

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO
RIO GRANDE DO SUL, CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E DA RESISTÊNCIA À PENICILINA EM
ISOLADOS DE *Neisseria meningitidis***

Ludmila Fiorenzano Baethgen

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

**Porto Alegre
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO
RIO GRANDE DO SUL, CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E DA RESISTÊNCIA À PENICILINA EM
ISOLADOS DE *Neisseria meningitidis***

Ludmila Fiorenzano Baethgen

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Bioquímica da UFRGS, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

**Porto Alegre
2007**

*Este trabalho foi desenvolvido no
Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS
e no Centro de Biotecnologia da UFRGS.*

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Issac Newton

*Dedico este trabalho ao meu amor, Caco, que
junto comigo concretizou nosso “experimento”
mais perfeito, a Luiza!*

Agradecimentos

Ao meu incansável orientador, Dr. Arnaldo Zaha, que sempre depositou uma enorme confiança no meu trabalho, e a quem tenho um enorme respeito e admiração pelo pesquisador que é e amigo que demonstrou ser ao longo desses anos;

A Dra. Maria Lúcia Rossetti, “co-orientadora”, que sempre estimulou e tornou possível o sonho de se fazer pesquisa unindo os esforços da Universidade e da Saúde Pública em nosso estado, o meu muito obrigado por me propiciar mais esta oportunidade;

Ao Dr. Lee W. Riley, que expandiu meus horizontes na pesquisa científica e me fez ser ainda mais apaixonada pelo o que faço e que ainda concedeu uma bolsa do Programa Fogarty na UC Berkeley onde todo este trabalho de epidemiologia começou;

À minha primeira parceira de trabalho e de grupo, Camile de Moraes, e à segunda também, Luciana Weidlich, minhas amigas do peito que sonharam comigo, ajudaram e ajudam a concretizar cada vírgula do que estamos construindo na pesquisa e na vida;

Às minhas “fiéis escudeiras” Luciana Nunes e Cecília Klein, que sem elas este trabalho não seria possível, muito menos o “projeto Luiza”...

À minha querida amiga Patrícia Cafrune, incansável nas discussões científicas, ou não científicas, e que acabou se tornando *membro honorável* do nosso grupo de trabalho;

A todos os funcionários da Seção de Bacteriologia, em especial à Silvia Rios, que sempre colaboraram e tornaram possíveis os projetos;

À epidemiologista Claudete Kmetzsch, que desde há muito tempo deposita toda sua confiança em nossos esforços e também ajudou a concretizar os projetos do grupo e a Divisão de Vigilância Epidemiológica/CEVS/SES-RS;

Ao Instituto Adolfo Lutz – Seção de Bacteriologia, em especial a Dra. Ana Paula Lemos, colaboradora incansável que sempre me incentivou e que também ajudou a concretizar este trabalho;

Ao Dr. Albert Ko há quem devo muito pelos conhecimentos em epidemiologia adquiridos durante um estágio realizado em seu laboratório - FIOCRUZ/BA;

Ao colega de laboratório Binh Diep, pelo período na UC Berkeley, onde juntos criamos o VSS-PCR e ao Dr. George Sensabaugh por ter me recebido tão carinhosamente em seu laboratório;

A todas as colegas do laboratório que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho, seja colocando a “mão na massa” ou tornando o ambiente de trabalho agradável e divertido;

À minha família e a família do Caco, que desde sempre me incentivaram e deram apoio em tudo na minha vida, vocês fazem parte de todo este sonho!!!

Ao PPG Bioquímica - UFRGS, aos professores, funcionários, em especial à Cléia, pela dedicação que têm para com a pesquisa, assim como, a CAPES pela oportunidade da bolsa de estudos;

E a todos que de alguma maneira influenciaram ou propiciaram o desenvolvimento deste trabalho, seja na vida profissional ou pessoal, MEU MUITO OBRIGADO!!!!

SUMÁRIO

PARTE I.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1. <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	13
1.1.2. Estrutura antigênica do meningococo	15
1.1.2.1. Cápsula Polissacarídica	16
1.1.2.2. Proteínas de Membrana Externa (OMPs).....	17
1.1.3. Suscetibilidade antimicrobiana	19
1.2. DOENÇA MENINGOCÓCICA	20
1.2.1. Estado de portador e doença.....	20
1.2.2. Transmissão e fatores de risco	21
1.2.3. Patogênese e imunidade	22
1.3. TIPAGEM DE <i>N. MENINGITIDIS</i>	24
1.3.1. Métodos Fenotípicos	24
1.3.2. Métodos Genotípicos.....	25
1.3.2.1. Métodos preferencialmente utilizados para estudos populacionais da DM	26
1.3.2.2. Métodos preferencialmente utilizados para estudos de surtos da DM	29
1.4. GENÉTICA POPULACIONAL DE <i>N. MENINGITIDIS</i>	30
1.5. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO BRASIL E NO RIO GRANDE DO SUL.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
PARTE II.....	37
CAPÍTULO I: EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO RIO GRANDE DO SUL E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS ATRAVÉS DE MULTILOCUS SEQUENCE TYPING.....	38
ARTIGO CIENTÍFICO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM 01/08/2007 PELA REVISTA <i>TROPICAL MEDICINE AND INTERNATIONAL HEALTH</i>	39
CAPÍTULO II: ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE À PENICILINA EM <i>N. MENINGITIDIS</i> ISOLADOS DE PACIENTES DO RS.....	64
II.1. MATERIAIS E MÉTODOS	66
II.1.1. Local do Estudo	66
II.1.2. Amostragem e tipo de estudo	66
II.1.3. Suscetibilidade à penicilina	66
II.1.4. Detecção cromogênica da atividade da β -lactamase.....	68
II.1.5. Análise estatística	68
II.2. RESULTADOS	69
II.2.1. Isolados com suscetibilidade diminuída ou resistentes à penicilina e associação com fenótipos e STs e atividade da β -lactamase.....	69
CAPÍTULO III: PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO DE TIPAGEM PARA A CARACTERIZAÇÃO DE SURTOS DA DOENÇA MENINGOCÓCICA	71
III.1. MATERIAIS E MÉTODOS	73
III.1.1. Amostragem	73

III.1.2. Caracterização fenotípica	73
III.1.3. MLST	74
III.1.4. Análise de seqüências do gene <i>opa</i> e desenho dos <i>primers</i>	74
III.1.5. VSS-PCR e análise dos resultados	75
III.1.6. Interpretação dos padrões do VSS-PCR.....	76
III.1.7. Origem dos dados e análise estatística	76
III.2. RESULTADOS	78
III.2.1. Padronização das condições da PCR.....	78
III.2.2. Reprodutibilidade e tempo de execução.....	79
III.2.3. Análise dos isolados e comparação com os resultados do MLST.....	80
III.2.4. Análise dos controles geográficos e comparação com os resultados do MLST.....	82
PARTE III.....	84
1. DISCUSSÃO	85
2. CONCLUSÕES	96
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
APÊNDICE I: REVISÃO DA DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE CLONES EPIDÊMICOS.	114
APÊNDICE II: ANÁLISE DETALHADA DE ALGUNS FATORES RELACIONADOS AO ESTUDO DA SÉRIE HISTÓRICA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA NO RS E DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ATRAVÉS DO MLST.	122
APÊNDICE III: ALINHAMENTO DE 27 SEQÜÊNCIAS DO GENE OPA UTILIZADAS PARA O DESENHO DOS PRIMERS NA PADRONIZAÇÃO DO VSS-PCR.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1: Função e classificação das principais estruturas de <i>N. meningitidis</i>	15
Tabela I.2: composição química da cápsula polissacarídica dos sorogrupos patogênicos de <i>neisseria meningitidis</i>	17
Tabela II.1: Resultados dos testes de suscetibilidade à penicilina em isolados de <i>N. meningitidis</i> e associação com seus fenótipos e caracterização pelo MLST.....	70
Tabela III.1: <i>Primers</i> utilizados para a análise de isolados de <i>N. meningitidis</i> através de VSS-PCR.....	75
Tabela III.2: Índices discriminatórios dos métodos de tipagem molecular utilizados para a caracterização dos isolados de <i>N. meningitidis</i> do RS.....	83
Tabela A.I: Relação da estrutura populacional de <i>N. meningitidis</i> e epidemiologia da doença meningocócica.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I.1: Fluxograma para a aquisição de <i>N. meningitidis</i> e desenvolvimento de doença ou estado de portador. .	21
FIGURA II.1: Fotografia de um teste de suscetibilidade à penicilina, de um isolado de meningococo considerado sensível, utilizando fita E-test® (AB BIODISK, Suécia) conforme regras estabelecidas pelo CLSI/NCCLS (2005).....	67
FIGURA III.1: Análise de isolados de <i>N. meningitidis</i> por VSS-PCR..	78
FIGURA III.2: Reprodutibilidade do VSS-PCR.....	79
FIGURA III.3: Dendrograma originado através do software Gelcompar das 56 amostras do rs, referentes ao ano de 2000, analisadas pelo VSS-PCR.	81
FIGURA III.4: Dendrograma originado através do software Gelcompar dos controles geográficos analisados pelo VSS-PCR.	82

PARTE I

RESUMO

Infecções por *Neisseria meningitidis* são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo devido à habilidade do patógeno em provocar epidemias e até pandemias. Por ser capaz de se recombinar geneticamente existe uma grande variabilidade de tipos circulantes que podem diferir de acordo com a população atingida e localização geográfica. Por isso os objetivos deste estudo foram: avaliar a epidemiologia da doença meningocócica (DM) em pacientes do Rio Grande do Sul (RS), caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *N. meningitidis* utilizando métodos convencionais e propor um novo método de tipagem para o estudo de surtos, bem como avaliar sua susceptibilidade à penicilina. Para isso foi realizado um estudo retrospectivo de coorte em 2.215 casos de DM notificados entre 1995 a 2003 no RS. Foi observada uma redução de quase 50% dos casos durante o período e a taxa de letalidade foi de 22%. Ainda assim, uma incidência marcante continua sendo observada mesmo depois do final do período epidêmico, em 1999, onde as faixas etárias de crianças entre 1 e 4 anos e menores de 1 ano representam juntas quase 55% dos casos notificados, com uma média de incidência de 11,3/100.000 hab e 31,3/100.000 hab, respectivamente. A maioria dos casos foi atribuída ao sorogrupo B (69,8%), que aumentou significativamente. Também foi observada uma diminuição significativa dos casos pelo sorogrupo C. Os fenótipos B:4,7:P1.19,15, B:15:P1.7,16 e B:NT:P1.3 representam quase 50% de todos os isolados sorotipados. Cinquenta e seis isolados obtidos de pacientes do RS, durante o primeiro ano não-epidêmico, somados a 20 isolados dos estados de Santa Catarina e Paraná, Dinamarca e França foram genotipados por *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Foram identificados 20 *Sequence Types* (STs) distintos, dos quais 8 foram caracterizados como tipos novos, encontrados somente no RS. ST-33 (27%) e ST-259 (18%) foram os tipos mais frequentes, ambos pertencentes ao complexo clonal ST-32/ET-5. Os casos ST-259 do RS demonstraram uma maior tendência de desfecho de casos fatais. Não foram encontrados isolados ST-259 entre os controles geográficos ou em outros estudos previamente realizados no Brasil. Nossos resultados sugerem que estes dois clones observados durante todo o período de estudo, somados à emergência do ST-103 contribuem para a manutenção da alta incidência da DM no RS. Quase 18% dos isolados apresentaram suscetibilidade reduzida à penicilina. A presença de suscetibilidade reduzida ou plena à penicilina associada ao clone ST-461 foi estatisticamente significativa ($P=0,017$) quando comparada à resistência nos demais clones. Nenhum isolado demonstrou atividade para a β -lactamase. Também foi padronizado um novo método de genotipagem, chamado de *Variable Site Specific-PCR* (VSS-PCR) que apresentou um excelente poder discriminatório, de baixo custo operacional e de fácil execução e interpretação, que poderá ser utilizado em estudos de surtos da DM, assim que seja validado.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis infections are an important cause of morbidity and mortality worldwide because of the pathogen ability to cause epidemics and pandemics. The recombination ability results in a large variability of circulating types that can differ depending on the infected population and geographic localization. Considering these aspects, the aims of this study were: to evaluate meningococcal disease epidemiology affecting patients from the state of Rio Grande do Sul (RS), phenotypic and genotypic characterization of *N. meningitidis* isolates, using conventional methods and standardizing a new method for outbreak study; and evaluation of penicillin susceptibility. A retrospective cohort study was carried out among 2,215 meningococcal disease (MD) cases reported from 1995 to 2003 in RS, Brazil. A reduction of almost 50% in the overall incidence was observed, and the case-fatality rate during this period was 22%. Even so, high incidence of MD continued to be observed after the epidemic period which ended in 1999. The age group of 1-4 years old and infants under 1 year of age represent together almost 55% of the reported cases with a mean incidence of 11.3/100,000 pop and 31.3/100,000 pop, respectively. The majority of cases were caused by *N. meningitidis* serogroup B (69.8%), which increased significantly. There was a significant decrease in serogroup C cases. The phenotypes B:4,7:P1.19,15, B:15:P1.7,16 and B:NT:P1.3 represented almost 50% of all serotyped cases. Fifty-six isolates obtained from RS patients during the first non-epidemic year 2000 plus 20 isolates from other southern Brazilian states (Santa Catarina and Paraná), Denmark and France were typed by Multilocus Sequence Typing (MLST). Twenty different Sequence Types (STs) were identified, 8 of them found only in RS. ST-33 (27%) and ST-259 (18%) were the most frequent, both belonging to the ST-32/ET-5 complex. The ST-259 cases showed a trend towards higher risk of fatal outcome. ST-259 isolates were not detected among geographic controls or in other studies carried out in Brazil. Our data suggest that these two clones which occurred over the entire study period and the emergence of the ST-103 isolates contributed to the continued high incidence of MD in RS. Almost 18% of isolates presented moderate resistance to penicillin. The decreased susceptibility or complete resistance to penicillin associated to ST-461 clone was statistically significant ($P=0,017$) when compared to the other clones. None of the isolates have showed β -lactamase activity. We standardized a new genotyping method, called Variable Site Specific-PCR (VSS-PCR) that shows high discriminatory power, lower costs, easy performance and interpretation, which may be used in MD outbreaks, after its validation.

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM	Concentração inibitória mínima
CSF	Fluido cérebro-espinhal
DM	Doença meningocócica
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ET	<i>Electrophoretic Type</i>
LOS	Lipooligossacarídeo
MAbs	Anticorpos monoclonais
MLDF	<i>Multilocus DNA Fingerprinting</i>
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLRT	<i>Multilocus Restriction Typing</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NST	Não soro-subtipável
NT	Não tipável
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
Opa	<i>Opacity proteins</i>
PBP	<i>Penicilin-binding protein</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>penA</i>	Gene que codifica para proteína ligante de penicilina, PBP2
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i>
rep-PCR	Reação em cadeia da polimerase de regiões palindrômicas extragênicas repetitivas do genoma
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rRNA	RNA ribossomal
SNC	Sistema nervoso central
ST	<i>Sequence Type</i>
Tfp	<i>Type IV Pilus</i>
tRNA	RNA transportador
VSS-PCR	<i>Variable Site Specific - PCR</i>

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A primeira descrição da doença meningocócica (DM) realizou-se em 1805, por um médico suíço, Vieusseaux, durante uma epidemia em Genebra, onde crianças e adolescentes foram afetados, resultando em 33 mortes (Vieusseaux, 1805 *apud* Barroso, 2000). Em 1884, o agente etiológico foi descrito por Machiafava & Celli, sob a forma de diplococos no líquido cérebro-espinhal de doentes, pelo método de coloração de Gram (Machiafava & Celli, 1884 *apud* Barroso, 2000). Esses microrganismos assemelhavam-se àqueles descritos por Albert Neisser (1879) como o agente causal da gonorréia (Neiser, 1879 *apud* Morse, 1986). O isolamento em cultura ocorreu em 1887, por Anton Weichselbaum, na cidade de Viena. Este pesquisador descreveu detalhadamente as características bioquímicas da bactéria encontrada em seis casos de meningite cérebro-espinhal epidêmica (Weichselbaum, 1887 *apud* Schreiber & Mathys, 1991).

Apesar dos consideráveis avanços nos estudos epidemiológicos, imunológicos e moleculares que têm levado a um melhor entendimento da infecção meningocócica, a DM permanece como um sério problema de saúde pública capaz de causar morbidade e mortalidade significativas.

1.1. *Neisseria meningitidis*

Pertencente à classe β -Proteobacteria e à família *Neisseriaceae*, *N. meningitidis*, caracteriza-se por ser um diplococo gram-negativo, imóvel, não formador de esporos cujas células coradas aparecem caracteristicamente em forma de rim, com suas superfícies côncavas adjacentes. Quando em cultura a bactéria isolada do sangue ou do líquido, forma colônias não pigmentadas, não hemolíticas com tamanho variando de 0,6 a 0,8

micrômetros de diâmetro. Entretanto, organismos isolados da nasofaringe de indivíduos saudáveis frequentemente crescem como colônias opacas (Hart & Rogers, 1993; Volk *et al.*, 1996; Arditi & Yogev, 1997; Barroso, 2000).

É uma bactéria comensal humana, encontrada em mucosas, já não mais considerada restrita à nasofaringe, embora seja este o sítio mais frequentemente identificado como seu reservatório (Lourenço *et al.*, 2006).

Seu crescimento é do tipo fastidioso, necessitando de meio de cultura e condições apropriadas. É uma bactéria aeróbica e prefere um ambiente úmido e temperatura de 37°C para crescimento ótimo; o isolamento e crescimento podem ser melhorados em uma concentração de 5-10% de CO₂ (Arditi & Yogev, 1997).

O meningococo se mostra sensível à dessecação, aos raios solares e às variações de temperatura. As culturas não sobrevivem mais do que três dias sobre a bancada e a sobrevivida em temperatura ambiente com baixa umidade não ultrapassa a três horas, fazendo com que a existência em vida livre não seja possível (Barroso, 2000).

A seqüência completa do genoma de *N. meningitidis*, cepa MC58, sorogrupo B, apresentou 2.272.351 pares de bases com um conteúdo de 51,5% de G+C. O genoma contém quatro operons de RNA ribossomal (rRNA) 16S, 23S e 5S e 59 RNAs transportadores (tRNAs) com especificidade para todos os 20 aminoácidos. Contém ainda, 2.158 regiões codificantes, das quais 53,7% apresentam funções conhecidas. Comparado com outros patógenos estudados até o momento, o meningococo contém um maior número de genes envolvidos em variação de fase, um mecanismo que controla a sua expressão e contribui para sua sobrevivência contra o sistema imune do hospedeiro (Tettelin *et al.*, 2000).

1.1.2. Estrutura antigênica do meningococo

O meningococo é circundado por uma membrana externa, contendo pili, proteínas de membrana externa (OMP – *outer membrane proteins*) e lipooligosacarídeos (LOS). Entretanto, os meningococos patogênicos possuem ainda uma cápsula polissacarídica ligada à membrana externa, que é um dos fatores de virulência mais bem definidos até o momento (Nassif, 2000; Tzeng & Stephens, 2000; van Dauren *et al.*, 2000). A função e classificação destes e outros componentes antigênicos da bactéria estão descritos na Tabela I.1.

TABELA I.1: FUNÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS DE *N. MENINGITIDIS*.

<i>COMPONENTE</i>	<i>FUNÇÃO</i>	<i>CLASSIFICAÇÃO</i>
1. Cápsula Polissacarídica	Protege contra mediadores do hospedeiro, bacteriólise complemento-dependente e fagocitose	13 sorogrupos (A, B, C, 29E, H, I, K, L, M, W135, X, Y, Z)
2. Proteínas de membrana externa (OMPs)		
2.1. Porinas	Formam poros através dos quais passam solutos hidrofílicos, cátion-seletivos ou ânions-seletivos	
2.1.1. PorA		Proteína de membrana externa Classe 1 (sorosubtipagem)
2.1.2. PorB		Proteína de membrana externa Classe 2 ou 3 (sorotipagem)
2.2. Proteínas opacidade-associadas		
2.2.1. Opa	Promove a aderência às células epiteliais e leucócitos do hospedeiro	
2.2.2. Opc	Promove aderência às células do hospedeiro	Proteína de membrana externa Classe 5
2.3. Proteína RmpM	Ligação da membrana externa com peptídeoglicano e interação com porinas ^a	Proteína de Classe 4
3. Lipooligosacárideos	Atividade endotóxica	13 imunotipos: baseados em diferenças na antigenicidade.
4. Pili (família de pilus –Tfp ^b)	Promove aderência às células epiteliais e endoteliais e eritrócitos	Classe I e II: ambos podem ser isolados de pacientes com DM.

Modificado de Rosenstein *et al.*, 2001. ^aGrizot & Buchanan, 2004; ^bMers & So, 2000; Tzeng & Stephens, 2000; Corbett *et al.*, 2004.

Serão detalhados a seguir os seguintes componentes: cápsula polissacarídica e as porinas (OMPs) – importantes para fins de classificação fenotípica do meningococo e as proteínas Opa, cujo gene foi utilizado como alvo para a padronização de um novo método de caracterização molecular proposto neste trabalho.

1.1.2.1. Cápsula Polissacarídica

Esta estrutura confere ao meningococo propriedades protetoras contra fagocitose e bacteriolise, possibilitando sua sobrevivência durante a invasão da corrente sanguínea ou do fluido cérebro-espinhal (CSF) do hospedeiro. Oferece ainda proteção (previne dessecação e morte por fagocitose) e propriedades anti-aderentes que permitem a transmissão, disseminação e sobrevivência em compartimentos externos e internos, como por exemplo, os vacúolos fagocíticos. Repulsão através de carga negativa, impedimento estérico e cobertura de ligantes de aderência são mecanismos propostos para as propriedades anti-adesivas da cápsula (Tzeng & Stephens, 2000).

Os antígenos da cápsula polissacarídica permitem a classificação de *N. meningitidis* em diferentes sorogrupos. Atualmente existem 13 sorogrupos identificados: A, B, C, 29E, H, I, K, L, M, W₁₃₅, X, Y e Z, existindo algumas controvérsias quanto ao reconhecimento do sorogrupo D (CDC, 1998). Com relação à patogenicidade, destacam-se 5 sorogrupos: A, B, C, W₁₃₅ e Y. A cápsula destes meningococos associados à doença invasiva é basicamente composta de derivados do ácido siálico, exceto para o sorogrupo A, a qual é formada pela polimerização do N-acetil D-manosamina fosfato (Tzeng & Stephens, 2000; Taha, 2002). Na Tabela I.2 encontramos a descrição detalhada da composição química dos principais sorogrupos patogênicos.

TABELA I.2: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CÁPSULA POLISSACARÍDICA DOS SOROGRUPOS PATOGENICOS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*.

SOROGRUPO	CÁPSULA POLISSACARÍDICA
A	α - <i>N</i> -acetil <i>D</i> -manosamina -1-fosfato
B	α -2,8, ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
C	α -2,9, ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
W ₁₃₅	D-galactose e ácido <i>N</i> -acetilneuramínico 1:1
Y	D-glicose e ácido <i>N</i> -acetilneuramínico 1:1

Adaptado de: Volk *et al.*, 1996; Tzeng & Stephens, 2000; Taha, 2002.

Os sorogrupos são identificados através das técnicas de soroaglutinação, coaglutinação ou empregando anticorpos monoclonais (MAbs) em técnicas de *ELISA* (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ou *dot-blotting* (Vedros & Genus, 1984; Morello *et al.*, 1991; Janda & Knapp, 2003). Mais recentemente, as técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido amplamente utilizadas. A amplificação do gene *siaD*, que codifica a poli-sialiltransferase, determina os sorogrupos B, C, Y e W135 (Taha, 2000; Pollard *et al.*, 2002; Baethgen *et al.*, 2003; Lewis & Clarcke, 2003) enquanto o sorogrupo A pode ser determinado através da amplificação dos genes *mynB* (que codifica a enzima que atua na polimerização da N-acetil-D-manosamina) ou *orf2* (Taha, 2000; Taha, 2002; Baethgen *et al.*, 2003).

1.1.2.2. Proteínas de Membrana Externa (OMPs)

São reconhecidas cinco classes de OMPs (denominadas de 1 a 5) de acordo com sua massa molecular e seu comportamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Tsai *et al.*, 1981). OMPs de classe 1 a 3 são porinas: OMPs de classe 1 são denominadas PorA e as de classe 2 e 3 de PorB; a proteína de classe 4 é designada de proteína RmpM (*reduction modifiable protein M*) e as proteínas Opa (*Opacity proteins*) constituem as OMPs de classe 5 (Rosenstein *et al.*, 2001). Todos os

meningococos possuem OMPs de classe 1, 4 e 5, e somente uma das OMPs de classe 2 ou de classe 3.

As porinas das neissérias patogênicas funcionam como poros que são essenciais para sua sobrevivência, pois modulam a troca de íons entre a bactéria e o meio externo. Podem também interagir com a membrana plasmática de células eucarióticas, causando uma mudança no potencial de membrana e interferência na sinalização celular, sugerindo que estejam envolvidas na reorganização celular do hospedeiro durante o processo de infecção (Nassif, 1999; Massari *et al.*, 2003). Outros detalhes a respeito das porinas serão abordados no subitem 1.3.1. Métodos Fenotípicos.

Atualmente as proteínas Opa têm recebido uma atenção considerável nos estudos de interação das espécies patogênicas de *Neisseria* (*N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*) com as células do hospedeiro, uma vez que as espécies comensais não expressam essa classe protéica. Esta família de proteínas fase-variáveis permite a aderência da bactéria a diferentes tipos de células que possam ser encontrados durante o processo de infecção (Gray-Owen, 2003).

A variação de fase destas proteínas é o resultado da alteração de leituras, provocada por mudanças no número de repetições de nucleotídeos pentaméricos (CTCTT) encontrados na região do peptídeo-sinal dos genes *opa*. A variação antigênica ocorre como consequência da expressão variante dos múltiplos loci *opa* no cromossomo bacteriano. Cada locus contém duas regiões hipervariáveis (HV1 e HV2) e uma região semi-variável (SV) codificantes na porção N-terminal da proteína, enquanto que as demais regiões são altamente conservadas (Hobbs *et al.*, 1994). Neste mesmo estudo, os autores sugerem que a inconsistência entre a quantidade de genes estruturais completos encontrados em *N. meningitidis* (três ou quatro), comparada com a quantidade de proteínas Opa diferentes entre si (sete proteínas distintas em isolados de mesmo complexo clonal) indica a

ocorrência de uma **microevolução**¹ dos isolados em um período relativamente curto de tempo (Hobbs *et al.*, 1994).

1.1.3. Suscetibilidade antimicrobiana

O uso massivo de sulfonamidas para prevenir e tratar a DM levou ao isolamento de cepas resistentes em 1937, poucos anos depois da descoberta desta classe de fármacos (Fermér & Swedberg, 1997). Também existem relatos da emergência de meningococos com suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina, resistência à rifampicina, cloranfenicol, eritromicina (Yagupsky *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 1994; Galimand *et al.*, 1998; Stefanelli *et al.*, 2001; Cousin *et al.*, 2003; Corso *et al.*, 2005).

Na Espanha, na década de 80, começaram a ser identificadas cepas de *N. meningitidis* com suscetibilidade reduzida à penicilina² (Saez-Nieto *et al.*, 1987; Saez-Nieto *et al.*, 1992). Relatos similares surgiram por todo o mundo (Jackson *et al.*, 1994; Blondeau & Yaskuchuk, 1995; Sosa *et al.*, 2001; Caniça *et al.*, 2004; Noah & Henderson, 2002; Stefanelli *et al.*, 2004), fazendo com que fossem adotadas medidas de monitoramento contínuo das cepas circulantes, uma vez que a penicilina é um dos antibióticos mais utilizados no tratamento das infecções meningocócicas. A redução da suscetibilidade à penicilina parece estar relacionada principalmente a alterações na estrutura da proteína ligante de penicilina (*penicilin-binding protein* – PBP2), codificada pelo gene *penA*, sendo extremamente raros os relatos de meningococos produtores de beta-lactamase (Antignac *et al.*, 2001). O acúmulo de PBPs alteradas em *N. meningitidis* pode levar a um maior nível de resistência à penicilina ocasionando em falência do tratamento, o que constituiria um

¹ O termo **microevolução** refere-se ao acúmulo de mudanças genéticas em um ou poucos loci de bactérias epidemiologicamente relacionadas (Achtman, 1994).

² Isolados com suscetibilidade reduzida à penicilina devem apresentar uma concentração inibitória mínima variando de 0,6 µg/mL a 1,0 µg/mL (CLSI/NCCLS, 2005).

novo problema em saúde pública, como já foi relatado para a espécie *Streptococcus pneumoniae* (Sutcliffe *et al.*, 1988; Spratt, 1994; Temime *et al.*, 2003).

1.2. Doença meningocócica

O termo doença meningocócica (DM) representa um espectro de doenças causadas por *N. meningitidis*, que variam de faringite a septicemia e meningite. A doença meningocócica normalmente ocorre na forma de epidemias. Estas começaram a ser reconhecidas a partir da Primeira Guerra Mundial, quando foram detectadas em recrutas militares isolados em campos de treinamento (Brundage *et al.*, 2002), enquanto que epidemias na população civil envolvem principalmente crianças desde sua primeira descrição (Vieusseaux, 1805 *apud* Barroso, 2000).

A ocorrência ou não de uma epidemia dependerá de relações de interação entre fatores que podem contribuir com a *tríade de infecção*. Os fatores que necessitam estar presentes são: o agente infeccioso, condições favoráveis no ambiente e uma população suscetível (Lindsay, 1999).

1.2.1. Estado de portador e doença

Estudos que avaliam a colonização de nasofaringe mostraram que aproximadamente 10% da população humana são portadores assintomáticos do meningococo. As taxas de portadores são baixas em crianças e aumentam com a idade, alcançando maiores valores em adolescentes e adultos (Cartwright *et al.*, 1987; Caugant *et al.*, 1994; Andersen *et al.*, 1998; Bevanger *et al.*, 1998). *N. meningitidis* causa doença sistêmica em uma minoria destes portadores (Rosenstein *et al.*, 2001) o que leva a crer que a doença é um “acidente” durante o ciclo biológico da bactéria. Na maioria dos casos o

estado de portador é um processo imunizador, que resulta em uma resposta com anticorpos protetores (Stephens, 1999). Exatamente quais fatores determinam quais pessoas infectadas desenvolverão doença ou permanecem como portadores são desconhecidos (Figura I.1).

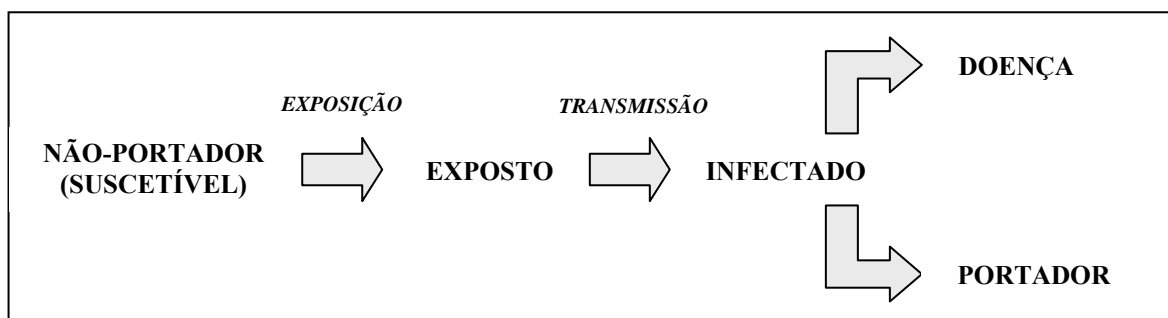


Figura I.1: Fluxograma para a aquisição de *N. meningitidis* e desenvolvimento de doença ou estado de portador (Adaptado de Lindsay, 1999).

Casos de doença meningocócica podem ser definidos como primários ou secundários. O intervalo entre casos primários e secundários não deve levar mais do que duas semanas. A quimioprofilaxia pode estender este intervalo para alguns meses. Entretanto, nesta situação é possível que, este paciente que veio a desenvolver a doença após receber quimioprofilaxia, não seja um caso secundário, e sim um caso primário atribuído a re-colonização (Lindsay, 1999).

1.2.2. Transmissão e fatores de risco

A disseminação de *N. meningitidis* ocorre de pessoa a pessoa através de secreções orais e o organismo tende a se instalar na nasofaringe posterior. É estimado que o período de incubação seja de quatro dias, podendo variar de dois a dez dias.

Os fatores de risco bem descritos para a doença meningocócica são: idade, exposição ao cigarro (fumantes ativos ou passivos), fatores socioeconômicos, contato direto com paciente infectado e co-infecção respiratória (Lindsay, 1999). Estima-se que

contatos residentes no mesmo domicílio do paciente aumentam suas chances em adquirir a DM de 200 a 3700 vezes quando comparadas com o resto da população e, que este risco também é aumentado, mas em menor grau, para contatos de creches e escolas (Jensen, 2003). Dentre as diferentes faixas etárias sabe-se que a mais atingida é a de crianças menores de quatro anos. Entretanto, outro pico de doença ou de estado de portador do meningococo é freqüentemente associado aos adolescentes. Estudos demonstram que a alta freqüência de carreadores de meningococo entre adolescentes pode estar intimamente relacionada ao fator de risco *comportamento social*, onde a maioria dos jovens se submete à diversos fatores simultaneamente como: ambientes fechados (bares, pubs e/ou discoclubs), ser fumante ativo ou passivo de cigarros e contatos íntimos com diferentes parceiros (beijo na boca, falar muito alto e muito próximo nestes ambientes devido ao volume elevado do som) (MacLennan *et al.*, 2006).

1.2.3. Patogênese e imunidade

A nasofaringe fornece um ambiente ideal para a colonização por bactérias – é úmido e possui uma alta concentração de CO₂ – além disso, as células epiteliais dessa região possuem receptores específicos para o *pilus* de *N. meningitidis* (Arditi & Yogev, 1997; Barroso, 2000).

Anticorpos de proteção inespecíficos são normalmente produzidos em resposta a antígenos, os mesmos que são comuns a outras espécies de *Neisseria* ou de outras bactérias não relacionadas. A suscetibilidade ou resistência à doença meningocócica é determinada pela presença ou ausência de soro bactericida, que tem atividade bacteriolítica. Esse efeito é mediado por anticorpos específicos IgG ou IgM com componentes terminais (C5-C9) do sistema complemento. Esses anticorpos bactericidas circulantes no sangue parecem

impedir a multiplicação e disseminação da bactéria para outros tecidos. O grupo opsonico específico e anticorpos bactericidas estão presentes no soro de muitos adultos. Isso explica o fato dos picos de incidência de infecções sérias de meningococo ocorrerem entre 6 meses e 2 anos de idade, que corresponde ao tempo de perda dos anticorpos transplacentários e à aquisição dos anticorpos naturalmente adquiridos (Arditi & Yogev, 1997).

Uma vez que o microrganismo inicia a invasão, penetra nas células epiteliais e alcança os espaços sub-epiteliais e tecido linfóide adjacente, chegando, assim, ao sistema circulatório. A presença de *N. meningitidis* na mucosa da nasofaringe, induz a produção e secreção de IgA, sendo este o possível mecanismo de sobrevivência da bactéria, já que este anticorpo bloqueia o efeito bacteriolítico de IgG ou IgM somado aos componentes do sistema complemento (Boslego & Tramont, 1992). Muitas cepas desse microrganismo podem ainda produzir protease IgA1, que degrada IgA da mucosa e facilita o acesso da bactéria ao sistema vascular, tornando-a resistente à opsonização e fagocitose (Arditi & Yogev, 1997).

A cápsula polissacarídica dos sorogrupos A e C, induzem anticorpos específicos da classe IgG ou IgM. Estes anticorpos possuem um efeito bactericida que pode atuar de duas maneiras. A primeira, IgG e talvez IgM atuem como anticorpo opsonico para aumentar a fagocitose e a subsequente morte por neutrófilos polimorfonucleares. A segunda, a ligação de IgG ou IgM ao antígeno da cápsula de *N. meningitidis*, que ativa a cascata de complemento causando um ponto de lesão na parede celular e membrana bacteriana (Densen, 1989; Boslego & Tramont, 1992).

O sorogrupo B é relativamente não-imunogênico. Dados sugerem que humanos são imunologicamente tolerantes ao sorogrupo B do meningococo devido à similaridade de sua cápsula polissacarídica com os constituintes do tecido do hospedeiro (Arditi & Yogev, 1997; Pizza *et al.*, 2000). Mesmo após a infecção, são encontrados baixos títulos de

anticorpos do tipo IgM e estes possuem pouca afinidade de ligação e baixa atividade bactericida contra a bactéria (Arditi & Yogev, 1997). Por este motivo, não existe vacina efetiva contra o sorogrupo B, já que as disponíveis são sintetizadas a partir de constituintes da cápsula polissacarídica, só sendo eficientes para os sorogrupos A, C, W₁₃₅ e Y (Arditi & Yogev, 1997; Tettelin *et al.*, 2000; Pizza *et al.*, 2000).

Quando o anticorpo está presente no soro, o meningococo é destruído rapidamente assim que entra em contato com a corrente sanguínea. Mas se o anticorpo bactericida está ausente, a bactéria multiplica-se e dissemina-se no sangue podendo causar uma meningococemia, ou ainda consegue invadir o SNC, local preferencial durante o curso da disseminação hematogênica (Boslego e Tramont, 1992; Nassif *et al.*, 1999; Barroso, 2000).

1.3. Tipagem de *N. meningitidis*

1.3.1. Métodos Fenotípicos

Diferenças imunológicas e estruturais entre as diferentes classes de proteínas de membrana permitem a subdivisão dos principais sorogrupos em sorotipos (PorB) e soro-subtipos (PorA). Até o momento estão descritos 17 sorotipos e 18 soro-subtipos (Sacchi *et al.*, 1998a; Sacchi *et al.*, 1998b). A padronização do esquema de sorotipagem dos antígenos de superfície do meningococo, feita à semelhança do esquema de tipagem de *Escherichia coli* e *Salmonella*, determina que uma cepa de *N. meningitidis*, com a fórmula antigênica B:4:P1.15 pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4, soro-subtipo P1.15. Nomenclaturas designadas como NT e NST significam, respectivamente, que as proteínas de sorotipo e soro-subtipo não puderam ser classificadas pelo painel de MAbs disponível (Lemos, 2005).

Atualmente existe uma variedade de técnicas empregando anticorpos monoclonais para a sorotipagem, tais como soroaglutinação (Zollinger *et al.*, 1984), dot-blotting (Wedege *et al.*, 1990), radioimunoensaio (Zollinger *et al.*, 1979; de Marie *et al.*, 1984), *ELISA* (Abdillahi & Poolman, 1988) e aglutinação em látex (Wedege *et al.*, 1990). Mais recentemente, como no caso da sorogrupagem, a biologia molecular também tornou possível a determinação das seqüências de nucleotídeos dos genes que codificam PorA e PorB, elucidando a estrutura e topologia de epitopos de sorotipos e soro-subtipos nessas proteínas e, apresentando vantagens em relação a sorotipagem tradicional, uma vez que permite a caracterização completa da cepa em estudo. Além disso, o seqüenciamento demonstra que a variação de um único aminoácido pode abolir a reatividade com alguns MAbs, resultando em cepas não sorotipáveis e/ou não soro-subtipáveis (Lemos, 2005).

1.3.2. Métodos Genotípicos

Epidemiologistas que investigam e desenvolvem intervenções de controle para doenças de notificação compulsória³ lidam hoje em dia com um dilema quando precisam selecionar um método molecular. Diferenças no comportamento biológico do patógeno, as necessidades e as variações técnicas, devem ser consideradas quando um determinado método de tipagem é utilizado, seja para investigações de surto, ou seja, para vigilância epidemiológica em escala regional, nacional ou global (Struelens *et al.*, 1998).

Diversos métodos genotípicos e fenotípicos estão descritos para a caracterização de isolados de *N. meningitidis* e a escolha do método e/ou dos métodos a serem utilizados dependerá das questões epidemiológicas que devem ser respondidas. A classificação

³Segundo a Portaria Nº 5 (21/02/2006) do Ministério da Saúde, são de **notificação compulsória** em todo o território nacional as seguintes doenças: Botulismo; Carbúnculo ou Antraz; Cólera; Coqueluche; Dengue; Difteria; Doença de Creutzfeldt-Jacob; Doença de Chagas (casos agudos); **Doença Meningocócica e outras meningites**; Esquistossomose (em área não endêmica); Eventos Adversos Pós-Vacinação; Febre Amarela; Febre do Nilo Ocidental; Febre Maculosa; Febre Tifóide; Hanseníase; Hantavíroses; Hepatites Virais; Infecção pelo vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana (HIV) em gestantes e crianças expostas ao risco de transmissão vertical; Influenza Humana por novo subtipo (pandêmico); Leishmaniose Tegumentar Americana; Leishmaniose Visceral; Leptospirose; Malária; Meningite por *Haemophilus influenzae*; Peste; Poliomielite; Paralisia Flácida Aguda; Raiva Humana; Rubéola; Sarampo; Sífilis Congênita; Sífilis em gestante; Síndrome da Rubéola Congênita; Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids); Síndrome Febril Íctero-hemorrágica Aguda; Síndrome Respiratória Aguda Grave; Tétano; Tularemia; Tuberculose; Variola.

fenotípica das cepas bacterianas em sorogrupo, sorotipo ou soro-subtipo é capaz de fornecer informações importantes para a adoção de medidas de controle em saúde pública (ex: intervenção vacinal na população), porém, por si só, algumas vezes é inadequada para estudos epidemiológicos, pois nem sempre é capaz de estabelecer a real relação epidemiológica dos isolados. Por isso, nos últimos anos, diversos métodos de tipagem molecular têm sido propostos com o objetivo de tentar elucidar a dinâmica da DM, conforme descrito a seguir.

1.3.2.1. Métodos preferencialmente utilizados para estudos populacionais da DM

Para estudos de vigilância epidemiológica global ou regional devem ser preferencialmente escolhidos aqueles métodos que analisam variações genéticas que foram acumuladas lentamente na população e que são ditas “seletivamente neutras” (Maiden *et al.*, 1998), pois analisam isolados de longos períodos de incidência de determinada doença. Até recentemente, o método genotípico, padrão ouro, para o estudo populacional do meningococo era o *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) (Selander *et al.*, 1986). O princípio da técnica baseia-se na identificação de variações no *loci* cromossomal, que codifica enzimas metabólicas, através das diferenças da sua mobilidade eletroforética em em gel. A combinação dos padrões de migração para as diferentes enzimas define o “tipo eletroforético” (ET).

Porém, devido às dificuldades metodológicas e de comparação de resultados entre diferentes laboratórios e alto-custo, nos últimos anos têm sido amplamente difundida a técnica *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que é conceitualmente similar ao MLEE, porém utiliza seqüenciamento do DNA para a identificação de variações alélicas de genes constitutivos ou *housekeeping genes* (genes que codificam as mesmas enzimas metabólicas

do MLEE) (Maiden *et al.*, 1998). Atualmente, o método do MLST preconiza o seqüenciamento de sete genes constitutivos (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC*, e *pgm*) (Enright & Spratt, 1999), que foram escolhidos por não estarem sujeitos à pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro. Ao contrário do MLEE, onde são detectadas somente as mudanças não-sinônimas do DNA, que afetam a mobilidade eletroforética da proteína em gel, no MLST são detectadas todas as mudanças do DNA, sejam elas não-sinônimas ou sinônimas. Por isso uma quantidade bem menor de genes se faz necessária para a tipagem de isolados pelo MLST do que pelo MLEE (Vogel & Claus, 2003). Para cada seqüência (ou alelo), de cada um dos sete genes, é dado um determinado número e a combinação dos sete números caracteriza o *sequence type* (ST). A partir daí é possível a construção de dendrogramas baseados nas diferenças de alinhamento dos diferentes perfis alélicos (Maiden *et al.*, 1998).

Este método facilitou a comparação de resultados inter-laboratoriais através de um banco de dados global⁴ que se encontra disponível na Internet (<http://pubmlst.org/neisseria>) e ultimamente tem sido considerado o padrão de referência para a tipagem do meningococo em estudos populacionais, em investigação de surtos e em estudos com portadores assintomáticos (Feavers *et al.*, 1999; Jolley *et al.*, 2000; Nicolas *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2003; Skoczynska *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004; Yazdankhah *et al.*, 2004; de Filippis & Vicente, 2005; Forgor *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2005; Chiou *et al.*, 2006; Gottfredsson *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2006).

Jolley e colaboradores (2007) propuseram uma série de recomendações a respeito da caracterização molecular de meningococos através de métodos baseados em

⁴Desde que o meningococo serviu como organismo modelo para o desenvolvimento do MLST em 1998, o banco de dados está realmente grande: em setembro de 2007 haviam sido submetidas informações de 9.211 isolados de *Neisseria meningitidis* pertencentes a 6.339 diferentes STs que foram depositadas por pesquisadores dos 4 continentes (Disponível em: <http://pubmlst.org/neisseria>. Acesso em: 18/09/2007).

seqüenciamento que incluem: 1. a escolha de determinados alvos gênicos para a caracterização de antígenos (genes *porA* e *fetA* para a investigação rápida de surtos da doença e para investigar a distribuição de variantes antigênicas; e gene *porB* somente se for necessária uma melhor distinção dos isolados); 2. MLST para determinar o tipo e o complexo clonal de isolados de doença invasiva (ou de portadores) através da seleção representativa de isolados de determinado país ou ainda para situações de vigilância epidemiológica de caráter regional e 3. modificações na nomenclatura dos isolados para a seguinte forma: sorogrupo: tipo PorA (anteriormente determinado pela tipagem sorológica como sorotipo): tipo FetA: *sequence type* (complexo clonal), como por exemplo: B:P1.19,15:F5-1:ST-33 (cc32).

Mais tarde, surgiram variações do MLST que visavam adaptar o método ou reduzir o alto custo do seqüenciamento dos diversos genes. O método conhecido como MLDF – *Multilocus DNA Fingerprinting* (Taha, 2002) analisa o polimorfismo dos genes *pilA*, *pilD*, *crgA*, *regF* e *Iga* através da clivagem com enzimas de restrição e combina os resultados com o emprego do MLST para detectar novas linhagens de meningococo. Outra variação do MSLT foi o MLRT – *Multilocus Restriction Typing*, que analisa o polimorfismo dos sete genes utilizados pelo MLST através de sua clivagem com enzimas de restrição (Bennett & Cafferkey, 2003; Dyet *et al.*, 2004).

A ribotipagem que utiliza o rRNA como sonda (*ribotyping*) foi bastante utilizada para o estudo da epidemiologia molecular de *N. meningitidis*, inclusive sendo utilizada para a caracterização de isolados brasileiros, auxiliando na determinação de clones responsáveis pelo aumento de casos do sorogrupo C na cidade de Curitiba – Paraná no período de 1989-1990 e no entendimento da persistência de uma cepa do sorogrupo B na cidade de São Paulo apesar da campanha de vacinação (Jordens & Pennington, 1991; Woods *et al.*, 1992; Tondella *et al.*, 1994; Sacchi *et al.*, 1995).

Outro método que ainda é utilizado para ajudar estabelecer a relação epidemiológica entre diferentes isolados do meningococo é o seqüenciamento do gene que codifica o RNA ribossomal 16S. A diversidade das seqüências pode ser utilizada como um marcador molecular de *N. meningitidis*, onde alguns tipos foram associados com linhagens hipervirulentas já definidas pelo MLEE e pelo MLST (Sacchi *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2002).

1.3.2.2. Métodos preferencialmente utilizados para estudos de surtos da DM

Para a investigação de surtos, um limitado número de isolados obtidos de um pequeno número de pacientes preferencialmente devem ser caracterizados em um único experimento que possa responder a seguinte questão: *quais isolados são clonais (epidemiologicamente relacionados) e quais não são (casos esporádicos)?* Normalmente os métodos empregados com essa finalidade devem ser de alta-resolução e com poder discriminatório alto. Esses métodos podem ser divididos em dois grupos: aqueles que analisam as diferenças encontradas em todo o cromossomo, e aqueles baseados em um ou poucos elementos genéticos. O *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) sem dúvida é o método mais utilizado do primeiro grupo (Bygraves & Maiden, 1992; Yakubu & Pennington *et al.*, 1995; Bevanger *et al.*, 1998; Popovic *et al.*, 2001; Pérez-Trallero *et al.*, 2002; Boras *et al.*, 2004; McEllistrem *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006) seguido pela análise de genes específicos com enzimas de restrição (Bjorvatn *et al.*, 1984; Kristiansen *et al.*, 1986; Kristiansen *et al.*, 1992; Weis & Lind, 1996). No segundo grupo encontramos outras opções: o rep-PCR – reação em cadeia da polimerase de regiões palindrômicas extragênicas repetitivas do genoma (Woods *et al.*, 1994; de Filippis & Vicente, 2005); o RAPD – *Random Amplified Polymorphism DNA* (Woods *et al.*, 1996); análise de

diferentes produtos de PCR através de RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Zhang *et al.*, 1990; Kristiansen *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1995). Exceto pelo PFGE, nenhum destes outros métodos parece ter sido uma escolha de consenso para o estudo de surtos. Porém, as limitações do PFGE estão no tempo de execução da técnica e complexidade dos padrões gerados e custo de equipamentos e de material de consumo.

Considerando que a proteína Opa apresenta uma alta variabilidade entre diferentes isolados de *N. meningitidis*, a utilização deste tipo de alvo gênico para a caracterização molecular de diferentes isolados parece ser promissora para o estudo de surtos através da PCR, pois se diferentes isolados apresentarem padrões iguais ou muito semelhantes, é provável que exista relação epidemiológica entre os mesmos.

1.4. Genética populacional de *N. meningitidis*

O uso do MLEE tem demonstrado que *N. meningitidis* exibe uma maior diversidade genética comparada à maioria das bactérias patogênicas ao homem (Caugant, 1998). Essa diversidade na variabilidade genética e antigênica é o resultado de sua competência para a transferência horizontal de genes intra e inter-espécie do gênero *Neisseria* (Maiden, 1993; Suker *et al.*, 1994; Morelli *et al.*, 1997; Feil *et al.*, 1999; Linz *et al.*, 2000) assim como entre membros de outros gêneros (Feil *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2001). A partir daí surge o conceito de **estrutura do tipo mosaico** ou **panmítica**⁵ (Smith *et al.*, 1993; Vogel & Claus, 2003). Entretanto, percebe-se que na maioria dos surtos ou epidemias os casos estão restritos a clones com um potencial particular de causar doença, tornando-se super-representado, e dando a impressão superficial de uma população com estrutura clonal. A

⁵ O termo “panmítica” origina-se da habilidade de *panmixia* (*pan* = tudo; *mixis* = misturar) do meningococo em realizar cruzamentos genéticos ao acaso (Smith *et al.*, 1993).

estes clones foi atribuído o termo **linhagens hipervirulentas** (Caugant *et al.*, 1986; Caugant *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1993; Achtman, 1995; Vogel *et al.*, 2004).

A exceção a essa regra, de estrutura populacional panmítica, é atribuída a meningococos do sorogrupo A onde se percebe um alto grau de clonalidade através da história das epidemias e hiperendemias mundiais, e principalmente às epidemias recorrentes do continente africano (Caugant, 1998; Bart *et al.*, 2001). As razões para a persistência da meningite meningocócica deste sorogrupo na África sub-Sahariana e seu desaparecimento dos EUA e de outros países industrializados são pouco conhecidas. É sugerido que a troca gênica entre isolados do sorogrupo A é insuficiente para romper esta clonalidade, o que pode ser atribuído, em parte, devido à dispersão geográfica que contribui para uma freqüente “purificação” das seqüências variantes (Bart *et al.*, 2001). Também é evidente que estes organismos podem se adaptar rapidamente às mudanças que ocorrem durante a transmissão para um novo hospedeiro e, esta adaptação pode estar associada a grande quantidade de antígenos de superfície de fase-variável que garantem uma heterogeneidade numa mesma população (Richardson *et al.*, 2002).

O conceito de **complexo clonal** é atribuído a membros presumidamente originários de um ancestral comum, sabendo-se que cepas de *N. meningitidis* praticamente idênticas pelo MLEE, distinguem-se em apenas uma ou duas enzimas, resultando em diferentes alelos. Portanto, isolados clínicos de casos esporádicos e isolados de epidemias no mundo todo podem ser agrupados em sete complexos clonais⁶, também conhecidos como: subgrupos, clusters ou linhagens. São eles: subgrupos I, III e V, complexos clonais ET-5 e ET-37, linhagem III e cluster A4 (Caugant, 1998).

⁶ Ver Apêndice I: revisão da distribuição global dos sete complexos clonais.

1.5. Epidemiologia da doença meningocócica no Brasil e no Rio Grande do Sul

No Brasil, no ano de 1916, a doença meningocócica foi descrita pela primeira vez na cidade do Rio de Janeiro. Essa descrição foi apresentada por J. M. Vieira, à Faculdade Nacional de Medicina, como a primeira tese brasileira sobre o tema. Já o relato da primeira epidemia dessa doença data de 1920, ocorrendo também no Rio de Janeiro, cujo estudo foi apresentado por A. Renzo. Entre 1921 e 1923, a incidência da doença na cidade de São Paulo ultrapassou 10 casos por 100.000 habitantes, porém, essa situação não foi caracterizada como epidemia (Barroso, 2000). A segunda onda epidêmica, descrita na literatura foi entre 1947 e 1948, observada na região Mogiana de São Paulo, envolvendo várias cidades vizinhas (Barroso, 2000).

No começo da década de 60, isolados de *N. meningitidis* do subgrupo I foram disseminados pelo continente americano, causando mais uma epidemia no território nacional (Caugant, 1998).

O problema da infecção por *N. meningitidis* permaneceu sem a devida atenção das autoridades até a década de 70, quando a pandemia, causada por isolados do subgrupo III, afetou o Brasil, juntamente com uma epidemia em diversos estados por meningococos do sorogrupo C, complexo clonal ET-37 (Olyhoek *et al.*, 1987; Barroso, 2000; Puricelli *et al.*, 2004; de Moraes & Barata, 2005; Lemos, 2005). Após o ocorrido, em 1975, o Ministério da Saúde iniciou a organização do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Meningites e, também, a reestruturação do diagnóstico bacteriológico em diversos estados do país (WHO, 1998; Barroso, 2000).

No fim dos anos 80, instalou-se no Brasil uma epidemia de DM por cepas de fenótipo B:4:P1.19,15, idêntico às cepas responsáveis pela epidemia cubana, tendo sido responsável

pelo aumento significativo de casos principalmente na região da Grande São Paulo (Sacchi *et al.*, 1992; Caugant, 1998; Lemos, 2005). Em meados de 1990, muitos estados brasileiros adotaram a vacinação em massa com utilização da vacina cubana específica para o sorogrupo B do meningococo (Costa *et al.*, 1991 e Sierra *et al.*, 1991 *apud* Caugant, 1998).

No início da década de 90, isolados do grupo A4, estiveram associados ao aumento do número de casos atribuídos ao fenótipo C:2b:P1.3, que foi responsável por 74% dos isolados do sorogrupo C de 1990 (Sacchi *et al.*, 1992) a meados de 1996 (Barroso *et al.*, 1996; Lemos, 2005). Neste mesmo período, este fenótipo foi responsável por surtos na cidade de Curitiba, Paraná e por casos de DM nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (Sacchi *et al.*, 1995).

Rigatti (2000) analisando o comportamento da DM na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, no período de 1995 a 2000 observou que em 1995 havia uma co-dominância de meningococos do sorogrupo B e C enquanto que no ano de 1999 foi observada uma identificação quase que exclusiva de casos atribuídos ao sorogrupo B. A autora ressalta que as campanhas de vacinação para o sorogrupo C em 1995, destinada à faixa etária de 4 a 19 anos para residentes da região metropolitana e, a campanha de vacinação com a vacina B/C de origem cubana, destinada à população de faixa etária de 6 meses a 14 anos, resultaram no desaparecimento de casos atribuídos ao meningococo C, com o último caso desse sorogrupo sendo notificado em 1998.

A partir de 1999, além da identificação quase que exclusiva dos meningococos B, observou-se também um aumento no número de casos notificados. Apesar da solicitação de uma nova campanha de vacinação para este sorogrupo pela Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre junto à Secretaria Estadual da Saúde, esta campanha não ocorreu. Observou-se que isolados desta cidade, quando caracterizados quanto ao sorogrupo e sorotipo, não se assemelhavam às características da única vacina para o sorogrupo B do

mercado mundial (Rigatti, 2000; Lemos *et al.*, 2006). O fenótipo em questão é conhecido como **fenótipo epidêmico norueguês**⁷ (B:15:P1.7,16), o qual parece estar confinado aos estados da região sul do Brasil (Lemos *et al.*, 2006).

Outro estudo com isolados de meningococo provenientes de 4 estados brasileiros (Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Santa Catarina), demonstrou que 81% dos mesmos pertencem ao sorogrupo B, complexo clonal ST-32/ET-5. Neste estudo, os autores salientam a importância do desenvolvimento de uma nova vacina contra *N. meningitidis* específica para este sorogrupo, uma vez que a vacina cubana, utilizada nas campanhas de vacinação no período de 1990 a 1994, mostrou-se ineficaz (de Filippis & Vicente, 2005).

Em 2003 foram notificados pelo Ministério da Saúde, 3.363 casos de DM no Brasil com 676 mortes, o que resulta em uma taxa de letalidade de 20% (Moraes C., Comunicação pessoal – Ministério da Saúde). No Rio Grande do Sul, no mesmo ano, o Setor de Epidemiologia do Estado notificou 193 casos de meningite meningocócica, dos quais 34 pacientes foram a óbito. A taxa de letalidade foi de 17,6%. Só a região metropolitana de Porto Alegre foi responsável pela notificação de 62,3% do total de casos do estado. Confirmando o estudo de Rigatti (2000), aproximadamente 80% dos casos do Estado, ocorridos em 2003 foram atribuídos ao sorogrupo B do meningococo (Kmetzsch CI, Comunicação pessoal – Secretaria Estadual da Saúde).

⁷ Epidemia ocorrida em 1975 no norte da Noruega que persistiu até meados da década de 80, quando já estava disseminada por todo país, atribuída principalmente a isolados de fenótipo B:15:P1.7,16, complexo clonal ET-5 (Caugant, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

Como descrito anteriormente, as características imunogênicas e epidêmicas da doença meningocócica podem variar de acordo com determinadas características da bactéria, da população infectada e com sua distribuição geográfica. Ocasionalmente, surtos localizados de DM podem ocorrer, e algumas vezes ondas epidêmicas podem se disseminar por vários países ou continentes, constituindo pandemias (Caugant, 1998). O monitoramento da população bacteriana circulante, bem como estudos descrevendo os grupos clonais virulentos em circulação, são fundamentais para o entendimento da dinâmica da DM, fornecendo as bases epidemiológicas para as estratégias de controle em níveis regionais e mundiais (Stephens, 1999; Lemos, 2005).

Considerando a importância histórica da DM causada pelo sorogrupo B no Rio Grande do Sul e o confinamento do fenótipo norueguês em nossa população, o presente estudo foi proposto visando um melhor entendimento da epidemiologia desta doença. Para isso, foram determinados os fenótipos dos meningococos circulantes no período de 1995 a 2003, além de um levantamento epidemiológico da população infectada no período. Complementando o estudo, alguns isolados foram caracterizados genotipicamente e foi traçado o perfil de susceptibilidade à penicilina dos mesmos.

Devido à falta de consenso entre pesquisadores na escolha de métodos de custo acessível e com resultados de fácil interpretação e que sejam reprodutíveis para o estudo de surtos da doença meningocócica, estamos propondo uma nova alternativa que, como será demonstrado apresenta resultados promissores em sua fase inicial de padronização.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a epidemiologia da doença meningocócica em pacientes infectados no RS, caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *N. meningitidis*, utilizando métodos convencionais e propor um novo método de tipagem para o estudo de surtos, bem como avaliar sua susceptibilidade à penicilina, principal fármaco utilizado no tratamento da doença meningocócica.

3.2. Objetivos específicos

1. Organizar um banco de meningococos isolados de pacientes do período de 1995 a 2003;
2. Criar um banco de dados a partir das fichas epidemiológicas dos pacientes que foram preenchidas pelo clínico responsável;
3. Inserir no banco de dados todos os resultados dos testes bioquímicos, imunológicos e de caracterização fenotípica, convencionalmente utilizados;
4. A partir da análise do banco de dados, selecionar os isolados adequados para a caracterização genotípica;
5. Avaliar a susceptibilidade à penicilina destes isolados;
6. Propor e padronizar um método de tipagem por PCR que possa ser utilizado para a investigação de surtos da DM utilizando como alvo de amplificação os genes que codificam para a proteína Opa ;
7. Comparar os resultados obtidos pelo MLST com aqueles gerados pelo novo método de genotipagem;

PARTE II

CAPÍTULO I: Epidemiologia da Doença Meningocócica no Rio Grande do Sul e Caracterização Molecular de Isolados de *Neisseria meningitidis* através de *Multilocus Sequence Typing*

Artigo científico aceito para publicação em 01/08/2007 pela revista *Tropical Medicine and International Health*

TROPICAL MEDICINE & INTERNATIONAL HEALTH

Editors: S Cairncross, H van Asten, S Jaffar, T Junghanss, P Van der Stuyft, RD Walter

Assistant Editor: Adam Snow
London School of Hygiene & Tropical Medicine
Keppel Street, London WC1E 7HT
Phone +44-(0)207-927 2828
Fax +44-(0)207-637 4314
email adam.snow@lshtm.ac.uk

01.08.2007

Dr Arnaldo Zaha
zaha@cbiot.ufrgs.br

Our reference number 4567

Dear Dr Zaha

I am pleased to inform you that your paper **High prevalence of Neisseria meningitidis ST-32/ET-5 clonal complex in Southern Brazil** has been accepted for publication in *Tropical Medicine & International Health*.

We anticipate that this manuscript will appear online in 2 - 3 months and in a printed issue within 4 - 5 months. To see how things will proceed from here, please refer to the attached checklist. (The checklist is for you to see whether you have provided all the documents we need; there is no need to return it to me.)

Yours sincerely

Adam Snow
Assistant Editor

**Epidemiology of Meningococcal Disease in Southern Brazil from 1995 to 2003, and
Molecular Characterization of *Neisseria meningitidis* Using Multilocus Sequence
Typing**

Short title: Epidemiology of Meningococcal Disease in Southern Brazil

Baethgen, L.F.^{1,2}; Weidlich, L.^{1,2}; Moraes, C.²; Klein, C.²; Nunes, L.S.²; Cafrune, P.I.^{1,2};
Lemos, A.P.³; Rios, S.S.⁴; Abreu, M.F.⁴; Kmetzsch, C.⁵; Sperb, A.F.⁵; Riley, L.W.⁶;
Rossetti, M.L.R.^{2,7} and Zaha, A.^{1,8*}

¹Programa de Pós-graduação em CB: Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBioq - UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, RS, Brazil.

³Seção de Bacteriologia - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.

⁴Seção de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN/RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Divisão de Vigilância Epidemiológica, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil.

⁶School of Public Health, University of California, Berkeley, USA.

⁷Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

⁸Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot - UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author.

Mailing addresses: Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Caixa Postal 15.005, CEP: 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

A retrospective cohort study was carried out among 2,215 meningococcal disease (MD) cases reported from 1995 to 2003 in Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil. A reduction of almost 50% in the overall incidence was observed, and the case-fatality rate during this period was 22%. Even so, high incidence of MD continued to be observed after the epidemic period that ended in 1999. The age group of 1-4 years and infants under 1 year represent together 54.1% of the reported cases with an incidence of 11.3/100,000 pop and 31.3/100,000 pop, respectively. The majority of cases were caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B (69.8%), which increased significantly. There was a significant decrease in serogroup C cases in the whole period. The phenotypes B:4,7:P1.19,15, B:15:P1.7,16 and B:NT:P1.3 represented almost 50% of all serotyped cases. Fifty-six isolates obtained from RS patients during the first non-epidemic year 2000 plus 20 isolates from other southern Brazilian states (Santa Catarina and Paraná), Denmark and France were typed by Multilocus Sequence Typing. Twenty different STs were identified, 8 of them found only in RS. ST-33 (27%) and ST-259 (18%) were the most frequent, both belonging to the ST-32/ET-5 complex. The ST-259 cases showed a trend towards higher risk of fatal outcome. ST-259 isolates were not detected among geographic controls or in other studies carried out in Brazil. Our data suggest that these two clones over the entire study period and the emergence of the ST-103 isolates contributed to the continued high incidence of MD in RS.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, epidemiology, molecular characterization, Rio Grande do Sul, Brazil.

INTRODUCTION

Meningococcal disease (MD) is an important cause of mortality and morbidity worldwide (WHO, 1998). In 1974 there was a large MD epidemic in Brazil, caused by *Neisseria meningitidis* serogroups A and C (Brasil, 1999; Barata, 2004), including the Rio Grande do Sul (RS) state, where the incidence reached 40.8 cases per 100,000 population. The number of cases decreased in the following years due to control measures (vaccination programs) adopted in the country (Kmetzsch. C.I., personal communication).

RS is the southern-most Brazilian state with a population of 10.5 million inhabitants (IBGE, 2003) with climate conditions, socioeconomic factors, cultural habits and ethnic population makeup distinct from other regions of the country due mostly to European immigration. The four seasons are well defined in this region, and it has the coldest winter in the country. Many studies have shown that seasonal variation, in particular, cold season may increase risk of MD (Peltola, 1983; Cruz *et al.*, 1990; Lindsay *et al.*, 2002).

From 1983 to 1992 the mean incidence was 1.3 cases per 100,000 population and this period was considered endemic for MD as determinate by the RS surveillance health authorities. However, in 1993 the incidence suddenly increase to 2.5 cases per 100,000, reaching 3.5 in 1995 and decreasing to 2.7 in 1999, characterizing an epidemic period. From 2000 year up to now, the pattern of disease became endemic again with incidence ranging from 1.5 to 2 cases per 100,000 (Kmetzsch. C.I., personal communication; Brasil, 2005).

Neisseria meningitidis is subdivided into 12 major serogroups based on the chemical and immunological properties of their capsular polysaccharides. Serogroups A, B, C, W135 and Y are responsible for most of the MD cases in the world but it has been demonstrated that MD incidence can differ with regard to geographic location and temporal variation (Tzeng & Stephens, 2000).

It has been shown that in some instances the emergence of a new clone or a clone complex is associated with an increased case-fatality rate compared to other strains (Jensen *et al.*, 2002) or is characterized by high rates of disease following nasopharyngeal acquisition (Stephens, 2007). So, the characterization of *N. meningitidis* isolates is essential for surveillance measures, providing useful information for predicting the potential efficacy of vaccines. With this aim, the serotype and serosubtype of

meningococci isolates have been classified based on differences on PorB and PorA outer membrane proteins (OMPs) respectively (Frasch *et al.*, 1985, Poolman, & Abdilahi, 1988).

The two best studied outer membrane vesicle (OMV) vaccines were produced in response to national outbreaks in Norway and Cuba, respectively. Both these vaccines have been used for epidemic control in their respective countries and, in the case of the Cuban vaccine, in Brazil and Chile (WHO, 2007). Since 1991, New Zealand has experienced an epidemic of meningococcal disease caused by meningococci belonging to the ST-41/44 complex, lineage III, with the signature strain type B:4:P1.7-2,4 (Dyet & Martin, 2005). To control the epidemic, a strain-specific OMV vaccine, MeNZB, which induced serum bactericidal antibodies specifically targeted to VR2 P1.4 epitope of the PorA P1.7-2,4 protein (Martin *et al.*, 2006). A bivalent OMV-based vaccine made up of serotypes P1.19,15 and P1.7,1, which is already under evaluation in Brazil (Jessouroun *et al.*, 2004). The successful development of a broad specificity group B vaccine may come in the end as a consequence of the sequencing of the meningococcal genome and the use of reverse vaccinology strategy to identify antigens to be included as candidate vaccines (Danzig, 2006; Giuliani *et al.*, 2006).

From 1995 to 2003, 2,215 cases of MD were reported in RS. Almost 70% belonged to serogroup B, suggesting an endemic situation as already reported for other regions of Brazil (66.5%) (Kmetzsch, C.I., personal communication; Lemos *et al.*, 2006). The massive presence of the phenotype B:4,7:P1.19,15 and the presence of 'Norwegian' epidemic phenotype B:15:P1.7,16 confined to the Southern States of Brazil have been described previously (Lemos *et al.*, 2006).

Recently, a genotyping method based on sequence analysis called Multilocus Sequence Typing (MLST) was developed for *N. meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998). The method has been useful in demonstrating association between isolates, showing the existence of distinct clones over-represented in certain communities (Maiden *et al.*, 1998; Feavers *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2001; Skoczynska *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2005; Chiou, *et al.*, 2006). This method, an adaptation of Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), has become a widely used method and permits to compare results among different places in the world (Maiden *et al.*, 1998). MLST is based on DNA sequence variation in specific regions of seven housekeeping genes that range from 433-501 bp in length. For each gene fragment, different sequences are assigned as distinct alleles, and each isolate is defined by the combination of alleles at each of seven

housekeeping loci. This is known as the allelic profile or sequence type (ST). The STs are assigned to lineages using the BURST software (<http://neisseria.mlst.net>).

In this work we have analyzed the MD surveillance data reported to the Epidemiological Surveillance Office of Rio Grande do Sul State in the period of 1995 to 2003, serosubtyped viable isolates and typed representative isolates from the first non-epidemic year of the study period (year 2000) by MLST. The results indicate that ST-33 and ST-259 (ST-32/ET-5 complex), the most frequent in the period, and the emergence of the ST-103 isolates may contribute to the continued high incidence of MD in RS.

MATERIAL AND METHODS

Study location, population and time. RS, located in the south of Brazil, had a population of 10.5 million inhabitants in 2003 (IBGE, 2003). The study involved nineteen health units covering 100% of RS population. We review the meningococcal disease surveillance data from January 1995 to December 2003.

Study type, definitions and epidemiological data. This study was a retrospective cohort review of surveillance data reported to the Epidemiological Surveillance Office of Rio Grande do Sul. Reporting is based on the clinical and laboratory case definition used by the Brazilian Ministry of Health (Brasil, 2005). Demographic and clinical characteristics of patients were collected at the hospitals and then reported to the SINANW software (Sistema Nacional de Agravos de Notificação) at the regional level. These data were revised and analyzed at the Epidemiological Surveillance Office of RS using TabWin (version 3.4 - Tab for Windows, Department of Information and Informatics for Health Unique Sytem - DATA SUS: <http://www.datasus.gov.br/tabwin/tabwin.htm/>).

Statistical analysis. Demographic and clinical characteristics of patients were analyzed with the software EpiInfo (version 6.04d, Centers for Disease Control and Prevention, USA). The population data were obtained from the Brazilian Institute for Geography and Statistics (IBGE, 2003). For the comparison of categorical variables, a chi-square test with Yates' correction and Fisher's exact test were used. Differences between groups were tested by univariate analyses and expressed as odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (95% CI). Student's t-test was used for comparing means of continuous variables. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Bacterial Strains. All positive cultures must be submitted to the Institute of Biological Research - Reference Laboratory of Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS) to biochemical

and serogroup identification. During this period 693 (29.6%) culture positive cases were identified as gram-negative diplococci on the basis of growth characteristics, oxidase and catalase positivity. These isolates were recovered from blood or cerebrospinal fluid of patients with systemic disease and were stored in the IPB-LACEN/RS collection. From these, 290 (41.8%) viable isolates were submitted to Bacteriology Section of Instituto Adolfo Lutz (IAL), National Reference Center for Meningitis (Centro de Referência Nacional para Meningites, CRNM) for serosubtyping. The study included 19 isolates from cases from two neighboring states (Santa Catarina and Paraná) and from other countries (France and Denmark) that were used as geographic comparison isolates. The reference strain M5741 (B:4,7:P1.19,15), donated by Centers for Disease Control and Prevention (CDC) was used to standardize MLST technique in the laboratory.

Serologic typing. Serogroups were determined by slide agglutination test with A, B, C, W135, and Y monoclonal antibodies (Pastorex® Meningitis - Bio-Rad, France) and by PCR as previously described by Taha (2000) and Baethgen *et al.* (2003). These isolates were further serotyped and serosubtyped by dot-blotting of whole cell suspensions with an expanded panel of monoclonal antibodies (mAbs) at IAL as described previously (Wedeg *et al.*, 1990; Lemos *et al.*, 2006).

Multilocus Sequence Typing. Among 290 *N. meningitidis* isolates from the IPB-LACEN/RS collection, we selected the isolates from the first non-epidemic year of this study period (year 2000) represented by 56 viable isolates corresponding to almost 75% of MD culture positive cases from that year for the MLST characterization. Chromosomal DNA was extracted from cells incubated overnight on chocolate agar at 37°C in 5% CO₂ by boiling. The primers and protocols used for amplification and sequencing of the seven housekeeping genes are listed on the MLST website (<http://pubmlst.org/neisseria/>). PCR products of the seven housekeeping genes were prepared for sequencing by a standard polyethylene glycol/ethanol PCR product purification method. Sequence reactions were performed with the Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, Foster city, CA, 94404), and the extension products were analyzed in an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems). The DNA fragments from each gene were sequenced at least once with the respective primers.

Sequence Analysis. Forward and reverse sequences were analyzed for each gene by Chromas - Version 2.31 (Copyright© 1998-2005 Technelysium Pty Ltd. - available at <http://www.technelysium.com.au>) and aligned using ClustalW – Sequence analysis

(EMBL-EBI available online at <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) software. Sequences were submitted to the MLST website and compared to the existing alleles for determination of the allele type, STs, and clonal complexes of the isolates.

RESULTS

Description of surveillance data. During the period of study (1995 to 2003) 2,215 clinical cases of MD were reported in RS. The mean incidence was 2.5 ± 0.6 cases per 100,000 population ranging from 3.5 in 1995 to 1.8 cases per 100,000 population in 2003. A seasonal pattern of meningococcal disease activity could be observed with highest peaks appearing during the winter (Figure 1).

The overall case fatality rate (CFR) was 377/2215 (17%). The information about outcome was not available for 515 cases. Thus, CFR was 377/1700 (22.2%) for cases with known information. According to the known clinical status, bacteremia was associated with a higher CFR (mean $46.8\% \pm 10.6$), followed by meningitis ($10.4\% \pm 3.7$) and both bacteremia and meningitis ($15.1\% \pm 2.6$) ($P < 0.001$).

The mean incidence of MD in infants under 1 year of age was 31.3 ± 5.7 per 100,000 population, higher than that in the 1-4 years of age group, which was 11.3 ± 3.4 ($P < 0.001$). Despite that, a higher prevalence of cases was reported in the group 1-4 years of age ($31.7\% \pm 3.8$), while it was lower for infants under 1 year of age ($22.4\% \pm 2.8$) ($P < 0.001$).

Mean incidence in males was 2.7 ± 0.6 cases per 100,000 population and in females it was 2.2 ± 0.6 cases per 100,000 ($P = 0.14$). Males had higher incidence from 1995 to 2002. The year 2003 was the only period when the difference was significant; females had a lower incidence (1.5/100,000) when compared to male (2.2/100,000) (OR= 1.53; 95% CI 1.14–2.06) ($P < 0.001$).

Among all criteria used to confirm meningococcal disease, 32.2% of cases were determined by positive culture, 24.7% only by clinical criteria, 16.8% by counterimmunoelectrophoresis (CIE), 12.7% by bacterioscopy, 10.3% latex agglutination (LA). The serogroup was determined (by LA and/or CIE) for 1,046 isolates, and 730 (69.8%) were serogroup B, 283 (27.1%) serogroup C and 33 (3.1%) serogroup Y/W135. The mean number of cases per year was 81.1 for serogroup B, 31.4 for serogroup C and 3.7 for serogroup Y/W135, showing a significant increase of serogroup B ($P < 0.001$) and a significant decrease of serogroup C ($P < 0.001$) during the period of the study.

The mean proportion of cases among the nineteen health units demonstrated that Porto Alegre (the capital of RS State) accounted for 47.9%, followed by Caxias do Sul with 10.6% and Alegrete with 6.7%. However, if we analyze the mean incidence, the health unit of Alegrete showed the highest value at $3.6 \pm 1.1/100,000$ population followed by Porto Alegre $3.6 \pm 0.8/100,000$ population and Santa Cruz do Sul $3.0 \pm 1.2/100,000$ population.

Bacterial identification, grouping, typing and subtyping. Among the 290 *Neisseria meningitidis* isolates submitted to CNRM the serogroup B was confirmed in 229 cases (78.9%), 41 (14.1%) were serogroup C, 18 (6.2%) were serogroup W135, one (0.3%) was serogroup Y and one (0.3%) was non-groupable (Table 1).

The most common phenotypes for serogroup B were: 55 B:4,7:P1.19,15 (24%) isolates, 57 B:15:P1.7,16 (24.9%), 22 B:NT:P1.3 (9.6%) and 5 B:NT:NST (2.2%) isolates. Among 41 isolates belonging to serogroup C (14.1%) we found 16 C:2b:P1.3 (39%) and 6 C:NT:NST (14.6%) isolates. For the 18 W135 serogroup the most common phenotype was identified W135:2a:P1.2 (n=7, 38.8%) (Table 2). The CFR for the phenotype B:15:P1.7,16 was 15% and was the only one that demonstrated a significant association for fatality compared to the total number of cases with known outcome ($P < 0.05$). An increase in the number of phenotype B:NT:P1.3 cases was observed after the epidemic period of the study (2000-2003 period) ranging from 4 to 18 cases ($P < 0.05$). The phenotype B:NT:P1.3 plus B:4,7:P1.19,15 and B:15:P1.7,16 accounted for 46% of all cases. The non-serosubtyped isolates accounted for 16.5% of typed isolates.

STs and lineage assignment. Among the 56 viable isolates studied from year 2000, 20 STs were identified, including 8 new ones. Database analysis grouped the isolates into four clonal complexes and four single STs. Thirty-nine of these isolates were confirmed as belonging to known major hyperinvasive genetic clones, with 38 (69.6%) and one isolate (1.8%) being assigned to the ST-32/ET-5 and ST-23/Cluster A3 complexes, respectively (Table 3).

Among the serogroup B isolates we detected ten different STs, belonging to the ST-32/ET-5 complex, three STs belonging to the ST-103 complex, and one ST belonging to the ST-461 complex. Among the serogroup C isolates, two STs belonged to ST-103 complex, and two other isolates were assigned to new STs. Serogroup Y strain belong to the ST-23 complex/Cluster A3 (Table 3).

Among 20 geographic controls, five STs (ST-32, ST-33, ST-463, ST-802, and ST-4948) were identified, all of which belonged to ST-32/ET-5 complex ET-5. Neither ST-259 nor ST-639 was identified among these isolates (Table 4).

DISCUSSION

As shown by this study, during the 1995-2003 period in RS, there was a reduction of 47% in the overall incidence of meningococcal disease; this was also observed all over the country (59%). MD in RS has been considered to be endemic since 2000 and the incidence in 2003 was 1.8 cases/100,000 population. During the same period the overall incidence in Brazil was 3.3 ± 1.0 cases/100,000 population and the incidence in 2003 was 1.9 cases/100,000 population (unpublished data from the Ministry of Health). The incidence is comparable to that of countries unaffected by major epidemics, such as United States of America, Australia, Scotland and Croatia (Rosenstein *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000; Kyaw *et al.*, 2002; Boras *et al.*, 2004).

The CFR for 1995-2003 period was 22%, which would be considered high if compared to other places in Brazil: 17.3% in Campinas (São Paulo State), and 13.3-17.5% in Rio de Janeiro city (Noronha *et al.*, 1997; Donalisio *et al.*, 2000; Escosteguy *et al.*, 2004). The overall CFR in Brazil during the study period was $19.5\% \pm 0.7$ (unpublished data from the Ministry of Health). CFR reported from other countries ranged from 4-13% (Campagne *et al.*, 1999; Rosenstein *et al.*, 1999; Paret *et al.*, 1999, Ward *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2003; Tsolia *et al.*, 2003, Boras *et al.*, 2004). Possible explanations for this finding include differential reporting of severe cases, presence of virulent clones in the population, and timely access of medical care. Additionally, not all public health departments include probable cases in their surveillance reports to the Epidemiological Surveillance Office of Rio Grande do Sul or to the Brazilian Ministry of Health. As expected, bacteremia cases showed higher mean CFR compared to CFR for bacteremia and meningitis and meningitis only. However, the CFR for bacteremia described in our study showed a higher value when compared to other studies (Schuchat *et al.*, 1997; Paret *et al.*, 1999; Rosenstein *et al.*, 1999).

Consistent with earlier studies, both infants ($P < 0.001$) and males (trend for all periods except 2003) continued to have the highest attack rates of MD (Rosenstein *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2001; Mantese *et al.*, 2002). There was an overall reduction in incidence for almost all age groups and by gender during the study period. Data from

Ministry of Health in Brazil showed more cases among males and infants under 4 years age (unpublished data from the Ministry of Health).

Consistent with trends observed in Brazil, the proportion of meningococcal cases due to serogroup B remained predominant over time from 50.8% in 1995, reaching 88.7% in 2001 and decreasing to 81.3% in 2003. Meningococcal C cases, second in frequency, started with a peak of 47% in 1995, decreasing during the next 4 years, and increasing slightly after 2000, reaching 12.5% of cases in 2003.

A large diversity of serotypes and serosubtypes was observed within both the serogroup B and the serogroup C populations, although only some of them predominated. The ‘Norwegian’ epidemic phenotype B:15:P1.7,16, B:4,7:P1.19,15 and B:NT:P1.3 represented more than 50% of serogroup B cases while phenotypes C:2b:P1.3 and C:NT:NST represented almost 54% of serogroup C cases. Lemos *et al.* (2006) also observed this trend among B:4,7:P1.19,15, C:2b:P1.3 and C:NT:NST isolates from Brazil, but they mentioned that the presence of ‘Norwegian’ epidemic phenotype was almost confined to the southern administrative region of Brazil (formed by RS, Santa Catarina and Paraná states), while the C:NT:NST phenotype was almost limited to São Paulo state. These may explain the differences found among the predominant phenotypes observed in isolates from different regions of the country, changing the current overall incidence of B and C serotypes.

The increased prevalence of B:15:P1.7,16 cases during 1998-2003 in RS could be due to infection by a strain with increased virulence or meningococcal serum antibody resistance, as already described by others (Caugant, 1998; Jensen *et al.*, 2003). Several studies have shown that mutations in the DNA region encoding for the PorA epitopes of B:15:P1.7,16 meningococci may result in no recognition by the bactericidal serum antibodies that were prevalent in the population, and even by the sera from individuals immunized with a vaccine based on outer membranes from B:15:P1.7,16 strain (Rosenqvist *et al.*, 1993; Brooks *et al.*, 1994; Caugant, 1998; Taha *et al.*, 2001). It is also possible that in RS we have a similar situation to that described by Caugant *et al.* (1988) in Norway, in which the ET-5 complex was responsible for almost 80% of the cases during the 80’s. However, the carriage study of this hypervirulent/hyperinvasive lineage in the population showed that it was carried only by 0.7% of the population, explaining why there was not a good protection against this clonal complex in the entire population.

Serogroup W135, important because of the cases associated with returning pilgrims from Saudi Arabia (Lingappa *et al.*, 2003), accounted for 3.5% of all cases in RS State from 1995-2003. Among the 18 serotyped isolates for this serogroup, only 3 (16.7%) were serosubtype P1.5,2, but all cases occurred before the year 2000.

Our results indicate that *N. meningitidis* serogroup B is responsible for causing endemic disease in RS. A similar situation was observed in Canada, and isolates of this serogroup have been described as genetically heterogeneous (Ashton & Caugant, 2001), with no single clone or any particular antigenic type predominating alone among the invasive disease isolates (Law *et al.*, 2006).

By MLST, the 56 isolates showed 20 different STs, in which, 8 were exclusively found in RS State. These unique STs accounted for 14.3% of all infections studied during the year 2000. Gottfredsson *et al.* (2006) found almost the same proportion (14.4%) for new STs in their collection of 362 isolates during a 28-year period of study.

Isolates belonging to ST-32/ET-5 complex and ST-23/Cluster A3 complexes, which are termed ‘hypervirulent lineages’ (Maiden *et al.*, 1998) represent 70% of all isolates typed in 2000. Among ST-32/ET-5 complex, ST-33 was the most common type found in RS, followed by ST-259, causing 26.8% and 17.9% of cases, respectively. The ST-23 complex/Cluster A3 was represented by only one isolate. Among the serogroup C isolates we determined 3 new STs among 4 isolates tested. None of the serogroup C strains analyzed belonged to any hypervirulent clones. We did not find any of the Hajj-related W135:2a:P1.5,2 (ST-11/ET-37 clonal complex) isolates that caused outbreaks worldwide (Popovic *et al.*, 2000, Aguilera *et al.*, 2002, Taha *et al.*, 2004).

In another study carried out in Brazil, the majority of isolates (82%) belonged to 4 hypervirulent lineages, and 11 of 20 new sequence type (STs) characterized were related to hypervirulent lineages (de Filippis & Vicente, 2005). However, the second most common type among RS isolates (ST-259) was not detected, indicating a high diversity of serogroup B in different geographic location. A similar situation was observed among the twenty selected geographic controls from ST-32/ET-5 complex, where no ST-259 was detected. This sequence type has been described in isolates from the United Kingdom (MLST database), Ireland and Netherlands (Murphy *et al.*, 2003; Schouls *et al.*, 2006). It is possible that this strain has been introduced into RS state by the frequent exchange of people from neighbor countries such as Uruguay and Argentina that receive many tourists

from European countries. This hypothesis needs further investigation since there is no available information about STs of isolates from these countries.

A limitation of surveillance-based studies is the bias introduced by underreporting. However, because of the severity of the disease and the need for intravenous antibiotic treatment, most patients with meningitis are hospitalized, and the local health department is usually notified in order to track down close contacts and ensure that they receive antibiotic prophylaxis. Hospital practices, such as antibiotic administration before acquisition of cultures, might render samples from patients culture-negative. However, this might be reduced by the inclusion of probable cases based on clinical criteria. Another limitation is the large proportion of missing information for outcome (23%) that may have underestimated the CFR. Despite this, the trends described in our study are consistent with those described on the epidemiology of meningococcal disease in other places in Brazil and the world. The strain collection used to predict the most common genotypes in our population may contain bias, but the information generated by the MLST method added to the phenotype characterization and epidemiological trends, based on an endemic year collection, gives a rich MD panorama.

There is an OMV-based vaccine based on Brazilian prevalent *N. meningitidis* serotypes P1.19,15 and P1.7,1, under evaluation in Brazil (Jessouroun *et al.*, 2004). The preliminary results showed a higher induction of bactericidal antibody titers against homologous and heterologous target strains when compared to the Cuban vaccine (VA-MENGOC-BC[®], Cuba) and seems to be a good candidate vaccine after being evaluated by clinical trials. De Fillippis & Vicente (2005) considered that 81% of the Brazilian isolates analyzed were from serogroup B, and belong to ST-32/ET-5 complex which are genetically related to the Cuban vaccine strain used in a mass vaccination in Brazil during 1997-1998. The high genetic diversity found among PorA could explain why this vaccine did not confer effective herd immunity (de Filippis, *et al.*, 2007). Our results showed that this Brazilian vaccine would target less than 30% of the MD cases caused by serogroup B meningococcus in RS State if serotype P1.7,16 is not included. We are now investigating the PorA regions from RS meningococcal isolates to verify its variability in our population (unpublished results).

The data presented in this work suggest that the incidence maintenance of MD over the last years can be explained by the high prevalence of specific B phenotypes in the RS

population. Further studies are being conducted by our group to better elucidate genotypic aspects of MD in RS State.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks are due to Leonard Mayer for critical reading of the manuscript and for providing the reference strain M5741. We thank Elise Jensen and Muhamed-Kheir Taha for providing isolates from their collections to be used as geographic controls. To Rita de Cássia C. Bertoni and to Denise Berto to permit the use of Santa Catarina and Paraná meningococcus isolates, also used as geographic controls.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul/FAPERGS, Brazil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, Brazil, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde/CDCT-FEPPS, Brazil, and Fogarty International Center, National Institutes of Health, USA (Grant no. TW00905).

This publication made use of the Neisseria Multi Locus Sequence Typing website (<http://pubmlst.org/neisseria/>) developed by Keith Jolley and Man-Suen Chan and sited at the University of Oxford (Jolley *et al.* 2004, *BMC Bioinformatics*, 5:86). The development of this site has been funded by the Wellcome Trust and European Union.

REFERENCES

- Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C, *et al.* (2002) Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. *Emerging Infectious Diseases*, **8**, 761-767.
- Ashton FE & Caugant DA (2001) The panmitic nature of *Neisseria meningitidis* serogroup B during a period of endemic disease in Canada. *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 283-289.
- Baethgen LF, Moraes C, Weidlich L *et al.* (2003) Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: standardization and adaptation for use in a public health laboratory. *Journal of Medical Microbiology* **52**, 793-799.
- Barata RB (2004) The impact of mass vaccination on meningococcal disease in the 1970s epidemic in Brazil. *Caderno de Saude Publica* **20**, 1762-1763.
- Boras A, Jeren T, Sacchi CT *et al.* (2004) Establishment of an active laboratory-based surveillance for bacterial meningitis in Croatia and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates causing meningococcal disease that were collected in the year 2000, the first year of activity. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1803-1806.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Boletim Epidemiológico. Edição Especial, 9-10, 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2005) *Guide to Epidemiological Surveillance*. 6th edn. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf) Ministério da Saúde, Brasília, 861 p.

Brooks JL, Rosenqvist E, Bjune G *et al.* (1994) Comparisson of the class-1 outer membrane protein from B:15:P1.16 *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients previously immunized with a serogroup B outer membrane protein vaccine in Norway. *Microbial Pathogenesis* **17**, 425-430.

Campagne G, Schuchat A, Djibo S *et al.* (1999) Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. *Bulletin of the World Health Organization* **77**, 499-508.

Caugant, DA (1998). Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 505-525.

Caugant DA, Kristiansen B-E, Froholm, LO *et al.* (1988) Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infection and Immunity* **56**, 2060-2068.

Chiou CS, Liao JC, Liao TL *et al.* (2006) Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. *BMC Infectious Diseases* **6**, 25.

Cruz C, Pavez G, Aguilar E *et al.* (1990) Serotype-specific outbreak of group B meningococcal disease in Iquique, Chile. *Epidemiology and Infection* **105**, 119-126.

Danzig L. (2006) Reverse vaccinology - in search of a genome-derived meningococcal vaccine. *Vaccine* **24**, (S2) 11-12.

de Filippis I & Vicente AC (2005) Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **53**, 161-167.

de Filippis I, de Andrade CF, Silva L *et al.* (2007). PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. *Infection and Immunity* **75**, 3683-3685.

Donalisio MR, Kemp B, Rocha MM & Ramalheira RM (2000) Fatality rate in the epidemiology of meningococcal disease: study in the region of Campinas, SP, Brazil, 1993 to 1998. *Revista de Saúde Pública* **34**, 589-595.

- Dyet KH & Martin DR (2005) Sequence variation in the porB gene from B:P1.4 meningococci causing New Zealand's epidemic. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 838-42.
- Escosteguy CC, Medronho R de A, Madruga R *et al.* (2004) Epidemiologic surveillance and evaluation of meningitis hospital care. *Revista de Saúde Pública* **38**, 657-663.
- Feavers IM, Gray SJ, Urwin R *et al.* (1999) Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3883-3887.
- Frasch CE, Zollinger WD, & Poolman JT (1985) Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Reviews of Infectious Diseases* **7**, 504-510.
- Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M *et al.* (2006) A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**, 10834-10839.
- Gottfredsson M, Diggle MA, Lawrie DI, *et al.* (2006) *Neisseria meningitidis* sequence type and risk for death, Iceland. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 1066-1073.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2003) Available online: <http://www.ibge.gov.br/>
- Jensen ES, Berthelsen L, Lind I *et al.* (2002) Period prevalence and case fatality rate associated with distinctive clone complexes of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**, 506-512.
- Jensen ES, Schonheyder HC, Lind I *et al.* (2003) *Neisseria meningitidis* phenotypic markers and septicaemia, disease progress and case-fatality rate of meningococcal disease: a 20-year population-based historical follow-up study in a Danish county. *Journal of Medical Microbiology* **52**, 173-179.
- Jessouroun E, da Silveira IF, Larangeira AP *et al.* (2004) Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. *Vaccine* **22**, 2617-2625.
- Kyaw MH, Christie P, Jones IG & Campbell H (2002) The changing epidemiology of bacterial meningitis and invasive non-meningitic bacterial disease in Scotland during the period 1983-99. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **34**, 289-298.
- Law DK, Lorange M, Ringuette L *et al.* (2006) Invasive meningococcal disease in Quebec, Canada, due to an emerging clone of ST-269 serogroup B meningococci with serotype antigen 17 and serosubtype antigen P1.19 (B:17:P1.19). *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 2743-2749.

Lemos AP, Brandao AP, Gorla MC *et al.* (2006) Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. *Journal of Medical Microbiology* **55**, 751-757.

Lindsay AP, Hope V, Marshall RJ & Salinger J (2002) Meningococcal disease and meteorological conditions in Auckland, New Zealand. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* **26**, 212-218.

Lingappa JR, Al-Rabeah AM, Hajjeh R *et al.* (2003) Serogroup W-135 meningococcal disease during the Hajj, 2000. *Emerging Infectious Diseases* **9**, 665-671.

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E *et al.* (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3140-3145.

Mantese OC, Hirano J, Santos IC *et al.* (2002) Etiological profile of bacterial meningitis in children. *Jornal de Pediatria* **78**, 467-474.

Martin DR, Ruijne N, McCallum L *et al.* (2006) The VR2 epitope on the PorA P1.7-2,4 protein is the major target for the immune response elicited by the strain-specific group B meningococcal vaccine MeNZB. *Clinical and Vaccine Immunology* **13**, 486-91.

Murphy KM, O'Donnell KA, Higgins AB *et al.* (2003) Irish strains of *Neisseria meningitidis*: characterisation using multilocus sequence typing. *British Journal of Biomedical Science* **60**, 204-209.

Nicolas P, Decousset L, Riglet V *et al.* (2001) Clonal expansion of sequence type (ST)-5 and emergence of ST-7 in serogroup A meningococci, Africa. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 849-854.

Nicolas P, Norheim G, Garnotel E *et al.* (2005) Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* isolated in the African Meningitis Belt between 1988 and 2003 shows dominance of sequence type 5 (ST-5) and ST-11 complexes. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5129-5135.

Noronha CP, Baran M, Nicolai CC *et al.* (1997) Epidemiology of meningococcal disease in the city of Rio de Janeiro: changes after vaccination against B and C serogroups. *Cadernos de saúde pública/Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública* **13**, 295-303.

Paret G, Keller N, Barzilai A *et al.* (1999) Invasive meningococcal disease: patient and strain characteristics set new challenge for prevention and control. *Infection* **27**, 261-264.

Peltola H (1983) Meningococcal disease: still with us. *Reviews of infectious diseases* **5**, 71-91.

Poolman JT & Abdillahi H (1988) Outer membrane protein serosubtyping of *Neisseria meningitidis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **7**, 291-292.

Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW *et al.* (2000) *Neisseria meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. *Emerging Infectious Diseases* **6**, 428-429.

Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E *et al.* (1993) A new variant of subtype P1.16 in *neisseria meningitidis* from Norway, associated with increased resistance to bactericidal antibodies induced by a serogroup B outer membrane protein vaccine. *Microbial Pathogenesis* **15**, 197-205.

Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS *et al.* (1999) The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *The Journal of Infectious Diseases* **180**, 1894-1901.

Schouls LM, van der Ende A, Damen M & van de Pol I (2006) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 1509-1518.

Schuchat A, Robinson K, Wenger JD *et al.* (1997) Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *New England Journal of Medicine*, **337**, 970-976.

Skoczynska A, Konior R, Sadowy E *et al.* (2004) Identification of *Neisseria meningitidis* sequence type 66 in Poland. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **10**, 848-850.

Stephens, DS (2007) Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 3-14.

Taha MK (2000) Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 855-857.

Taha MK, Bichier E, Perrocheau A & Alonso JM (2001) Circumvention of herd immunity during an outbreak of meningococcal disease could be correlated to escape mutation in the *porA* gene of *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity* **69**, 1971-1973.

Taha MK, Giorgini D, Ducos-Galand M & Alonso JM (2004) Continuing diversification of *Neisseria meningitidis* W135 as a primary cause of meningococcal disease after emergence of the serogroup in 2000. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4158-4163.

Tsolia MN, Theodoridou M, Tzanakaki G *et al.* (2003) The evolving epidemiology of invasive meningococcal disease: a two-year prospective, population-based study in children in the area of Athens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **36**, 87-94.

Tzeng Y-L & Stephens DS (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* **2**, 687-700.

Wang VJ, Kuppermann N, Malley R *et al.* (2001) Meningococcal disease among children who live in a large metropolitan area, 1981-1996. *Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32**, 1004-1009.

Ward J, Hanna JN, Bates JR & Selvey LA (2000) Enhanced surveillance for meningococcal disease in Queensland in 1999. *Communicable Diseases Intelligence* **24**, 332-335.

Wedeg E, Hoiby EA, Rosenqvist E & Froholm LO (1990) Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and Elisa. *Journal of Medical Microbiology* **31**, 195-201.

Weiss PLD, Coplan P & Guess H (2001) Epidemiology of bacterial meningitis among children in Brazil, 1997-1998. *Revista de Saúde Pública* **35**, 249-255.

WHO (1998) ***Control of epidemic meningococcal disease***. WHO practical guidelines. 2nd edition, World Health Organization (<http://www.who.int/emc-documents/meningitis/whoemcbac983.html>).

WHO (2007). Text available online: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/print.html

Urwin R & Maiden MC (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiology* **11**, 479-487.

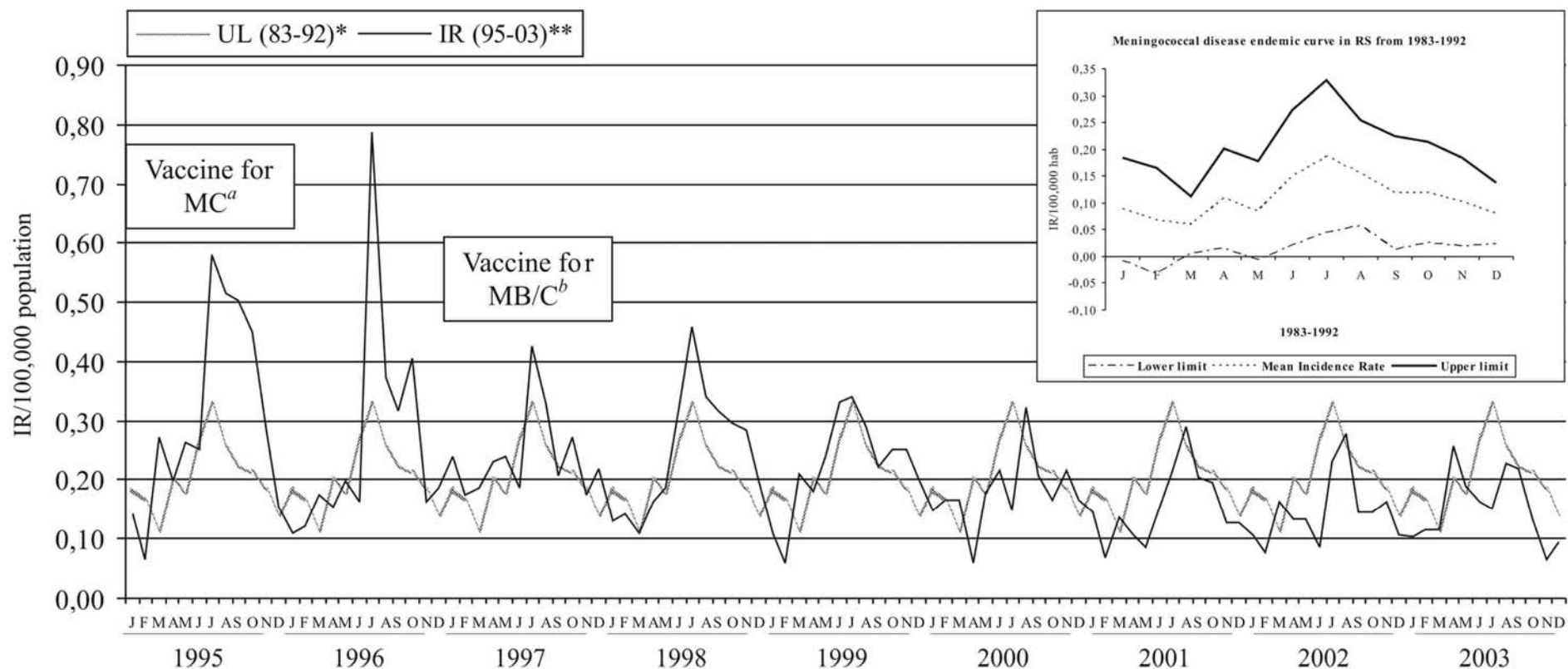


Figure 1: Control chart based on non-epidemic years 1983-1992 showing the seasonality of MD from 1995-2003 in Rio Grande do Sul State, Brazil. *UL (83-92): upper limit based on non-epidemic 1983-1992 period; **IR (95-03): incidence rate during 1995-2003, study period. ^aMass vaccination program for *N. meningitidis* serogroup C during the epidemic year 1995; ^bMass vaccination program for *N. meningitidis* serogroups B/C during the epidemic year 1997 (Cuban anti-meningococcal BC vaccine – VA-MENGOC B-C[®]). The insert in the upper part of the figure shows the meningococcal disease endemic curve in RS from 1983-1992, which was used as a reference for definition of the upper limit (Brasil, 2005).

Table 1: MD caused by *N. meningitidis* serogroup B, C, W135 isolates in RS, from 1995 to 2003.

Year	No. of MD cases	IR*	No. (%) of cases culture positive	No. (%) of isolates Serotyped	No. (%) of isolates in serogroup from serotyped isolates			
					B	C	W135	Others
1995	335	3.5	93 (27.7)	24 (25.8)	9	13	5	0
1996	289	3.0	80 (27.7)	26 (32.5)	10	13	0	0
1997	263	2.7	73 (27.7)	12 (16.4)	7	1	3	1
1998	269	2.7	66 (24.5)	26 (39.4)	22	2	2	0
1999	268	2.7	83 (30.9)	59 (71)	50	6	3	0
2000	220	2,2	78 (35.8)	65 (83.3)	59	5	0	1
2001	191	1,8	78 (40.4)	35 (44.9)	34	0	1	0
2002	184	1,8	68 (36.4)	14 (20.6)	11	0	3	0
2003	193	1,8	74 (38.3)	29 (39.2)	27	1	1	0
TOTAL	2215	-	693 (29.6)	290 (41.8)	229 (79)	41 (14.1)	18 (6.2)	2 (0.7)

*Incidence rate per 100,000 population.

Table 2: Number of isolates with the most common phenotypes for serogroups B, C and W135.

Serogroup (Total of isolates)	No. of fatal cases/total*	CFR (%)	Phenotype	No. isolates (%)	No. of fatal cases/total ^c	CFR (%)
B (229)	13/186	7.0	B:4,7:P1.19,15 (+ B:4:P1.15 ^a)	55 (24)	0/44	0
			B:15:P1.7,16 (+ B:15:P1.16 ^b)	57 (24.9)	7/46	15.2
			B:NT:P1.3	22 (9.6)	1/20	5.0
			B:NT:NST	5 (2.2)	1/4	25.0
			C:2b:P1.3	16 (39)	0/9	0
C (41)	2/22	9.0	C:NT:NST	6 (14.6)	0/5	0
			W135 (18)	1/16	6.2	W135:2a:P1.2

^aBefore 1997 the panel of mAbs could not identify the serotype 7 and serosubtype P1.19. Probably the 6 isolates with the phenotype B:4:P1.15 are phenotype B:4,7:P1.19,15 or belong to the same clonal group (Lemos *et al.*, 2006).

^bBefore 1997 the panel of mAbs could not identify the serosubtype 7. Probably the 3 isolates with the phenotype B:15:P1.16 are phenotype B:15:P1.7,16 or belong to the same clonal group (Lemos *et al.*, 2006).

^cThe total cases account just cases with the outcome.

NT: non-typable; NST: non-serosubtypable

Table 3. Correlation among MLST and serotyping results and their frequency on 56 *N. meningitidis* isolates from RS.

N° of isolates	%	Phenotype	MLST	
			Clonal Complex	ST
15	26.8	B:4,7:P1.19,15		33
10	17.9	B:15:P1.7,16		259
3	5.4	B:15:P1.7,16		463
2	3.6	B:4,7:P1.19,15		32
2	3.6	B:4,7:P1.19,15		5728*
1	1.8	B:4,7:P1.19,15	ST-32/ET-5 complex	639
1	1.8	B:15:P1.7,16		32
1	1.8	B:17:P1.7,16		5723*
1	1.8	B:17:P1.9		2400
1	1.8	B:19,14:P1.7,16		5724*
1	1.8	B:4,7:P1.19		1880
7	12.5	B:NT:P1.3		103
1	1.8	C:NT:NST	ST-103 complex	5338
1	1.8	C:NT:NST		5727*
4	7.1	B:19,1:NST	ST-461 complex	461
1	1.8	Y:19,14:P1.12	ST-23 complex/Cluster A3	23
1	1.8	B:10:P1.14		5725*
1	1.8	B:14:NST		5729*
1	1.8	C:21:P1.14		5726*
1	1.8	C:4:P1.9		5734*

ST: Sequence Type; %: frequency of isolates with determinate ST; NT: non-typable; NST: non-serosubtypable; *: New ST. Note: All isolates from year 2000.

Table 4: Geographic control strains used in the study and MLST results.

N° of isolates	Country	State	Phenotype	ST	Clonal Complex (MLEE)	
1	CDC*		B:4,7:P1.19,15	33		
1	France		B:15:P1.7	32		
1			B:14:P1.7,16			
5	Denmark		B:15:P1.7,16	32		
1			B:15:P1.7,16	802	ST-32 (ET-5)	
2	Brazil		B: 4,7:P1.19,15	33		
3		SC	B: 15:P1.7,16	463		
1			B:15:P1.7,16	4948		
3		PR		B:15:P1.7,16	32	
2				B:4,7:P1.19,15	33	

SC: State of Santa Catarina; PR: State of Paraná. *M5741 strain donated by Leonard Mayer from Centers for Disease Control and Prevention.

**CAPÍTULO II: Estudo da suscetibilidade à penicilina em *N. meningitidis*
isolados de pacientes do RS**

Relatos da identificação de cepas de *N. meningitidis* com suscetibilidade reduzida à penicilina têm ocorrido mundialmente (Blondeau & Yaskuchuk, 1995; Sosa *et al.*, 2001; Caniça *et al.*, 2004; Noah & Henderson, 2002; Stefanelli *et al.*, 2004), fazendo com que sejam adotadas medidas de monitoramento contínuo das cepas circulantes, uma vez que a penicilina é um dos antibióticos mais utilizados no tratamento das infecções meningocócicas.

O significado clínico dos casos de DM por isolados com CIM elevada ainda é incerto. Muitas dessas infecções causadas por isolados com suscetibilidade reduzida à penicilina têm sido tratadas com sucesso quando se eleva a dosagem do medicamento. Entretanto, apesar de raros, já foram relatados casos de falência no tratamento (meningite) quando a dose recomendada foi utilizada (Hindler & Swenson, 2003). Provavelmente devido a essa raridade de casos com falência de tratamento, testes de suscetibilidade aos fármacos utilizados não eram recomendados até bem recentemente.

Alguns autores chegaram a sugerir a utilização do método de disco-difusão para penicilina, porém posteriormente foi comprovada sua ineficácia em diferenciarem isolados suscetíveis de isolados moderadamente resistentes (Pérez-Trallero *et al.*, 1994). A partir de 2005, o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI/NCCLS) começou a recomendar a utilização dos métodos de microdiluição em caldo ou do E-test® que têm demonstrado resultados promissores na caracterização de isolados de meningococo.

Sabendo-se da incidência dessa bactéria na população gaúcha e da recomendação mundial do uso da penicilina como um dos fármacos de escolha no tratamento da DM, foi desenvolvido o presente estudo que será detalhado a seguir.

II.1. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1.1. Local do Estudo

O primeiro isolamento de *N. meningitidis* de pacientes com suspeita da doença é realizado nos hospitais da rede de saúde pública. Posteriormente, as culturas são encaminhadas ao laboratório de referência do estado para a confirmação dos casos de doença meningocócica (Setor de Bacteriologia – IPB-LACEN/RS).

Ao chegarem àquele laboratório os isolados são repicados em novo meio, é confirmada sua identificação através de testes bioquímicos que serão descritos a seguir, e finalmente são estocados a -70°C para posteriores estudos de resistência e genotipagem que são realizados no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT/FEPPS).

II.1.2. Amostragem e tipo de estudo

Foram analisados neste estudo os isolados de *N. meningitidis* obtidos a partir da cultura do líquido ou hemocultura dos casos de meningite e/ou septicemia notificados no ano epidemiológico de 2000 que foram caracterizados genotipicamente por MLST, conforme descrito no capítulo anterior, caracterizando um estudo retrospectivo. Para a detecção cromogênica da atividade da β -lactamase foram utilizados dois isolados bacterianos como controle positivo (*Escherichia coli* ATCC 35218) e negativo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) das reações enzimáticas.

II.1.3. Suscetibilidade à penicilina

Para a análise da suscetibilidade à penicilina dos isolados de meningococo foi utilizado o método E-test® (AB Biodisk, Suécia) que determina a concentração inibitória mínima (CIM) a este fármaco. As condições do teste e as normas interpretativas foram

realizadas conforme determinado pelo CLSI/NCCLS (2005). A padronização do método E-test® (AB Biodisk, Suécia) é parte do projeto intitulado “Delineamento do perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos e caracterização Molecular de Isolados de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*” submetido e aprovado pelo comitê de ética do Hospital Nossa Senhora Conceição em setembro de 2004. Número de isolados analisados pelo estudo e critérios adotados para a análise

Foram analisados 56 isolados, referentes ao ano de 2000, ano este caracterizado como epidemiologicamente endêmico para a doença meningocócica. Os critérios estabelecidos pelo CLSI/NCCLS (2005) determinam que: serão considerados sensíveis os isolados com concentração inibitória mínima (CIM) igual ou inferior a 0,06 µg/mL; isolados com resistência intermediária devem apresentar valores de CIM entre 0,12 e 0,25 µg/mL e os isolados serão considerados resistentes quando apresentarem valores de CIM maiores ou iguais a 0,5 µg/mL. A Figura II.1 apresenta um exemplo de teste de suscetibilidade à penicilina (E-test®, AB Biodisk, Suécia), realizado neste estudo.

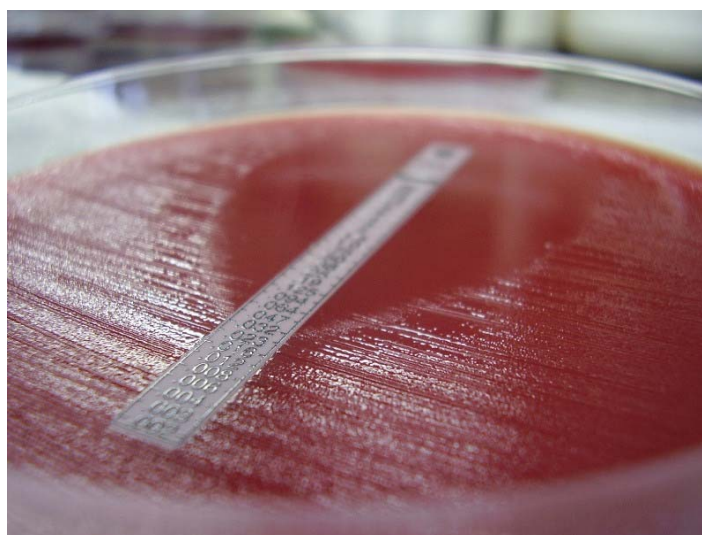


Figura II.1: Fotografia de um teste de suscetibilidade à penicilina, de um isolado de meningococo considerado sensível, utilizando fita E-test® (AB Biodisk, Suécia) conforme regras estabelecidas pelo CLSI/NCCLS (2005).

II.1.4. Detecção cromogênica da atividade da β -lactamase

A Nitrocefina (Glaxo Research 87/312, Oxoid) é uma cefalosporina cromogênica que exibe uma alteração de cor rápida e distinta, do amarelo para vermelho, conforme a ligação amida no anel beta-lactâmico é hidrolisada por uma beta-lactamase. Foi utilizado o método da semeadura direta (O'Calhaghan *et al.*, 1972 *apud* Franco *et al.*, 2000) conforme as especificações do fabricante: uma gota da Nitrocefina (500 μ g/mL) foi adicionada à uma lâmina de vidro limpa. Com o uso de uma alça estéril, foi selecionada uma colônia e a mesma foi dissolvida na gota de Nitrocefina. É considerada uma reação positiva quando a cor do reagente muda de amarelo para vermelho durante o período de 30 minutos.

II.1.5. Análise estatística

Dados clínicos e demográficos dos pacientes foram coletados nos prontuários dos hospitais e reportados ao software SINANW do Sistema Nacional de Agravos de Notificação que são revisados e analisados pelo Setor de Epidemiologia da Secretaria Estadual de Saúde do RS através do programa TabWin (versão 3.4 – Tab for Windows, DATA SUS: <http://www.datasus.gov.br/tabwin/tabwin.htm/>).

Os dados epidemiológicos e laboratoriais foram processados através do programa EpiInfo (versão 6.04d, Centers for Disease Control and Prevention, USA). Para a comparação de variáveis categóricas foram utilizados o teste do χ^2 com correção de Yates e teste exato de Fisher. Foram considerados significantes valores de *P* menores que 0,05.

II.2. RESULTADOS

II.2.1. Isolados com suscetibilidade diminuída ou resistentes à penicilina e associação com fenótipos e STs e atividade da β -lactamase

Do total de 56 isolados analisados, 7 (12,5%) apresentaram resistência intermediária ou plena à penicilina. Os fenótipos e STs envolvidos com a diminuição da suscetibilidade foram: 1 isolado B:4,7:P1.19,15 (ST-32), 1 isolado B:15:P1.7,16 (ST-32), 1 isolado B: 4,7:P1.19,15 (ST-33), todos pertencentes ao complexo clonal ST-32/ET-5 e 3 isolados B:19,1:nt (ST-461, ccST-461). Apenas um isolado, com fenótipo B:19,1:nt (ST-461) apresentou resistência plena à este fármaco. A presença de suscetibilidade reduzida ou resistência plena à penicilina associada ao clone ST-461 demonstrou ser estatisticamente significativa ($P=0,017$) quando comparada à presença da resistência nos demais clones.

A fita de E-test® (AB Biodisk, Suécia) apresenta a concentração de 0,94 $\mu\text{g/mL}$, um valor intermediário entre o que é considerado sensível e o que é considerado moderadamente resistente pelo CLSI/NCCLS (2005). Três isolados, caracterizados fenotipicamente como B:4,7:P1.19,15 (ST-33) apresentaram este valor de CIM. Se considerarmos estes isolados como resistentes intermediários, a porcentagem total de isolados com suscetibilidade diminuída à penicilina é de 17,8% (10/56). Os demais 46 isolados (82,1%) demonstraram serem suscetíveis à penicilina com CIM inferior a 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Em nenhum isolado foi detectada cromogenicamente a atividade de β -lactamase. A Tabela II.1 descreve detalhadamente os resultados encontrados.

TABELA II.1: RESULTADOS DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE À PENICILINA EM ISOLADOS DE *N. MENINGITIDIS* E ASSOCIAÇÃO COM SEUS FENÓTIPOS E CARACTERIZAÇÃO PELO MLST.

CC	MLST	Suscetível ($\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$)	Intermediário entre susceptível e com susceptibilidade reduzida ($=0.094 \mu\text{g/mL}$)	Suscetibilidade reduzida ($0.12-0.25 \mu\text{g/mL}$)	Resistente ($=1,00 \mu\text{g/mL}$)	TOTAL
ST-32/ET-5	33	11 (19,6%)	3 (5,4%)	1 (1,8%)	0	15 (26,8%)
	259	10 (17,9%)	0	0	0	10 (17,9%)
	463	3 (5,4%)	0	0	0	3 (5,4%)
	32	1 (1,8%)	0	2 (3,6%)	0	3 (5,4%)
	639	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	5728	2 (3,6%)	0	0	0	2 (3,6%)
	5723	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	2400	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	5724	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	1880	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
ST-103	103	7 (12,5%)	0	0	0	7 (12,5%)
	5338	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	5727	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
ST-461	461	0	0	3 (5,4%)	1 (1,8%)	4 (7,1%)
ST-23	23	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	5725	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	5729	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	5726	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
	5734	1 (1,8%)	0	0	0	1 (1,8%)
TOTAL		46 (82,1%)	3 (5,4)	6 (10,7%)	1 (1,8%)	56 (100%)

CC: complexo clonal.

**CAPÍTULO III: Padronização de Método de Tipagem para a
Caracterização de Surto da Doença Meningocócica**

Estudos epidemiológicos têm permitido um melhor entendimento da natureza de disseminação do meningococo, assim como nas relações entre doença endêmica e epidêmica (Yazdankhah *et al.*, 2005).

O MLEE e o MLST têm sido considerados o *padrão ouro* nos estudos epidemiológicos deste microrganismo. O primeiro tem demonstrado uma relação de desequilíbrio significativa entre alelos nas populações de *N. meningitidis* e também a presença de clusters de isolados que compartilham perfis de alelos multilocus muito semelhantes (Caugant *et al.*, 1987). O maior problema é que os resultados obtidos pelo uso do MLEE em diferentes laboratórios são muito difíceis de serem comparados. Já o MLST, uma adaptação do MLEE, apresenta as vantagens de rapidez e simplicidade atribuídas ao seqüenciamento automatizado de DNA. O acúmulo de mudanças nos nucleotídeos dos genes constitutivos do meningococo é um processo relativamente lento e o perfil de alelos de uma cepa é bastante estável ao longo do tempo. Entretanto, apesar das inúmeras vantagens, o MLST ainda é considerado uma ferramenta cara para a pesquisa em países em desenvolvimento. Além disso, a metodologia exige vários dias de trabalho para a caracterização completa das amostras.

Dentre as metodologias mais utilizadas para o estudo de surtos da doença meningocócica, o PFGE é a mais utilizada, porém, os equipamentos necessários também são caros e o tempo total de execução e análise dos resultados também é demorado.

Tendo em vista o exposto, e considerando a importância da proteína Opa como descrito anteriormente (página 18), desenvolvemos um novo método de tipagem para o estudo de surtos da doença meningocócica. Escolhemos como estratégia metodológica uma PCR multiplex, com *primers* especialmente desenhados com base nas regiões conservadas e hiper-variáveis do gene *opa* de *N. meningitidis* que denominamos VSS-PCR (*Variable Site Specific - PCR*) como detalhado a seguir. A padronização do método VSS-PCR faz

parte do projeto intitulado “Aplicação de Métodos de Tipagem Molecular para Caracterização de Isolados de *Neisseria meningitidis* do Rio Grande do Sul” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS/RS (seguindo as regras do Ministério da Saúde) em junho de 2004. Este estudo foi realizado em colaboração com o Dr. Lee W. Riley e Binh Diep, School of Public Health - UC Berkeley e do Dr. Albert Ko, FIOCRUZ/BA.

III.1. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1.1. Amostragem

Cinquenta e sete isolados de *N. meningitidis* foram incluídos neste estudo. Eles compreendem 56 isolados, obtidos a partir da cultura do líquido ou hemocultura dos casos de meningite e/ou septicemia, notificados no ano epidemiológico de 2000, previamente analisados por Baethgen *et al.* (2007, no prelo), e um isolado de referência, M5741, utilizado como controle das reações de PCR. Além disso, foram incluídos os mesmos 19 controles geográficos do estudo de caracterização genotípica através do MLST (Capítulo I - pág. 38).

III.1.2. Caracterização fenotípica

Os sorogrupos foram determinados pela utilização de kit de aglutinação de látex com soros monoclonais para os sorogrupos A, B, C, W135 e Y (Pastorex® Meningitis - Bio-Rad, França) ou por PCR, como previamente descrito por Taha (2000) e Baethgen *et al.* (2003). Os isolados foram sorotipados e soro-subtipados por dot-blotting de suspensões

celulares com painel estendido de anticorpos monoclonais (MAbs) realizado pelo Instituto Adolfo Lutz como anteriormente descrito (Wedeg *et al.*, 1990; Lemos *et al.*, 2006).

III.1.3. MLST

A caracterização por MLST foi realizada nos isolados de *N. meningitidis* do primeiro ano não-epidêmico da doença meningocócica no RS (ano de 2000) da coleção do IPB-LACEN/RS conforme anteriormente descrito por Baethgen *et al.* (2007, no prelo). Estes isolados representam quase 75% dos casos de cultura positiva daquele ano. Das culturas incubadas por 15-17 horas em meio ágar-chocolate em estufa a 37°C com 5% CO₂, foi realizada uma suspensão de colônias, de onde o DNA cromossômico foi extraído através do método de fervura.

III.1.4. Análise de seqüências do gene *opa* e desenho dos *primers*

Foram selecionadas aleatoriamente 27 seqüências de genes *opa* depositadas no GenBank⁸. As mesmas foram alinhadas e nelas identificadas as regiões conservadas e hiper-variáveis do gene que codifica a proteína (Ver alinhamento de seqüências em Apêndice III). A partir dessa análise foram projetados 7 oligonucleotídeos com auxílio do programa Primers! (version 1.0; não mais disponível online: <http://www.williamstone.com/primers>). A Tabela III.1 apresenta as seqüências dos *primers* que foram utilizados na PCR para a caracterização de *N. meningitidis*.

⁸ Número de acesso no GenBank das 27 seqüências utilizadas para o desenho dos *primers* do VSS-PCR: AF001201 (NmA/opaB94); AF001202 (NmA/opaB90); AF001203 (NmA/opaB5202); AF001204 (NmA/opaB102); AF016285 (NmB/opaJ129); AF016286 (NmB/opaA127); AF016287 (NmB/opaJ125); AF016289 (NmB/opaB128); AF016290 (NmB/opaA123); AF016291 (NmB/opaD130); AF016292 (NmB/opaD126); AF031334 (NmA/opaD109); U03404 (NmA/opaD); U03405 (NmA/opaA); U03406 (NmA/opaB); U03408 (NmA/opaD); U03409 (NmA/opaB); U03410 (NmA/opaD); U03411 (NmA/opaB); U03412 (NmA/opaB); U37255 (NmC/opa RHV); U37257 (NmC/opa RHV); U77881 (Nm ET-37); X63108 (Nm ET-37/opaD1700); X63109 (Nm ET-37/opaA1800); X63110 (Nm ET-37/opaJ540); X63111 (Nm ET-37/opaB900).

TABELA III.1: PRIMERS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DE ISOLADOS DE *N. MENINGITIDIS* ATRAVÉS DE VSS-PCR.

NOME DO PRIMER	SEQÜÊNCIA (5'→3')
LB01	GTGCGCATTCCATCCAC
LB02	GTTACAGAAAATGGAAAGAAAG
LB03	ATGGGCGTGGAAGCTG
LB04	CAAACCTCAACGATAAATTCGA
LB05	TCTTTGACAGGGCCTCC
LB06	TGATAGGCGTTTTCGG
LB07	GCTTCAGAGTAACCCGT

III.1.5. VSS-PCR e análise dos resultados

A amplificação foi realizada em volume de 25µL contendo: 10mM Tris/HCl (pH 8,3), 1,5mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,3µM de cada um dos 7 primers, 5U Taq DNA polimerase (Cenbiot; UFRGS). Após um passo inicial de desnaturação a 94°C por 1 min, foram realizados 35 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de um ciclo adicional de extensão de 72°C por 1 min em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.).

Vinte µL dos fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 80 volts, por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, em gel de poliacrilamida a 8%, não desnaturante (29:1, Acrilamida: Bis-acrilamida), em cuba de eletroforese vertical (Mini-protean II, Bio-Rad), utilizando tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e os fragmentos de DNA visualizadas sobre luz UV e fotodocumentadas. As imagens foram analisadas visualmente e pelo software GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Similaridades nos padrões de eletroforese foram calculadas pelo coeficiente Dice.

III.1.6. Interpretação dos padrões do VSS-PCR

Para testar a reprodutibilidade do VSS-PCR, o DNA de cada isolado foi amplificado em 2 a 3 reações independentes. Juntamente com a amplificação do DNA dos isolados de pacientes foi utilizado um controle, representado pela cepa padrão M5741, e os padrões dos testes das amostras só foram incluídos para análise quando o padrão de bandas do controle era o esperado.

Dois ou mais isolados foram definidos como pertencentes a um mesmo *cluster* quando seus padrões de bandas pelo VSS-PCR eram indistinguíveis. Isolados com padrões muito semelhantes, com até três ou mais bandas de diferença, foram considerados como pertencentes à mesma *família*. Foram considerados *padrões únicos*, ou isolados *não-cluster* aqueles isolados com padrões totalmente distintos.

III.1.7. Origem dos dados e análise estatística

Dados clínicos e demográficos dos pacientes foram coletados nos prontuários dos hospitais e reportados ao software SINANW do Sistema Nacional de Agravos de Notificação que são revisados e analisados pelo Setor de Epidemiologia da Secretaria Estadual de Saúde do RS através do programa TabWin (versão 3.4 – Tab for Windows, DATA SUS: <http://www.datasus.gov.br/tabwin/tabwin.htm/>). Os dados epidemiológicos e laboratoriais foram processados através do programa EpiInfo (versão 6.04d, Centers for Disease Control and Prevention, USA). Para a comparação de variáveis categóricas foram utilizados o teste do χ^2 com correção de Yates e teste exato de Fisher. Diferenças entre grupos foram testadas por análise univariada e expressas como Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95%. O teste t-student foi utilizado para comparar variáveis contínuas. Foram considerados significantes valores de *P* menores que 0,05. O índice

discriminatório (ID), ou poder discriminatório, foi calculado com base no Índice de Diversidade de Simpson conforme descrito por Hunter & Gaston (1988). Conforme mencionado anteriormente, as similaridades nos padrões de eletroforese foram calculadas pelo coeficiente Dice através do software GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

III.2. RESULTADOS

III.2.1. Padronização das condições da PCR

Após testes de amplificação com diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* e diferentes concentrações de MgCl₂ adicionadas à mistura da reação de PCR, foram estabelecidas as condições já descritas na Seção Materiais e Métodos deste capítulo, exceto pelo fato de que excluímos o *primer 7* da PCR, pois sua utilização não implicava em nenhuma diferença dos padrões visualizados em gel. Para fins de análise foram considerados somente os fragmentos de 50 a 800 pb quando comparados com o marcador de peso molecular de 50pb (Invitrogen). A Figura III.1 mostra alguns dos padrões gerados pelo VSS-PCR.

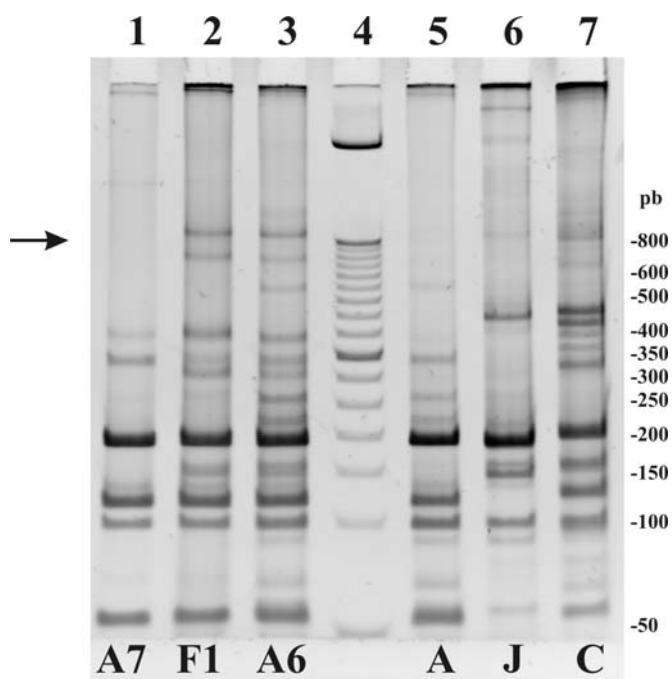


Figura III.1: Análise de isolados de *N. meningitidis* por VSS-PCR. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (não-desnaturante) corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de UV. canaletas 1-3: isolados de meningococo de diferentes pacientes; canaleta 4: marcador de tamanho de fragmentos de DNA 50 pb (Invitrogen); canaletas 5-7: isolados de meningococo de diferentes pacientes. As letras abaixo indicam os nomes atribuídos aos diferentes padrões eletroforéticos. A seta à esquerda indica o limite considerado para todos os géis analisados.

III.2.2. Reprodutibilidade e tempo de execução

O VSS-PCR demonstrou ser bastante reprodutível, pois durante o período de padronização, as amplificações de diversos isolados foram realizadas pelo menos duas vezes e os padrões de bandas se repetem apesar do uso de diferentes misturas da PCR em diferentes períodos, o que pode ser observado na figura III.2.

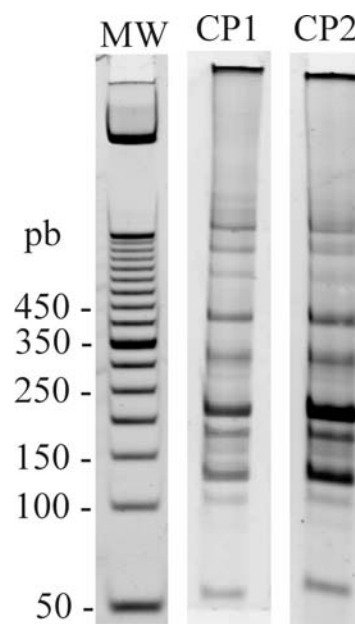


Figura III.2: Reprodutibilidade do VSS-PCR. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (não-desnaturante) corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de UV. MW: marcador de tamanho de fragmentos de DNA 50 pb (Invitrogen); CP1: controle da reação de PCR realizada em 13.07.2006, cepa de referência M5741 (B:P1.4,7:19,15); CP2: controle da reação de PCR realizada em 11.01.2007, cepa de referência M5741 (B:P1.4,7:19,15).

O tempo de execução do método a partir da cultura bacteriana é de aproximadamente 6 horas, considerando-se o tempo de preparo da reação, amplificação em termociclador, preparo do gel de poliacrilamida, eletroforese e visualização dos fragmentos.

III.2.3. Análise dos isolados e comparação com os resultados do MLST

Foram analisados por VSS-PCR 55 isolados de *N. meningitidis* de pacientes com doença meningocócica no ano de 2000. A partir dessa análise foram identificados 35 padrões de bandas distintos, dos quais 9 formaram clusters distintos com pelo menos 2 isolados cada. O número de bandas variou de 5 a 12 fragmentos por isolado. Os padrões atribuídos à família A foram os mais comuns, agrupando 16 isolados de diferentes pacientes com aproximadamente 80% de similaridade. Apenas 4 isolados apresentaram padrões únicos de diferentes pacientes que não foram agrupados em nenhum cluster ou família.

Os agrupamentos gerados pelo VSS-PCR foram comparados com aqueles gerados pelo MLST. Como esperado, o VSS-PCR tem um poder discriminatório maior do que o MLST, pois, enquanto o VSS-PCR originou 35 padrões distintos o MLST gerou 19 tipos distintos. Entretanto, um resultado bastante interessante, foi que o dendograma gerado pelo VSS-PCR distingue bem o grupo dos isolados pertencentes ao complexo clonal ST-32/ET-5, dos demais complexos, exceto pelos isolados RS154/00 (ST-5726) e RS145/00 (ST-5734). Dentre os dois principais tipos deste complexo, o ST-33 foi dividido em 7 tipos distintos pelo VSS-PCR (família A) enquanto que o ST-259 foi dividido em 5 tipos distintos pelo novo método (todos restritos à família B).

Todos os isolados do ST-103 foram agrupados no cluster C, divididos nos tipos C, C1, C2 e C3, assim como o ST-461, cluster E (E, E1 e E2). Os dois isolados do mesmo paciente, um isolado da hemocultura (RS278/00) e outro da cultura do líquido (RS282/00), não apresentaram nenhuma diferença nos padrões entre si, que chamamos de tipo D1, assim como no MLST (ST-5728) (Figura III.3).

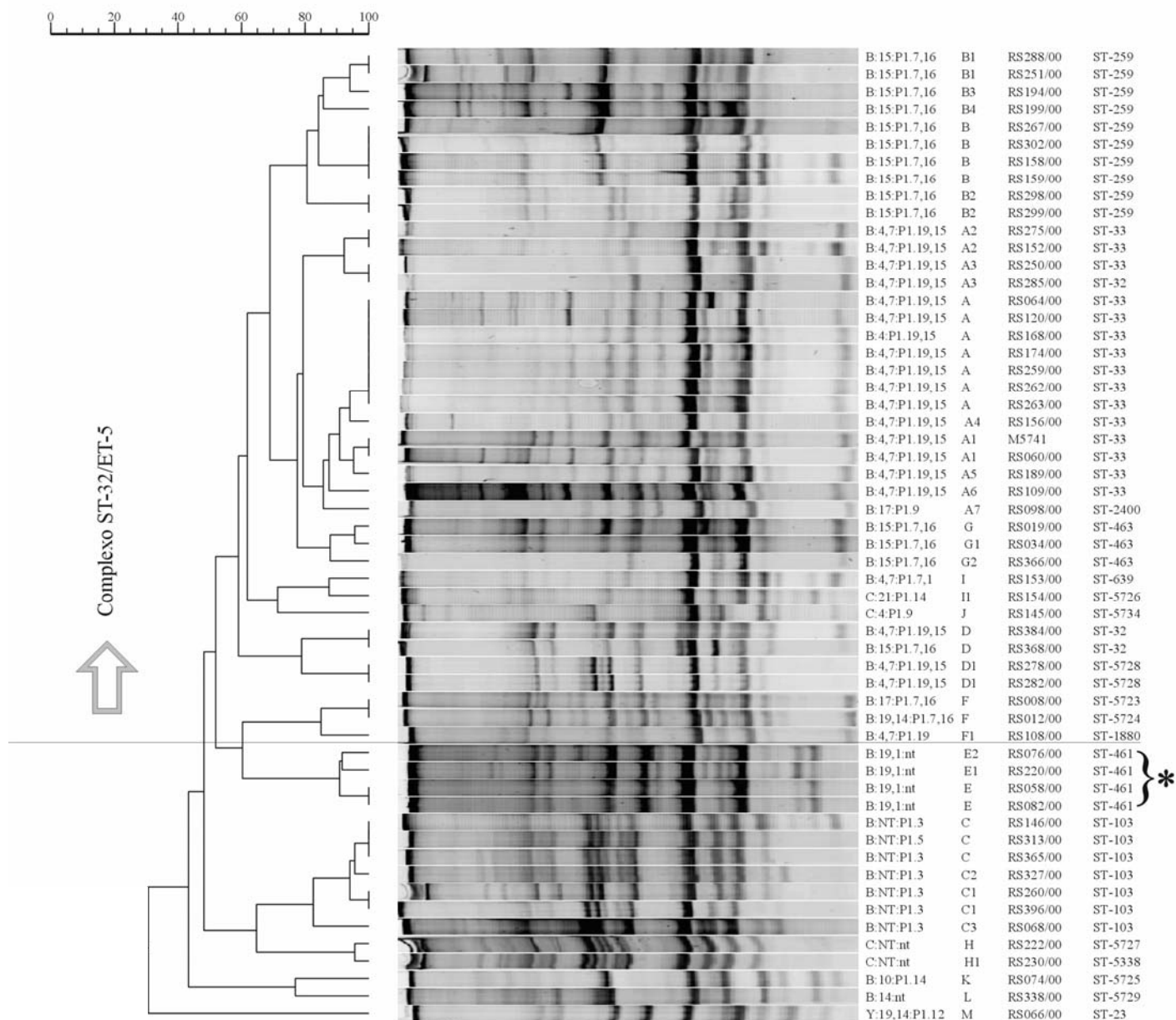


Figura III.3: Dendrograma originado através do software GelCompar das 56 amostras do RS, referentes ao ano de 2000, analisadas pelo VSS-PCR. Foram determinados 35 tipos eletroforéticos distintos nomeados de A a M. A linha divisória delimita os clones associados ao complexo clonal ET-5/ST-32 e a chave à direita com asterisco demonstra os padrões associados com a resistência moderada à penicilina.

III.2.4. Análise dos controles geográficos e comparação com os resultados do MLST

Foram analisados por VSS-PCR 20 isolados de *N. meningitidis* de diferentes locais do Brasil (Santa Catarina e Paraná) e do mundo (França e Dinamarca). A partir dessa análise foram identificados 16 padrões de bandas distintos, dos quais 3 formaram clusters distintos com pelo menos 2 isolados cada. O número de bandas variou de 4 a 15 fragmentos por isolado. Os padrões atribuídos à família A' foram os mais comuns, agrupando 3 isolados. Apenas 4 isolados apresentaram padrões únicos que não foram agrupados em nenhum cluster ou família. Os agrupamentos gerados pelo VSS-PCR foram comparados com aqueles gerados pelo MLST (Figura III.4).

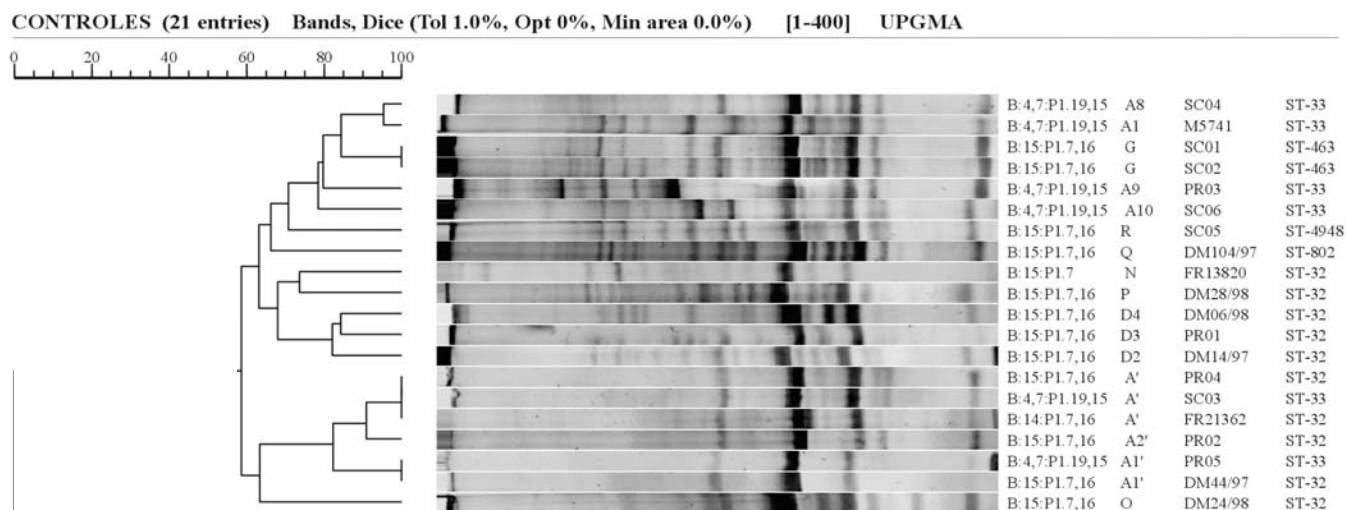


Figura III.4: Dendrograma originado através do software GelCompar dos controles geográficos analisados pelo VSS-PCR. Foram determinados 16 tipos eletroforéticos distintos nomeados de A a R (conforme comparação com árvore das amostras). Todos os controles analisados estão associados ao complexo clonal ET-5/ST-32.

O poder discriminatório, baseado no Índice de Diversidade de Simpson, analisa estatisticamente a capacidade de distinção entre isolados não relacionados. Isto pode ser determinado através do número de tipos definidos pelo método proposto e em sua frequência na população (Hunter & Gaston, 1988). Utilizando os controles geográficos e, sabendo que o VSS-PCR originou 16 padrões distintos e que o MLST gerou 5 tipos distintos e, que o tipo mais freqüente através do VSS-PCR agrupou 3 isolados do tipo A' (15%) e que o MLST agrupou 10 isolados do ST-32 (50%) foi possível determinar o poder discriminatório de ambos os métodos na população de isolados do RS. O VSS apresentou um ID de 0,973 enquanto que o MLST apresentou um ID de 0,678, conforme descrito na tabela abaixo.

TABELA III.2: ÍNDICES DISCRIMINATÓRIOS DOS MÉTODOS DE TIPAGEM MOLECULAR UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE *N. MENINGITIDIS* DO RS.

Método	Nº tipos	Nº de isolados do tipo mais freqüente (%)	Índice Discriminatório
MLST	5	10 (50)	0,678
VSS-PCR	16	3 (15)	0,973

PARTE III

1. DISCUSSÃO

Apesar de todos os avanços científicos, a doença meningocócica prevalece como um sério problema de saúde pública, estando relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade, somada à capacidade do patógeno, *N. meningitidis*, em provocar hiperendemias, epidemias e até pandemias. A ocorrência ou não dessas epidemias depende de fatores relacionados ao agente infeccioso, às condições ambientais e a uma população suscetível.

Trabalhos que visam o estudo epidemiológico da doença meningocócica, bem como a caracterização dos isolados bacterianos da população atingida podem auxiliar na tomada de decisões para o seu controle. Por isso, os três capítulos aqui apresentados tentam traçar um perfil da DM no Rio Grande do Sul através da epidemiologia, caracterização molecular, bem como a caracterização da resistência à penicilina, o principal fármaco utilizado para o tratamento de pacientes infectados por *N. meningitidis*.

O estudo epidemiológico da doença meningocócica, através da observação da série histórica de 1995 a 2003, demonstrou uma redução de 47% em sua incidência na população gaúcha, o que em parte pode ser atribuído ao sucesso das medidas de controle adotadas pela Secretaria da Saúde em 1995 e 1997, com as campanhas de vacinação. Esta redução no número de casos modificou o padrão de incidência de epidêmico para endêmico, com uma incidência média de 1,8 casos/100.000 habitantes, sendo comparável a de outros países como Estados Unidos, Austrália, Escócia e Croácia (Rosenstein *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000; Kyaw *et al.*, 2002; Boras *et al.*, 2004).

A taxa de letalidade no período estudado, no RS, foi de 22%, sendo superior àquelas encontradas em outras partes do Brasil (Noronha *et al.*, 1997; Donalisio *et al.*, 2000; Escosteguy *et al.*, 2004). No mesmo período a taxa de letalidade brasileira foi de

19.5%±0.7 (comunicação pessoal: Moraes, C. - Ministério da Saúde). Em outros países essa taxa varia de 4 a 13% (Campagne *et al.*, 1999; Rosenstein *et al.*, 1999; Paret *et al.*, 1999, Ward *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2003; Tsolia *et al.*, 2003, Boras *et al.*, 2004). Os casos com manifestação clínica de bacteremia (46,8%), e/ou bacteremia com meningite (15,1%) apresentaram valores de letalidade superiores às taxas médias de casos somente de meningite (10,4%). Além disso, esse valor também é superior àquele apresentado em outros estudos (Schuchat *et al.*, 1997; Paret *et al.*, 1999; Rosenstein *et al.*, 1999).

Consistente com outros estudos, crianças menores de 4 anos e pacientes do sexo masculino (tendência para todo o período analisado, exceto para o ano de 2003) continuam apresentando as maiores taxas de incidência para a DM (Rosenstein *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2001; Mantese *et al.*, 2002). Apesar disso, foi observada uma redução da incidência de casos ao longo do período analisado para quase todas as faixas etárias e para os pacientes de ambos os sexos. Dados do Ministério da Saúde confirmam os mesmos achados para a população brasileira do sexo masculino e crianças menores de quatro anos (comunicação pessoal: Moraes, C. - Ministério da Saúde).

Como observado em todo o país, a proporção de casos do sorogrupo B permanece maior quando comparada aos outros sorogrupos, durante todo o período, aumentando de 50,8% em 1995 para 81,3% em 2003. Casos atribuídos ao sorogrupo C, o segundo em frequência, iniciam com um pico de 47% em 1995, caindo nos quatro anos seguintes, e começando a aumentar novamente em 2000, alcançando 12,5% dos casos em 2003. Chamamos a atenção para este aumento de casos por este sorogrupo, pois, Lemos (2005) realizou um estudo na Região da Grande São Paulo, onde se percebeu que a partir de 2001 o sorogrupo C era o mais prevalente, já representando em 2003, 62,7% de todos os casos de DM sorogrupados. Foi também determinado que quase 90% destas cepas eram do

fenótipo C: NT:NST. Os autores então realizaram um estudo de caracterização destes isolados onde foi determinado que o novo clone C:23:P1.14-6 é o fenótipo responsável pelo aumento de casos por este sorogrupo.

A maior limitação encontrada pelo estudo de vigilância, baseado na análise dos dados de notificação da Secretaria da Saúde do Estado, provavelmente foram os vieses amostrais atribuídos a não-notificação de casos de doença meningocócica. Entretanto, devido à severidade da doença e a necessidade de tratamento por antibióticos de administração intravenosa, a maioria dos pacientes é hospitalizada, e o departamento de saúde local é obrigatoriamente notificado para que sejam contidos os casos secundários, relacionados ao caso índice, garantindo que recebam quimioprofilaxia. Práticas hospitalares, como a administração de antibióticos anterior à coleta do líquido, podem gerar resultados de culturas falso-positivas. Entretanto, isso pode ser reduzido pela inclusão dos casos prováveis baseados no critério clínico. Outra limitação do estudo foi a grande proporção de casos sem desfecho (23%), o que pode ter subestimado a taxa de casos fatais. Apesar destas limitações, as tendências observadas são consistentes com àquelas de outros estudos da epidemiologia da doença meningocócica em outros locais do Brasil e do mundo (Rosenstein *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2001; Mantese *et al.*, 2002).

Através da análise dos resultados gerados pela tipagem sorológica de 290 isolados de meningococo no período de 1995 a 2003, observou-se uma grande diversidade de sorotipos e sorosubtipos nas populações de sorogrupo B e C, embora somente alguns deles sejam predominantes. O fenótipo epidêmico norueguês B:15:P1.7,16 e isolados B:4,7:P1.19,15 e B:NT:P1.3 representam mais de 50% dos casos do sorogrupo B, enquanto que os fenótipos C:2b:P1.3 e C:NT:NST representam quase 54% dos casos pelo sorogrupo C. Lemos *et al.* (2006) também observaram esta tendência no Brasil entre isolados

B:4,7:P1.19,15, C:2b:P1.3 e C:NT:NST, mas mencionam a presença do fenótipo norueguês confinado somente à região sul do Brasil.

Também foi observado um aumento no número de casos atribuídos ao fenótipo B:15:P1.7,16 durante o período de 1998 a 2003 no RS. Este aumento poderia ser explicado pela infecção por isolados mais virulentos ou pela perda de imunidade da população como já descrito por outros autores (Caugant, 1998; Jensen *et al.*, 2003). Diversos estudos têm demonstrado que mutações na região gênica codificante para epitopos de PorA de meningococos B:15:P1.7,16 pode resultar no não reconhecimento pelos anticorpos bactericidas prevalentes na população, mesmo em indivíduos imunizados com a vacina baseada na membrana externa de isolados desse tipo (Rosenqvist *et al.*, 1993; Brooks *et al.*, 1994; Caugant, 1998; Taha *et al.*, 2001). É possível que no RS nós tenhamos uma situação semelhante a aquela descrita por Caugant *et al.* (1988) na Noruega, onde o complexo ET-5 foi responsável por aproximadamente 80% dos casos durante a década de 80. Entretanto, o estudo na população carreadora das linhagens hipervirulentas/hiperinvasivas demonstrou que somente 0,7% da população era portadora desta cepa, explicando o porquê de não haver uma boa proteção contra este complexo clonal na população como um todo.

Existe uma preocupação mundial em torno da disseminação de isolados com estas características fenotípicas. No estado de Oregon, EUA, no período de 1992 a 1998 houve uma epidemia causada por meningococos B:15:P1.7,16, somando quase 70% do número total de casos de doença invasiva daquele estado. Além disso, foi caracterizado como o sorosubtipo mais comum em todo o território americano no mesmo período (Tondella *et al.*, 2000). Isolados deste fenótipo também foram responsáveis por um surto de doença meningocócica na Noruega, na metade da década de 70, que anos mais tarde se disseminou por vários países da Europa, culminando com 61% de casos de DM do sorogrupo B, onde

predominavam os sorotipos P1.4 e P1.7,16. Portanto, é essencial a vigilância dos casos ocorridos no RS por cepas deste fenótipo sabendo-se de seu potencial epidêmico.

O monitoramento de casos associados ao sorogrupo W135 também é importante uma vez que foi descrita uma epidemia por estes isolados em peregrinos que retornaram da Arábia Saudita (Lingappa *et al.*, 2003). De todos os casos ocorridos no período de 1995 a 2003, somente 3,5% dos mesmos foram atribuídos a este sorogrupo. Dentre os 18 isolados que foram sorotipados, somente 3 (16,7%) eram do fenótipo W135:P1.5,2, porém todos os casos ocorreram antes de 2000, ano em que foi descrita a epidemia do Hajj.

Nossos resultados indicam que *N. meningitidis* do sorogrupo B é responsável por causar doença endêmica no RS. Uma situação similar foi observada no Canadá, onde isolados deste sorogrupo têm sido descritos como geneticamente heterogêneos (Ashton & Caugant, 2001), com nenhum clone predominante ou tipo antigênico sendo predominante dentre todos os isolados de doença invasiva (Law *et al.*, 2006). Apesar disso, é sabido que surtos causados por clones únicos, quando não controlados a tempo, podem se tornar epidêmicos.

A limitação encontrada na análise destes resultados pode ser devido ao viés amostral ocorrido pela não tipagem sorológica de todos os casos de cultura positiva do estado daquele período. Existe uma grande perda de isolados que chegam inviáveis dos hospitais e/ou perda de isolados que se tornam inviáveis após o seu armazenamento até que sejam enviados para o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

O estudo de genotipagem através do MLST demonstrou que os 56 isolados apresentaram 20 STs distintos, dos quais oito foram caracterizados como tipos novos encontrados no RS. Esses tipos únicos somam 14,3% de todas as infecções caracterizadas no ano de 2000. Gottfredsson *et al.* (2006) encontraram quase a mesma proporção de

novos STs (14.4%), porém sua coleção era de 362 isolados de um período de estudo de 28 anos.

Isolados pertencentes aos complexos ST-32/ET-5 e ST-23/Cluster A3, os quais são denominados como *linhagens hipervirulentas* (Maiden *et al.*, 1998) representam 70% do total de isolados tipados no ano de 2000. Dentre os isolados do complexo ST-32/ET-5, o ST-33 foi o tipo mais comum encontrado no RS, seguido pelo ST-259, causando 26,8% e 17,9% dos casos, respectivamente. O complexo ST-23/Cluster A3 foi representado por apenas um isolado. Para os isolados do sorogrupo C foram determinados três novos STs entre quatro isolados deste sorogrupo. Não foi encontrado nenhum tipo idêntico àqueles relacionados à epidemia do Hajj, W135:2a:P1.5,2 (ET-37), que têm provocado surtos importantes em vários países do mundo (Popovic *et al.*, 2000, Aguilera *et al.*, 2002, Taha *et al.*, 2004).

Em outro estudo realizado no Brasil, a maioria dos isolados caracterizados (82%) pertence a 4 linhagens hipervirulentas, e 11 dos 20 tipos novos encontrados estão relacionados epidemiologicamente a estas linhagens (de Filippis & Vicente, 2005). Entretanto, o segundo tipo mais comum dentre os isolados do RS (ST-259) não foi encontrado por estes autores, mesmo entre os isolados de Santa Catarina, indicando uma alta diversidade de sorogrupo B em diferentes localidades geográficas. A caracterização dos controles geográficos, todos do complexo ST-32/ET-5, demonstrou uma situação similar, onde nenhum ST-259 foi encontrado. Este tipo pode ser encontrado no banco de dados do MLST para isolados do Reino Unido e em dois outros estudos realizados na Irlanda e na Holanda (Murphy *et al.*, 2003; Schouls *et al.*, 2006). Talvez, o freqüente deslocamento de pessoas entre o RS e os países vizinhos, Uruguai e Argentina, possa explicar esse resultado. A entrada desses isolados no continente americano poderia ter ocorrido a partir desses países, uma vez que os mesmos recebem muitos turistas de países

européus. Esta hipótese necessita ser investigada uma vez que não existem dados disponíveis a respeito de quais STs circulam naqueles países.

Os critérios observados para a escolha dos isolados que deveriam predizer os genótipos mais comuns circulantes em nossa população, foram isolados de um ano considerado endêmico para a DM e que representassem pelo menos 70% dos casos de cultura positiva daquele ano. Por isso foram selecionados os isolados do ano de 2000, onde a informação gerada pelo MLST desses isolados, adicionada à caracterização sorológica e à sua epidemiologia possibilitou o delineamento do panorama dessa doença no RS.

Já existe no Brasil uma vacina em desenvolvimento, baseada nos sorotipos P1.19,15 e P1.7,1 (Jessouroun *et al.*, 2004). Os resultados preliminares demonstraram a indução de altos títulos de anticorpo bactericida contra alvos homólogos e heterólogos quando comparada à vacina cubana (VA-MENCOC-BC[®], Cuba) e parece ser uma boa candidata após ser avaliada na fase clínica. De Fillippis & Vicente (2005) consideraram que 81% de seus isolados eram do sorogrupo B e pertencentes ao complexo ST-32/ET-5 que é geneticamente relacionado à cepa utilizada para o desenvolvimento da vacina cubana, que foi utilizada massivamente no Brasil durante os anos de 1997-1998. A alta diversidade encontrada entre PorA nestes isolados talvez possa explicar o porque desta vacina não ter conferido uma imunidade efetiva (de Filippis *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstram que esta vacina cobrirá menos de 30% dos casos de DM atribuídos ao sorogrupo B em nosso estado se o sorotipo P1.7,16 não for incluído. Nosso grupo está agora investigando as regiões de PorA de isolados do RS para que também possamos verificar sua variabilidade na nossa população (dados não publicados).

O estudo de caracterização de suscetibilidade à penicilina demonstrou uma taxa de 12,5% de isolados que apresentaram resistência intermediária ou plena a este fármaco e nenhum isolado da coleção testada apresentou associação com a produção de β -lactamase.

Entretanto, três isolados B:4,7:P1.19,15 (ST-33) apresentaram valor de CIM de 0,94 µg/mL. A fita de E-test® (AB Biodisk, Suécia) apresenta esta concentração do fármaco, um valor intermediário entre o que é considerado sensível e o que é considerado moderadamente resistente pelo CLSI/NCCLS (2005). Mastrantonio *et al.* (2003) utilizando este mesmo método consideram os valores de CIM >0.06–1 µg/mL como isolados moderadamente resistentes à penicilina. Portanto, se considerarmos este último critério, a taxa de isolados moderadamente resistentes à penicilina é de 17,8%. Em outros países as taxas de isolados com diminuição da suscetibilidade à penicilina variam de 0 a 24,6% (Gottfredsson *et al.*, 2006; Mastrantonio *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006).

Todos os clones caracterizados como ST-461 apresentaram valores de CIM compatíveis com suscetibilidade reduzida ou plena à penicilina. Esta associação demonstrou ser estatisticamente significativa ($P=0,017$) quando comparada à suscetibilidade reduzida nos demais clones. No site do MLST, além de um isolado deste estudo, existem 12 isolados caracterizados como ST-461, sendo que somente um, originário da Espanha, apresenta suscetibilidade reduzida à penicilina (http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=pub-nm_isolates.xml&page=query).

Alguns estudos também relatam a existência de clones moderadamente resistentes à penicilina. Em Cuba, no período de 1993-1999, 22,5% dos casos de DM pelo fenótipo B:4:P1.15 apresentaram suscetibilidade diminuída à penicilina (Sosa *et al.*, 2001). Em Portugal, nos anos de 2001 e 2002 foi demonstrada a emergência e disseminação de 27,5% de isolados moderadamente resistentes, com fenótipo C:2b:P1.2,5, relacionados ao complexo clonal ST-8/Cluster A4 hipervirulento (Caniça *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006). Na Itália, a partir de 2002, 78,4% dos isolados com fenótipo C:2b:P1.5, também pertencentes ao mesmo complexo clonal das cepas de Portugal, apresentavam suscetibilidade diminuída a este fármaco (Stefanelli *et al.*, 2004).

Sabendo da alta incidência de isolados do sorogrupo B na população gaúcha e, que todos os casos de suscetibilidade diminuída à penicilina foram a eles atribuídos sugerimos que deva ser contínuo o seu monitoramento tentando controlá-los ao máximo e que talvez uma caracterização molecular dos genes envolvidos com a resistência a este fármaco possa auxiliar na melhor interpretação dos resultados.

A tipagem de agentes infecciosos baseada em diferenças genéticas pode fornecer informações importantes relacionadas à transmissão da doença. A possibilidade de detectar um genótipo em particular em uma comunidade pode levar à identificação de fatores de risco associados com a transmissão de uma determinada cepa. A caracterização da distribuição geográfica de diferentes genótipos pode auxiliar no design de candidatos vacinais apropriados à população. Entretanto, os métodos de tipagem existentes para o meningococo são frequentemente bem utilizados após o período em que as epidemias de DM acabaram. Isso pode ser atribuído à demanda técnica necessária para a execução desses métodos, que na maioria das vezes só poderão ser aplicados em laboratórios de pesquisa altamente bem equipados. Portanto, informações epidemiológicas confiáveis de uma região geográfica específica normalmente não poderão ser acessadas durante o período do surto.

O VSS-PCR serve a esses propósitos, sabendo que foi desenvolvido para apresentar baixos custos, necessitando de poucos equipamentos de laboratório e de uma pequena quantidade do isolado em cultura. Nós utilizamos esse método para a tipagem de cepas circulantes no RS que, imediatamente foi capaz de discriminar adequadamente os isolados, inclusive distinguindo clones associados com resistência moderada à penicilina ou às linhagens hipervirulentas.

O cálculo do poder discriminatório para o VSS-PCR e para o MLST indicam que quando dois isolados forem escolhidos aleatoriamente na população, em 97,3% e em

67,8% das ocasiões os mesmos serão classificados em dois tipos distintos, respectivamente. Era esperado que o VSS-PCR apresentasse um maior poder discriminatório, uma vez que está associado ao gene *opa* (proteína de membrana), que apresenta regiões hipervariáveis, enquanto o MLST é baseado na análise de genes constitutivos da bactéria, estando menos sujeitos a variações, conforme descrito anteriormente.

A análise dos controles geográficos através do VSS-PCR demonstrou uma alta variabilidade de padrões, o que era esperado, uma vez que os mesmos eram de origens muito distintas e quando não, eram de períodos muito heterogêneos. Este resultado ressalta a característica de métodos baseados em regiões hiper-variáveis que não se prestam para estudos populacionais e sim para caracterização de surtos, ocorridos em um período de tempo limitado.

Sabendo que este método é baseado na técnica de PCR, muitos fatores podem influenciar nos padrões obtidos, incluindo a concentração do DNA e dos *primers*, o tipo de polimerase utilizada, as condições de amplificação assim como a duração da eletroforese. O método deve ser padronizado em cada laboratório, e deve haver uma consistência a ser mantida nos métodos e nos reagentes. É recomendada a inclusão de uma cepa de controle, que deve ter um padrão de bandas conhecido e que se repita em cada nova PCR e eletroforese. A concentração do DNA é provavelmente a variável mais importante, pois, seu excesso pode acarretar em mais fragmentos inespecíficos, enquanto que em quantidade insuficiente pode amplificar somente os fragmentos mais proeminentes. Qualquer uma dessas situações pode levar a uma má interpretação dos padrões obtidos, por isso recomendamos a quantificação do DNA extraído.

A PCR tem sido extensamente utilizada como alternativa para a genotipagem de microrganismos. O DRE-PCR, baseado na amplificação de segmentos de DNA localizados

entre os elementos repetitivos IS6110 e a *seqüência polimórfica repetitiva rica em GC* (PGRS) de *Mycobacterium tuberculosis* (Friedman *et al.*, 1995); o ERIC-PCR, que utiliza seqüências consenso repetitivas de enterobctérias para a tipagem de *Salmonella enterica* (Burr *et al.*, 1998) e o BOX-PCR, para a caracterização de isolados resistentes de *Streptococcus pneumoniae* (Ko *et al.*, 2000; Overweg *et al.*, 1999) são exemplos deste tipo de alternativa. Todos estes métodos apresentam um maior poder discriminatório, porém apresentam como desvantagem a sua baixa reprodutibilidade (Kremer *et al.*, 1999). Entretanto, é possível obter bons resultados quando um número pequeno de isolados é analisado, preferencialmente em uma mesma reação e em uma mesma corrida eletroforética (Wilson *et al.*, 1998, Garcia de Viedma *et al.*, 2006).

O VSS-PCR é um método simples, rápido e com um alto poder discriminatório que poderá ser utilizado principalmente para a caracterização de isolados associados a surtos da DM, possibilitando uma resposta acurada da relação epidemiológica dos mesmos desde que sejam observados os cuidados e limitações relacionados à execução de métodos que usam a PCR.

Os resultados até aqui apresentados levam à conclusão de que provavelmente a manutenção da incidência de doença meningocócica na população gaúcha nos últimos anos esteja associada à alta prevalência de clones do fenótipo B; que deve ser contínuo o trabalho de monitoramento da suscetibilidade aos fármacos utilizados para seu tratamento e que disponibilizamos uma nova alternativa para a tipagem e diferenciação dos clones circulantes.

2. CONCLUSÕES

1. Através do estudo de coorte retrospectivo em um banco de dados, foi possível observar uma redução de aproximadamente 50% dos casos para o período, com uma taxa média de letalidade de 22%. Foi confirmada uma alta incidência de casos entre pacientes das faixas etárias de 1 a 4 anos e para menores de 1 ano.

2. Também foi observado um aumento significativo dos casos atribuídos ao sorogrupo B e diminuição dos casos atribuídos ao sorogrupo C, onde os fenótipos B:4,7:P1.19,15, B:15:P1.7,16 e B:NT:P1.3 representaram quase 50% de todos os isolados sorotipados.

3. Foram selecionados 56 isolados de meningococo do primeiro ano não-epidêmico (2000) do RS, além de 20 isolados de outros estados ou países para o estudo de genotipagem. Dentre os isolados do RS foram identificados 20 STs, dos quais 8 foram identificados como tipos novos.

3.1. Os STs 33 e 259 foram os tipos mais freqüentes, ambos pertencentes ao complexo clonal ST-32/ET-5 e, os casos atribuídos ao ST-259 demonstraram uma maior tendência ao desfecho de casos fatais.

3.2. Não foram encontrados isolados caracterizados como ST-259 entre os controles geográficos ou em outros estudos realizados no Brasil até o momento.

3.3. Os resultados encontrados através do estudo epidemiológico e de caracterização fenotípica e genotípica, sugerem que a presença dos clones ST-33 e ST-259 juntamente com a emergência do clone ST-103 contribuem para a manutenção da alta incidência da DM no RS.

4. O estudo de caracterização da suscetibilidade a penicilina dos isolados genotipados demonstrou uma taxa de 18% de suscetibilidade reduzida com uma associação significativa ao clone ST-461, quando comparada aos demais clones. Nenhum isolado demonstrou atividade para a β -lactamase.

5. Um novo método de genotipagem, chamado de VSS-PCR, foi desenvolvido. Esse método apresentou um excelente poder discriminatório, tem baixo custo operacional e é de fácil execução e interpretação. Tal método poderá ser utilizado em estudos de surtos da DM, assim que seja validado.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdillahi H & Poolman JT. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. **Microb Path**, 4(1):27-32, 1988.
- Achtman M. Clonal spread of serogroup A meningococci: a paradigm for the analysis of microevolution in bacteria. **Mol Microbiol**. (1): 15-22, 1994.
- Achtman M. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. **Trends Microbiol**, 3(5): 186-192, 1995.
- Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C, Hahne S, W135 Working Group. Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. **Emerg Infect Dis**, 8: 761-767, 2002.
- Andersen J, Berthelsen L, Bech Jensen B, Lind I. Dynamics of the meningococcal carrier state and characteristics of the carrier strains: a longitudinal study within three cohorts of military recruits. **Epidemiol Infect**, 121(1): 85-94, 1998.
- Antignac A, Alonso JM, Taha MK. Nonculture prediction of *Neisseria meningitidis* susceptibility to penicillin. **Antimicrob Agents Chemother**, 45(12): 3625-3628, 2001.
- Arditi M & Yogev R. Common etiologic agents of bacterial meningitidis. In: **The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases**. Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR. 5th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, p. 316-322, 1997.
- Ashton FE & Caugant DA. The panmitic nature of *Neisseria meningitidis* serogroup B during a period of endemic disease in Canada. **Can J Microbiol**, 47: 283-289, 2001.
- Baethgen LF, Moraes C, Weidlich L, Rios S, Kmetzsch CI, Silva MS, Rossetti ML, Zaha A. Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: standardization and adaptation for use in a public health laboratory. **J Med Microbiol**, 52: 793-799, 2003.
- Baethgen LF, Weidlich L, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Cafrune PI, Lemos AP, Rios SS, Abreu MF, Kmetzsch C, Sperb AF, Riley LW, Rossetti MLR, Zaha A. High prevalence of *Neisseria meningitidis* ST-32/ET-5 clonal complex in Southern Brazil. **Trop Med Int Health**, no prelo.
- Barroso DE, Carvalho DM, Nogueira SA, Solari CA, Xavier-Silva J, Lemos AP, Casagrande ST, Rebelo MC, Soares V. Epidemiology and molecular analysis of epidemic meningococcal disease related to group C *Neisseria meningitidis* in a Brazilian metropolis: Rio de Janeiro 1993-1995. In: Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference, 1996, Baltimore. Proceedings of the Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference. Baltimore: Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference, 10: 435-437, 1996.

- Barroso DE. Doença Meningocócica *In: Medicina Tropical – Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias*. Batista RS, Gomes AP, Igreja RP, Huggins DW. Ed. Cultura Médica, 521-549, 2000.
- Bart A, Barnabe C, Achtman M, Dankert J, van der Ende A, Tibayrenc M. The population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A fits the predictions for clonality. *Infect Genet Evol.*, 1(2): 117-122, 2001.
- Bennett DE & Cafferkey MT. Multilocus restriction typing: a tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. *J Med Microbiol*, 52(Pt 9): 781-787, 2003.
- Bevanger L, Bergh K, Gísnas G, Caugant DA, Froholm LO. Identification of nasopharyngeal carriage of an outbreak strain of *Neisseria meningitidis* by pulsed-field gel electrophoresis versus phenotypic methods. *J Med Microbiol*, 47(11): 993-998, 1998.
- Bjorvatn B, Lund V, Kristiansen BE, Korsnes L, Spanne O, Lindqvist B. Applications of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 19(6): 763-765, 1984.
- Blondeau JM & Yaschuk Y. In vitro activities of ciprofloxacin, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphenicol, and rifampin against fully susceptible and moderately penicillin-resistant *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(11): 2577-2579, 1995.
- Boras A, Jeren T, Sacchi CT, Schmink S, Bozinovic D, Barsic B, Rosenstein NE, Popovic T. Establishment of an active laboratory-based surveillance for bacterial meningitis in Croatia and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates causing meningococcal disease that were collected in the year 2000, the first year of activity. *J Clin Microbiol*, 42(4): 1803-1806, 2004.
- Boslego J & Tramont EC. *Neisseria meningitidis*. *In: Infectious Diseases*. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NRWB. Saunders Company, Philadelphia, USA, p.1532-1538, 1992.
- Brooks JL, Rosenqvist E, Bjune G, Lambden PR, Heckels JE. Comparison of the class-1 outer membrane protein from B:15:P1.16 *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients previously immunized with a serogroup B outer membrane protein vaccine in Norway. *Microb Pathog*, 17(6): 425-430, 1994.
- Brundage JF, Ryan MA, Feighner BH, Erdtmann FJ. Meningococcal disease among United States military service members in relation to routine uses of vaccines with different serogroup-specific components, 1964-1998. *Clin Infect Dis*, 35(11): 1376-1381, 2002.
- Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Lett Appl Microbiol*, 27(1): 24-30, 1998.

- Bygraves JA & Maiden MC. Analysis of the clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. *J Gen Microbiol*, 138(3): 523-531, 1992.
- Campagne G, Schuchat A, Djibo S, Ousseini A, Cisse L, Chippaux JP. Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. *Bull World Health Organ*, 77: 499-508, 1999.
- Caniça M, Dias R, Ferreira E, Meningococci Study Group. *Neisseria meningitidis* C:2b:P1.2,5 with intermediate resistance to penicillin, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 10(3): 526-529, 2004.
- Carter PE, Abadi FJ, Yakubu DE, Pennington TH. Molecular characterization of rifampin-resistant *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(6): 1256-1261, 1994.
- Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect*, 99(3): 591-601, 1987.
- Caugant DA, Froholm LO, Bovre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander RK. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(13): 4927-4931, 1986.
- Caugant DA, Kristiansen BE, Froholm LO, Bovre K, Selander RK. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun*, 56(8): 2060-2068, 1988.
- Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, Wedege E, Eng J, Froholm LO. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol*, 32(2): 323-330, 1994.
- Caugant DA, Mocca LF, Frasch CE, Froholm LO, Zollinger WD, Selander RK. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol*, 169(6): 2781-2792, 1987.
- Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*, 106(5): 505-525, 1998.
- CDC. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae*, 1998. (Disponível on-line: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/meningitis_manual.pdf).
- Chiou CS, Liao JC, Liao TL, Li CC, Chou CY, Chang HL, Yao SM, Lee YS. Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. *BMC Infect Dis*, 6: 25, 2006.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Supplement M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2005.
- Corbett A, Exley R, Bourdoulous S, Tang CM. Interactions between *Neisseria meningitidis* and human cells that promote colonisation and disease. **Expert Rev Mol Med**, 6(14): 1-14, 2004.
- Corso A, Faccone D, Miranda M, Rodriguez M, Regueira M, Carranza C, Vencina C, Vazquez JA, Galas M. Emergence of *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in Argentina. **J Antimicrob Chemother**, 55(4): 596-597, 2005.
- Costa W, Sacchi CT, Ramos S, Milagres L, Prigenzi LS. Meningococcal disease in Sao Paulo, Brazil. **NIPH Ann**, 14(2): 215-216; discussion 216-8, 222-4, 1991.
- Cousin SJr, Whittington WL, Roberts MC. Acquired macrolide resistance genes in pathogenic *Neisseria* spp. isolated between 1940 and 1987. **Antimicrob Agents Chemother**, 47(12): 3877-3880, 2003.
- Davis J, Smith AL, Hughes WR, Golomb M. Evolution of an autotransporter: domain shuffling and lateral transfer from pathogenic *Haemophilus* to *Neisseria*. **J Bacteriol**, 183(15): 4626-4635, 2001.
- de Filippis I & Vicente AC. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 53(3): 161-167, 2005.
- de Filippis I, de Andrade CF, Silva L, Prevots DR, Vicente AC. PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. **Infect Immun**, 75(7): 3683-3685, 2007.
- de Marie S, Hoeijmakers JH, Poolman JT, Zanen HC. Filter radioimmunoassay, a method for large-scale serotyping of *Neisseria meningitidis*. **J Clin Microbiol**, 20(2): 255-258, 1984.
- de Moraes JC & Barata RB. Meningococcal disease in Sao Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics. **Cad Saude Publica**, 21(5): 1458-1471, 2005.
- Densen P. Interaction of complement with *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Clin. Microbiol. Rev**, 2 (suppl.): S11, 1989.
- Donalisio MR, Kemp B, Rocha MM, Ramalheira RM. Fatality rate in the epidemiology of meningococcal disease: study in the region of Campinas, SP, Brazil, 1993 to 1998. **Rev Saude Publica**, 34: 589-595, 2000.

- Dyet KH, Simmonds RS, Martin DR. Multilocus restriction typing method to predict the sequence type of meningococci. *J Clin Microbiol*, 42(4): 1742-1745, 2004.
- Enright MC & Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 7(12): 482-487, 1999.
- Escosteguy CC, Medronho R de A, Madruga R, Dias HG, Braga RC, Azevedo OP. Epidemiologic surveillance and evaluation of meningitis hospital care. *Rev Saude Publica*, 38: 657-663, 2004.
- Feavers IM, Gray SJ, Urwin R, Russell JE, Bygraves JA, Kaczmarek EB, Maiden MC. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol*, 37(12): 3883-3887, 1999.
- Feil EJ, Enright MC, Spratt BG. Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol*, 151(6): 465-469, 2000.
- Feil EJ, Maiden MC, Achtman M, Spratt BG. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol*, 16(11): 1496-1502, 1999.
- Ferner C & Swedberg G. Adaptation to sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: kinetic analysis of dihydropteroate synthases from *N. meningitidis* expressed in a knockout mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 179(3): 831-837, 1997.
- Ferreira E, Dias R, Caniça M. Antimicrobial susceptibility, serotype and genotype distribution of meningococci in Portugal, 2001-2002. *Epidemiol Infect*, 134(6): 1203-1207, 2006.
- Forgor AA, Leimkugel J, Hodgson A, Bugri A, Dangy JP, Gagneux S, Smith T, Pluschke G. Emergence of W135 meningococcal meningitis in Ghana. *Trop Med Int Health*, 10(12): 1229-1234, 2005.
- Franco BDGM, Landgraf ME, Landgraf M. *Manual Oxoid: Nitrocefina*. 1ª ed. (português) Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra, cap.4: 16-17, 2000.
- Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD Jr, Riley LW. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 33(5): 1383-1384, 1995.
- Galimand M, Gerbaud G, Guibourdenche M, Riou JY, Courvalin P. High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med*, 339(13): 868-874, 1998.
- Garcia de Viedma D, Alonso Rodriguez N, Andres S, Martinez Lirola M, Ruiz Serrano MJ, Bouza E; INDAL-TB working group Evaluation of alternatives to RFLP for the

- analysis of clustered cases of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10(4): 454-459, 2006.
- Gottfredsson M, Diggle MA, Lawrie DI, Erlensdottir H, Hardardottir H, Kristinsson KG, Clarke S. *Neisseria meningitidis* sequence type and risk for death, Iceland. *Emerg Infect Dis*, 12(7): 1066-1073, 2006.
- Gray-Owen SD. Neisserial Opa proteins: impact on colonization, dissemination and immunity. *Scand J Infect Dis*, 35(9): 614-8, 2003.
- Grizot S & Buchanan SK. Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 51(4): 1027-1037, 2004.
- Hart CA & Rogers TRF. Meningococcal disease. *J Med Microbiol*, 39: 3-25, 1993.
- Hindler JF & Swenson JM. Susceptibility test methods: fastidious bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. 8th edition, vol. I. p. 1128-1140, 2003.
- Hobbs MM, Seiler A, Achtman M, Cannon JG. Microevolution within a clonal population of pathogenic bacteria: recombination, gene duplication and horizontal genetic exchange in the *opa* gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 12(2): 171-180, 1994.
- Hunter PR & Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26(11): 2465-2466, 1988.
- Jackson LA, Tenover FC, Baker C, Plikaytis BD, Reeves MW, Stocker SA, Weaver RE, Wenger JD. Prevalence of *Neisseria meningitidis* relatively resistant to penicillin in the United States, 1991. Meningococcal Disease Study Group. *J Infect Dis*, 169(2): 438-441, 1994.
- Janda WM & Knapp JS. Gram-negative bacteria: *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. 8th edition, vol. I. p. 585-608, 2003.
- Jensen ES, Schonheyder HC, Lind I, Berthelsen L, Norgard B, Sorensen HT. *Neisseria meningitidis* phenotypic markers and septicaemia, disease progress and case-fatality rate of meningococcal disease: a 20-year population-based historical follow-up study in a Danish county. *J Med Microbiol*, 52: 173-179, 2003.
- Jensen, ES. *Seasonal variation of meningococcal disease and factors associated with its outcome*. Tese (doutorado). Department of Clinical Epidemiology, Aalborg Hospital and Aarhus University Hospital, Denmark, 61p., 2003.
- Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S, Musilek M, Kriz P, Maiden MC. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol*, 38(12): 4492-4498, 2000.

- Jolley KA, Brehony C, Maiden MC. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev*, 31(1): 89-96, 2007.
- Jordens, JZ & Pennington TH. Characterization of *N. meningitidis* isolates by ribosomal RNA gene restriction patterns and restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA. *Epidemiol Infect*, 107: 253-262, 1991.
- Jessouroun E, da Silveira IF, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch L, Frasch CE, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. *Vaccine*, 22(20): 2617-2625, 2004.
- Ko AI, Reis JN, Coppola SJ, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo TS, Pinheiro RM, Salgado K, Ribeiro Dourado CM, Tavares-Neto J, Rocha H, Galvao Reis M, Johnson WD Jr, Riley LW. Clonally related penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 from cases of meningitis in Salvador, Brazil. *Clin Infect Dis*, 30(1): 78-86, 2000.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*, 37(8): 2607-18, 1999.
- Kristiansen BE, Fermer C, Jenkins A, Ask E, Swedberg G, Skold O. PCR amplicon restriction endonuclease analysis of the chromosomal dhps gene of *Neisseria meningitidis*: a method for studying spread of the disease-causing strain in contacts of patients with meningococcal disease. *J Clin Microbiol*, 33(5): 1174-1179, 1995.
- Kristiansen BE, Sorensen B, Bjorvatn B, Falk ES, Fosse E, Bryn K, Froholm LO, Gaustad P, Bovre K. An outbreak of group B meningococcal disease: tracing the causative strain of *Neisseria meningitidis* by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 23(4): 764-767, 1986.
- Kristiansen BE, Tveten Y, Ask E, Reiten T, Knapskog AB, Steen-Johnsen J, Hoppen G. Preventing secondary cases of meningococcal disease by identifying and eradicating disease-causing strains in close contacts of patients. *Scand J Infect Dis*, 24(2): 165-173, 1992.
- Kyaw MH, Christie P, Jones IG, Campbell H. The changing epidemiology of bacterial meningitis and invasive non-meningitic bacterial disease in Scotland during the period 1983-99. *Scand J Infect Dis*, (34): 289-298, 2002.
- Law DK, Lorange M, Ringuette L, Dion R, Giguere M, Henderson AM, Stoltz J, Zollinger WD, De Wals P, Tsang RS. Invasive meningococcal disease in Quebec, Canada, due to an emerging clone of ST-269 serogroup B meningococci with serotype antigen 17 and serosubtype antigen P1.19 (B:17:P1.19). *J Clin Microbiol*, 44: 2743-2749, 2006.

- Lemos AP, Brandao AP, Gorla MC, Paiva MV, Simonsen V, Melles CE. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. *J Med Microbiol*, 55(Pt 6): 751-757, 2006.
- Lemos AP. *Descrição de um novo clone de Neisseria meningitidis sorogrupo C, grande São Paulo, 1990 a 2003*. Tese (doutorado): Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. 119 p., 2005.
- Lewis C & Clarke SC. Identification of *Neisseria meningitidis* serogroups Y and W135 by *siaD* nucleotide sequence analysis. *J Clin Microbiol*, 41(6): 2697-2699, 2003.
- Lindsay AP. *Meningococcal disease and meteorological conditions in Auckland*. Dissertação (mestrado). University of Auckland – Department Public Health, 113p., 1999.
- Lingappa JR, Al-Rabeah AM, Hajjeh R, Mustafa T, Fatani A, Al-Bassam T, Badukhan A, Turkistani A, Makki S, Al-Hamdan N, Al-Jeffri M, Al Mazrou Y, Perkins BA, Popovic T, Mayer LW, Rosenstein NE. Serogroup W-135 meningococcal disease during the Hajj, 2000. *Emerg Infect Dis*, 9: 665-671, 2003.
- Linz B, Schenker M, Zhu P, Achtman M. Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 36(5): 1049-1058, 2000.
- Lourenço MCS, Reis RS, Andrade ACV, Tuyama M, Barroso, DE. Subclinical infection of the genital tract with *Neisseria meningitidis*. *Braz J Infec Dis*, 10(2): 154-155, 2006.
- MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Roberts R, Evans MR, Cann K, Baxter DN, Maiden MC, Stuart JM. United Kingdom Meningococcal Carriage Group. Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. *Emerg Infect Dis*, 12(6): 950-957, 2006.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 3140-3145, 1998.
- Maiden MC. Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 112(3): 243-250, 1993.
- Mantese OC, Hirano J, Santos IC, Silva VM, de Castro E. Etiological profile of bacterial meningitis in children. *J Pediatr (Rio J)*, 78: 467-474, 2002.
- Massari P, Ram S, Macleod H, Wetzler LM. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends in Microbiol*, 11(2): 87-93, 2003.
- Mastrantonio P, Stefanelli P, Fazio C, Sofia T, Neri A, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M, Caporali MG, Salmaso S. Serotype distribution, antibiotic susceptibility, and

- genetic relatedness of *Neisseria meningitidis* strains recently isolated in Italy. ***Clin Infect Dis***, 36(4): 422-428, 2003.
- Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, Schmink SE, Noble CA, Tondella ML, Whitney AM, Al-Mazrou Y, Al-Jefri M, Mishkhis A, Sabban S, Caugant DA, Lingappa J, Rosenstein NE, Popovic T. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. ***J Infect Dis***, 185(11): 1596-1605, 2002.
- McEllistrem MC, Kolano JA, Pass MA, Caugant DA, Mendelsohn AB, Fonseca Pacheco AG, Shutt KA, Razeq J, Harrison LH; Maryland Emerging Infections Program. Correlating epidemiologic trends with the genotypes causing meningococcal disease, Maryland. ***Emerg Infect Dis***, 10(3): 451-456, 2004.
- Mers AJ & So M. Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. ***Annu Rev Cell Dev Biol***, 16: 423-457, 2000.
- Morelli G, Malorny B, Muller K, Seiler A, Wang JF, del Valle J, Achtman M. Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. ***Mol Microbiol***, 25(6): 1047-1064, 1997.
- Morello JÁ, Janda WM, Doern GV. *Neisseria* and *Branhamella*. In: ***Manual of Clinical Microbiology***. Balows A, Hansler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD & Shadomy HJ. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, p. 258-276, 1991.
- Morse SA. *Neisseria* e *Branhamella*. In: Braude, A. I.; Davis, C. E. & Fierer, J. ***Infectious Diseases and Medical Microbiology***. 5th ed. Washington, American Society for Microbiology, p. 258-287, 1986.
- Murphy KM, O'Donnell KA, Higgins AB, O'Neill C, Cafferkey MT. Irish strains of *Neisseria meningitidis*: characterisation using multilocus sequence typing. ***Br J Biomed Sci***, 60(4): 204-209, 2003.
- Nassif X, Pujol C, Morand P, Eugène E. Interactions of pathogenic *Neisseria* with host cells. Is it possible to assemble the puzzle? ***Mol Microbiol***, 32(6):1124-1132, 1999.
- Nassif X. A furtive pathogen revealed. ***Science***, 287: 1767-1768, 2000.
- Nassif X. Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucariotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? ***Current Opinion in Microbiology***, 2: 71-77, 1999.
- Nicolas P, Decousset L, Riglet V, Castelli P, Stor R, Blanchet G. Clonal expansion of sequence type (ST-)5 and emergence of ST-7 in serogroup A meningococci, Africa. ***Emerg Infect Dis***, 7(5): 849-54. 2001.
- Nicolas P, Norheim G, Garnotel E, Djibo S, Caugant DA. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* isolated in the African Meningitis Belt between 1988 and 2003

- shows dominance of sequence type 5 (ST-5) and ST-11 complexes. *J Clin Microbiol*, 43(10): 5129-5135, 2005.
- Noah N & Henderson B. Surveillance of bacterial meningitis in Europe 1999/2000. European bacterial meningitis surveillance project. Public Health Laboratory Service, Colindale, London, United Kingdom, 2002.
- Noronha CP, Baran M, Nicolai CC, Azevedo MB, Bernardes AT, Monteiro GT, Lopes GR, Rodrigues Rd, Santos AM, Lemos MC. Epidemiology of meningococcal disease in the city of Rio de Janeiro: changes after vaccination against B and C serogroups. *Cadernos de saúde pública/Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, 13: 295-303, 1997.
- Olyhoek T, Crowe BA, Achtman M. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. *Rev Infect Dis*, 9(4): 665-692, 1987.
- Overweg K, Hermans PW, Trzcinski K, Sluijter M, de Groot R, Hryniewicz W. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: identification of emerging clones. *J Clin Microbiol*, 37(6): 1739-1745, 1999.
- Paret G, Keller N, Barzilai A, Zemach M, Guttman D, Vardi A, Shatzberg G, Cohen H, Barzilay Z. Invasive meningococcal disease: patient and strain characteristics set new challenge for prevention and control. *Infection*, 27: 261-264, 1999.
- Perez-Trallero E, Gomez N, Garcia-Arenzana JM. E test as susceptibility test for evaluation of *Neisseria meningitidis* isolates. *J Clin Microbiol*, 32(9): 2341-2342, 1994.
- Perez-Trallero E, Vicente D, Montes M, Cisterna R. Positive effect of meningococcal C vaccination on serogroup replacement in *Neisseria meningitidis*. *Lancet*, 360(9337): 953, 2002.
- Pizza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287: 1816-1820, 2000.
- Pollard AJ, Probe G, Trombley C, Castell A, Whitehead S, Bigham JM, Champagne S, Isaac-Renton J, Tan R, Guiver M, Borrow R, Speert DP, Thomas E. Evaluation of a diagnostic polymerase chain reaction assay for *Neisseria meningitidis* in North America and field experience during an outbreak. *Arch Pathol Lab Med*, 126(10): 1209-1215, 2002.
- Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW, Whitney AM, Mayer LW, Noble CA, Ajello GW, Mostashari F, Bendana N, Lingappa J, Hajjeh R, Rosenstein NE. *Neisseria*

- meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET-37 complex. ***Emerg Infect Dis***, 6: 428-429, 2000.
- Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, Hunter SB, Ribot EM, Boxrud D, Tondella ML, Kim C, Noble C, Mothershed E, Besser J, Perkins BA. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. ***J Clin Microbiol***, 39(1): 75-85, 2001.
- Puricelli RC, Kupek E, Westrupp MH. Three decades of meningococcal disease in the state of Santa Catarina, Brazil. ***Braz J Infect Dis***, 8(3): 241-248, 2004.
- Richardson AR, Yu Z, Popovic T, Stojiljkovic I. Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. ***Proc Natl Acad Sci USA***, 99(9): 6103-6107, 2002.
- Rigatti, MFB. Análise do comportamento da doença meningocócica em Porto Alegre – 2000. ***Boletim Epidemiológico***, ano III (8): 4-5, 2000.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML, Danila R, Cieslak P, Shutt KA, Popovic T, Schuchat A, Harrison LH, Reingold AL. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. ***J Infect Dis***, 180: 1894-1901, 1999.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. ***N Engl J Med***, 344(18): 1378-1388, 2001.
- Sacchi CT, Lemos AP, Brandt ME, Whitney AM, Melles CE, Solari CA, Frasc CE, Mayer LW. Proposed standardization of *Neisseria meningitidis* PorA variable-region typing nomenclature. ***Clin Diagn Lab Immuno.***, 5(6): 845-855. 1998a.
- Sacchi CT, Lemos AP, Whitney AM, Solari CA, Brandt ME, Melles CE, Frasc CE, Mayer LW. Correlation between serological and sequencing analyses of the PorB outer membrane protein in the *Neisseria meningitidis* serotyping system. ***Clin Diagn Lab Immunol***, 5(3): 348-354, 1998b.
- Sacchi CT, Pessoa LL, Ramos SR, Milagres LG, Camargo MC, Hidalgo NT, Melles CE, Caugant DA, Frasc CE. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in Sao Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. ***J Clin Microbiol***, 30(7): 1734-1738, 1992.
- Sacchi CT, Tondella ML, Gorla MC, de Lemos PS, Melles CE, de Paiva MV, Rodrigues DS, Andrade AJ, Ribeiro MO, Sperb A. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* serogroup C epidemic strains in south Brazil. ***Rev Inst Med Trop Sao Paulo***, 37(4): 281-289, 1995.
- Sacchi CT, Whitney AM, Reeves MW, Mayer LW, Popovic T. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. ***J Clin Microbiol***, 40(12): 4520-4527, 2002.

- Sáez-Nieto JA, Fontanals D, Garcia de Jalon J, Martinez de Artola V, Peña P, Morera MA, Verdaguer R, Sanfeliu I, Belio-Blasco C, Perez-Saenz JL. Isolation of *Neisseria meningitidis* strains with increase of penicillin minimal inhibitory concentrations. *Epidemiol Infect*, 99(2): 463-469, 1987.
- Sáez Nieto JA, Lujan R, Berron S, Campos J, Viñas M, Fusté C, Vázquez JA, Zhang Q-Y, Bowler LD, Martinez-Suarez JV, Spratt BG. Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: a 5-year history (1985-1989). *Clin Infect Dis*, 14(2): 394-402, 1992
- Schouls LM, van der Ende A, Damen M, van de Pol I. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by Multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 44: 1509-1518, 2006.
- Schreiber W & Mathys FK. Meningite epidêmica. In: *Infectio: doenças infecciosas na história da medicina*. Basileia: Editiones Roche, p. 112-115, 1991.
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med*, 337(14): 970-976, 1997.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of Multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol.*, 51: 837-884, 1986.
- Shao Z, Li W, Ren J, Liang X, Xu L, Diao B, Li M, Lu M, Ren H, Cui Z, Zhu B, Dai Z, Zhang L, Chen X, Kan B, Xu J. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. *Lancet*, 367(9508):419-423, 2006.
- Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*, (2): 195-207, 1991.
- Skoczynska A, Konior R, Sadowy E, Piatkowska-Smietanska M, Lelek B, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Identification of *Neisseria meningitidis* sequence type 66 in Poland. *Clin Microbiol Infect*, 10(9): 848-850, 2004.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10): 4384-4388, 1993.
- Sosa J, Llanes R, Guzman D, Quintana I, Flores M, Gutierrez O. Typing and susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Cuba (1993-1999). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(4): 523-525, 2001.
- Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science.*, 264(5157): 388-393, 1994.

- Stefanelli P, Fazio C, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M, Mastrantonio P. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease: detection of point mutations in the *rpoB* gene and molecular characterization of the strains. *J Antimicrob Chemother*, 47(2): 219-222, 2001.
- Stefanelli P, Fazio C, Neri A, Sofia T, Mastrantonio P. Emergence in Italy of a *Neisseria meningitidis* clone with decreased susceptibility to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(8): 3103-3106, 2004.
- Stephens DS. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet*, 353(9157): 941-942, 1999.
- Struelens MJ, de Gheldre Y, Deplano A. Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 19(8): 565-569, 1998.
- Suker J, Feavers IM, Achtman M, Morelli G, Wang JF, Maiden MC. The *porA* gene in serogroup A meningococci: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. *Mol Microbiol*, 12(2): 253-265, 1994.
- Sutcliffe EM, Jones DM, el-Sheikh S, Percival A. Penicillin-insensitive meningococci in the UK. *Lancet*, 1(8586): 657-658, 1988.
- Taha MK, Bichier E, Perrocheau A, Alonso JM. Circumvention of herd immunity during an outbreak of meningococcal disease could be correlated to escape mutation in the *porA* gene of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 69(3): 1971-1973, 2001.
- Taha MK, Giorgini D, Ducos-Galand M, Alonso JM. Continuing diversification of *Neisseria meningitidis* W135 as a primary cause of meningococcal disease after emergence of the serogroup in 2000. *J Clin Microbiol*, 42: 4158-4163, 2004.
- Taha MK. Molecular detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2(2): 143-150, 2002.
- Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol*, 38(2): 855-857, 2000.
- Takahashi H, Kuroki T, Watanabe Y, Tanaka H, Inouye H, Yamai S, Watanabe H. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing. *J Med Microbiol*, 53(Pt 7): 657-62, 2004. *Erratum in: J Med Microbiol*, 53(11): 1175, 2004.
- Temime L, Boelle PY, Courvalin P, Guillemot D. Bacterial resistance to penicillin G by decreased affinity of penicillin-binding proteins: a mathematical model. *Emerg Infect Dis*, 9(4): 411-417, 2003.
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, Nelson WC, Gwinn ML, DeBoy R, Peterson JD, Hickey EK, Haft DH, Salzberg SL, White O, Fleischmann RD, Dougherty BA, Mason

- T, Cieko A, Parksey DS, Blair E, Cittone H, Clark EB, Cotton MD, Utterback TR, Khouri H, Qin H, Vamathevan J, Gill J, Scarlato V, Masignani V, Pizza M, Grandi G, Sun L, Smith HO, Fraser CM, Moxon ER, Rappuoli R, Venter JC. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 287: 1809-1815, 2000.
- Tondella ML, Popovic T, Rosenstein NE, Lake DB, Carlone GM, Mayer LW, Perkins BA. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. The Active Bacterial Core Surveillance Team. *J Clin Microbiol*, 38(9): 3323-3328, 2000.
- Tondella ML, Sacchi CT, Neves BC. Ribotyping as an additional molecular marker for studying *Neisseria meningitidis* serogroup B epidemic strains. *J Clin Microbiol*, 32(11): 2745-2748, 1994.
- Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*, 146(1): 69-78, 1981.
- Tsolia MN, Theodoridou M, Tzanakaki G, Kalabalikis P, Urani E, Mostrou G, Pangalis A, Zafiropoulou A, Kassiou C, Kafetzis DA, Blackwell CC, Kremastinou J, Karpathios TE. The evolving epidemiology of invasive meningococcal disease: a two-year prospective, population-based study in children in the area of Athens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 36: 87-94, 2003.
- Tzeng Y-L. & Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microb Infect*, 2: 687-700, 2000.
- van Dauren M, Brandtzaeg P, van der Meer J. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin. Microbiol Rev.*, 13(1): 144-166, 2000.
- Vedros NA & Genus I. *Neisseria*. In: Krieg NR. Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams and Wilkins, p. 290-296, 1984.
- Vogel U & Claus H. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *Front Biosci*, 8: e14-22, 2003.
- Vogel U, Claus H, Frosch M. Genetic lineages and their traits in *Neisseria meningitidis*. *Int J Med Microbiol*, 294(2-3): 75-82, 2004.
- Volk WA, Gehardt BM, Hammarskjöld M-L, Kadner RJ. Neisseriaceae. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 5th edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 348-352, 1996.
- Wang VJ, Kuppermann N, Malley R, Barnett ED, Meissner HC, Schmidt EV, Fleisher GR. Meningococcal disease among children who live in a large metropolitan area, 1981-1996. *Clin Infect Dis*, 32: 1004-1009, 2001.

- Ward J, Hanna JN, Bates JR, Selvey LA. Enhanced surveillance for meningococcal disease in Queensland in 1999. *Commun Dis Intell*, 24: 332-335, 2000.
- Wedge E, Hoiby EA, Rosenqvist E, Froholm LO. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. *J Med Microbiol*, 31(3): 195-201, 1990.
- Weis N & Lind I. Usefulness of the DNA-fingerprinting pattern and the multilocus enzyme electrophoresis profile in the assessment of outbreaks of meningococcal disease. *Epidemiol Infect*, 116(2): 103-114, 1996.
- Weiss PLD, Coplan P, Guess H. Epidemiology of bacterial meningitis among children in Brazil, 1997-1998. *Rev Saude Publica*, 35: 249-255, 2001.
- WHO. *Control of epidemic meningococcal disease*. WHO practical guidelines. 2nd edition, World Health Organization, 1998. ([http://: www.who.int/emc-documents/meningitis/whoemcbac983.html](http://www.who.int/emc-documents/meningitis/whoemcbac983.html)).
- Wilson SM, Goss S, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J Clin Microbiol*, 36(11): 3385, 1998.
- Woods CR, Koeuth T, Estabrook MM, Lupski JR. Rapid determination of outbreak-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. *J Infect Dis*, 174(4): 760-767, 1996.
- Woods JP, Kersulyte D, Tolan RW Jr, Berg CM, Berg DE. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis to type disease and carrier strains of *Neisseria meningitidis* isolated during a university outbreak. *J Infect Dis*, 169(6): 1384-1389, 1994.
- Woods TC, Helsel LO, Swaminathan B, Bibb WF, Pinner RW, Gellin BG, Collin SF, Waterman SH, Reeves MW, Brenner DJ, Broome C. Characterization of *N. meningitidis* serogroup C by multilocus enzyme electrophoresis and ribosomal DNA restriction profiles (ribotyping). *J. Clin. Microbiol*, 30: 132-137, 1992.
- Yagupsky P, Ashkenazi S, Block C. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease and failure of chemoprophylaxis. *Lancet*, 341(8853):1152-1153, 1993.
- Yakubu DE & Pennington TH. Epidemiological evaluation of *Neisseria meningitidis* serogroup B by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 10(3-4): 185-189, 1995.
- Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, Kremastinou J, Kalmusova J, Musilek M, Alvestad T, Jolley KA, Wilson DJ, McCarthy ND, Caugant DA, Maiden MC. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol*, 42(11): 5146-5153, 2004.

- Yazdankhah SP, Lindstedt BA, Caugant DA. Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 43(4): 1699-1705, 2005.
- Zhang QY, Jones DM, Saez Nieto JA, Perez Trallero E, Spratt BG. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2 genes of penicillin-resistant strains of *Neisseria meningitidis* revealed by fingerprinting of amplified DNA. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(8): 1523-1528, 1990.
- Zhu P, Hu X, Xu L. Typing *Neisseria meningitidis* by analysis of restriction fragment length polymorphisms in the gene encoding the class 1 outer membrane protein: application to assessment of epidemics throughout the last 4 decades in China. *J Clin Microbiol*, 33(2): 458-462, 1995.
- Zollinger WD, Mandrell RE, Griffiss JM, Altieri P, Berman S. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. *J Clin Invest*, 63(5): 836-848, 1979.
- Zollinger WD, Moran EE, Connelly H, Mandrell RE, Brandt B. Monoclonal antibodies to serotype 2 and serotype 15 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and their use in serotyping. *Infect Immun*, 46(1): 260-266, 1984.

APÊNDICE I: Revisão da distribuição global de clones epidêmicos.

Estudos de epidemiologia molecular possibilitaram que muitas coleções de meningococos fossem analisadas por MLEE. Como resultado destas análises sabe-se que: i) isolados com tipos eletroforéticos (ETs) muito uniformes representam clones epidemiologicamente estáveis durante o período de estudo em que foram coletadas (50 anos); ii) isolados com ETs geneticamente relacionados, representados por clones que estão se modificando durante o período de estudo e iii) isolados com uma grande diversidade de ETs, que não apresentam relação epidemiológica entre si. A tabela abaixo demonstra a relação existente entre estrutura populacional de *N. meningitidis* e epidemiologia da DM.

TABELA A.I.: RELAÇÃO DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *N. MENINGITIDIS* E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA.

Estrutura populacional	Doença associada com este tipo de estrutura	Exemplo de complexos clonais
Clonal	Epidêmica/pandêmica	Subgrupos I e III
Epidêmica	Surto	Complexo ET-37
	Hiper-endemia	Complexo ET-5
Panmítica (não-clonal)	Doença endêmica	-

Adaptado de Maiden & Feavers, 1995.

A partir disso, observou-se a existência de sete complexos clonais ET-5, ET-37, Cluster A4, Linhagem III e Subgrupos I e III que estão mundialmente representados. A seguir faremos uma breve revisão da epidemiologia dos mesmos (adaptado de Caugant, 1998).

Subgrupos I e III – pandemias do sorogrupo A

Epidemias de grande escala causadas por meningococos do sorogrupo A são conhecidas como um sério problema de saúde pública, pois normalmente ocorrem, ou ocorreram, em partes do mundo onde os recursos para seu controle são severamente limitados. Um dos exemplos mais conhecidos é o cinturão de meningite meningocócica na região de savana africana, que se estende da Gâmbia à Etiópia, acometendo milhões de pessoas todos os anos (Caugant, 1998; Tunkel, 2001).

Epidemias por estes meningococos são descritas desde 1960, e o estudo destes isolados possibilitou sua classificação em 9 complexos clonais, ou subgrupos, sendo os subgrupos I e III os responsáveis por pelo menos 3 “ondas” epidêmicas nos últimos 30 anos (Wang *et al.*, 1992).

Apesar da primeira identificação do subgrupo I ter ocorrido no Reino Unido em 1941, este só foi identificado novamente em 1960 no norte da África e em alguns países do cinturão de meningite africano, tendo então se dispersado para o Brasil, Estados Unidos e Canadá. A segunda onda epidêmica foi caracterizada na década de 70, atingindo a Europa, Nigéria e Ruanda. Na década de 80 e 90 ocorreram surtos na Nova Zelândia e na população aborígene da Austrália, sendo também identificados surtos por este subgrupo em refugiados de Moçambique, na África do Sul (Caugant, 1998).

Clones do subgrupo III, especialmente o clone III-1, tem sido responsável por 2 pandemias, ambas iniciadas na China, com 15 anos de intervalo. A primeira foi identificada no meio da década de 60, atingindo também, em 1969, a Rússia, România e Noruega. Em 1973 foi identificado na Suécia onde persistiu até os anos 80. Na Finlândia foi identificado em 1973 e em 1974-75 atingiu o Brasil, onde até então, vivia uma epidemia pelo sorogrupo C. A segunda pandemia também iniciada na China se espalhou pelo Nepal, no início da década de 80, dispersou-se para a Índia em 1985-86 e em Meca

em 1987, atingindo peregrinos que portavam o clone em seu retorno para a África, Estados Unidos, Inglaterra e França (Olyhoek *et al.*, 1987; Moore *et al.*, 1988; Achtman, 1995).

Em 1993, outra pandemia por este subgrupo foi caracterizada na China dispersando epidemias, a partir de 1994, pela Mongólia, Rússia e África (Achtman *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2001; Taha *et al.*, 2002). Casos de doença endêmica foram descritos em 1997 e 2000 no Reino Unido (Zhu *et al.*, 2001; Jacobsson *et al.*, 2003).

Complexo ET-5

Em 1975, no norte da Noruega, teve início uma epidemia provocada por *N. meningitidis* sorogrupo B. Nos anos seguintes a epidemia disseminou-se por todo o país. Análises destes isolados por MLEE demonstraram que 75% dos mesmos pertenciam a um grupo de clones geneticamente relacionados, denominados de complexo ET-5, com fenótipo B:15:P1.7,16. Um grande aumento na incidência da DM, pertencente a este mesmo complexo clonal também foi descrito na Espanha, na metade da década de 70, porém o fenótipo B:4:P1.19,15 era o predominante. A partir destes dois focos epidêmicos, houve nos anos seguintes, um aumento contido da incidência e surtos isolados na Europa Ocidental (Peltola *et al.*, 1982; Caugant, 1998).

No Brasil, apesar deste clone ter sido primeiramente identificado em 1979, a epidemia só se instalou em 1988 (Sacchi *et al.*, 1992a). Clones idênticos àqueles da Espanha foram responsáveis por uma epidemia em Cuba, que se espalhou para a Flórida, USA, onde atacava principalmente imigrantes hispânicos em Miami em 1981-82. Em 1985 a cidade de Iquique, no Chile, foi atingida, entretanto os casos eram atribuídos ao fenótipo B:15:P1.3 que mais tarde disseminou-se por todo o país. Apesar de causar casos esporádicos de DM nos EUA e Canadá, clones do complexo ET-5, com as mesmas características sorológicas das cepas norueguesas, aumentaram substancialmente sua

incidência a partir de 1994 nos estados de Oregon e Washington. Apesar de serem poucos casos ou pequenos surtos, também foram identificados isolados do complexo ET-5 na Argentina, Israel, Austrália, China, Japão e Tailândia (Caugant, 1998).

As conclusões geradas a partir da observação deste complexo clonal sugerem que:

- i) possui um baixo poder de transmissibilidade, pois existe uma demora entre a introdução do clone na população e o início de uma epidemia;
- ii) grande poder de recombinação, pois existem variantes sorológicas que envolvem diferenças em antígenos de superfície e de outras partes do cromossomo;
- iii) persistência, apesar de sua baixa transmissibilidade persiste por muitos anos na população;
- iv) taxas de letalidade elevadas, resultantes da grande quantidade de casos de septicemia e, finalmente
- v) alta incidência entre adolescentes (Caugant, 1998).

Complexo ET-37

O complexo ET-37 representa um grupo de clones que tem sido associado a epidemias há muito tempo. Compreendem isolados relacionados à expressão da proteína de classe 2 (geralmente caracterizada como sorotipo 2a) e podendo estar associada aos sorogrupos B, C, W135 e Y.

O primeiro surto associado ao complexo ET-37 atingiu as Forças Armadas dos EUA, durante os anos 60. No final desta década, foram identificados casos pelo sorogrupo B na Noruega, e na metade da década de 70, ocorreu uma mudança no perfil dos casos deste complexo, resultando em associação com o sorogrupo C. O complexo ET-37 foi responsável por um grande surto, também na década de 70, no Brasil, que foi seguida pela epidemia do sorogrupo A (subgrupo III-1) e por uma onda epidêmica causada por isolados do sorogrupo B na África do Sul, no final dessa década. Também foram identificados casos por este complexo clonal em 1974 na China. Na década de 80, foram descritos casos

envolvendo isolados do sorogrupo C nos EUA, Europa e em países da África. Além dos isolados do sorogrupo C, também foram descritos casos de pacientes africanos pertencentes aos sorogrupos Y e W135 (Caugant, 1998).

Em 1990, foi descrito um aumento na incidência de casos pelo sorogrupo C no Canadá, porém estes isolados foram caracterizados como uma variante do complexo ET-37, sendo designados como ET-15. A partir de então, foram reportados diversos surtos por este clone em diferentes regiões dos EUA, Israel, República Checa, Islândia, Finlândia e Inglaterra (Caugant, 1998). De 1999 a 2001 foi caracterizado um surto com aproximadamente 90% dos casos caracterizados como sorogrupo C, complexo ET-15, sorotipo 2a, na região de Edmonton, no Canadá (Tyrell *et al.*, 2002).

No ano de 2000, a mais recente onda epidêmica foi identificada em peregrinos islâmicos do Hajj (Meca e Medina, Arábia Saudita) e em seus contatos, onde o clone ET-37, fenótipo W135:2a:P1.5,2, foi responsável por inúmeros casos de DM na Europa e África entre outros (Taha *et al.*, 2000; Aguilera *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2002; Wilder-Wilder-Smith *et al.*, 2002; Kilic *et al.*, 2006).

Cluster A4

Este grupo de clones contém organismos do sorogrupo B e C e que expressam proteína de classe 2 geralmente caracterizada como 2b:P1.2 ou como 2b:P1.10. A primeira identificação do Cluster A4 data de 1961 na Holanda, seguida anos mais tarde de uma onda epidêmica de clones relacionados a este complexo. Isolados deste grupo eram causa comum de doença meningocócica durante a década de 70, nos EUA, Canadá, Reino Unido, Islândia e muitos outros países da Europa, sendo responsável por uma epidemia severa na Cidade do Cabo, África do Sul, iniciada em 1979. Anos mais tarde, clones do cluster A4 foram associados a uma alta incidência de doença do sorogrupo B em crianças na Grécia e

a um aumento do sorogrupo C nos estados do sul do Brasil (Sacchi *et al.*, 1992b; Sacchi *et al.*, 1994; Sacchi *et al.*, 1995). Na mesma época foi associado a surtos na Austrália e como a maior causa de DM na Argentina (Caugant, 1998).

Linhagem III

Este novo complexo clonal, chamado de Linhagem III, foi identificado pela primeira vez também na Holanda, em 1980 e se tornou o clone mais prevalente daquele país em 1990, representando aproximadamente 20% dos isolados. Também é isolado, mas com baixa frequência em outros países europeus, incluindo: Islândia, Finlândia, Noruega, Reino Unido, Grécia e Áustria. Apesar de não estar relacionado a grandes epidemias, um aumento em sua frequência, associado ao sorogrupo B, foi descrito na Holanda. No início dos anos 90, um aumento na incidência de DM ocorreu na Nova Zelândia, associado à emergência de isolados B:4:P1.4. Análises destes isolados indicaram que os mesmos eram geneticamente relacionados a clones da Linhagem III, causando uma onda de doença hiper-endêmica onde mais de 70% dos isolados apresentavam o fenótipo B:4:P1.4. Logo após, foram notificados casos de DM associados à este mesmo fenótipo na Inglaterra e Bélgica. No continente americano já existem indícios da chegada deste clone a partir do relato de um isolado encontrado no Chile. Assim como para isolados do complexo ET-5, isolados da Linhagem III parecem evoluir rapidamente, apresentando mudanças periódicas em seus fenótipos (Caugant, 1998).

Referências Bibliográficas

Achtman M, van der Ende A, Zhu P, Koroleva IS, Kusecek B, Morelli G, Schuurman IG, Brieske N, Zurth K, Kostyukova NN, Platonov AE. Molecular epidemiology of serogroup A meningitis in Moscow, 1969 to 1997. *Emerg Infect Dis*, 7(3):420-427, 2001.

- Achtman M. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. **Trends Microbiol**, 3(5):186-192, 1995.
- Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C, Hahne S, W135 Working Group. Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. **Emerg Infect Dis**, 8(8):761-767, 2002.
- Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. **APMIS**, 106(5):505-25, 1998.
- Jacobsson S, Issa M, Unemo M, Backman A, Molling P, Sulaiman N, Olcen P. Molecular characterization of group A *Neisseria meningitidis* isolated in Sudan 1985-2001. **APMIS**, 111(11):1060-1066, 2003.
- Kilic A, Urwin R, Li H, Saracli MA, Stratton CW, Tang YW. Clonal spread of serogroup W135 meningococcal disease in Turkey. **J Clin Microbiol**, 44(1):222-224, 2006.
- Maiden MCJ & Feavers IF. **Population genetics and global epidemiology of the human pathogen *Neisseria meningitidis***. In: Population Genetics of Bacteria – 52nd symposium of the Society for General Microbiology held at the University of Leicester, January 1995. Baumberg S, Young JPW, Wellington EMH, Saunders JR. Cambridge University Press, p. 270-293, 1995.
- Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, Schmink SE, Noble CA, Tondella ML, Whitney AM, Al-Mazrou Y, Al-Jefri M, Mishkhis A, Sabban S, Caugant DA, Lingappa J, Rosenstein NE, Popovic T. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. **J Infect Dis**, 185(11):1596-1605, 2002.
- Moore PS, Harrison LH, Telzak EE, Ajello GW, Broome CV. Group A meningococcal carriage in travelers returning from Saudi Arabia. **JAMA**, 260(18):2686-2689, 1988.
- Nicolas P, Decousset L, Riglet V, Castelli P, Stor R, Blanchet G. Clonal expansion of sequence type (ST-)5 and emergence of ST-7 in serogroup A meningococci, Africa. **Emerg Infect Dis**, 7(5):849-854, 2001.
- Olyhoek T, Crowe BA, Achtman M. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. **Rev Infect Dis**, 9(4):665-692, 1987.
- Peltola H, Jonsdottir K, Lystad A, Sievers CJ, Kallings I. Meningococcal disease in Scandinavia. **Br Med J (Clin Res Ed)**, 284(6329):1618-1621, 1982.
- Sacchi CT, Pessoa LL, Ramos SR, Milagres LG, Camargo MC, Hidalgo NT, Melles CE, Caugant DA, Frasch CE. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in Sao Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. **J Clin Microbiol**, 30(7):1734-1738, 1992a.

- Sacchi CT, Tondella ML, de Lemos AP, Gorla MC, Berto DB, Kumiochi NH, Melles CE. Characterization of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup C strains in several Brazilian states. *J Clin Microbiol*, 32(7):1783-1787, 1994.
- Sacchi CT, Tondella ML, Gorla MC, de Lemos PS, Melles CE, de Paiva MV, Rodrigues DS, Andrade AJ, Ribeiro MO, Sperb A. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* serogroup C epidemic strains in south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 37(4):281-289, 1995.
- Sacchi CT, Zanella RC, Caugant DA, Frascch CE, Hidalgo NT, Milagres LG, Pessoa LL, Ramos SR, Camargo MC, Melles CE. Emergence of a new clone of serogroup C *Neisseria meningitidis* in Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol*, 30(5):1282-1286, 1992b.
- Taha MK, Achtman M, Alonso JM, Greenwood B, Ramsay M, Fox A, Gray S, Kaczmarek E. Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet*, 356(9248):2159, 2000.
- Taha MK, Parent Du Chatelet I, Schlumberger M, Sanou I, Djibo S, de Chabalier F, Alonso JM. *Neisseria meningitidis* serogroups W135 and A were equally prevalent among meningitis cases occurring at the end of the 2001 epidemics in Burkina Faso and Niger. *J Clin Microbiol*, 40(3):1083-1084, 2002.
- Tunkel AR. *Bacterial Meningitis*. Chapter 2: Epidemiology and Etiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. p.17-40, 2001.
- Tyrrell GJ, Chui L, Johnson M, Chang N, Rennie RP, Talbot JA, Edmonton Meningococcal Study Group. Outbreak of *Neisseria meningitidis*, Edmonton, Alberta, Canada. *Emerg Infect Dis*, 8(5):519-521, 2002.
- Wang JF, Caugant DA, Li X, Hu X, Poolman JT, Crowe BA, Achtman M. Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. *Infect Immun*, 60(12):5267-82, 1992.
- Wilder-Smith A, Barkham TM, Earnest A, Paton NI. Acquisition of W135 meningococcal carriage in Hajj pilgrims and transmission to household contacts: prospective study. *BMJ*, 325(7360):365-366, 2002.
- Zhu P, van der Ende A, Falush D, Brieske N, Morelli G, Linz B, Popovic T, Schuurman IG, Adegbola RA, Zurth K, Gagneux S, Platonov AE, Riou JY, Caugant DA, Nicolas P, Achtman M. Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(9):5234-5239, 2001.

APÊNDICE II: Análise detalhada de alguns fatores relacionados ao estudo da série histórica da doença meningocócica no RS e da caracterização molecular através do MLST.

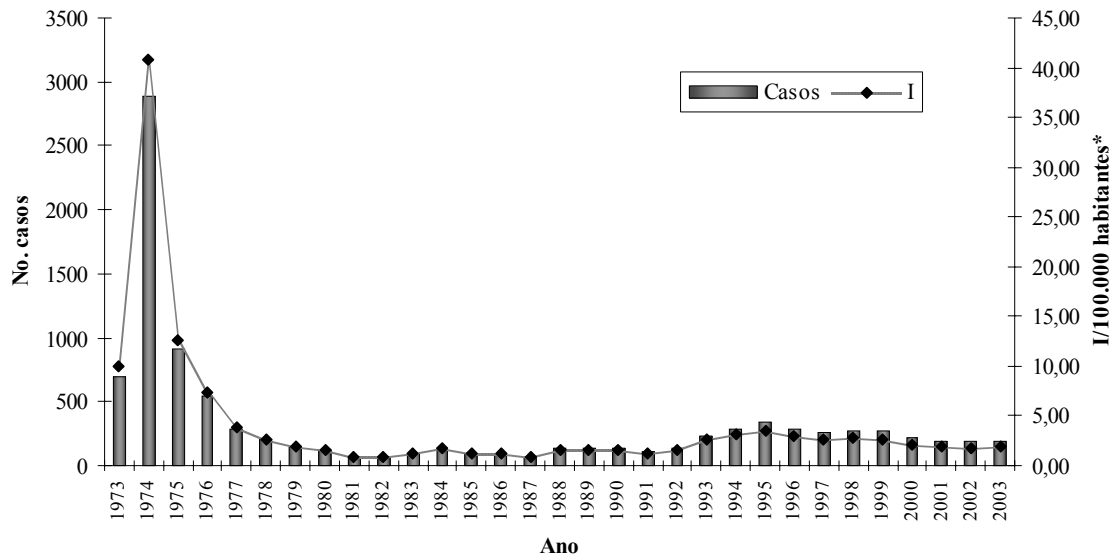


Figura 1. Incidência anual (por 100.000 habitantes) da doença meningocócica de 1973 a 2003 no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *I: incidência anual por 100.000 habitantes.

Tabela 1: Proporção de casos de doença meningocócica durante o período 1995-2003 conforme faixa etária.

Faixa etária	1995			1996			1997			1998			1999			2000			2001			2002			2003		
	(a)	casos	%	I ^a	casos	%	I ^a	casos	%	I ^a	casos	%	I ^a	casos	%	I ^a	casos	%	I ^a	casos	%	I ^a	casos	%	I ^a	casos	%
<1	71	21,19	37,59	50	17,30	29,96	67	25,48	39,60	52	19,33	30,40	62	23,13	35,85	57	25,91	33,26	44	23,04	25,35	41	22,28	23,39	46	23,83	25,97
01-04	126	37,61	16,81	101	34,95	14,85	85	32,32	12,33	92	34,20	13,20	85	31,72	12,07	62	28,18	9,06	63	32,98	9,09	48	26,09	6,86	53	27,46	7,50
05-09	49	14,63	4,94	43	14,88	4,87	37	14,07	4,13	40	14,87	4,42	40	14,93	4,37	31	14,09	3,49	28	14,66	3,12	42	22,83	4,63	23	11,92	2,51
10-14	33	9,85	3,47	35	12,11	3,67	22	8,37	2,28	20	7,43	2,05	25	9,33	2,54	28	12,73	3,07	7	3,66	0,76	16	8,70	1,72	15	7,77	1,59
15-19	26	7,76	3,09	21	7,27	2,36	14	5,32	1,55	18	6,69	1,98	15	5,60	1,63	11	5,00	1,14	12	6,28	1,23	11	5,98	1,11	18	9,33	1,80
20-29	13	3,88	0,77	15	5,19	0,97	15	5,70	0,95	18	6,69	1,13	15	5,60	0,93	9	4,09	0,55	10	5,24	0,61	14	7,61	0,84	12	6,22	0,72
30-39	4	1,19	0,27	9	3,11	0,57	8	3,04	0,50	7	2,60	0,44	12	4,48	0,74	3	1,36	0,19	13	6,81	0,80	3	1,63	0,18	11	5,70	0,67
40-49	2	0,60	0,19	12	4,15	1,00	6	2,28	0,49	10	3,72	0,81	8	2,99	0,64	7	3,18	0,51	5	2,62	0,36	2	1,09	0,14	7	3,63	0,50
50-59	4	1,19	0,54	1	0,35	0,13	3	1,14	0,38	7	2,60	0,87	3	1,12	0,37	7	3,18	0,76	3	1,57	0,32	3	1,63	0,32	4	2,07	0,42
≥60	7	2,09	0,82	2	0,69	0,21	6	2,28	0,64	5	1,86	0,52	3	1,12	0,31	5	2,27	0,47	6	3,14	0,56	4	2,17	0,37	4	2,07	0,37
Total	335	100	3,50	289	100	3,00	263	100	2,69	269	100	2,73	268	100	2,69	220	100	2,16	191	100	1,85	184	100	1,77	193	100	1,84

^aIncidência por 100 000 habitantes.

Tabela 2. Incidência anual (por 100.000 habitantes) da DM de acordo com o sexo.

sexo/ano	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Média de I*
Homens	3.52	3.44	3.08	2.86	3.00	2.26	1.96	1.86	2.23	2.69±0.63
Mulheres	3.47	2.55	2.32	2.51	2.37	2.02	1.75	1.68	1.46	2.24±0.61

*Incidência/100.000 habitantes.

Tabela 3. Variação gênica nos loci analisados pelo MLST dos 57 isolates e dos 19 controles comparada àquela dos 107 isolados mundiais durante a padronização do MLST (Maiden *et al.*, 1998).

Locus	Tamanho (pb)	57 isolados do RS			107 isolados mundiais		
		No. de alelos	No. de sítios polimórficos	dn/ds	No. de alelos	No. de sítios polimórficos	dn/ds
<i>abcZ</i>	433	9	44	0,0909	15	75 (17.4)	0.050
<i>adk</i>	465	6	10	0,0257	10	17 (3.7)	0.020
<i>aroE</i>	490	7	119	0,3147	18	166 (34.0)	0.293
<i>fumC</i>	465	7	23	0,0322	19	38 (8.2)	0.024
<i>gdh</i>	501	6	26	0,0460	16	28 (5.6)	0.050
<i>pdhC</i>	480	6	60	0,0792	24	80 (16.7)	0.070
<i>pgm</i>	450	6	44	0,1351	21	77 (17.0)	0.121

APÊNDICE III: Alinhamento de 27 seqüências do gene Opa utilizadas para o desenho dos primers na padronização do VSS-PCR.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

AF001203      -----
U37257       -----
U77881       -----
X63108       -----
AF016292     -----
U03405       -----
AF001201     -----
U03410       -----
AF001202     -----
AF016290     -----
U03406       -----
U03412       -----
U03409       -----
U03411       -----
AF016289     -----
X63111       -----
AF016287     -----
AF016291     -----
AF031334     -----
U03408       -----
U03404       GGCTTCAGCACCTTAGAGAATCGTTCTCTTTTTTGTTCATCCGCTATATTGTGTTGAAAC 60
AF001204     -----
AF016285     -----
AF016286     -----
U37255       -----
X63110       -----ATTGTGTTGAAAC 13
X63109       -----

```

```

AF001203      -----
U37257       -----
U77881       -----
X63108       -----
AF016292     -----
U03405       -----
AF001201     -----
U03410       -----
AF001202     -----
AF016290     -----
U03406       -----
U03412       -----
U03409       -----
U03411       -----
AF016289     -----
X63111       -----
AF016287     -----
AF016291     -----
AF031334     -----
U03408       -----
U03404       ATCGCCCCAAACCTGATATAGTCCGCTCCTGCAACATCATTGAAAATCGTTCTTTTTAAT 120
AF001204     -----
AF016285     -----
AF016286     -----
U37255       -----
X63110       ATCGCCCCAAACCCGATATAATCCGCCCTTGAACCATCAGTGAAAATCGTTCTTTTTAAT 73
X63109       -----

```

```

AF001203      -----
U37257       -----CCCCAAAAACCTTCTC 17
U77881       -----CCCCAAAAACCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTC 48
X63108       -----CCCCAAAAACCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTC 37
AF016292     -----
U03405       -----

```

AF001201 -----
 U03410 -----
 AF001202 -----
 AF016290 -----
 U03406 -----
 U03412 -----
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 -----
 X63111 ----- CCCCCAAAAAAC 13
 AF016287 -----
 AF016291 -----
 AF031334 -----
 U03408 -----
 U03404 CAGTTAAAACCGAATACGGAGTCGAAAATGAATCCAGCCCCAAAAACCTTCTCTTCTC 180
 AF001204 -----
 AF016285 -----
 AF016286 -----
 U37255 ----- CCCCCAAAAACCTTCTCTTCTC 23
 X63110 CAGTTAAA-CCGAATACGGAGTCGAAAATGAATCCAGCCCCAAAAACCTTCTCTTCTC 132
 X63109 ----- CCCCCAAAAACCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTC 32

AF001203 ----- CCGCAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 28
 U37257 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 77
 U77881 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 108
 X63108 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 97
 AF016292 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 U03405 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 AF001201 ----- CCGCAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACGG 28
 U03410 -----
 AF001202 ----- CCGCAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 28
 AF016290 ----- GCAAGTGAAGACAG 14
 U03406 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 U03412 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 X63111 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACGG 73
 AF016287 ----- GCAAGTGAAGACAG 14
 AF016291 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 AF031334 ----- GCAAGTGAAGACGGCAGCCG 20
 U03408 -----
 U03404 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACGG 235
 AF001204 ----- C-----CGCAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACGG 28
 AF016285 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 AF016286 ----- GCAAGTGAAGACGG 14
 U37255 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 78
 X63110 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 192
 X63109 TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTTCCGAGCGCAGGCGGCAAGTGAAGACAG 92

AF001203 CGGGCAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 88
 U37257 CGGGCAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 137
 U77881 CGGGCAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 168
 X63108 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 157
 AF016292 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 U03405 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 AF001201 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 88
 U03410 -----
 AF001202 CGGGCAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 88
 AF016290 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 U03406 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 U03412 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 X63111 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 133
 AF016287 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 AF016291 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 AF031334 CAGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCACAATTA 80
 U03408 -----
 U03404 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 295
 AF001204 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 88
 AF016285 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74
 AF016286 CAGCCGAGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 74

U37255 CGGGCACGGCCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 138
 X63110 CGGGCACGGCCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 252
 X63109 CAGCCGACGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGCATTACCCA 152

AF001203 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 142
 U37257 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 191
 U77881 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 222
 X63108 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 211
 AF016292 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 U03405 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATCT 128
 AF001201 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 142
 U03410 -----
 AF001202 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 142
 AF016290 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 U03406 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 U03412 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 X63111 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 187
 AF016287 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 AF016291 CGATTATCCGAAACCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 AF031334 TCCGGAACCAACCGGTGCAACAAAGACAAA-----ATAAGCACAGTAAGCGATTATTT 134
 U03408 -----
 U03404 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 349
 AF001204 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 142
 AF016285 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 AF016286 CGATTATCCGCAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 128
 U37255 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 192
 X63110 CGATTATCCGAAAGCAACCGGTGCAAACAAC-----ACAAGCACAGTAAGCGATTATTT 306
 X63109 CGATTATCCGAAACCAACCGGTACAGACAAAAGACAAAATAAGCACAGTAAGCGATTATTT 212

Primer forward LB01

AF001203 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 202
 U37257 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 251
 U77881 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 282
 X63108 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGAGTGTGTCAGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 271
 AF016292 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGACTTCCGGCGA 188
 U03405 CAGAAACATCC**GTACGCATTCCATCCAC**CTCGGGTGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 188
 AF001201 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 202
 U03410 -----
 AF001202 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTATGATTTCCGGCGG 202
 AF016290 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTATGATTTCCGGCGG 188
 U03406 CAGAAACATCC**GTACGCATTCCATCCAC**CTCGGGTGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 188
 U03412 CAGAAACATCC**GTACGCATTCCATCCAC**CTCGGGTGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 188
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGG 188
 X63111 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGAGTGTGTCAGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 247
 AF016287 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGAGTGTGTCAGTCCGGCTACGATTTCCGGCGG 188
 AF016291 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGACTTCCGGCGG 188
 AF031334 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 194
 U03408 -----
 U03404 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 409
 AF001204 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGA 202
 AF016285 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTATGATTTCCGGCGG 188
 AF016286 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTATGATTTCCGGCGG 188
 U37255 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGG 252
 X63110 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGG 366
 X63109 CAGAAACATCC**GTGCGCATTCCATCCAC**CCCCGGGTGTCGGTCCGGCTACGATTTCCGGCGG 272

AF001203 CTGGAGAATAG**CGGCAGATTATGCCAGTT**TACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 262
 U37257 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 311
 U77881 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 342
 X63108 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 331
 AF016292 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 248
 U03405 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 248
 AF001201 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 262
 U03410 -----GCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 47
 AF001202 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 262
 AF016290 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 248
 U03406 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 248
 U03412 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 248
 U03409 -----GCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 38
 U03411 -----GCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTGT 47

AF016289 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCGGT 248
 X63111 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTATAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCGGT 307
 AF016287 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAGCAACAATAAATATTCGGT 248
 AF016291 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACGCAACAATAAATATTCGGT 248
 AF031334 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTATTTCTAA 254
 U03408 - - - -AGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTATTTCTAA 56
 U03404 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTATTTCTAA 469
 AF001204 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTCTTCTAC 262
 AF016285 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTCTTCTAC 248
 AF016286 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTCTTCTAC 248
 U37255 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTCTTCTAC 312
 X63110 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTCTTCTAC 426
 X63109 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAAAAGAAAGTAATTATTCGGT 332

***** * * * * *

Primer forward LB02

AF001203 CAACACAAAAGA - - - -GTTGGAAAACAAGCATAACAAT - - -AAGAAAGACCTGAAGAC 313
 U37257 CAACACAAAAGA - - - -GTTGGAAAACAAGCATAACAAT - - -AAGAAAGACCTGAAGAC 362
 U77881 CAACACAAAAGA - - - -GTTGGAAAACAAGCATAACAAT - - -AAGAAAGACCTGAAGAC 393
 X63108 CAACACAAAAGA - - - -GTTGGAAAACAAGCATAACAAT - - -AAGAAAGACCTGAAGAC 382
 AF016292 AAACACAAAAGA - - - -GTTGGAAAACAAGCATAACAAT - - -AAGAAAGACCTGAAGAC 299
 U03405 CAACACAAAAGAATGTGCAGGTGAATAAAAGCAATGGCAAC - - -AGGCAAGACCTGAAGAC 305
 AF001201 AAACACAAAAGAGGTGCAAAAGAAACAATAGCAATGGCACCACCTGGAAGAAGACTGAAGAC 322
 U03410 CAACACAAAAGAGGTGCTAAGC - - -ATAGCAATGGCAAC - - -TGGCAAGAAGACTGAAGAC 101
 AF001202 CAACACAAAAGAGGTGGAAGAAGAAACAATACCAGTGGCAAC - - -TGGAAAGAAGACTGAAGAC 319
 AF016290 CAACACAAAAGAGGTGGAAGAAGAAACAATACCAGTGGCAAC - - -TGGAAAGAAGACTGAAGAC 305
 U03406 CAACACAAAAGAATGTGCAGGTGAATAAAAGCAATGGCAAC - - -AGGCAAGACCTGAAGAC 305
 U03412 CAACACAAAAGAATGTGCAGGTGAATAAAAGCAATGGCAGC - - -AGGCAAGACCTGAAGAC 305
 U03409 CAACACAAAAGAGTTGG - - -TAAACAC - AGCA - TAAACAAT - - -AAGAAAGACCTGAAGAC 89
 U03411 CAACACAAAAGAGGTGC - - -TAAGACATAGCAATGGCAAC - - -TGGCAAGAAGACTGAAGAC 101
 AF016289 TAAACACAAAAGAGTTGCAAAAACAATAGCAGTGGCAGTGCATC - - -TGGCAAGAAGACTGAAGAC 305
 X63111 CAACACAAAAGAGTTGCAAGAACAATAGCAGTGGCAGTGCATC - - -TGGCAAGAAGACTGAAGAC 364
 AF016287 CAACACAAAAGAGTTGAAAGAAAAC - - - - -GCAAC - - -AGGAAAGACCTGAAGAC 299
 AF016291 CAACACAAAAGAGTTGCAAGAACAAGGAGCATGGCAAC - - -TGGATAGAAGACTGAAGAC 305
 AF031334 AAAAGTTACTGAATT - - - -TAAACAC - CAAAACGGCAAC - - -AAACAAGAAGACAAAAC 305
 U03408 AAAAGTTACTGAATT - - - -TAAACAC - CAAAACGGCAAC - - -AAACAAGAAGACAAAAC 107
 U03404 AAAAGTTACTGAATT - - - -TAAACAC - CAAAACGGCAAC - - -AAACAAGAAGACAAAAC 520
 AF001204 TAA - - -TACAGAAA - - - -TAGCGAGACTCAACAGAACC - - -GCATAAAGAT - TGA AAC 310
 AF016285 TAAA - - -AAAGTTAC - - - -TGAAGAG - ATAAACAACAAC - - -TACAAAGAAACCCAAAC 296
 AF016286 TAAA - - -AAAGTTAC - - - -TGAAGAG - ATAAACAACAAC - - -TACAAAGAAACCCAAAC 296
 U37255 TAAA - - -AAAGTTAC - - - -TGAAGAT - ATAGCAGACAAC - - -TACAAAGAAACCCAAAC 360
 X63110 TAAA - - -AAAGTTAC - - - -TGAAGAT - ATAGCAGACAAC - - -TACAAAGAAACCCAAAC 474
 X63109 CAACATAAAAAGGG - - - -GAGAGAA - ACCCAGGACAAT - - -AGGGAAGAAGACTGAAGAC 383

** * * * *

AF001203 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 373
 U37257 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 422
 U77881 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 453
 X63108 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 442
 AF016292 GGAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 359
 U03405 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTGTCCGCCGTTA 365
 AF001201 GGAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 382
 U03410 AGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 161
 AF001202 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 379
 AF016290 GGAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
 U03406 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTGTCCGCCATTTA 365
 U03412 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTGTCCGCCGTTA 365
 U03409 GGAAAATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 149
 U03411 AGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 161
 AF016289 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
 X63111 GGAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 424
 AF016287 GGAAAATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 359
 AF016291 GGAAAATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
 AF031334 AGAACATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
 U03408 AGAACATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 167
 U03404 AGAACATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 580
 AF001204 AGGACATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 370
 AF016285 AAAACATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 356
 AF016286 AAAACATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTGTCCGCCATTTA 356
 U37255 AGAACATCAAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 420
 X63110 AGAACATCAAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 534
 X63109 GGAAAATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 443

* * * * *

Primer reverse LB03

AF001203 CGATTTCAAACCTCAACGATAAAT - - - - -TCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 424
 U37257 CGATTTCAAACCTCAACGATAAAT - - - - -TCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 473

U77881 CGATTTCAAACCTCAACGATAAAT-----TCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 504
X63108 CGATTTCAAACCTCAACGATAAAT-----TCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 493
AF016292 CGATTTCAAACCTCAACGATAAAT-----TCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 410
U03405 CGATTTCAATACCGGTTCCCGCT-----TCAAACCTATGTAGCGGTGCGCGTTCGC 416
AF001201 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 442
U03410 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 221
AF001202 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 439
AF016290 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 425
U03406 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 425
U03412 CGATTTCAAACCTCAACGATAAAT-----TCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 416
U03409 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 209
U03411 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 221
AF016289 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 425
X63111 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 484
AF016287 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 419
AF016291 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 425
AF031334 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 416
U03408 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 218
U03404 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 631
AF001204 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 421
AF016285 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 407
AF016286 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 407
U37255 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 471
X63110 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTC-----AAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 585
X63109 CGATTTCAAACCTCAACGATAAATTCGATAAATTCAAACCTATATCGGTGCGCGCGTTCGC 503
***** * * * * * ***** * * * * * *****

Primer reverse LB04

AF001203 CTACGGACACGTCAGACACAGCATCGATTTCGACCAAAAAACAACAGAGGTTGTTACCTC 484
U37257 CTACGGACACGTCAGACACAGCATCGATTTCGACCAAAAAACAACAGAGGTTGTTACCTC 533
U77881 CTACGGACACGTCAGACACAGCATCGATTTCGACCAAAAAACAACAGAGGTTGTTACCTC 564
X63108 CTACGGACACGTCAGACACAGCATCGATTTCGACCAAAAAACAACAGAGGTTGTTACCTC 553
AF016292 CTACGGACACGTCAGACACAGCATCGATTTCGACCAAAAAACAACAGAGGTTGTTACCTC 470
U03405 CTACGGACATGTTAGACACAGCATCGATTTCGACCAAAAAACAACAAATGTTCTTACCGT 476
AF001201 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCAG 502
U03410 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCAG 281
AF001202 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCCT 499
AF016290 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCCT 485
U03406 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCCT 485
U03412 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCCT 476
U03409 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCCT 269
U03411 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTTTTCCT 281
AF016289 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTACTTTTTCAG 485
X63111 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTACTTTTTCAG 544
AF016287 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTACTTTTTCAG 479
AF016291 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTACTTTTTCAG 485
AF031334 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCAC 476
U03408 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCAC 278
U03404 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCCTC 691
AF001204 CTACGGATACGTTAAGCATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCCTC 481
AF016285 CTACGGACACGTTAAACATCAAGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCCTC 467
AF016286 CTACGGACACGTTAAACATCAAGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTATTTACCCTC 467
U37255 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCCTC 531
X63110 CTACGGACACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCAGTGGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCCTC 645
X63109 CTACGGGACGTTAAACATCAGGTTTCATTTCGTTGAGAAAAGAAACCACGACTGTTTACCCTC 563
***** * * * * * ***** * * * * * *****

Primer reverse LB06

AF001203 CACCCATGGTGGTGTGCTGACACAAAACCTA-CGATTTATAATGGGGAAAGTACGC--AAAA 541
U37257 CACCCATGGTGGTGTGCTGACACAAAACCTA-CGATTTATAATGGGGAAAGTACGC--AAAA 590
U77881 CACCCATGGTGGTGTGCTGACACAAAACCTA-CGATTTATAATGGGGAAAGTACGC--AAAA 621
X63108 CACCCATGGTGGTGTGCTGACACAAAACCTA-CGATTTATAATGGGGAAAGTACGC--AAAA 610
AF016292 CTCCCATGCT---CCTGGCACAGCACCTA-CGATTTATAATGTGCCAAAAGTACGC--AAAA 524
U03405 CCCCAACAATATCTCTGGCGGAACACCTA-CGATTTATAATCAGGGAAGTACGC--AAGA 533
AF001201 TAAACCAAGTGGTAGCACTACAAGCCAGGCGAGATC---CCAAGTTTGGTTAC--CAAA 557
U03410 TAAATCACAAG---GCTCTACAGCCAGGCAAGATC---CCAAGTTTGGTTAC--CAAA 333
AF001202 TAAACCATCGAAAGGTGCTACAGAGCCAGGCAAGATC---CCAAGTTTGGTTAC--CAAA 554
AF016290 TAAACCATCGAAAGGTGCTACAGAGCCAGGCAAGATC---CCAAGTTTGGTTAC--CAAA 540
U03406 TAAACCAACGAAAGGTGCTACACAGCCAGGCAAGCTTGTATCAGGTTCCGACCCC--CAAA 543
U03412 TAAACCAACGAAAGGTGCTACACAGCCAGGCAAGCTTGTATCAGGTTCCGACCCC--CAAA 534
U03409 TAAACCAACGAAAGGTGCTACACAGCCAGGCAAGCTTGTATCAGGTTCCGACCCC--CAAA 327
U03411 TAAACCAACGAAAGGTGCTACACAGCCAGGCAAGCTTGTATCAGGTTCCGACCCC--CAAA 339
AF016289 TCCACCAGCGCAAGGCGCTACAGTCCAGGCAAAATCGTACAAGTTCCGACCAA--CAAA 543
X63111 TAAACCAGGGTTGGCGTTACAGAGCCAGGCAAGATCGTAGAAGTTCCGACCCC--CAAA 602
AF016287 TGACCAACGGGAGACGCTACAGTGGGAGGCATATCCAGAGAGACCGAGTAG--CAAA 537
AF016291 TACCAACGAAAGGCGCTAAAGTTGGAGGCACGATCACACACAATTCGATGAG--CAAA 543
AF031334 TAA--CAATGGAGG-----CCCTGTCCACAAG-----GTCCGACCCC--CAAA 516

U03408 TAA -- CAATGGAGG ----- CCCTGTCCACAAG ----- -GTCCGACCCC -- CAAA 318
 U03404 TAAACCAACGAAAGGTCTACACAGCCAGCCAA GCTTGTATCAGGTCGACCCC -- CAAA 749
 AF001204 TAAACCAAATGAGG ----- CCCTGTCAAAGAA G ----- -GTCCGACCCC -- CAAA 524
 AF016285 TAAACCAACGCAAGCGCTCCACAGGAGGCTCTATTATAC -- -AACTGATCCCAGCAAAA 525
 AF016286 TAAACCAAAGAACGGCTCTCCACAGGAGGCCCCATTATAC -- -AACTGATCCCAGCAAAA 525
 U37255 TAAACCGACGGCAACCTCTCCACAGGAGGCCCCATTATAC -- -AACTGATCCCAGCAAAA 589
 X63110 TAAACCGACGGCAACCTCTCCACAGGAGGCCCCATTATAC -- -AACTGATCCCAGCAAAA 703
 X63109 TAAACCGACGGCAACCTCTCCACAGGAGGCCCCATTATAC -- -AACTGATCCCAGCAAAA 621

Primer reverse LB05 * *

Primer reverse LB06

AF001203 C -- GCCTATCACGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 599
 U37257 C -- GCCTATCAC - AAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 647
 U77881 C -- GCCTATCACGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 679
 X63108 C -- GCCTATCACGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 668
 AF016292 C -- GCCTATCACGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTAGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 582
 U03405 C -- GCCTATCACGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 591
 AF001201 CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 617
 U03410 CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 393
 AF001202 CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCACCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 614
 AF016290 CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 600
 U03406 CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 603
 U03412 CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTT ----- 576
 U03409 CCTGCCTATCACGAAAGCAAC ----- 348
 U03411 CCTGCCTATCACGAAAGCA ----- 358
 AF016289 CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGTATCAGCAGCTTAGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 603
 X63111 CCTCCCTATCACGAAAGCAACAGTATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 662
 AF016287 CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGGCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 597
 AF016291 CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 603
 AF031334 CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 576
 U03408 CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCC ----- 372
 U03404 CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 809
 AF001204 CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 584
 AF016285 CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 585
 AF016286 CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 585
 U37255 CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 649
 X63110 CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 763
 X63109 CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTGTCGCCGGTGTGTC 681
 * * * * * * * * *

AF001203 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 659
 U37257 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 707
 U77881 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 739
 X63108 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 728
 AF016292 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 642
 U03405 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACTTTAGACACCCGGATACCGTACCACAAA ----- 644
 AF001201 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 677
 U03410 GGTTTCGACATCACGCC - AAGCTGACCTTGACAC ----- 427
 AF001202 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 674
 AF016290 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 660
 U03406 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACTTTAGACACCCGGATACCGTACCACAACCTGGGGA 663
 U03412 -----
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTTAGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 663
 X63111 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTACCACAACCTGGGGA 722
 AF016287 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 657
 AF016291 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 663
 AF031334 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 636
 U03408 -----
 U03404 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 869
 AF001204 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 644
 AF016285 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 645
 AF016286 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 645
 U37255 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTACCACAACCTGGGGA 709
 X63110 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTACCACAACCTGGGGA 823
 X63109 GGTTTCGACATCACGCCAAGCTGACCTTGACACCCGGATACCGTTACCACAACCTGGGGA 741

Primer reverse LB07

AF001203 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTGGGCATGCGCTACCACTTC 719
 U37257 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTGGGCATGCGCTACCACTTC 767
 U77881 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTGGGCATGCGCTACCACTTC 799
 X63108 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTGGGCATGCGCTACCACTTC 788
 AF016292 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTGGGCATGCGCTACCACTTC 702
 U03405 -----
 AF001201 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTGGGCATGCGCTACCACTTC 737

U03410 -----
 AF001202 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCACTTC 734
 AF016290 CGCTTGGAAAACACCCGATTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCGCTTC 720
 U03406 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGCTCATTGG**----- 706
 U03412 -----
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCACTTC 723
 X63111 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCGCTTC 782
 AF016287 CGCTTGGAAAACACCCGATTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCGCTTC 717
 AF016291 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCGT**TGCGCTACCGCTTC 723
 AF031334 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCACTTC 696
 U03408 -----
 U03404 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCC----- 896
 AF001204 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCGT**TGCGCTACCACTTC 704
 AF016285 CGCTTG-AAAACACCCGATTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCGCTTC 704
 AF016286 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCGCTTC 705
 U37255 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCGCTTC 769
 X63110 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCGCTTC 883
 X63109 CGCTTGGAAAACACCCGCTTCAAACCCA**CGAAGTCTCATTGGGCA**TGCGCTACCACTTC 801

AF001203 TGA----- 722
 U37257 TGATTCCTC----- 775
 U77881 TGA----- 802
 X63108 TGATTCCTCCGATACCGATGCGCTCTGAACCTTCAGACGATTTTTGATTTACCTGCCGTT 848
 AF016292 TGA----- 705
 U03405 -----
 AF001201 TGA----- 740
 U03410 -----
 AF001202 TGA----- 737
 AF016290 TGA----- 723
 U03406 -----
 U03412 -----
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 TGA----- 726
 X63111 TGA----- 785
 AF016287 TGA----- 720
 AF016291 TGA----- 726
 AF031334 TGA----- 699
 U03408 -----
 U03404 -----
 AF001204 TGA----- 707
 AF016285 TGA----- 707
 AF016286 TGA----- 708
 U37255 TGATTCCTC----- 778
 X63110 TGATTCCTCCGATACCGATGCGCTCTGAACCTTCAGACGATTTTTGATGCACCTGCCGTTT 943
 X63109 TGA----- 804

AF001203 -----
 U37257 -----
 U77881 -----
 X63108 TACAGGCG----- 856
 AF016292 -----
 U03405 -----
 AF001201 -----
 U03410 -----
 AF001202 -----
 AF016290 -----
 U03406 -----
 U03412 -----
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 -----
 X63111 -----
 AF016287 -----
 AF016291 -----
 AF031334 -----
 U03408 -----
 U03404 -----
 AF001204 -----
 AF016285 -----
 AF016286 -----
 U37255 -----

X63110
X63109

ACAGACGCGGGGCGGGCGTGGG 965
