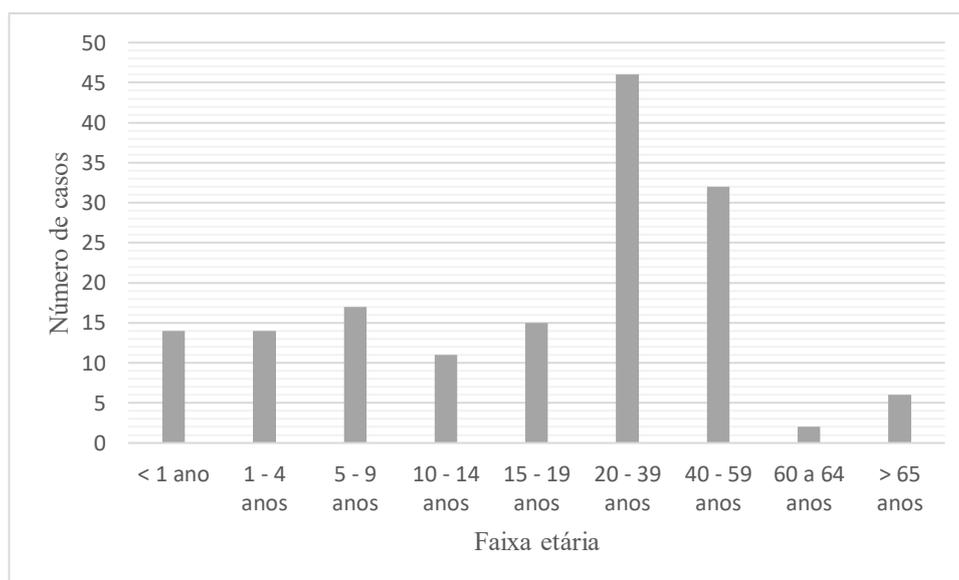
5 RESULTADOS

5.1 CASOS DE DOENÇA MENINGOCÓCICA IDENTIFICADOS NO LACEN-MG

Entre 2017 e 2019, 157 casos de doença meningocócica invasiva foram identificados no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias. Destes, 41 foram diagnosticados por cultura (26,1%), 46 por teste de aglutinação do látex (29,3%) e 70 por qPCR (44,6%). A incidência foi maior em mulheres (50,32%) em comparação com os homens e 35,3% dos casos foram em crianças ≤ 14 anos (Figura 5).

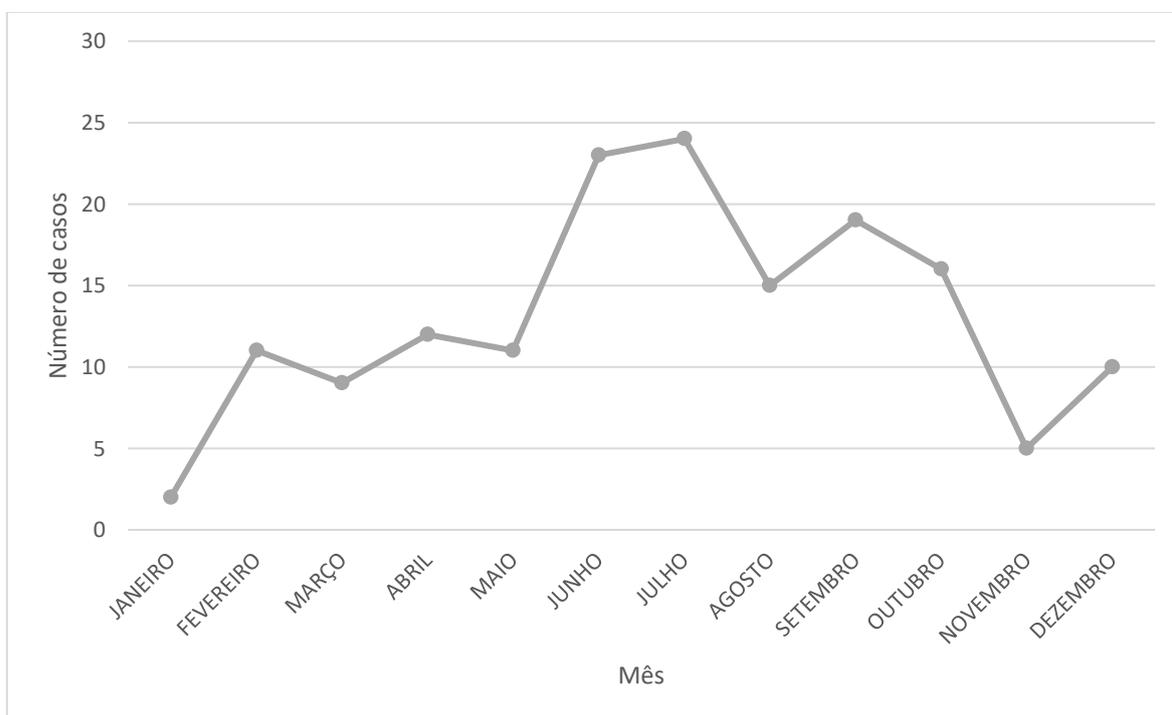
A taxa de incidência para a média anual de casos foi de 0,25 casos por 100.000 habitantes segundo dados do LACEN-MG entre 2017-2019 e dados demográficos do IBGE referente a estimativa de população de Minas Gerais em 2019.

Figura 5 - Distribuição de casos de doença meningocócica por faixa etária entre 2017 e 2019, Funed, MG, Brasil.



Analisando os dados, foi possível observar uma variação sazonal padrão na incidência da doença meningocócica na população durante o período estudado. Ocorreu maior percentual de casos da doença nos meses mais frios, com picos em junho e julho, e declínio nos meses mais quentes (Figura 6).

Figura 6. Incidência de casos acumulados de doença meningocócica distribuídos ao longo dos meses, entre 2017 e 2019, Funed, MG, Brasil.



Houve a ocorrência de pelo menos um caso em todas as 13 regiões geográficas intermediárias de Minas Gerais, confirmando o aspecto endêmico da doença meningocócica no Estado. O maior número de casos da doença ficou concentrado na área de abrangência da região geográfica de Belo Horizonte (32,5%), devido, principalmente, à densidade populacional desta região onde está inserida a capital do Estado, com predomínio de incidência do grupo C (Tabela 6).

N. meningitidis grupo C (92 casos; 58,6%) foi o grupo mais comumente identificado, seguido pelos grupos B (32 casos; 20,4%), W (14 casos; 8,9%) e Y (13 casos; 8,3%). Em seis casos (3,8%; 1,9% foram caracterizados como grupo W/Y pela técnica de aglutinação pelo látex e 1,9% caracterizado como não grupável por qPCR) não foi possível identificar o grupo por causa de limitações das técnicas empregadas.

Outra importante observação foi a ocorrência de casos da doença pelo grupo W nas regiões geográficas intermediárias, Belo Horizonte, Montes Claros, Teófilo Otoni, Pouso

Alegre, Divinópolis, Uberlândia e Varginha, e a ocorrência do grupo Y nas regiões de Belo Horizonte, Ipatinga, Governador Valadares, Juiz de Fora, Teófilo Otoni e Varginha (Tabela 6). Esses dados levantam a necessidade de maior vigilância nestas áreas e monitoramento da possível introdução destes grupos em outras regiões, principalmente por estes grupos só fazerem parte da formulação da vacina disponível para crianças entre 11 e 12 anos na rede pública de saúde.

Tabela 6 - Distribuição dos casos de doença meningocócica invasiva segundo região de abrangência das macrorregiões de saúde de Minas Gerais, entre 2017 e 2019, Funed, MG, Brasil.

Região Geográfica Intermediária*	Número de casos	%	<i>Neisseria meningitidis</i> grupo					
			B	C	W	Y	Y/W	NG
3101 - Belo Horizonte	51	32,5	10	25	5	7	2	2
3102 - Montes Claros	2	1,3	0	1	1	0	0	0
3103 - Teófilo Otoni	7	4,4	2	1	1	2	1	0
3104 - Governador Valadares	1	0,6	0	0	0	1	0	0
3105 – Ipatinga	3	1,9	1	1	0	1	0	0
3106 - Juiz de Fora	18	11,5	1	16	0	1	0	0
3107 – Barbacena	2	1,3	1	1	0	0	0	0
3108 – Varginha	12	7,6	3	5	3	1	0	0
3109 - Pouso Alegre	3	1,9	0	2	1	0	0	0
3110 – Uberaba	16	10,2	4	12	0	0	0	0
3111 – Uberlândia	21	13,4	6	14	1	0	0	0
3112 - Patos de Minas	3	1,9	3	0	0	0	0	0
3113 – Divinópolis	18	11,5	1	14	2	0	0	1
Total	157	100	32	92	14	13	3	3

Legenda: NG: Não grupável; *Fonte: https://www.ibge.gov.br/apps/regioes_geograficas/, acessado em 12/08/2020.

5.2 IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO BACTERIANA

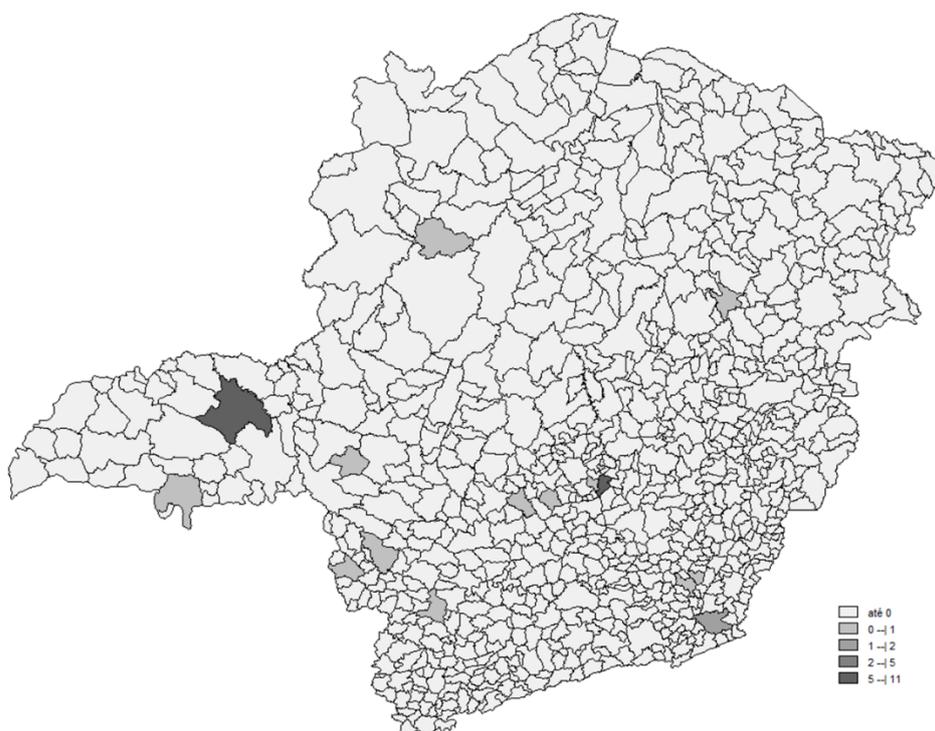
Um total de 35 das 41 amostras bacterianas isoladas de líquido ou sangue de casos suspeitos de meningite bacteriana oriundos da rede pública de saúde de Minas Gerais foram analisadas nesta pesquisa, devido seis amostras não apresentarem viabilidade após armazenamento (Figura 7). Todas as amostras foram isoladas de casos suspeitos de doença

meningocócica comunitária, coletados como parte das investigações da vigilância epidemiológica passiva baseada em laboratório.

A maioria das amostras bacterianas foi isolada de pacientes do gênero feminino (57,1%) e 28,6% dos pacientes tinham até 14 anos. Os municípios de Belo Horizonte e Uberlândia contribuíram com o maior número de amostras para este estudo (Tabela 6).

N. meningitidis grupo C (21 amostras; 60%) foi o grupo mais comumente identificado, seguido pelos grupos B (6 amostras; 17,1%), W (6 amostras; 17,1%) e Y (2 amostras; 5,7%).

Figura 7 - Mapa de Minas Gerais mostrando as regiões de origem das amostras bacterianas de *Neisseria meningitidis*.

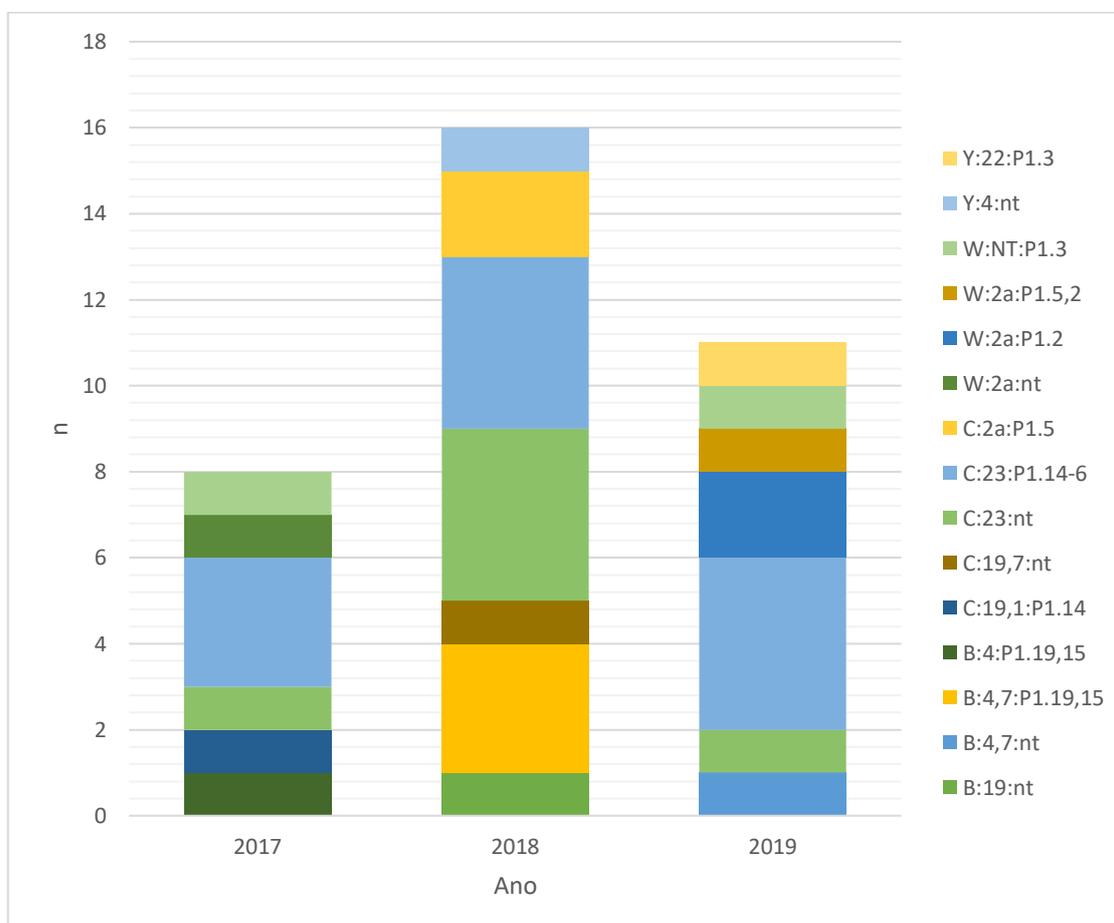


Fonte: Tabwin.

Os sorotipos foram determinados para 33 amostras (94,3%) e o subtipo foi identificado para 24 amostras (68,6%) (Tabela 7). As amostras mais comuns por grupo:tipo:subtipo foram a C:23:P1.14-6 (n=11), B:4,7:P1.19,15 (n=3), W:2a:P1.2 (2) e

Y:4:nt (1). Em todos os anos, a amostra classificada como C:23:P1.14-6 foi a mais frequente (Figura 8).

Figura 8 - Distribuição de *Neisseria meningitidis* classificadas como grupo:tipo:subtipo por ano.

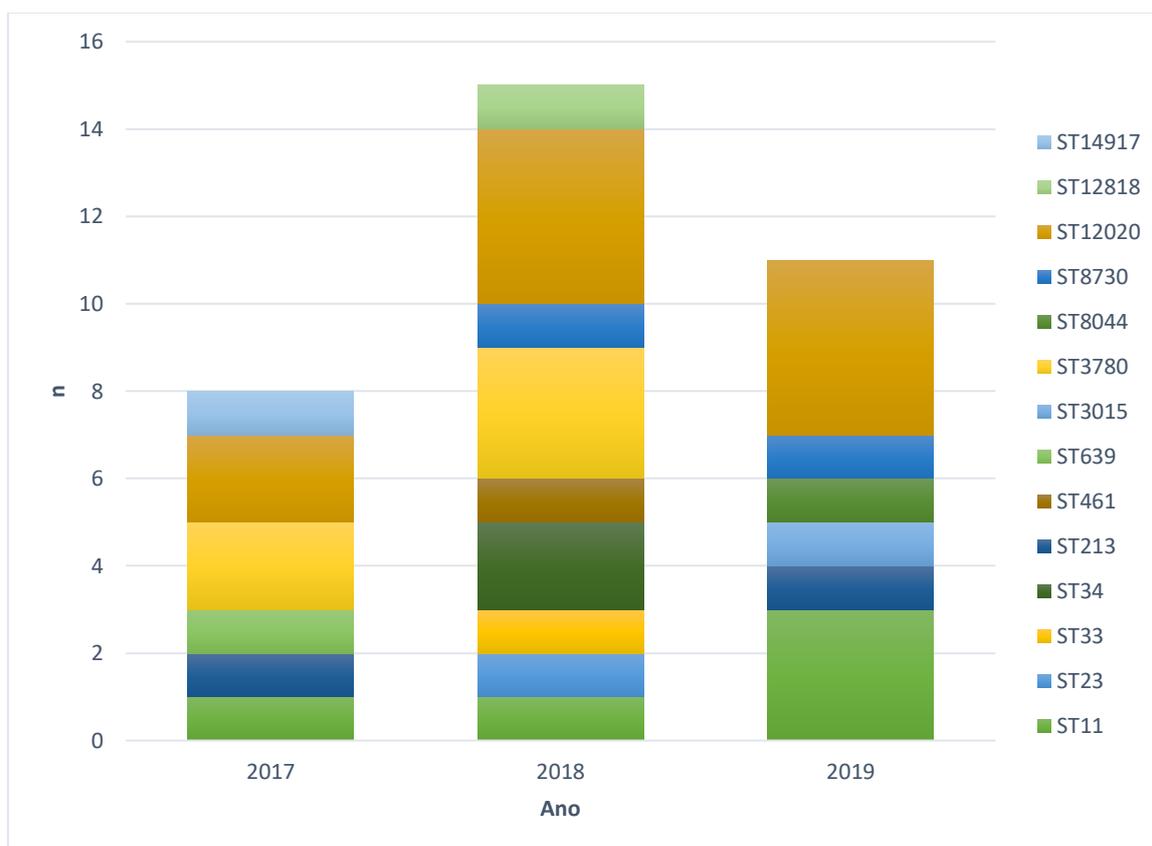


5.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

O MLST revelou a diversidade genética das amostras ao identificar 14 tipos sequenciais (ST) entre as 35 amostras clínicas analisadas. O ST12020 foi o tipo sequencial mais prevalente (n=10; 29,4%) e, em todos os anos, foi o mais frequente (Figura 9). As amostras restantes foram caracterizadas como ST11 (n=5; 14,6%), ST3780 (n=5; 14,6%), ST8730 (n=2; 5,9%), ST34 (n=2; 5,9%), ST213 (n=2; 14,6%), ST23 (n=1, 2,9%), ST33 (n=1, 2,9%), ST461 (n=1, 2,9%), ST639 (n=1, 2,9%), ST3015 (n=1, 2,9%), ST8044 (n=1,

2,9%), ST12818 (n=1, 2,9%) e ST14917 (n=1, 2,9%). Não foi possível identificar o tipo sequencial da amostra 261/18 (NmC:19,7:nt), pois o perfil alélico da mesma não era compartilhado por nenhuma outra amostra presente no banco de dados do portal <https://pubmlst.org/>. Somente o complexo clonal (cc865), *match* com ao menos 6 *loci* desta amostra, foi identificado (Tabela 7).

Figura 9 - Distribuição dos tipos sequenciais (ST) de *Neisseria meningitidis* por ano.



Dos 14 ST identificados, 13 foram agrupados em oito complexos clonais, sendo que o complexo clonal (cc) 103 foi o mais frequente (n=17; 48,6%). Os demais ST foram agrupados nos complexos clonais cc11 (n=6; 17,6%), cc32 (n=4; 11,8%), cc22 (n=2; 5,9%), cc213 (n=2; 5,9%), cc23 (n=1; 2,9%), cc461 (n=1; 2,9%) e cc865 (n=1; 2,9%). O tipo sequencial ST3015 não foi agrupado em nível de complexo clonal (Tabela 6).

A distribuição geográfica das linhagens hipervirulentas, segundo ST, foi: na área de abrangência da SRS de Belo Horizonte identificou-se a circulação dos clones ST11 (n=2, NmW, cc11), ST23 (n=1, NmY, cc23), ST639 (n=1, NmB, cc32), ST3015 (n=1, NmY),

ST3780 (n=4, NmC, cc103), ST8730 (n=1, NmC, cc103) e ST12020 (n=1, NmC, cc103); SRS de Alfenas o clone ST11 (n=1, NmW, cc11); SRS de Diamantina o ST213 (n=1, NmB, cc213); SRS de Divinópolis o ST11 (n=1, NmW, cc11) e ST12020 (n=1, NmC, cc103); SRS de Leopoldina o cc865 (n=1, NmC) e ST8730 (n=1, NmC, cc103); SRS de Montes Claros o ST 8044 (n=1, NmW, cc22); SRS de Passos o ST3780 (n=1, NmC, cc103) e ST33 (n=1, NmB, cc32); SRS de Ubá o ST12020 (n=2, NmC, cc103); SRS de Uberaba o ST461 (n=1, NmB, cc461) e ST12020 (n=1, NmC, cc103); SRS de Uberlândia o ST11 (n=1, NmC, cc11), ST34 (n=2, NmB, cc32), ST213 (n=1, NmC, cc213), ST12020 (n=5, NmC, cc103), ST12818 (n=1, NmC, cc11) e ST14917 (n=1, NmW, cc22).

Tabela 7 - Identificação dos perfis alélicos de cada amostra bacteriana de *Neisseria meningitidis*.

Registro	Origem	Bactéria	Grupo	Alelos MLST							ST	cc
				<i>abcZ</i>	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdh</i>	<i>pdhC</i>	<i>pgm</i>		
087/17	Itaúna	Nm	W	2	3	4	3	8	4	6	11	11
287/17	Uberlândia	Nm	C	7	5	1	13	36	53	15	213	213
273/17	São Sebastião do Paraíso	Nm	C	276	4	9	9	5	18	2	3780	103
307/17	Belo Horizonte	Nm	C	276	4	9	9	5	18	2	3780	103
147/17	Uberlândia	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
132/17	Uberlândia	Nm	W	276	5	18	8	11	4	21	14917	22
163/17	Uberlândia	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
497/17	Belo Horizonte	Nm	B	8	10	5	9	6	3	8	639	32
026/18	Uberlândia	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
102/18	Frutal	Nm	B	12	5	12	35	60	22	17	461	461
085/18	Passos	Nm	B	8	10	5	4	6	3	8	33	32
053/18	Uberlândia	Nm	C	2	3	4	3	9	4	861	12818	11
063/18	Uberlândia	Nm	B	8	10	5	4	5	3	8	34	32
064/18	Uberlândia	Nm	B	8	10	5	4	5	3	8	34	32
251/18	Belo Horizonte	Nm	Y	10	5	18	9	11	9	17	23	23
261/18	Leopoldina	Nm	C	8	3	154	17	26	22	2	no ST	865
127/18	Uberlândia	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
307/18	Belo Horizonte	Nm	C	276	4	9	9	5	18	2	3780	103
336/18	Uberlândia	Nm	C	2	3	4	3	8	4	6	11	11
342/18	Divinópolis	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
353/18	Contagem	Nm	C	276	4	9	9	5	18	2	3780	103
488/18	Visconde do Rio Branco	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
492/18	Leopoldina	Nm	C	276	4	9	9	26	18	2	8730	103
227/18	Belo Horizonte	Nm	C	276	5	9	9	5	18	2	3780	103
26/19	Belo Horizonte	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
87/19	Uberlândia	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
88/19	Brasília de Minas	Nm	W	11	5	18	8	11	24	494	8044	22
146/19	Alfenas	Nm	W	2	3	4	3	8	4	6	11	11
371/19	Belo Horizonte	Nm	W	2	3	4	3	8	4	6	11	11
386/19	Ubá	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
216/19	Belo Horizonte	Nm	W	2	3	4	3	8	4	6	11	11
220/19	Belo Horizonte	Nm	Y	219	5	275	17	11	8	21	3015	no cc
546/19	Belo Horizonte	Nm	C	276	4	9	9	26	18	2	8730	103
554/19	Araxá	Nm	C	2	4	9	9	5	18	2	12020	103
672/19	Capelinha	Nm	B	7	5	1	13	36	53	15	213	213

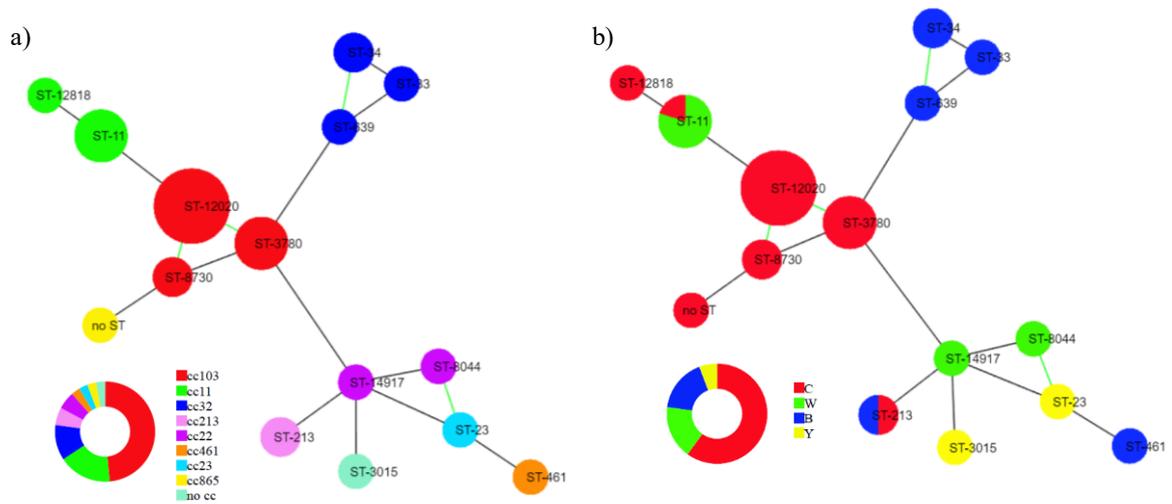
Legenda: ST: *Sequence type*; cc: *Clonal complex*; Nm: *Neisseria meningitidis*; MLST: *Multi Locus Sequence Type*.

A análise filogenética das sequências concatenadas dos genes do MLST revelou que as amostras bacterianas foram agrupadas em cinco *clusters* e a ocorrência de eventos potenciais de troca de cápsula pela identificação de amostra com um sorogrupo diferente das amostras vizinhas em seu agrupamento filogenético (Figuras 10 e 11). O *cluster* 1 continha somente amostras de *N. meningitidis* do grupo C, pertencentes aos complexos clonais cc103 e cc865. O *cluster* 1 foi subdividido em 2 ramos, sendo que o ramo 1 contém as amostras dos tipos sequenciais ST12020, ST3780 e ST8730 e o ramo 2, do cc865.

O *cluster* 2 possuía amostras dos grupos B, C e W, pertencentes aos cc32 e cc11, sendo subdividido em dois ramos, o primeiro composto somente por amostras do grupo B do cc32 (ST639, ST33 e ST34). O segundo era composto por amostras dos grupos C e W do cc11 (ST11 e ST12818), podendo indicar a ocorrência de troca capsular entre as amostras do ST11.

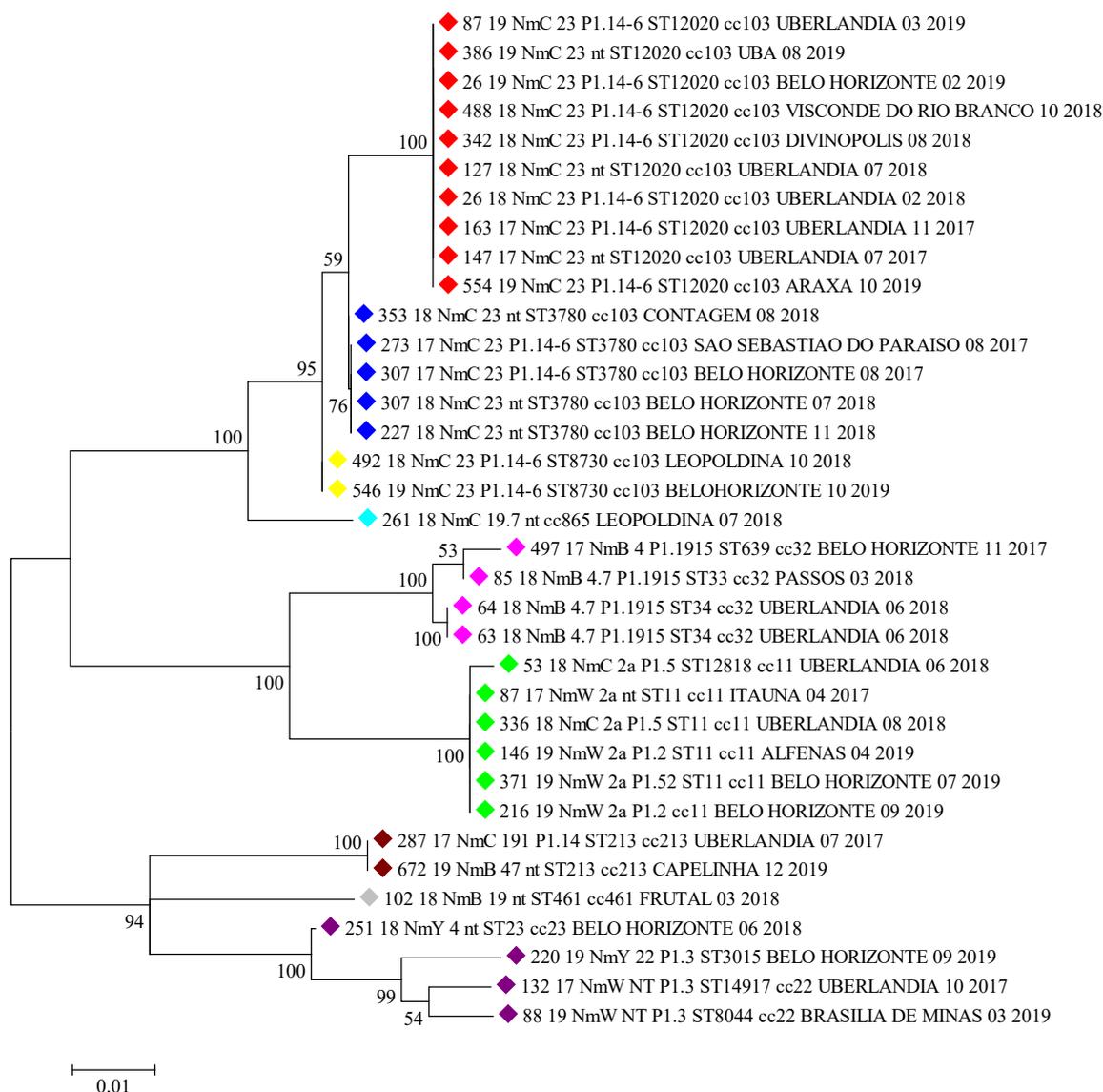
O *cluster* 3 era composto por um ramo, contendo amostras do cc213, sendo uma do grupo B e outra do grupo C, podendo indicar a ocorrência de troca capsular (Figura 10 e 11). O *cluster* 4 era composto por apenas uma amostra do grupo B cc461. Finalmente, o *cluster* 5 era composto por amostras bacterianas relacionadas geneticamente em menor grau entre si. Este ramo possuía duas amostras do grupo Y cc23 e ST3015 e duas amostras do grupo W cc22.

Figura 10 - Árvores geradoras mínimas (*Minimum Spanning Trees* - MST) de 35 amostras de *Neisseria meningitidis* baseadas nos resultados do MLST.



Legenda: Cada círculo indica um tipo sequencial identificado pelo MLST e o tamanho do círculo indica o número de amostras contidos num dado tipo sequencial. a) esquema a, os círculos foram coloridos de acordo ao complexo clonal em que os tipos sequenciais pertenciam; b) esquema b, os círculos foram coloridos de acordo aos sorogrupos em que os tipos sequenciais pertenciam.

Figura 11 - Árvore filogenética mostrando a diversidade das seqüências concatenadas dos genes do MLST de 35 amostras bacterianas de meningococo, MG, Brasil.



Legenda: A filogenia foi determinada considerando as seqüências alinhadas por ClustalW e a reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança (bootstrap 1000), baseado no modelo de Tamura 3-parametros. Análises evolutivas foram realizadas no software MEGA7.

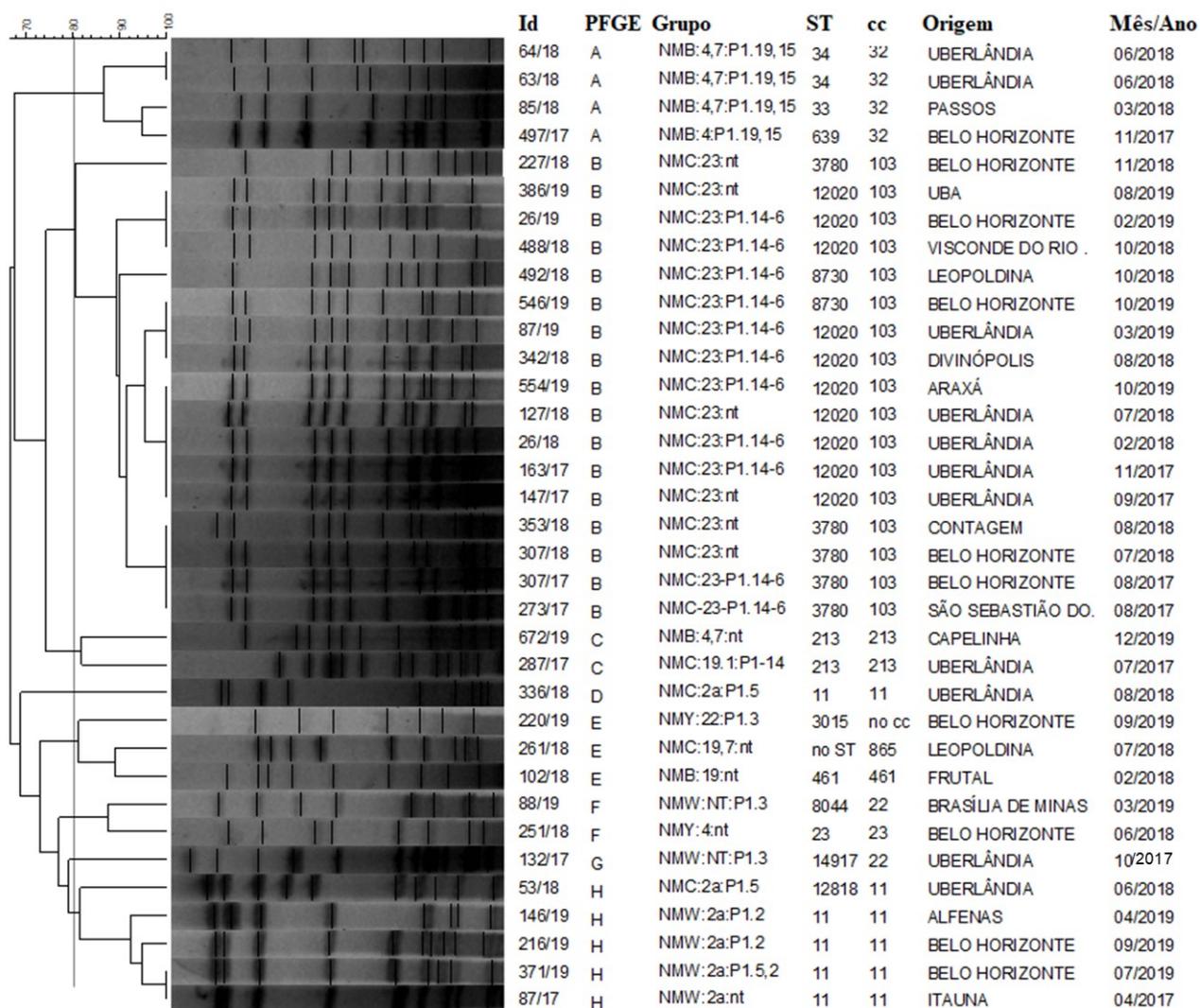
A tipagem por PFGE foi realizada em todas as amostras bacterianas e a análise genética dos perfis de restrição permitiu a identificação de oito *clusters* (pulsotipos), designados pelos padrões clonais de A – H, exibindo similaridade $\geq 80\%$ dentro de cada *cluster* (Figura 12). O pulsotipo mais prevalente foi o B, com 17 amostras que pertenciam ao complexo clonal 103.

Ao *cluster* A pertenciam quatro amostras do cc32. O *cluster* B era composto por 17 amostras do cc103 e o C por 2 amostras do cc213. Já o *cluster* D era composto por uma amostra do cc11, enquanto o E era composto por três amostras, sendo uma do cc865, uma do cc461 e uma do ST3015.

O *cluster* F era composto por uma amostra do cc22 e uma amostra do cc23, o G por uma amostra do cc22 e o H por cinco amostras do cc11.

Os resultados de filogenia pelo PFGE e MLST foram similares, sendo que o PFGE apresentou um maior poder discriminatório, uma vez que foi possível agrupar as amostras em oito pulsotipos, enquanto o MLST agrupou as amostras em cinco *clusters*.

Figura 12 - Representação esquemática do dendograma de similaridade entre os 35 perfis de restrição gerados pela enzima *NheI* no PFGE.



Legenda: Id: Identificação das amostras; PFGE: *Pulsed-field gel electrophoresis* ; ST: *Sequence type*; cc: *Clonal complex*; Visconde do Rio.: Visconde do Rio Branco; São Sebastião do.: São Sebastião do Paraíso. A linha vertical representa o limiar de similaridade $\geq 80\%$.

5.4 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Sensibilidade a todos os antimicrobianos testados foi observada para 40% (14/35) das amostras de *N. meningitidis* isoladas no período deste estudo. Essas amostras pertenciam aos complexos clonais cc11, cc22, cc32, cc103 e cc213.

Uma amostra do grupo W (cc11) apresentou resistência à penicilina (2,9%), com uma CIM de 0,5 mg/L, fenótipo pen^R, enquanto 20 (57,1%) amostras apresentaram redução da sensibilidade a penicilina (resistência intermediária), fenótipo pen^I. A CIM das amostras pen^I variou de 0,09 a 0,25 mg/L. Destas 20 amostras, 15 pertenciam ao grupo C (cc103 e cc865), três ao grupo B (cc461, cc32 e cc213), uma ao grupo W (cc22) e uma ao grupo Y (cc23). Todas as amostras testadas foram sensíveis a ceftriaxona, ciprofloxacina e rifampicina (Tabela 7). Quando analisamos utilizando o BrCAST, 2021 somente a amostra com CIM de 0,5 mg/L seria resistente e a sensibilidade a todos os antimicrobianos testados passaria para 97,14% (34/35).

A amostra com perfil de resistência era de origem da SRS de Alfenas. As demais amostras com redução da sensibilidade à penicilina (pen^I) eram provenientes das SRS Belo Horizonte, Coronel Fabriciano, Diamantina, Divinópolis, Leopoldina, Montes Claros, Passos, Sete Lagoas, Ubá, Uberaba e Uberlândia.

Tabela 8 - Caracterização das amostras bacterianas de *Neisseria meningitidis* isoladas no LACEN-MG entre 2017 e 2019.

Registro	Grupo	Tipo	Subtipo	CIP	CRO	PEN	RIF	ST	cc	PFGE	PenA
087/17	W	2a	nt	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,03 (S)	0,015 (S)	11	11	H	
287/17	C	19,1	P1.14	0,0015 (S)	0,0015 (S)	0,06 (S)	0,015 (S)	213	213	C	
273/17	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,0003 (S)	0,06 (S)	0,007 (S)	3780	103	B	
307/17	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,125 (I)	0,015 (S)	3780	103	B	14
147/17	C	23	nt	0,007 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,015 (S)	12020	103	B	
132/17	W	NT	P1.3	0,007 (S)	0,0003 (S)	0,06 (S)	0,015 (S)	14917	22	G	
163/17	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,125 (I)	0,007 (S)	12020	103	B	14
497/17	B	4	P1.19,15	0,007 (S)	0,0007 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	639	32	A	
026/18	C	23	P1.14-6	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,015 (S)	12020	103	B	14
102/18	B	19	nt	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,25 (I)	0,06 (S)	461	461	E	420
085/18	B	4,7	P1.19,15	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,03 (S)	33	32	A	52
053/18	C	2a	P1.5	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)	12818	11	H	
063/18	B	4,7	P1.19,15	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	34	32	A	
064/18	B	4,7	P1.19,15	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,5 (S)	34	32	A	
251/18	Y	4	nt	0,0007 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,007 (S)	23	23	F	20
261/18	C	19,7	nt	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,007 (S)	No ST	865	E	9
127/18	C	23	nt	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,125 (I)	0,125 (S)	12020	103	B	14
307/18	C	23	nt	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,016 (S)	0,06 (S)	3780	103	B	
336/18	C	2a	P1.5	0,0007 (S)	0,0007 (S)	0,047 (S)	0,06 (S)	11	11	D	
342/18	C	23	P1.14-6	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,125 (I)	0,03 (S)	12020	103	B	14
353/18	C	23	nt	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,19 (I)	0,03 (S)	3780	103	B	14
488/18	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,094 (I)	0,125 (S)	12020	103	B	14
492/18	C	23	P1.14-6	0,0015 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,015 (S)	8730	103	B	14
227/18	C	23	nt	0,003 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,06 (S)	3780	103	B	14
26/19	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,094 (I)	0,03 (S)	12020	103	B	14
87/19	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,06 (S)	12020	103	B	14
88/19	W	NT	P1.3	0,003 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,06 (S)	8044	22	F	14
146/19	W	2a	P1.2	0,003 (S)	0,016 (S)	0,5 (R)	0,03 (S)	11	11	H	9
371/19	W	2a	P1.5,2	0,03 (S)	0,016 (S)	0,064 (S)	0,125 (S)	11	11	H	
386/19	C	23	nt	0,03 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,5 (S)	12020	103	B	14
216/19	W	2a	P1.2	0,03 (S)	0,016 (S)	0,032 (S)	0,06 (S)	11	11	H	
220/19	Y	22	P1.3	0,03 (S)	0,016 (S)	0,047 (S)	0,06 (S)	3015	No cc	E	
546/19	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,094 (I)	0,06 (S)	8730	103	B	14
554/19	C	23	P1.14-6	0,03 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,03 (S)	12020	103	B	14
672/19	B	4,7	Nt	0,0015 (S)	0,016 (S)	0,25 (I)	0,03 (S)	213	213	C	14

Legenda: LCR: líquido, M: masculino, F: feminino, Nm: *Neisseria meningitidis*, NT: não tipável, nt: não subtipável, CIP: ciprofloxacina, CRO: ceftriaxona, PEN: penicilina, RIF: rifampicina, S: sensível, I: sensibilidade intermediária, R: resistência, ST: *sequence type*, no ST: não classificado em ST, cc: complexo clonal, no cc: não agrupado em complexo clonal.

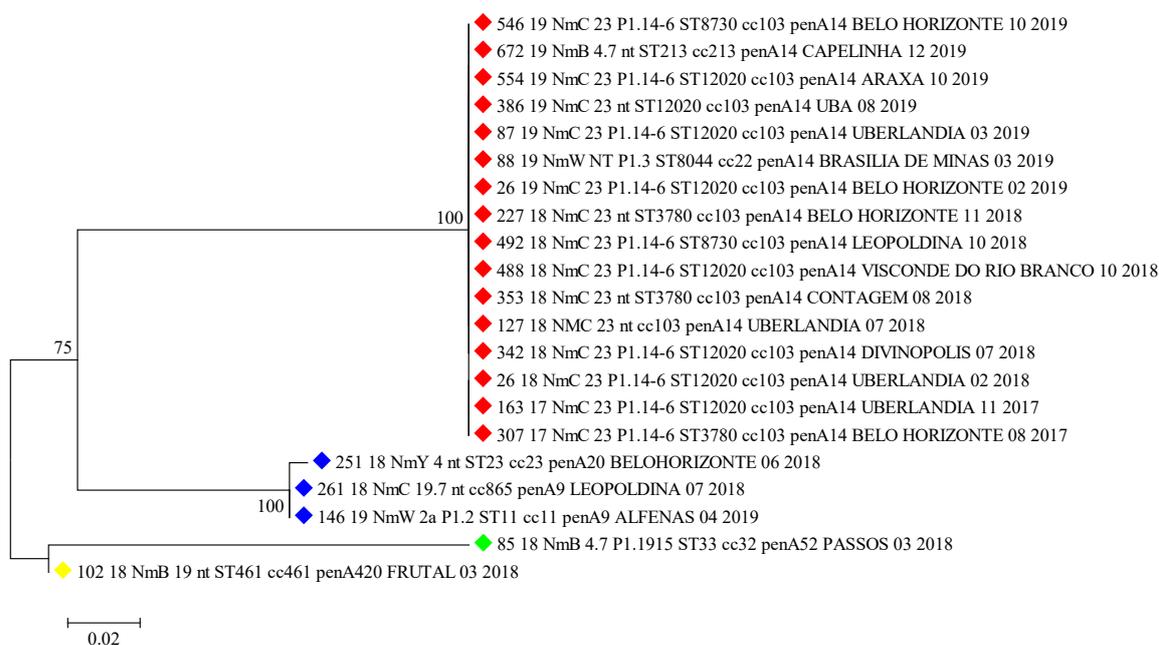
5.4.1 Análise genética do gene *penA* associado ao fenótipo de resistência a penicilina

A análise das sequências do gene *penA* das amostras bacterianas com perfil de sensibilidade reduzida mostrou a presença de cinco alelos entre as 21 amostras de *N. meningitidis* analisadas. Os cinco alelos estavam relacionados à redução de sensibilidade à penicilina (fenótipo pen^I): *penA14* (16), *penA9* (2), *penA20* (1), *penA52* (1) e *penA420* (1). Os alelos *penA9*, *penA14*, *penA20* e *penA52* apresentavam os cinco polimorfismos F504L, A510V, I515V, H541N e I566V associados com o fenótipo pen^I. O alelo *penA420* estava relacionado ao fenótipo pen^I, mas não apresentava nenhum dos cinco polimorfismos F504L, A510V, I515V, H541N e I566V associados ao fenótipo pen^I.

A análise filogenética das 21 sequências de DNA do gene *penA* de *N. meningitidis* com perfil de redução de sensibilidade à penicilina possibilitou a observação do agrupamento das sequências em quatro *clusters* (Figura 12).

O *cluster* 1 formado continha 16 amostras do genótipo *penA14* pertencentes aos complexos clonais 103 (14), cc213 (1) e cc22 (1). O *cluster* 2 possuía três amostras com os genótipos *penA9* (2) e *penA20* (1) dos cc23, cc11 e cc865. O *cluster* 3 tinha uma amostra do genótipo *penA52* cc32. Finalmente, no *cluster* 4 tinha uma amostra do genótipo *penA420* cc461.

Figura 13 - Árvore filogenética mostrando a diversidade de alelos do gene *penA* de 21 amostras bacterianas de meningococo, Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais, Brasil.



Legenda: A filogenia foi determinada considerando as sequências de 402 pb do gene *penA* alinhadas por ClustalW e a reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança, baseado no modelo de Tamura-Nei. Análises evolutivas foram realizadas no *software* MEGA7.

6 DISCUSSÃO

De acordo com Iversson (1976), desde os primeiros estudos epidemiológicos, destaca-se maior incidência da doença meningocócica nos meses frios, tanto nos períodos epidêmicos, como endêmicos, conforme descrito neste estudo, possibilitando maior transmissão do meningococo, devido, principalmente, ao confinamento das pessoas em ambientes fechados como residências mal ventiladas, aglomerações, migrações e o registro de grande número de afecções respiratórias virais neste período.

Entre 2000 e 2009, em Minas Gerais, período anterior à introdução da vacina meningocócica C, 26,3% dos casos tinham entre 1 e 4 anos e 54,7% dos casos eram do gênero masculino (NASCIMENTO; MIRANZI; SCATENA, 2012). Em São Paulo, entre 2006 e 2011, 60% dos casos eram em homens e 20% dos pacientes tinham até 5 anos de idade (STRELOW *et al.*, 2016). Durante 2017 a 2019, no LACEN-MG, verificamos que 57,1% das amostras bacterianas foram isoladas de pacientes do gênero feminino (57,1%) e que 8,9% dos pacientes tinham entre 1 e 4 anos de idade.

A taxa de incidência para a média anual de casos, segundo dados do LACEN-MG entre 2017-2019 e do IBGE referente a estimativa de população de Minas Gerais em 2019, foi de 0,25 casos/100.000 habitantes, demonstrando que as amostras da maioria dos casos suspeitos foram encaminhadas para o LACEN-MG, o que comprova a representatividade dos dados apresentados neste estudo.

A partir dos dados apresentados, foi possível verificar que houve uma redução no número de casos na faixa etária de 1 a 4 anos em Minas Gerais, devido, provavelmente, à introdução da vacina meningocócica MenC no calendário básico de vacinação em 2010 (NUNES *et al.*, 2021).

Até 2005, o grupo B era o mais frequente em casos invasivos de doença meningocócica no Brasil. Posteriormente, a circulação do grupo C aumentou, tornando-se o mais frequente e respondendo por 75,3% dos casos em Minas Gerais em 2009 e por mais de 74% dos casos no Brasil em 2010 (IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Gorla *et al.*, (2020), mostrou a distribuição de casos da doença meningocócica no Brasil por sorogrupos, sendo que C (n=4,729; 54.4%), B (n=3,313; 38.1%), W (n=423; 4.9%), Y (n=203; 2.3%), X (n=5; 0.1%) e outros (n=16; 0.2%). Embora, Tzeng e Stephens (2021)

tenham observado um aumento da ocorrência de doença meningocócica pelos grupos W, X, Y, E e *N. meningitidis* não grupáveis, nesta pesquisa não observamos este fenômeno que vem ocorrendo em outras regiões do mundo. Em nosso estudo, encontramos que 60% das amostras bacterianas pertenciam ao grupo C; 17,1% ao B; 17,1% ao W e 5,7% ao Y. Os dados mostram que houve uma redução na incidência da doença meningocócica ocasionada pelo grupo C em Minas Gerais quando comparado com os dados de 2009. Esta mudança vem sendo observada no Brasil desde 2010, após a introdução da vacina conjugada monovalente MenC no Programa Nacional de Imunização (PNI) do Brasil (ANDRADE *et al.*, 2017; MORAES *et al.*, 2017).

Com relação a tipagem e subtipagem, os resultados corroboram com os resultados do estudo realizado em Salvador, Bahia, publicado em janeiro de 2018, que descreveu que, para os grupos B e C, os tipos/subtipos mais prevalentes também foram o C:23:P1.14-6 e o B:4,7:P1.19,15 (CORDEIRO *et al.*, 2018). Os tipos/subtipos mais frequentemente encontrados neste estudo (C:23:P1.14-6, B:4,7:P1.19,15, W:2a:P1.2 e Y:4:nt) também faziam parte dos tipos/subtipos mais prevalentes no Brasil (GORLA *et al.*, 2018; GORLA *et al.*, 2020). Os dados acima demonstram que as linhagens invasivas que circularam em Minas Gerais durante o período do estudo também circulavam em outras regiões do Brasil e que, atualmente, a linhagem C:23:P1.14-6 é a mais prevalente no Estado e no Brasil.

Os dados epidemiológicos sobre a diversidade genética, baseados em MLST, mostraram a presença de alto grau de diversidade genética na população analisada, tendo em vista que um total de 14 tipos sequenciais foram identificados nas 35 amostras analisadas. O ST12020 foi o mais prevalente, seguido pelos ST11 (n=5; 14,6%), ST3780 (n=5; 14,6%), ST8730 (n=2; 5,9%), ST34 (n=2; 5,9%), ST213 (n=2; 14,6%), ST23 (n=1, 2,9%), ST33 (n=1, 2,9%), ST461 (n=1, 2,9%), ST639 (n=1, 2,9%), ST3015 (n=1, 2,9%), ST8044 (n=1, 2,9%), ST12818 (n=1, 2,9%) e ST14917 (n=1, 2,9%). A amostra 261/18 (NmC:19,7:nt) não teve o seu tipo sequencial identificado, pois o perfil alélico desta amostra não era compartilhado por nenhuma outra amostra presente no banco de dados do portal <https://pubmlst.org/>. Somente o complexo clonal (ST-865), *match* com ao menos 6 *loci* desta amostra, foi identificado (Tabela 7).

Treze tipos sequenciais foram agrupados em oito complexos clonais. Os ST12020, ST3780 e ST8730 foram agrupados no cc103 (n=17; 48,6%). Os ST11 e ST12818 foram agrupados no cc11 (n=6; 17,6%), os ST33, ST34 e ST639 no cc32 (n=4; 11,8%), o ST213

no cc213 (n=2; 5,9%), os ST8044 e ST14917 no cc22 (n=2; 5,9%), o ST23 no cc23 (n=1; 2,9%), o ST461 no cc461 (n=1; 2,9%) e o no ST no cc865 (n=1; 2,9%). O ST3015 não foi agrupado em nível de complexo clonal (Tabela 8).

As amostras do grupo C estavam relacionadas aos tipos sequenciais ST12020 (cc103), ST3780 (cc103), ST8730 (cc103), ST11 (cc11), ST12818 (cc11), ST213 (cc213) e no ST (cc865). As do grupo B aos ST33 (cc32), ST34 (cc32), ST639 (cc32), ST213 (cc213) e ST461 (cc461), as do grupo W aos ST11 (cc11), ST8044 (cc22) e ST14917 (cc22) e as do grupo Y aos ST23 (cc23) e ST3015 (no cc) (Figura 10).

Estudos anteriores encontraram associação entre complexos clonais e grupos, como cc461 e o cc32 associados ao grupo B e o cc11 uma linhagem altamente diversificada geneticamente associada aos grupos C, B, W e em menor grau ao Y (MAIDEN, 1998; LEMOS *et al.*, 2010; DE FILIPPIS *et al.*, 2012; MUSTAPHA *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2017).

Desde 2005, o cc103 tem sido o mais prevalente no Brasil e ocorre também em muitos outros países do mundo. No Brasil, o cc103 foi relacionado ao grupo C e tem sido descrito desde 1989 e possui a maioria das linhagens exibindo o fenótipo 23:P1.14-6 (GORLA *et al.*, 2020). A linhagem Nm C cc103 foi caracterizada por possuir um genoma acessório específico composto por CRISP/cas e um sistema de modificação de restrição. Essa linhagem também foi caracterizada por possuir uma ilha genômica semelhante a elementos conjugativos e integrativos. Esta ilha carregava genes potencialmente associados à virulência e *fitness*, contribuindo para a persistência espaço-temporal desta linhagem. Devido a este cenário, a vacina conjugada MenC foi introduzida no Brasil em 2010. No entanto, casos e surtos causados por Nm grupo C cc103 continuam sendo reportados no Brasil, como um surto na Bahia em 2010 e um surto na cidade de Ouro Branco, Minas Gerais, em 2011 (DE LEMOS *et al.*, 2007; IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012; SÁFADI *et al.*, 2013; BASTOS *et al.*, 2015; MARIN *et al.*, 2017). Nesta pesquisa, encontramos que a maioria (48,6%) das amostras bacterianas isoladas no LACEN-MG era do cc103 (ST3780, ST8730 e ST12020), relacionadas ao grupo C (C:23:P1.14-6, 11/35; C:23:nt, 6/35), e exibia o fenótipo 23:P1.14-6. Não foi possível relacionar o cc103 com regiões geográficas específicas no estado. Os dados mostraram que, apesar da introdução da vacina MenC em Minas Gerais em 2009, Nm grupo C cc103 continua sendo a linhagem mais prevalente no estado entre 2017 e 2019.

O cc11 foi o segundo mais prevalente entre as amostras analisadas e que ele estava relacionado aos grupos C (C:2a:P1.5; 2/35) e W (W:2a:P1.2, 2/35; W:2a:P1.5,2, 1/35; W:2a:nt, 1/35). A análise filogenética apresentou que as amostras do tipo sequencial ST11 dos grupos C e W estavam estreitamente correlacionadas geneticamente, indicando a possibilidade de estar ocorrendo o fenômeno de troca capsular (C->W). O cc11 está relacionado a altas taxas de mortalidade e grandes surtos ao longo do tempo, incluindo surto por Nm C cc11 nas forças armadas dos EUA na década de 1960, na epidemia de meningite no Brasil na década de 70 e em surtos no sistema educacional do Reino Unido na década de 1990. A Nm W cc11 foi a causa de um surto global entre peregrinos que foram a Meca (Hajj) em 2000 e posteriormente causou epidemias no cinturão africano de meningite e aumento de casos endêmicos na África do Sul, Austrália, Europa e América do Sul (LUCIDARME *et al.*, 2017).

O clone W:2a:P1.5,2 cc11, chamado linhagem da América do Sul, surgiu em 2003 no sul do Brasil. Embora a linhagem da América do Sul apresentava características fenotípicas similares ao dos isolados da linhagem do Hajj 2000, a análise de sequenciamento do genoma completo demonstrou que a MenW:cc11 ‘linhagem da América do Sul’ é distinta da linha do Hajj. A linhagem da América do Sul foi propagada para Argentina, Chile, Inglaterra e País de Gales, onde se tornaram endêmicas depois de se diversificarem em uma sublinhagem chamada de 2013-strain (GORLA *et al.*, 2020).

O *cluster* de genes da cápsula (*cps*) é uma ilha genética de 24 kb adquirido horizontalmente por *N. meningitidis*. A diversidade de sorogrupos entre os meningococos dentro de um mesmo complexo clonal é originada pela troca capsular, transferência horizontal de genes de biossíntese capsular por recombinação homóloga. A troca capsular em meningococo é um evento relativamente comum associado à permanência da doença meningocócica e de relevância para a saúde pública, visto que a maioria das vacinas meningocócicas utilizam antígenos capsulares. Dado o número de amostras do grupo C no cc11, o grupo C é considerado como a cápsula de início desta linhagem, com os grupos B, W e Y representando cápsulas alternativas. Em adição a esta informação, o tipo sequencial ST11 do cc11 é, historicamente, uma linhagem meningocócica hipervirulenta associada ao grupo C e acredita-se que as linhagens do ST11 tenham adquirido a cápsula W através de eventos de troca capsular de C para W (MUSTAPHA *et al.*, 2016).

Nas amostras incluídas no presente estudo, o cc32 e o cc461 também estavam associados ao grupo B, sendo que o cc32 (B:4: P1.19,15, 1/35; B:4,7:P1.19,15, 3/35) foi o terceiro mais prevalente entre os complexos clonais identificados e o mais prevalente entre amostras do grupo B. O cc32 tem sido encontrado em quase todos os estados do Brasil. Um estudo em Salvador, Bahia, sobre portadores assintomáticos entre 11-19 anos em 2014, detectou a presença de linhagens hipervirulentas dos complexos clonais 103, 11 e 32. Um estudo publicado em 2011, sobre a epidemiologia molecular do grupo B no Brasil, detectou que o cc32 (ST-33, ST34 e ST-639) foi predominante em todas as regiões do Brasil, representando 55,9% das amostras, sendo que estes mesmos tipos sequenciais foram identificados em nosso estudo. Duas amostras do cc461 foram detectadas no estudo de 2011. Nesta pesquisa, foi identificado somente uma amostra do cc461 (B:19:nt, 1/35), demonstrando uma menor representatividade deste complexo clonal no grupo B. Nos EUA, entre 2011 e 2015, o cc32 também estava entre os complexos clonais mais prevalentes, junto com o cc11 e cc23 (DE FILIPPIS *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2017; POTTS *et al.*, 2018).

A análise filogenética também revelou a possibilidade de troca capsular no cc213, onde as amostras do ST213 dos grupos C (C:19,1:P1.14, 1/35) e B (B:4,7:nt, 1/35) estavam estreitamente relacionadas geneticamente. Duas amostras do cc213 foram isoladas, uma do grupo B e outra do grupo C. Este complexo é relacionado aos grupos B e C, sendo que a maioria das amostras está relacionada ao grupo B. Este complexo já foi relatado na Europa e no Japão. Poucas amostras deste complexo do grupo C também já foram detectadas no Reino Unido, Irlanda, Holanda e República Checa. No Brasil, este é o primeiro relato deste complexo clonal (<https://pubmlst.org/neisseria>).

Duas amostras do grupo W foram associadas ao cc22 (W:nt:P1.3, 2/35) (ST8044 e ST14917). Este complexo clonal já tinha sido descrito no Brasil, por LEMOS *et al.*, 2010, mas dos tipos sequencias ST22, ST6342 e ST364. Embora o cc22 já tivesse sido descrito no Brasil, é a primeira vez que o tipo sequencial ST8044 do cc22 é descrito no Brasil. O ST8044 tem três relatos de isolamento no banco de dados do MLST, sendo essa linhagem somente descrita até agora na Espanha. Já o ST14917 tem o relato de uma amostra isolada no Brasil em 2016 (<https://pubmlst.org/neisseria>).

Uma amostra do grupo C foi relacionado ao cc865 (C:19,7:nt, 1/35). O cc865 está associado aos grupos B e C. A maioria das amostras do banco de dados do MLST estão associadas ao grupo B (<https://pubmlst.org/neisseria>). Não foi possível identificar o tipo

sequencial da amostra NmC:19,7:nt analisada nesta pesquisa, pois o perfil alélico encontrado não era compartilhado por nenhuma outra amostra presente no banco de dados do portal <https://pubmlst.org/>, portanto somente o complexo clonal (ST-865) foi identificado. Este fato ocorreu possivelmente por esta amostra se tratar de um tipo sequencial ainda não descrito (CAUGANT, 2008).

As amostras do grupo Y estavam associadas ao cc23 (ST23) (Y:4:nt, 1/35) e ao ST3015 (Y:22:P1.3, 1/35). O cc23 está associado aos grupos B, C, Y e W, sendo o grupo Y mais comum. Há relatos da circulação deste complexo na Europa, EUA, Canadá e Japão. O ST23 cc23 do grupo Y já foi detectado no Brasil, tendo o primeiro relato no Rio de Janeiro em 1990, segundo registro no banco de dados do portal do MLST (<https://pubmlst.org/neisseria>). O ST3015 está associado aos grupos B, Y e W, sendo o grupo Y mais comum. Há relatos de identificação do ST3015 na Europa, EUA, Japão, Costa Rica e Brasil. No Brasil existe o relato de uma amostra do ST3015 grupo Y identificada em 2014, segundo registro no banco de dados do portal do MLST (<https://pubmlst.org/neisseria>) (CAUGANT, 2008; JANDOVA *et al.*, 2016; OLDFIELD *et al.*, 2018).

A combinação de dados do MLST com o PFGE permitiu alcançar um maior poder discriminatório na análise filogenética, sendo que, foi possível observar que o PFGE apresentou um maior poder de resolução, permitindo discriminar diferenças sutis apresentadas dentro de alguns complexos clonais, como as observadas nos complexos cc11 e cc22, as quais não foram observadas no MLST.

No teste de sensibilidade a antimicrobianos, todas as amostras bacterianas foram sensíveis a ceftriaxona, ciprofloxacina e rifampicina, sendo que 57,1% das amostras bacterianas foram identificadas com redução da sensibilidade a penicilina (resistência intermediária) e 2,9% com resistência *in vitro* a penicilina. Esses resultados mostram que vem ocorrendo um aumento das amostras com perfil de redução da sensibilidade a penicilina quando comparado a estudos a nível de Brasil realizados em 2011 que reportou redução da sensibilidade a penicilina em 13% das amostras e em 2018 que publicou redução de 33% (GORLA *et al.*, 2011; GORLA *et al.*, 2018).

O BrCAST, 2021 alterou os pontos de corte clínicos das CIM para *Neisseria meningitidis*, nesta nova classificação somente uma amostra bacteriana testada seria resistente a penicilina e a sensibilidade a todos os antimicrobianos testados passaria para 97,14% (34/35). Este resultado reforça que os antimicrobianos de escolha para o tratamento

empírico e controle (quimioprofilaxia) da doença meningocócica permanecem efetivos, tanto quando se analisa as CIM pelo CLSI como pelo BrCAST.

A análise das 21 sequências do gene *penA* (codificador da proteína de ligação da penicilina 2, PBP-2) das amostras bacterianas com perfil de resistência ou redução da sensibilidade à penicilina identificou os alelos *penA14* (n=16), *penA9* (n=2), *penA20* (n=1), *penA52* (=1) e *penA420* (=1), tendo o *penA14* (cc22, cc103 e cc213) como o mais prevalente. Os alelos *penA9*, *penA14*, *penA20* e *penA52* apresentavam as cinco mutações que levavam a alterações de aminoácidos no domínio da transpeptidase da PBP2 (F504L, A510V, I515V, H541N e I566V) associados com o fenótipo pen^I descritos anteriormente por (TAHA *et al.*, 2007). O *penA420* estava relacionado ao fenótipo pen^I, mas não apresentava nenhum dos cinco polimorfismos no fragmento do gene *penA* analisado. Acredita-se que esse fenótipo pen^I seja proveniente de outras mutações presentes ao longo do gene *penA* (FONSECA *et al.*, 2017). O alelo *penA9*, associado à amostra do grupo W (cc11) que apresentou resistência à penicilina, tinha apenas um relato de amostra com o fenótipo pen^R (<http://pubmlst.org/neisseria/>).

A distribuição dos alelos do gene *penA* por grupo mostrou que as amostras com alelo *penA14* pertenciam aos grupos B (cc213), C (cc103) e W (cc22), *penA9* aos grupos C (cc865) e W (cc11), *penA20* ao grupo Y (cc23), *penA52* ao grupo B (cc32) e *penA420* ao grupo B (cc461). Em 2017, um estudo realizado no Brasil por FONSECA *et al.*, 2017 afirmou que os alelos *penA9*, *penA14* e *penA420* já estavam associados ao fenótipo pen^I no Brasil, sendo o *penA14* o mais prevalente entre as amostras com sensibilidade reduzida à penicilina e que o alelo *penA14* estava restrito ao grupo C pertencente ao cc103. Na presente investigação, encontramos que o alelo *penA14* estava relacionado aos grupos B (cc213), C (cc103) e W (cc22), com predomínio em amostras do grupo C do cc103, sugerindo uma expansão deste alelo para os grupos B e W.

A análise filogenética dos alelos *penA* mostrou o agrupamento das sequências em quatro *clusters*, com a formação de um grande grupo filogenético com amostras do fenótipo *penA14*. Não foi possível correlacionar os fenótipos encontrados com regiões geográficas específicas.

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo forneceram dados valiosos para atualizar as estratégias de controle e prevenção da doença meningocócica, e as metodologias

implementadas no Lacen-MG permitirão o monitoramento de futuras mudanças na epidemiologia molecular da doença meningocócica invasiva em Minas Gerais.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, características fenotípicas, genotípicas, mecanismos de resistência e epidemiologia molecular das amostras de *N. meningitidis* isoladas no LACEN-MG durante o período de 2017 a 2019 foram exploradas.

Evidenciamos, entre 2017 e 2019, a incidência dos grupos B, C, Y e W, com predomínio do grupo C. Também, a redução de casos na faixa etária entre 1 a 4 anos e a redução da incidência da doença meningocócica ocasionada pelo grupo C em Minas Gerais, quando comparado com dados publicados anteriormente.

Foi encontrada uma alta diversidade genética entre as amostras analisadas, demonstrada pela identificação de 14 tipos sequenciais, que foram agrupados em oito complexos clonais, sendo mais prevalentes os cc103, 11 e 32.

A análise filogenética revelou a possibilidade de eventos de troca capsular no ST11 cc11 e no ST213 cc213. Este tipo de evento é associado à permanência da doença meningocócica e de relevância para a saúde pública, visto que a maioria das vacinas meningocócicas utilizam antígenos capsulares.

Os resultados de filogenia pelo PFGE e MLST foram similares, sendo que o PFGE apresentou um maior poder discriminatório, uma vez que foi possível agrupar as amostras em oito pulsotipos, enquanto o MLST agrupou as amostras em cinco *clusters*.

O teste de sensibilidade mostrou que a redução de sensibilidade foi restrita à penicilina, evidenciando que ceftriaxona, ciprofloxacina e rifampicina, utilizados no tratamento empírico e controle (quimioprofilaxia) da doença meningocócica, permanecem efetivos. A investigação do mecanismo de resistência através do sequenciamento do gene *penA* identificou que, na maioria das amostras, a redução da sensibilidade à penicilina estava associada à presença de cinco mutações, que interferiam em aminoácidos nas sequências do domínio da transpeptidase da PBP2.

A linhagem invasiva caracterizada como *N. meningitidis* grupo C:23:P1.14-6:ST12020:CC103:penA14 apresentando sensibilidade reduzida à penicilina foi a mais prevalente.

As metodologias utilizadas nesse estudo foram implementadas no Lacen/MG FUNED, o que vem contribuir com a vigilância epidemiológica e o programa de imunização contra *N. meningitidis* associada à doença invasiva.

Os resultados alcançados neste estudo forneceram informações valiosas para controle e prevenção da doença meningocócica e gerou a possibilidade de monitorar futuras mudanças na epidemiologia da doença meningocócica invasiva em Minas Gerais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAYEHU, T.; MEKASHA, A.; ABEBE, T. Nasal carriage rate and antibiotic susceptibility pattern of *Neisseria meningitidis* in healthy Ethiopian children and adolescents: A cross-sectional study. **PLoS One**, 12, n. 10, p. e0187207, 2017.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25, n. 17, p. 3389-3402, Sep 1997.

ANDRADE, A. L. *et al.* Impact of meningococcal C conjugate vaccination four years after introduction of routine childhood immunization in Brazil. **Vaccine**, 35, n. 16, p. 2025-2033, 04 2017.

BARLOW, A. K.; HECKELS, J. E.; CLARKE, I. N. The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: gene sequence and structural and immunological similarities to gonococcal porins. **Mol Microbiol**, 3, n. 2, p. 131-139, Feb 1989.

BASTOS, R. C. *et al.* Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies. **Vaccine**, 33, n. 35, p. 4281-4287, Aug 2015.

BEESSLAAR, J. *et al.* Clinical data supporting a 2-dose schedule of MenB-FHbp, a bivalent meningococcal serogroup B vaccine, in adolescents and young adults. **Vaccine**, May 2018.

BENNETT, J. S. *et al.* Identifying *Neisseria* species by use of the 50S ribosomal protein L6 (rplF) gene. **J Clin Microbiol**, 52, n. 5, p. 1375-1381, May 2014.

BISHOP, B. *et al.* The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid bacterial identification in patients with smear-positive bacterial meningitis. **Clin Microbiol Infect**, 24, n. 2, p. 171-174, Feb 2018.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde** : volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3^a. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SINAN Web., 2019. Acesso em: 26/04/2020.

BRATCHER, H. B.; *et al.* Establishment of the European meningococcal strain collection genome library (EMSC-GL) for the 2011 to 2012 epidemiological year. **Euro Surveill**, 23, n. 20, May 2018.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15-03-2021, 2021. <http://www.brcast.org.br>

BREHONY, C.; JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. **FEMS Microbiol Rev**, 31, n. 1, p. 15-26, Jan 2007.

BRYNILDSRUD, O. B. *et al.* Acquisition of virulence genes by a carrier strain gave rise to the ongoing epidemics of meningococcal disease in West Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 21, p. 5510-5515, May 2018.

BUTCHER, S.; SARVAS, M.; RONEBERG-NYMAN, K. Class-3 porin protein of *Neisseria meningitidis*: cloning and structure of the gene. **Gene**, 105, n. 1, p. 125-128, Aug 1991.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Evaluation of quinolone resistance-determining region mutations and efflux pump expression in *Neisseria meningitidis* resistant to fluoroquinolones. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 72, n. 3, p. 263-266, Mar 2012.

CAUGANT, D. A. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: importance for the epidemiology of meningococcal disease. **Infect Genet Evol**, 8, n. 5, p. 558-565, Sep 2008.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.

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

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

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

DEGHMANE, A. E.; HONG, E.; TAHA, M. K. Emergence of meningococci with reduced susceptibility to third-generation cephalosporins. **J Antimicrob Chemother**, 72, n. 1, p. 95-98, Jan 2017.

DI CAPRIO, G. *et al.* Increased rate of penicillin non-susceptible strains of *N. meningitidis* in Naples, Italy. **J Chemother**, p. 1-2, Jul 2017.

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

DONALD, R. G. *et al.* Meningococcal serogroup B vaccines: Estimating breadth of coverage. **Hum Vaccin Immunother**, 13, n. 2, p. 255-265, 02 2017.

DRETTLER, 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**, 14, n. 5, p. 1146-1160, May 2018.

FEIL, E. J. *et al.* eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol**, 186, n. 5, p. 1518-1530, Mar 2004.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39, n. 4, p. 783-791, Jul 1985.

FONSECA, É. *et al.* The invasive MenC cc103 lineage with penicillin reduced susceptibility persisting in Brazil. **Int J Med Microbiol**, May 2017.

FRANCISCO, A. P. *et al.* Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. **BMC Bioinformatics**, 10, p. 152, May 2009.

FRASCH, C. E.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. **Rev Infect Dis**, 7, n. 4, p. 504-510, 1985 Jul-Aug 1985.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology.*: p. 24-74. p. 2004.

GORLA, M. C. *et al.* Emergence of resistance to ciprofloxacin in *Neisseria meningitidis* in Brazil. **J Med Microbiol**, 67, n. 3, p. 286-288, Mar 2018.

GORLA, M. C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated from meningitis cases in Brazil from 2006 to 2008. **Enferm Infec Microbiol Clin**, 29, n. 2, p. 85-89, Feb 2011.

GORLA, M. C. *et al.* Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive cases in Brazil from 2009 to 2016. **J Med Microbiol**, May 2018.

GORLA, M. C. *et al.* Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive meningococcal disease in Brazil from 2002 to 2017. *Access Microbiol*, 2, n. 1, p. acmi000079, 2020.

HARCOURT, B. H. *et al.* Population-Based Surveillance of *Neisseria meningitidis* Antimicrobial Resistance in the United States. **Open Forum Infect Dis**, 2, n. 3, p. ofv117, Sep 2015.

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

HITCHCOCK, P. J. Unified nomenclature for pathogenic *Neisseria* species. **Clin Microbiol Rev**, 2 Suppl, p. S64-65, Apr 1989.

HOLT, J. G. *et al.* Bergey's manual of determinative bacteriology. p. 71-174 p. 1994.

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

IVERSSON, L. B. Aspectos epidemiológicos da meningite meningocócica no município de São Paulo (Brasil), no período de 1968 a 1974. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. p. 1-16, 1976.

JANDOVA, Z. *et al.* Serogroup and Clonal Characterization of Czech Invasive *Neisseria meningitidis* Strains Isolated from 1971 to 2015. **PLoS One**, 11, n. 12, p. e0167762, 2016.

Jl, X. *et al.* Capsule switching of *Neisseria meningitidis* sequence type 7 serogroup A to serogroup X. **J Infect**, 75, n. 6, p. 521-531, Dec 2017.

JOLLEY, K. A.; BREHONY, C.; MAIDEN, M. C. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. **FEMS Microbiol Rev**, 31, n. 1, p. 89-96, Jan 2007.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, 33, n. 7, p. 1870-1874, 07 2016.

LAW, D. K. *et al.* Determination of serotyping antigens, clonal analysis and genetic characterization of the 4CMenB vaccine antigen genes in invasive *Neisseria meningitidis* from Western Canada, 2009 to 2013. **J Med Microbiol**, 63, n. Pt 11, p. 1490-1499, Nov 2014.

LEE, H. *et al.* Prevalence and serogroup changes of *Neisseria meningitidis* in South Korea, 2010-2016. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 5292, Mar 2018.

LEMOS, A. P. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. **J Infect**, 60, n. 3, p. 209-217, Mar 2010.

LEWIS, L. A.; RAM, S. Meningococcal disease and the complement system. **Virulence**, 5, n. 1, p. 98-126, Jan 2014.

LUCIDARME, J. *et al.* Frequent capsule switching in 'ultra-virulent' meningococci - Are we ready for a serogroup B ST-11 complex outbreak? **J Infect**, 75, n. 2, p. 95-103, 08 2017.

MAIDEN, M. C. The Impact of Molecular Techniques on the Study of Meningococcal Disease. **Methods Mol Med**, 15, p. 265-291, 1998.

MAIDEN, M. C. *et al.* *Neisseria meningitidis* subtype nomenclature. **Clin Diagn Lab Immunol**, 6, n. 5, p. 771-772, Sep 1999.

MANCHANDA, V.; GUPTA, S.; BHALLA, P. Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. **Indian J Med Microbiol**, 24, n. 1, p. 7-19, Jan 2006.

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

MCCARTHY, P. C.; SHARYAN, A.; SHEIKHI MOGHADDAM, L. Meningococcal Vaccines: Current Status and Emerging Strategies. **Vaccines (Basel)**, 6, n. 1, Feb 2018.

MCNAMARA, L. A. *et al.* Mass chemoprophylaxis for control of outbreaks of meningococcal disease. **Lancet Infect Dis**, May 2018.

MENTZER, D.; OBERLE, D.; KELLER-STANISLAWSKI, B. Adverse events following immunisation with a meningococcal serogroup B vaccine: report from post-marketing surveillance, Germany, 2013 to 2016. **Euro Surveill**, 23, n. 17, Apr 2018.

MORAES, C. *et al.* Evaluation of the impact of serogroup C meningococcal disease vaccination program in Brazil and its regions: a population-based study, 2001-2013. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 112, n. 4, p. 237-246, Apr 2017.

MORENO, J.; ALARCON, Z.; PARRA, E.; DUARTE, C. *et al.* Molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates recovered from patients with invasive meningococcal disease in Colombia from 2013 to 2016. **PLoS One**, 15, n. 7, p. e0234475, 2020.

MOTHERSHED, E. A. *et al.* Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. **J Clin Microbiol**, 42, n. 1, p. 320-328, Jan 2004.

MOUNCHETROU NJOYA, I. *et al.* A cluster of meningococcal disease caused by rifampicin-resistant C meningococci in France, April 2012. **Euro Surveill**, 17, n. 34, Aug 2012.

MOURA, A. R. S. S. *et al.* Molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates recovered from 11-19-year-old meningococcal carriers in Salvador, Brazil. **PLoS One**, 12, n. 9, p. e0185038, 2017.

MOWLABOCCUS, S. *et al.* Clonal Expansion of New Penicillin-Resistant Clade of *Neisseria meningitidis* Serogroup W Clonal Complex 11, Australia. **Emerg Infect Dis**, 23, n. 8, p. 1364-1367, Aug 2017.

MS. Ministério da Saúde do Brasil. Meningite: notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net. . 2018.

MUSTAPHA, M. M. *et al.* Genomic Epidemiology of Hypervirulent Serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis*. **EBioMedicine**, 2, n. 10, p. 1447-1455, Oct 2015.

MUSTAPHA, M. M. *et al.* Genomic Investigation Reveals Highly Conserved, Mosaic, Recombination Events Associated with Capsular Switching among Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup W Sequence Type (ST)-11 Strains. **Genome Biol Evol**, 8, n. 6, p. 2065-2075, 07 2016.

NASCIMENTO, K. A.; MIRANZI, S. E. S.; SCATENA, L. M. Epidemiological profile of meningococcal disease in the State of Minas Gerais and in the Central, North, and Triângulo Mineiro regions, Brazil, during 2000-2009. **Rev Soc Bras Med Trop**, 45, n. 3, p. 334-339, Jun 2012.

NEVES, M. D. A. Anotações sobre trabalho e gênero. **Cadernos de Pesquisa**, maio/ago v.v.43, p. p.404-421.

NUNES, A. A. *et al.* Meningococcal disease epidemiology in Brazil (2005-2018) and impact of MenC vaccination. **Vaccine**, 39, n. 3, p. 605-616, 01 15 2021.

OLDFIELD, N. J. *et al.* Limited Impact of Adolescent Meningococcal ACWY Vaccination on *Neisseria meningitidis* Serogroup W Carriage in University Students. **J Infect Dis**, 217, n. 4, p. 608-616, 01 2018.

OPPENHEIM, B. Antibiotic resistance in *Neisseria meningitidis*. *Clin Infect Dis*. Jan;24 Suppl 1:: S98-101 p. 1997.

OPS. Informe Regional de SIREVA II, 2010:Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. SALUD, O. P. D. L. Washington, D.C.: OPS, © 2011.

OPS. Informe Regional de SIREVA II, 2016:Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. SALUD, O. P. D. L. Washington, D.C.: OPS, © 2017.

OPS. Informe Regional de SIREVA II, 2016:Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. SALUD, O. P. D. L. Washington, D.C.: OPS, © 2018.

PLANT, L. *et al.* Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun**, 74, n. 2, p. 1360-1367, Feb 2006.

POPOVIC, T. *et al.* Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. **J Clin Microbiol**, 39, n. 1, p. 75-85, Jan 2001.

POTTS, C. C. *et al.* Population structure of invasive *Neisseria meningitidis* in the United States, 2011-15. **J Infect**, 77, n. 5, p. 427-434, 11 2018.

PRESA, J. V. *et al.* Epidemiological burden of meningococcal disease in Brazil: A systematic literature review and database analysis. **Int J Infect Dis**, 80, p. 137-146, Mar 2019.

PROCOP , G. W.; KONEMAN, E. W. Koneman's Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. *In*: EDITION, S. (Ed.). 2016.

RAINBOW, J. *et al.* Rifampin-resistant meningococcal disease. **Emerg Infect Dis**, 11, n. 6, p. 977-979, Jun 2005.

RAYMOND, N. J. *et al.* Molecular epidemiology of sporadic (endemic) serogroup C meningococcal disease. **J Infect Dis**, 176, n. 5, p. 1277-1284, Nov 1997.

READ, R. C. *Neisseria meningitidis*; clones, carriage, and disease. **Clin Microbiol Infect**, 20, n. 5, p. 391-395, May 2014.

RODRIGUES, C. M. C. *et al.* Genomic Surveillance of 4CMenB Vaccine Antigenic Variants among Disease-Causing *Neisseria meningitidis* Isolates, United Kingdom, 2010-2016. **Emerg Infect Dis**, 24, n. 4, p. 673-682, Apr 2018.

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

RUSSELL, J. E. *et al.* PorA variable regions of *Neisseria meningitidis*. **Emerg Infect Dis**, 10, n. 4, p. 674-678, Apr 2004.

SACCHI, C. T. *et al.* Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, 6, n. 6, p. e20675, 2011.

SACCHI, C. T. *et al.* Proposed standardization of *Neisseria meningitidis* PorA variable-region typing nomenclature. **Clin Diagn Lab Immunol**, 5, n. 6, p. 845-855, Nov 1998.

SACCHI, C. T. *et al.* Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. **J Clin Microbiol**, 40, n. 12, p. 4520-4527, Dec 2002.

SADARANGANI, M.; POLLARD, A. J. Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story. **Lancet Infect Dis**, 10, n. 2, p. 112-124, Feb 2010.

SANTOLAYA, M. E. *et al.* Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study. **Lancet**, 379, n. 9816, p. 617-624, Feb 2012.

SERRA, L. *et al.* Carriage of *Neisseria Meningitidis* in Low and Middle Income Countries of the Americas and Asia: A Review of the Literature. **Infect Dis Ther**, Apr 2020.

SILVA, L. A. *et al.* *Neisseria meningitidis* disease-associated clones in Amazonas State, Brazil. **Infect Dis (Lond)**, p. 1-8, Apr 2018.

SIMÕES, M. J. *et al.* Molecular surveillance of *Neisseria meningitidis* capsular switching in Portugal, 2002-2006. **Epidemiol Infect**, 137, n. 2, p. 161-165, Feb 2009.

SPENCE DAVIZON, E. *et al.* Two Cases of Meningococcal Disease in One Family Separated by an Extended Period - Colorado, 2015-2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 67, n. 12, p. 366-368, Mar 2018.

STEFANELLI, P. *et al.* First report of capsule replacement among electrophoretic type 37 *Neisseria meningitidis* strains in Italy. **J Clin Microbiol**, 41, n. 12, p. 5783-5786, Dec 2003.

STEPHENS, D. S. Conquering the meningococcus. **FEMS Microbiol Rev**, 31, n. 1, p. 3-14, Jan 2007.

STRELOW, V. L. *et al.* Meningococcal meningitis: clinical and laboratorial characteristics, fatality rate and variables associated with in-hospital mortality. **Arq Neuropsiquiatr**, 74, n. 11, p. 875-880, Nov 2016.

SWARTLEY, J. S. *et al.* Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 1, p. 271-276, Jan 1997.

SÁFADI, M. A. *et al.* The current situation of meningococcal disease in Latin America and recommendations for a new case definition from the Global Meningococcal Initiative. **Expert Rev Vaccines**, 12, n. 8, p. 903-915, Aug 2013.

TAHA, M. K. *et al.* Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. **Lancet**, 356, n. 9248, p. 2159, 2000 Dec 23-30 2000.

TAHA, M. K. *et al.* Continuing diversification of *Neisseria meningitidis* W135 as a primary cause of meningococcal disease after emergence of the serogroup in 2000. **J Clin Microbiol**, 42, n. 9, p. 4158-4163, Sep 2004.

TAHA, M. K. *et al.* Multicenter study for defining the breakpoint for rifampin resistance in *Neisseria meningitidis* by *rpoB* sequencing. **Antimicrob Agents Chemother**, 54, n. 9, p. 3651-3658, Sep 2010.

TAHA, M. K. *et al.* Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis*. **Antimicrob Agents Chemother**, 51, n. 8, p. 2784-2792, Aug 2007.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Mol Biol Evol**, 9, n. 4, p. 678-687, Jul 1992.

TANABE, M.; NIMIGEAN, C. M.; IVERSON, T. M. Structural basis for solute transport, nucleotide regulation, and immunological recognition of *Neisseria meningitidis* PorB. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 15, p. 6811-6816, Apr 2010.

TATUSOVA, T. *et al.* NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Res**, 44, n. 14, p. 6614-6624, 08 2016.

TELISINGHE, L. *et al.* Chemoprophylaxis and vaccination in preventing subsequent cases of meningococcal disease in household contacts of a case of meningococcal disease: a systematic review. **Epidemiol Infect**, 143, n. 11, p. 2259-2268, Aug 2015.

TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, 33, n. 9, p. 2233-2239, Sep 1995.

TUNKEL, A. R. *et al.* Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. **Clin Infect Dis**, 39, n. 9, p. 1267-1284, Nov 2004.

TZENG, Y. L.; THOMAS, J.; STEPHENS, D. S. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. **Crit Rev Microbiol**, 42, n. 5, p. 759-772, Sep 2016.

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**, 9, n. 3, Mar 03 2021.

VALENZA, G. *et al.* Microbiological evaluation of the new VITEK 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. **J Clin Microbiol**, 45, n. 11, p. 3493-3497, Nov 2007.

VIEUSSEUX, M. Memoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805.: **J Med Clin Pharm.** 11: 163–182 p. 1805.

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

WANG, Q. *et al.* Genetic study of capsular switching between *Neisseria meningitidis* sequence type 7 serogroup A and C strains. **Infect Immun**, 78, n. 9, p. 3883-3888, Sep 2010.

WEICHSELBAUM, A. Ueber die Aetiologie der akuten meningitis cerebrospinalis.: **Fortschr Med.**: 573 p. 1887.

YEZLI, S. *et al.* Meningococcal disease during the Hajj and Umrah mass gatherings. **Int J Infect Dis**, 47, p. 60-64, Jun 2016.

ZALMANOVICI TRESTIOREANU, A. *et al.* Antibiotics for preventing meningococcal infections. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 10, p. CD004785, Oct 2013.

ZAPUN, A.; MORLOT, C.; TAHA, M. K. Resistance to β -Lactams in *Neisseria* ssp Due to Chromosomally Encoded Penicillin-Binding Proteins. **Antibiotics (Basel)**, 5, n. 4, Sep 2016.

ZUGHAIER, S. *et al.* TLR4-dependent adjuvant activity of *Neisseria meningitidis* lipid A. **Vaccine**, 25, n. 22, p. 4401-4409, May 2007.

ZUGHAIER, S. M. *et al.* *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway. **Infect Immun**, 72, n. 1, p. 371-380, Jan 2004.

9 ANEXOS

Anexo I. Parecer do Comitê de ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *Neisseria meningitidis* ISOLADAS NO LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE MINAS GERAIS.

Pesquisador: PAULA PRAZERES MAGALHAES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02069918.2.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.059.846

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo descritivo e de epidemiologia molecular que inclui a caracterização fenotípica de amostras clínicas, a tipagem genética pelas técnicas de multilocus sequence typing (MLST) e pulsedfield gel electrophoresis (PFGE), o sequenciamento dos genes associados à resistência antimicrobiana, além do estabelecimento do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos usando E-test. As amostras a serem estudadas fazem parte da coleção do Laboratório Central de Saúde de casos de meningite bacteriana e/ou meningococemia entre janeiro de 2017 e dezembro de 2019. Pública de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias. Elas serão armazenadas em freezer a -80°C, em BHI (brain heart infusion) com 20% de glicerol.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a diversidade genética de clones hipervirulentos de *N. meningitidis* associados à doença meningocócica que circulam no estado de Minas Gerais e detectar os genes responsáveis pela resistência antimicrobiana de amostras da bactéria isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos relatados.

De acordo com o formulário "Informações básicas do Projeto" os benefícios deste projeto são: "A incorporação de novas metodologias moleculares no LACEN/MG para pesquisar a incidência de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.059.846

linhagens hipervirulentas de *Neisseria meningitidis* (complexos clonais) circulantes em Minas Gerais e detectar os mecanismos moleculares de resistência associados a susceptibilidade reduzida aos antibióticos nestas cepas isoladas no período entre Janeiro de 2017 e dezembro de 2019, a fim de prover informações epidemiológicas relevantes para subsidiar o estudo de novos protocolos de tratamento para o Estado e para o País, contribuindo assim para tornar a assistência à saúde mais efetiva por meio do uso adequado de antimicrobianos e da detecção da emergência de resistência microbiana em serviços de saúde no Estado de Minas Gerais. Além de formar recursos humanos para atuar no sistema único de saúde (SUS)."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Por se tratar de análises da coleção de amostras bacterianas do Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, o projeto não oferece riscos. É um projeto importante, pois irá identificar os principais complexos clonais de *Neisseria meningitidis* circulantes no Estado de Minas Gerais; descrever o perfil de susceptibilidade das amostras e os respectivos mecanismos de resistência encontrados; incorporar tecnologia pelo Sistema Único de Saúde, através da transferência da tecnologia para o Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas, Instituto Octávio Magalhães (SDBF/IOM/FUNED), Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN/MG), Fundação Ezequiel Dias; contribuir para reafirmação da Instituto Octávio Magalhães, LACEN-MG, Fundação Ezequiel Dias como fornecedor de ciência e tecnologias para o Sistema Único de Saúde (SUS); contribuir para o aumento da produção científica dos membros envolvidos no projeto; além de formar recurso humano para atuar no Sistema único de Saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os itens do formulário "Informações básicas do Projeto" foram preenchidos. De acordo com o formulário há dispensa para o TCLE e não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco. Há descrição detalhada do orçamento. As etapas de execução do projeto estão datadas a partir de 2019. Consta na documentação: 1) Declaração de manuseio de material biológico do responsável técnico pelo Laboratório Central de Saúde Pública da Fundação Ezequiel Dias; 2) Justificativa de ausência de TCLE; 3) Parecer favorável do professor do departamento de microbiologia e 4) Folha de rosto devidamente assinada.

Recomendações:

Não há recomendações.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.059.846

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou a favor da aprovação do projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1232010.pdf	30/10/2018 16:56:49		Aceite
Outros	Parecer_consultado.pdf	30/10/2018 16:55:57	Dhian Renato Almeida Camargo	Aceite
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/10/2018 13:53:22	Dhian Renato Almeida Camargo	Aceite
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Camargo_DRA_Projeto_Detalhado.pdf	02/10/2018 18:05:43	Dhian Renato Almeida Camargo	Aceite
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_manuseio_de_material_biologico.pdf	02/10/2018 13:27:29	Dhian Renato Almeida Camargo	Aceite
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_ausencia_TCLE.pdf	02/10/2018 13:27:16	Dhian Renato Almeida Camargo	Aceite

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.059.846

BELO HORIZONTE, 05 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Anexo II. Declaração de manuseio de material biológico.



DECLARAÇÃO DE MANUSEIO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Declaro que tenho ciência e autorizo a Msc. Dhian Renato Almeida Camargo – Analista e Pesquisador de Saúde e Tecnologia, a manipular as amostras bacterianas (cepas) da coleção do Laboratório de Referência Regional para Meningites Bacterianas e colher os dados referentes a estas cepas dos livros de registro das coleções de cepas de Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças do Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias e das fichas de investigação do Sistema de Vigilância Epidemiológica, salvaguardando os interesses dos pacientes, sua imagem e sua privacidade. As cepas padrão e os dados coletados farão parte do projeto de pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *Neisseria meningitidis* ISOLADAS NO LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE MINAS GERAIS" apresentado no âmbito desta proposta.

Chequer Brito Chamone
 Chequer Brito Chamone
 Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças

Responsável Técnico pelo Laboratório Central de Saúde Pública - MG
 Coordenador da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças
 Instituto Octávio Magalhães – Fundação Ezequiel Dias

Anexo III. Certificado de participação em simpósio.**CERTIFICADO**

Certificamos que **Dhian Renato Almeida Camargo** participou do “VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONECTA SIM: Microbiologia Interligada**”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019 com duração total de 16h.

Profa. Dra. Betânia Paiva Drummond
Coordenadora do Conecta SIM

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Anexo IV. Certificado de apresentação de trabalho científico em simpósio.**CERTIFICADO**

Certificamos que **CAMARGO, D. R. A.; OLIVEIRA, M. A. A.; MAGALHÃES, P. P.;** teve o seu trabalho "**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *Neisseria meningitidis* ISOLADAS NO LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE MINAS GERAIS EM 2018**" apresentado no formato de **pôster** no "VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONECTA SIM: Microbiologia Interligada**", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019.

Profa. Dra. Betânia Paiva Drummond
Coordenadora do Conecta SIM

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Anexo V. Artigo científico.

Genetic characterization and detection of resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* strains isolated in the Central Public Health Laboratory of Minas Gerais, Brazil, 2017-2019

Dhian Renato Almeida Camargo^{1,2/+}, Marluce Aparecida Assunção Oliveira¹, Paula Prazeres Magalhães²

¹Ezequiel Dias Foundation (Funed), Belo Horizonte, MG, Brazil.

² Federal University of Minas Gerais, Institute of Biological Sciences, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁺ Corresponding author: Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 30510-010. Service of Bacterial and Fungal Diseases, Ezequiel Dias Foundation (Funed). E-mail: dhianrenato@gmail.com.

Financial support: Ezequiel Dias Foundation, Brazil.

Abstract

Neisseria meningitidis (Men) is associated with high levels of morbidity and mortality in children and young adults worldwide. We describe the genetic characterization and detection of antimicrobial resistance mechanisms in 35 *N. meningitidis* strains isolated in the Central Public Health Laboratory of Minas Gerais, Brazil between 2017 and 2019. The strains were genetically characterized by multilocus sequence typing (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The antimicrobial sensitivity pattern was determined using E-test and the resistance mechanism was analyzed by sequencing of the *penA* gene. PFGE identified eight pulsotypes (A-H), while MLST identified eight clonal complexes (cc), with the most common being cc103 (48,6%) followed by the cc11 (17,6%) and cc32 (11,8%). All strains were sensitive to ceftriaxone, ciprofloxacin and rifampicin, while 20 strains showed intermediate degree of susceptibility to penicillin (pen^I) (MIC between 0.12

and 0.25 mg/L) and one expressed resistance to penicillin (MIC=0.5 mg/L). In addition, five alleles of the *penA* gene were identified and in general, they had polymorphisms associated with the pen^I phenotype. The research showed that there was a predominance of the invasive lineage MenC:23:P1.14-6:cc103:*penA14* with reduced sensitivity to penicillin, and that resistance to ceftriaxone, ciprofloxacin and rifampicin was not detected. This study was vital for advising effective treatment options and for monitoring the development and spread of resistance.

Keywords

Neisseria meningitidis, meningococcal disease, drug resistance, penicillin resistance.

Introduction

N. meningitidis is a Gram-negative diplococcus, etiologic agent of meningococcal disease, characterized by sepsis and/or bacterial meningitis. Meningococcal disease is associated with high lethality (up to 50% when untreated) and high frequency (more than 10%) of severe sequelae. Early treatment with antimicrobials is the most important measure to save lives and reduce complications. ⁽¹⁾

Six serogroups A, B, C, W, Y and X are responsible for almost all cases of invasive meningococcal disease (IMD) and the incidence of serogroups varies among Brazilian regions. ⁽²⁾ The meningococcal serogroup C conjugate vaccine (MenC) was introduced in the Brazilian vaccination calendar in 2010. Despite this, cases and outbreaks caused by serogroup C clonal complex 103 continued to be reported in Brazil. ^(3,4)

N. meningitidis resistant or with intermediate resistance to penicillin G have been reported worldwide and recently, the phenomenon of resistance to ceftriaxone has also been described in some regions of the world (Africa and Europe). ⁽⁵⁾ In recent years, resistant meningococci to drugs used in chemoprophylaxis have been increasingly reported worldwide. ^(6,7)

Studies regarding the molecular epidemiology are necessary to explain the distribution of meningococcal strains (clones) and to understand the epidemic dynamics of pathogen to help determine the most effective control measures. Multilocus sequence

typing (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) are increasingly being used to study the genetic diversity of clinical isolates, including *N. meningitidis*.^(8,9) However, few studies have been conducted in Brazil to assess the prevalence of *N. meningitidis* isolates and sequence types (STs) in sporadic cases and outbreaks.

Surveillance of antimicrobial resistance (AMR) present in microbial populations is vital for advising effective treatment options and for monitoring the development and spread of resistance. Thus, the aim of the present study was to report the genetic characterization and detection of resistance mechanisms of *N. meningitidis* strains isolated from cases of meningococcal disease in Minas Gerais state, Brazil, because of the relevance of this microorganism worldwide.

Materials and Methods

Bacterial strains

This is a descriptive study on meningococcal strains isolated from blood or cerebrospinal fluid from patients with bacterial meningitis between January 2017 and December 2019 in the Central Public Health Laboratory (Lacen) of Ezequiel Dias Foundation, Minas Gerais (MG) state, Brazil. The cultures were carried out on chocolate agar + Polyvitex (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated at 37 °C under 5% CO₂, while identification was carried out by standard bacteriology procedures. Serotyping and serosubtyping of *N. meningitidis* isolates were performed at the Medical Biology Division, Bacteriology Department of Adolfo Lutz Institute, Brazil, by dot blot analyses using whole-cell suspensions, as described previously.⁽¹⁰⁾

Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of penicillin G, ceftriaxone, rifampicin and ciprofloxacin were determined by E-test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute.⁽¹¹⁾

PCR and sequencing of *penA*

Genomic DNA from the isolates was prepared for PCR and genetic analyses using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The amplification and sequencing of the *penA* gene, encoding penicillin-binding protein 2 (PBP2), was performed by employing primers and conditions described previously.⁽¹²⁾ The *penA* allele definition was determined at the *Neisseria* typing scheme (<https://pubmlst.org/neisseria/>). A specific *penA* segment of 402 bp, which is the target region for penicillin susceptibility definition and for allele assignment, was aligned with Clustal W program, and a Maximum Likelihood tree was constructed in software MEGA 7.⁽¹³⁾ The stability of the phylogenetic relationship was evaluated by bootstrap analysis based on 1000 replicates.⁽¹⁴⁾

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

First, *genomic DNA* in agarose *plugs* was prepared using the CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The genomic DNA was digested with *NheI* (New England Biolabs, UK) enzyme and run into a CHEF-DRIII system, as previously described.⁽¹⁵⁾ PFGE profiles and cluster analyses were identified by using the software Bionumerics version 7.5 (Applied Maths, Inc.). The dice similarity coefficient was used to determine the similarity between each banding pattern. A dendrogram was constructed using the unweighted-pair group method with arithmetic averages. The values used for optimization and tolerance were 1.0 and 1.5%, respectively. Isolates with similarities greater than 80% were considered to belong to the same cluster, following previously proposed criteria.⁽¹⁶⁾

Multilocus sequence typing

The MLST assay was performed as previously described.⁽¹⁷⁾ Briefly, seven *N. meningitidis* housekeeping genes (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC*, *pgm*) were amplified and sequenced. Alleles, sequence type (ST) and clonal complex (CC) were assigned using the *N. meningitidis* MLST database (<https://pubmlst.org/neisseria/>).

Phylogenetic relationship

The products of the housekeeping genes were compared and analyzed by employing the BLAST program. To explore the phylogenetic relationship among the isolates, the seven loci of each isolate were concatenated and aligned using the Clustal W program. An evolutionary tree for the data set was formed by the Maximum Likelihood tree using the software MEGA 7.⁽¹³⁾ The stability of the phylogenetic relationship was evaluated by bootstrap analysis based on 1000 replicates.⁽¹⁴⁾

Statistical analysis

The collected data were inserted into the database of the Epi Info™ program version 7.2.3.1 (CDC/USA) and analyzed with a 95% confidence index ($P < 0.05$). The systematized results were expressed by absolute and percentage frequencies distribution.

Ethics

This study was approved by the Research Ethics Committee in research of the Federal University of Minas Gerais (CAAE 02069918.20000.5149).

Results

General characteristics of invasive meningococcal disease

In the study period, 157 cases of IMD have been detected, including 70 cases (50.32%) identified by qPCR, 46 cases (29.3%) by latex agglutination test and 41 cases (26.1%) by viable cultures. All samples were collected from suspected cases of meningococcal disease from January 2017 to December 2019. Meningococcal disease was more frequent during the winter season with 34.39% of cases. The incidence was higher in women (50.32%) compared to men, which gives a sex ratio of 1.28, and 35.3% of cases

were in children ≤ 14 years old. The incidence rate for the annual average of cases was 0.25/100,000 inhabitants according to data from Lacen-MG between 2017-2019 and demographic data from IBGE.

IMD were mainly due to serogroup C with 58.6% of cases, followed by serogroup B with 20.4%. Only 8.9% and 8.3% of the cases were associated with serogroups W and Y, respectively. In 3.8% of cases, it was not possible to identify the serogroup, due to limitations of the techniques used. There was at least one case of IMD in all 13 intermediate geographic regions of Minas Gerais state. The largest number of cases was concentrated in the coverage area of the geographical region of Belo Horizonte (32.5%), with a predominance of serogroup C incidence.

Bacterial Strains and Antimicrobial Susceptibility

A total of 35 non-duplicate *N. meningitidis* isolates were analyzed in this research. Bacterial strains were of serogroups C (60%), B (17.1%), W (17.1%) and Y (5.8%). Serotypes were determined for 33 strains of meningococcus (94.3%) and the serosubtype was identified for 24 (68.6%). The most common strains by group:type:subtype were C:23:P1.14-6 (n=11), B:4.7:P1.19.15 (n=3), W:2a:P1. 2 (n=2) and Y:4:nt (n=1). In all years, the strains classified as C:23:P1.14-6 were the most frequent.

In regard to penicillin, of the 35 strains isolated, 20 (57.1%) had reduced susceptibility to the antimicrobial ($0.12 \leq \text{MIC} \leq 0.25$ mg/L), 40% (n=14) were susceptible ($\text{MIC} \leq 0.06$ mg/L) and one isolate of serogroup W (2.9%) was resistant ($\text{MIC} = 0.5$ mg/L). It should be noted that all the bacterial strains were susceptible to ceftriaxone, ciprofloxacin and rifampicin. *N. meningitidis* strains with reduced susceptibility to penicillin G belonged to serogroup C (15/20), serogroup B (3/20), serogroup W (1/20) and serogroup Y (1/20).

Genetic characterization

The genetic characterization by MLST and PFGE of 35 meningococcus strains is summarized in Table I. MLST showed that the majority of isolates belong to the invasive

clonal complex cc103 (ST-3780, ST-8730 and ST-12020) followed by the cc11 (ST-11 and ST-12818), cc32 (ST-33, ST-34 and ST-639), cc22 (ST-8044 and ST-14917), cc213 (ST-213), cc23 (ST-23), cc461 (ST-461) and cc865 (no ST). The ST-3015 was not grouped at the level of clonal complex.

PFGE typing was performed on all bacterial strains and the genetic analysis of the restriction patterns allowed the identification of 8 clusters (pulsotypes), designated by the clonal patterns A-H, showing similarity $\geq 80\%$ within each cluster. B was the most prevalent pulsotype, with 17 isolates belonging to the clonal complex 103.

Phylogenetic analysis of the concatenated sequences of the MLST genes revealed that the bacterial strains were grouped into five clusters and the occurrence of potential capsule exchange events by identifying isolates from different serogroups in the same cluster (Figure 1).

The characterization of the *penA* resistance gene in 21 isolates showed that the *penA14* allele was the most widespread ($n=16$), followed by *penA9* ($n=2$), *penA20* ($n=1$), *penA52* ($n=1$) and *penA420* ($n=1$). The *penA9*, *penA14*, *penA20* and *penA52* alleles had the five polymorphisms F504L, A510V, I515V, H541N and I566V associated with the pen^I phenotype. The *penA420* allele was related to the pen^I phenotype but did not have any of the five polymorphisms associated with the pen^I phenotype. Phylogenetic analysis of the DNA sequences of the *penA* resistance gene made it possible to observe the grouping of the sequences into four clusters (Figure 2).

Discussion

Minas Gerais state is in the southeast region of Brazil, includes 853 cities and is larger than countries such as France, Sweden, Spain and Japan. Between 2000 and 2009, in Minas Gerais, the period before the introduction of the MenC vaccine, 75.3% of IMD cases were caused by *N. meningitidis* group C and 26.3% of the patients ranged from 1 to 4 years of age.⁽¹⁸⁾ During 2009 to 2016, 68.5% of cases were caused by group C in Brazil.⁽⁷⁾ During the 36-month surveillance period, we found that 58.6% of the samples belonged to group C and 8.9% of patients were aged 1-4 years.

The data showed that there was a reduction in the incidence of meningococcal disease caused by group C and also in the age group from 1 to 4 years in Minas Gerais when compared to the 2009 data. This change has been observed in Brazil since 2010, after the introduction of the MenC vaccine in the National Immunization Program (PNI) in Brazil. The epidemiology of the disease is likely to continue changing in Minas Gerais, what stresses the need for constant monitoring by the meningococcal disease surveillance system to understand these changes and provide information that may help designing protocols aiming at reducing the incidence of this disease in the state.^(2, 3)

Regarding typing and subtyping, the results of the present investigation corroborate those of the study carried out in Salvador, Bahia, published in January 2018, which described that, for groups B and C, the most prevalent types/subtypes were also C:23:P1.14-6 and the B:4,7:P1.19,15.⁽¹⁹⁾ The most frequent types/subtypes found in our study (C:23:P1.14-6, B:4,7:P1.19,15, W:2a: P1.2 and Y:4: nt) were also part of the most prevalent types/subtypes in Brazil described in 2018.⁽⁷⁾ The data above demonstrate that the invasive strains that circulated in Minas Gerais during the study period also circulated in other regions of Brazil and that, currently, C:23:P1.14-6 strain is the most prevalent in the state and in Brazil.

All isolates included in this study were sensitive to ceftriaxone, ciprofloxacin, and rifampicin, with 57.1% of bacterial strains being identified with decreased susceptibility to penicillin G and 2.9% with in vitro resistance to this antimicrobial agent. These results show that there has been an increase in the incidence of strains with decreased susceptibility to penicillin G when compared to studies conducted in Brazil in 2011 and 2018 that reported decreased susceptibility to penicillin G in 13% and 33% of the isolates, respectively.^(7, 20)

The present investigation identified that the *penA9*, *penA14*, *penA20* and *penA52* alleles had the five mutations that led to amino acid changes in the transpeptidase domain of the PBP2 (F504L, A510V, I515V, H541N and I566V) associated with the pen^I phenotype previously described.⁽¹²⁾ The allele *penA420* was related to the pen^I phenotype, but did not have any of the five polymorphisms in the fragment analyzed. We hypothesized that the pen^I phenotype could be associated to other polymorphisms along the entire *penA* genes.⁽²¹⁾

The phylogenetic analysis of the *penA* alleles showed that the sequences grouped in four clusters, with the formation of a large phylogenetic group with strains of the *penA14* phenotype. It was not possible to correlate the phenotypes found with specific geographic regions.

This is the first study in MG that included the genetic characterization of *N. meningitidis* that employed PFGE and MLST. Epidemiological data on genetic diversity, based on MLST, showed the presence of a high degree of genetic diversity in the population analyzed, considering that a total of 14 sequential types were identified among the 35 strains analyzed. Thirteen sequential types were grouped into eight clonal complexes. The ST-3015 was not grouped at the level of clonal complex.

It was not possible to identify the ST of isolate 261.18 (cc865), since the allelic profile found was not shared by any other strain included in the database of the portal <https://pubmlst.org/>. This fact occurred possibly because it is a ST not yet described.⁽²²⁾

Group C strains were related to ST-12020 (cc103), ST-3780 (cc103), ST-8730 (cc103), ST-11 (cc11), ST-12818 (cc11), ST-213 (cc213) and no ST (cc865). Those from group B to ST-33 (cc32), ST-34 (cc32), ST-639 (cc32), ST-213 (cc213) and ST-461 (cc461), those from group W to ST-11 (cc11), ST-8044 (cc22) and ST-14917 (cc22) and those from group Y to ST23 (cc23) and ST-3015.

In Brazil, cc103 has been linked to group C and has been described since 1989 with most strains exhibiting phenotype 23:P1.14-6.^(3, 4, 23) In this research, we found that the majority (48.6%) of the bacterial strains samples isolated in Lacerdópolis-MG were from cc103, related to group C, and exhibited the phenotype 23:P1.14-6. The data showed that, despite the introduction of the MenC vaccine in 2009, MenC cc103 remained the most prevalent hypervirulent strain in MG between 2017 and 2019.

In addition to cc103, the clonal complexes cc11, cc32, cc22, cc23, cc461, cc865 and ST-3015 had previously been reported in Brazil.^(4, 7, 24-27) In relation to cc213, in Brazil, this is the first report of this clonal complex.

The phylogenetic analysis showed that the strains of ST-11 (groups C and W) and ST-213 (groups C and B) were closely correlated genetically, indicating the possibility of the occurrence of the phenomenon of capsular exchange.⁽²⁸⁾

The combination of data from MLST and PFGE allowed to achieve a greater discriminatory power in phylogenetic analysis, and it was possible to observe that PFGE presented a greater resolving power, allowing to discriminate subtle differences presented within some clonal complexes, such as those observed in cc11 and cc22, which were not observed in the MLST.

In conclusion, our study provided an overview of the molecular epidemiology of *N. meningitidis* in Minas Gerais state, revealing a high diversity of 14 different STs and the presence of five clusters highlighting a spread of diverse clones with predominance of the invasive lineage MenC:23:P1.14-6:cc103:*penA14* with reduced sensitivity to penicillin, and that ceftriaxone, ciprofloxacin and rifampicin used in the empirical treatment and control (chemoprophylaxis) of meningococcal disease remain effective.

Acknowledgements

We acknowledge Fabiana Cardoso da Silva and Paulo Eduardo de Souza da Silva assistance in culturing bacterial strains.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interests.

Author's contribution

DRAC, MAAO and PPM - Conceived and designed the experiments; DRAC - performed the experiments; DRAC, MAAO and PPM - analysed the data; MAAO - contributed with reagents/materials/analysis tools; DRAC, MAAO and PPM - contributed to the writing of the manuscript.

References

1. Serra L, Presa J, Christensen H, Trotter C. Carriage of *Neisseria Meningitidis* in Low and Middle Income Countries of the Americas and Asia: A Review of the Literature. *Infect Dis Ther*. 2020.
2. Moraes C, Moraes JC, Silva GD, Duarte EC. Evaluation of the impact of serogroup C meningococcal disease vaccination program in Brazil and its regions: a population-based study, 2001-2013. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(4):237-46.
3. Andrade AL, Minamisava R, Tomich LM, Lemos AP, Gorla MC, de Cunto Brandileone MC, et al. Impact of meningococcal C conjugate vaccination four years after introduction of routine childhood immunization in Brazil. *Vaccine*. 2017;35(16):2025-33.
4. Marin MA, Fonseca E, Encinas F, Freitas F, Camargo DA, Coimbra RS, et al. The invasive *Neisseria meningitidis* MenC CC103 from Brazil is characterized by an accessory gene repertoire. *Sci Rep*. 2017;7(1):1617.
5. Alemayehu T, Mekasha A, Abebe T. Nasal carriage rate and antibiotic susceptibility pattern of *Neisseria meningitidis* in healthy Ethiopian children and adolescents: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2017;12(10):e0187207.
6. Gorla MC, Cassiolato AP, Pinhata JMW, de Moraes C, Corso A, Galletti P, et al. Emergence of resistance to ciprofloxacin in *Neisseria meningitidis* in Brazil. *J Med Microbiol*. 2018;67(3):286-8.
7. Gorla MC, Pinhata JMW, Dias UJ, de Moraes C, Lemos AP. Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive cases in Brazil from 2009 to 2016. *J Med Microbiol*. 2018.
8. Rouphael NG, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods Mol Biol*. 2012;799:1-20.
9. Mowlaboccus S, Jolley KA, Bray JE, Pang S, Lee YT, Bew JD, et al. Clonal Expansion of New Penicillin-Resistant Clade of *Neisseria meningitidis* Serogroup W Clonal Complex 11, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(8):1364-7.
10. Gorla MC, Pinhata JMW, Dias UJ, de Moraes C, Lemos AP. Surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive cases in Brazil from 2009 to 2016. *J Med Microbiol*. 2018;67(6):750-6.
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
12. Taha MK, Vázquez JA, Hong E, Bennett DE, Bertrand S, Bukovski S, et al. Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(8):2784-92.
13. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.
14. Felsenstein J. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution*. 1985;39(4):783-91.
15. Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):75-85.
16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.

17. Brehony C, Jolley KA, Maiden MC. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(1):15-26.
18. Nascimento KA, Miranzi SeS, Scatena LM. Epidemiological profile of meningococcal disease in the State of Minas Gerais and in the Central, North, and Triângulo Mineiro regions, Brazil, during 2000-2009. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(3):334-9.
19. Cordeiro SM, Cardoso CW, de Araújo LG, Ribeiro LE, Azevedo J, Silva RCV, et al. Dissemination of the ST-103 clonal complex serogroup C meningococci in Salvador, Brazil. *Microbes Infect.* 2018;20(1):19-24.
20. Gorla MC, de Paiva MV, Salgueiro VC, Lemos AP, Brandão AP, Vázquez JA, et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated from meningitis cases in Brazil from 2006 to 2008. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(2):85-9.
21. Fonseca É, Marin MA, Freitas FS, Vitória BSA, de Araújo FMG, Camargo DRA, et al. The invasive MenC cc103 lineage with penicillin reduced susceptibility persisting in Brazil. *Int J Med Microbiol.* 2017.
22. Caugant DA, Brynildsrud OB. *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):84-96.
23. de Lemos AP, Yara TY, Gorla MC, de Paiva MV, de Souza AL, Gonçalves MI, et al. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1266-73.
24. Moura ARSS, Kretz CB, Ferreira IE, Nunes AMPB, de Moraes JC, Reis MG, et al. Molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates recovered from 11-19-year-old meningococcal carriers in Salvador, Brazil. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185038.
25. de Filippis I, de Lemos AP, Hostetler JB, Wollenberg K, Sacchi CT, Dunning Hotopp JC, et al. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup B in Brazil. *PLoS One.* 2012;7(3):e33016.
26. Azevedo AC, Franco NEC, de Carvalho Rocha MR, Andrade C, Torres MC, de Filippis I. Molecular surveillance of brazilian meningococcal isolates serogroup c in the pre and post-men-c-vaccination period: Emergence of ST-3780. *Infect Genet Evol.* 2020;78:104079.
27. Lemos AP, Harrison LH, Lenser M, Sacchi CT. Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. *J Infect.* 2010;60(3):209-17.
28. Mustapha MM, Marsh JW, Krauland MG, Fernandez JO, de Lemos AP, Dunning Hotopp JC, et al. Genomic Investigation Reveals Highly Conserved, Mosaic, Recombination Events Associated with Capsular Switching among Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup W Sequence Type (ST)-11 Strains. *Genome Biol Evol.* 2016;8(6):2065-75.

Table I

Characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated at Lacen-MG between 2017 and 2019.

Strains	Date	Location	Age	Sex	Group	Type	Subtype	CIP	CRO	PEN	RIF	ST	cc	PFGE	penA
087.17	2017	Itaúna	17	M	W	2a	nt	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,03 (S)	0,015 (S)	11	11	H	
287.17	2017	Uberlândia	21	M	C	19,1	P1.14	0,0015 (S)	0,0015 (S)	0,06 (S)	0,015 (S)	213	213	C	
273.17	2017	São Sebastião do Paraíso	5	F	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,0003 (S)	0,06 (S)	0,007 (S)	3780	103	B	
307.17	2017	Belo Horizonte	30	M	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,125 (I)	0,015 (S)	3780	103	B	14
147.17	2017	Uberlândia	25	F	C	23	nt	0,007 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,015 (S)	12020	103	B	
132.17	2017	Uberlândia	4	M	W	NT	P1.3	0,007 (S)	0,0003 (S)	0,06 (S)	0,015 (S)	14917	22	G	
163.17	2017	Uberlândia	40	F	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,125 (I)	0,007 (S)	12020	103	B	14
497.17	2017	Belo Horizonte	2 months	M	B	4	P1.19,15	0,007 (S)	0,0007 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	639	32	A	
026.18	2018	Uberlândia	11	M	C	23	P1.14-6	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,015 (S)	12020	103	B	14
102.18	2018	Frutal	29	M	B	19	nt	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,25 (I)	0,06 (S)	461	461	E	420
085.18	2018	Passos	1	F	B	4,7	P1.19,15	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,03 (S)	33	32	A	52
053.18	2018	Uberlândia	20	M	C	2a	P1.5	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)	12818	11	H	
063.18	2018	Uberlândia	20	F	B	4,7	P1.19,15	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	34	32	A	
064.18	2018	Uberlândia	50	M	B	4,7	P1.19,15	0,0015 (S)	0,0007 (S)	0,06 (S)	0,5 (S)	34	32	A	
251.18	2018	Belo Horizonte	39	F	Y	4	nt	0,0007 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,007 (S)	23	23	F	20
261.18	2018	Leopoldina	7	M	C	19,7	nt	0,003 (S)	0,0007 (S)	0,19 (I)	0,007 (S)	No ST	865	E	9
127.18	2018	Uberlândia	37	F	C	23	nt	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,125 (I)	0,125 (S)	12020	103	B	14
307.18	2018	Belo Horizonte	42	F	C	23	nt	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,016 (S)	0,06 (S)	3780	103	B	
336.18	2018	Uberlândia	5	F	C	2a	P1.5	0,0007 (S)	0,0007 (S)	0,047 (S)	0,06 (S)	11	11	D	
342.18	2018	Divinópolis	67	F	C	23	P1.14-6	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,125 (I)	0,03 (S)	12020	103	B	14
353.18	2018	Contagem	23	F	C	23	nt	0,0007 (S)	0,0003 (S)	0,19 (I)	0,03 (S)	3780	103	B	14
488.18	2018	Visconde do Rio Branco	47	F	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,094 (I)	0,125 (S)	12020	103	B	14
492.18	2018	Leopoldina	3	F	C	23	P1.14-6	0,0015 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,015 (S)	8730	103	B	14
227.18	2018	Belo Horizonte	74	F	C	23	nt	0,003 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,06 (S)	3780	103	B	14
26.19	2019	Belo Horizonte	33	M	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,094 (I)	0,03 (S)	12020	103	B	14
87.19	2019	Uberlândia	42	M	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,06 (S)	12020	103	B	14
88.19	2019	Brasília de Minas	14	F	W	NT	P1.3	0,003 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,06 (S)	8044	22	F	14
146.19	2019	Alfenas	2 months	F	W	2a	P1.2	0,003 (S)	0,016 (S)	0,5 (R)	0,03 (S)	11	11	H	9
371.19	2019	Belo Horizonte	50	F	W	2a	P1.5,2	0,03 (S)	0,016 (S)	0,064 (S)	0,125 (S)	11	11	H	
386.19	2019	Ubá	23	F	C	23	nt	0,03 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,5 (S)	12020	103	B	14
216.19	2019	Belo Horizonte	53	M	W	2a	P1.2	0,03 (S)	0,016 (S)	0,032 (S)	0,06 (S)	11	11	H	
220.19	2019	Belo Horizonte	76	F	Y	22	P1.3	0,03 (S)	0,016 (S)	0,047 (S)	0,06 (S)	3015	No cc	E	
546.19	2019	Belo Horizonte	35	M	C	23	P1.14-6	0,003 (S)	0,016 (S)	0,094 (I)	0,06 (S)	8730	103	B	14
554.19	2019	Araxá	56	M	C	23	P1.14-6	0,03 (S)	0,016 (S)	0,125 (I)	0,03 (S)	12020	103	B	14
672.19	2019	Capelinha	26	F	B	4,7	Nt	0,0015 (S)	0,016 (S)	0,25 (I)	0,03 (S)	213	213	C	14

M: Male; F: Female; NT: Not typeable; nt: Not subtipable; CIP: Ciprofloxacin; CRO: Ceftriaxone; PEN: Penicillin; RIF: Rifampicin; S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant; ST: Sequence type, no ST: No sequence type; cc: Clonal complex; PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis no cc: no clonal complex.

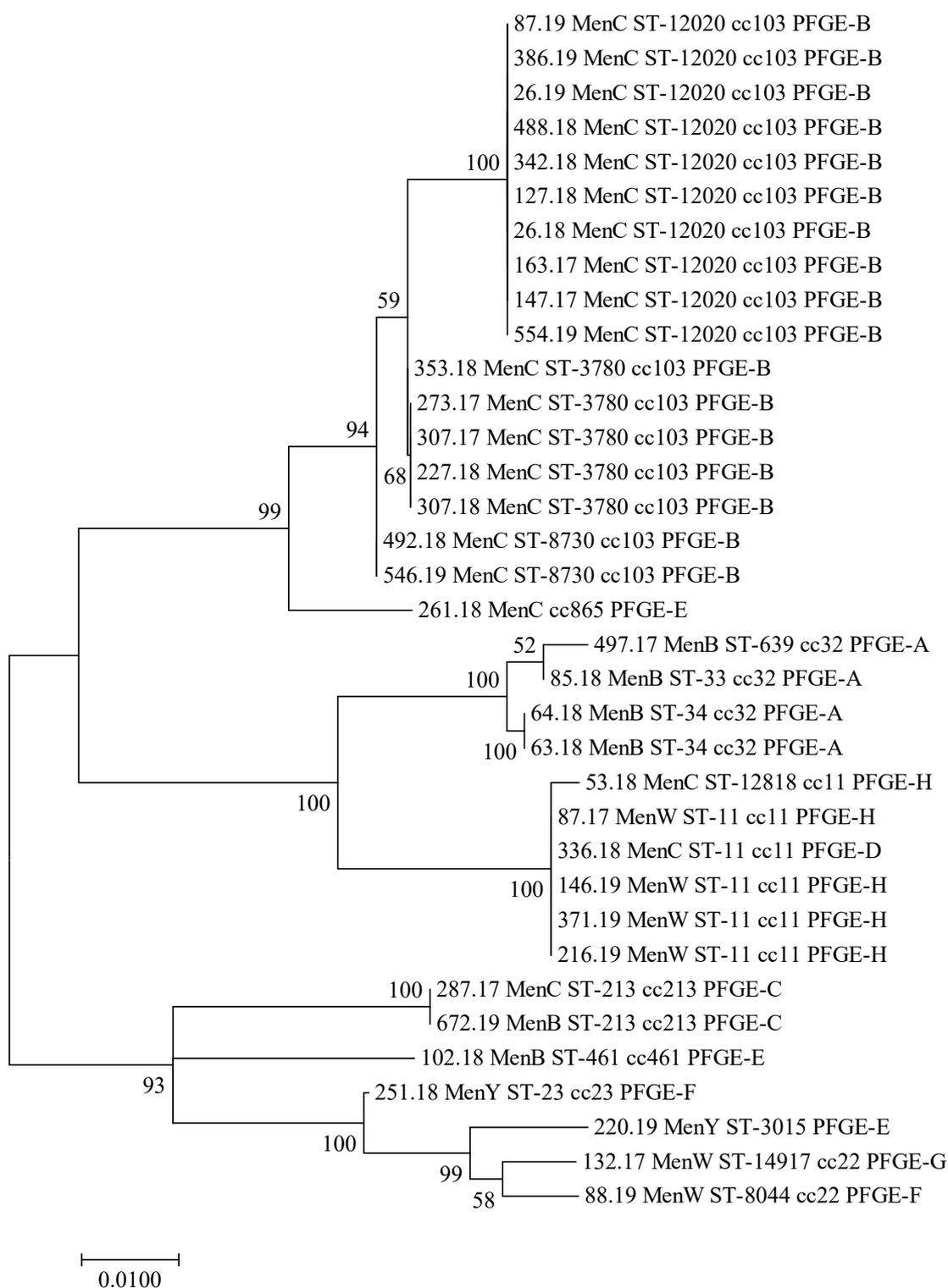


Fig. 1. Maximum Likelihood genetic tree showing the diversity of the concatenated sequences of the MLST genes of 35 *Neisseria meningitidis* strains, MG, Brazil.

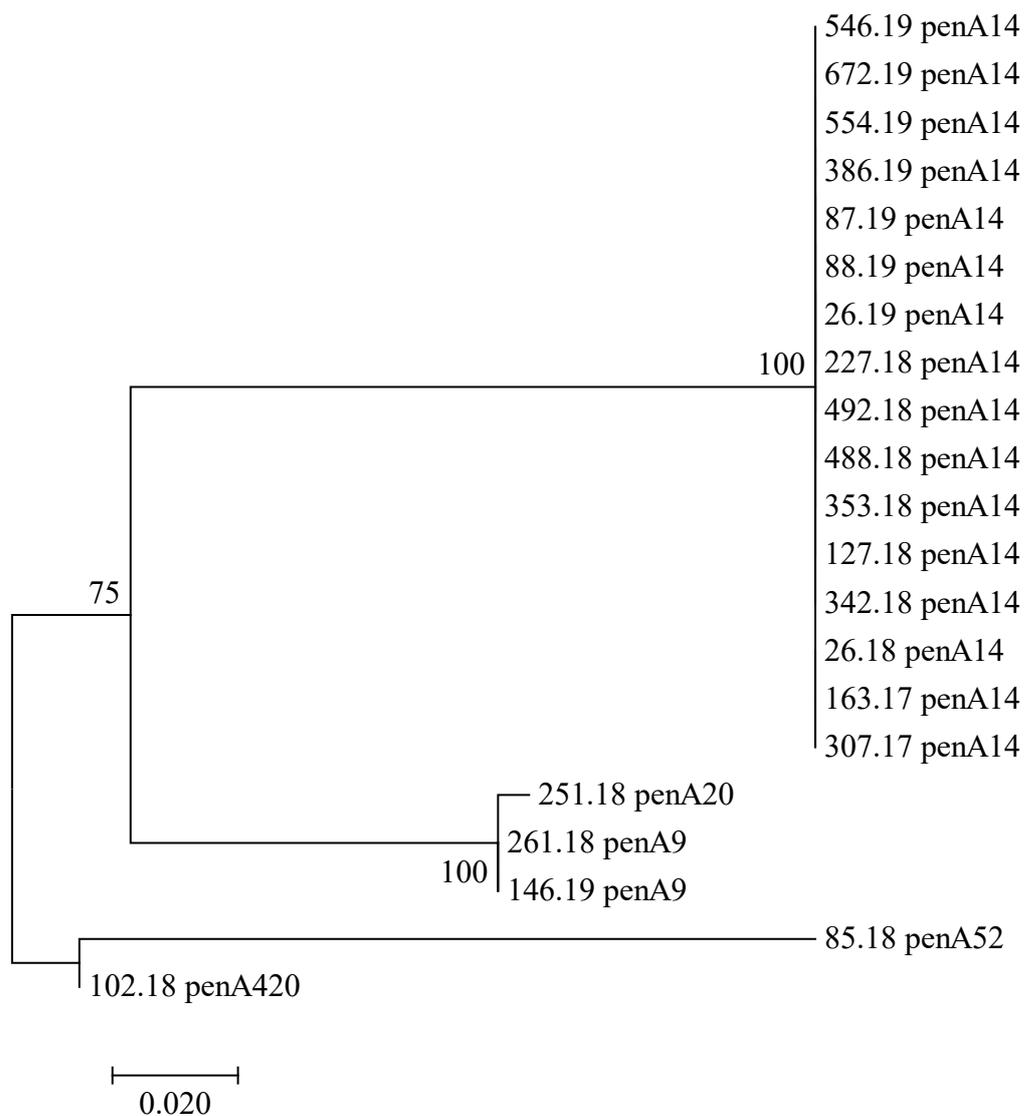


Fig. 2. Maximum Likelihood genetic tree showing the diversity of *penA* alleles of 21 *Neisseria meningitidis* strains from Minas Gerais state, Brazil. Sequence of 402 bp of *penA* were considered.