

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

TIPAGEM MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE
SURTOS RELACIONADOS A ISOLADOS DE *Neisseria*
***meningitidis* DO RIO GRANDE DO SUL**

LUCIANA DE SOUZA NUNES

Porto Alegre, setembro de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

TIPAGEM MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE
SURTOS RELACIONADOS A ISOLADOS DE *Neisseria*
***meningitidis* DO RIO GRANDE DO SUL**

LUCIANA DE SOUZA NUNES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, setembro de 2009.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e no Centro de Biotecnologia da UFRGS. O projeto recebeu financiamento do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) Edital 07/2006 da FEPPS e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*A vida é plena de possibilidades que nos desafiam a
cada dia a correr risco, tentar coisas novas, ver as
coisas com novos olhos. Porque é só quando tentamos
que descobrimos do que somos capazes.*

Autor desconhecido

*Dedico este trabalho ao meu amor, Rafael, e a
minha família que sempre me apoiou.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Arnaldo Zaha, pela confiança que demonstrou em meu trabalho, a quem tenho enorme respeito e admiração pelo exemplo de pesquisador e pessoa, muito obrigada pela oportunidade e carinho.

A incansável, admirável e eterna companheira de grupo Ludmila Baethgen, pelos inesquecíveis ensinamentos e por ter me recebido com o carinho de uma mãe, me acolhendo no grupo das Meningites e guiando em todos os momentos. Muito obrigado por me ensinar a ser um pouco mais metódica e tranquila.

A Dra. Maria Lúcia Rossetti, pela oportunidade que me proporcionou. Muito obrigada pela confiança e apoio.

Às parceiras de trabalho e de grupo, Luciana Weidlich, Cecília Klein, e Camile Moraes, principalmente pela grande ajuda no início das minhas atividades no laboratório, sempre disponíveis, pela amizade e pelo companheirismo profissional.

A Silvia Rios pela colaboração integral no desenvolvimento deste trabalho, e a todos os funcionários da Seção de Bacteriologia.

A Geovana Michael da Faculdade de Veterinária que foi primordial e paciente nos experimentos de PFGE.

A minha quase irmã Francieli Rosso, por todos os momentos de desabafo, pelo ombro oferecido, pelas longas conversas antes de dormir, pelos sonhos, planos e principalmente por fazer parte da minha vida, muito obrigada por sua grande amizade.

À Andréia Valim por ter me guiado e pelo grande incentivo inicial nesta decisão.

Às colegas Lia, Patrícia, Fernanda, Raquel e Andrezza pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, seja colocando a “mão na massa” ou tornando o ambiente de trabalho agradável e divertido.

Aos colegas Taís, Martin, Ana, Paulo, Aline e Karina por serem tão prestativos, pelos momentos de descontração e pelas palavras de apoio.

As ICs mais admiráveis do laboratório, Edi, Carol e Daiani, muito obrigado por todos os momentos de distração.

Pessoal do Lab 206 e 210, obrigada pelos momentos de descontração, pela grande dedicação ao laboratório, pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do CDCT, pelo estímulo, conversas e disponibilidade em todos os momentos.

Ao PPG, aos professores, funcionários, em especial à Silvinha e ao Luciano, pela dedicação que têm para com os alunos, assim como, ao CNPq pela oportunidade da bolsa de estudos.

À minha família, pelo apoio constante, em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram e deram apoio em tudo na minha vida, sempre mostrando o quanto eu era capaz, vocês fazem parte de todo este sonho! Muito obrigada pela oportunidade, suporte e amor incondicional. Ao meu sobrinho Roger e minha sobrinha recém chegada Isadora, obrigada por tornarem nossa família muito mais feliz.

Ao Rafa, pelo companheirismo, compreensão, por incentivar os meus sonhos e pelos momentos juntos, sei que sempre poderei contar com você, muito obrigada por toda dedicação.

E a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	13
“ABSTRACT”	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 MENINGITE MENINGOCÓCICA	15
1.2 CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO	16
1.2.1 <i>Cápsula Polissacarídica</i>	17
1.2.2 <i>Proteínas de membrana externa</i>	19
1.3 SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA	25
1.4 EPIDEMIOLOGIA	26
1.4.1 <i>Distribuição dos sorogrupos</i>	27
1.5 DIAGNÓSTICO DE DM	32
1.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>N. MENINGITIDIS</i>	34
1.7 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>N. MENINGITIDIS</i>	36
1.7.1 <i>Multilocus Enzima-Eletroforese (MLEE)</i>	36
1.7.2 <i>Tipagem de Sequências Multilocus (MLST)</i>	37
1.7.3 <i>Tipagem de Opa por PCR</i>	39
1.7.4 <i>Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)</i>	40
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MANUSCRITO: RAPID MOLECULAR TYPING METHOD FOR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> OUTBREAKS	44
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	75

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS NAS SEÇÕES 1, 2 E 5.....	77
	ANEXOS.....	94
	ANEXO I: ALINHAMENTO DE 27 SEQUÊNCIAS DO GENE <i>OPA</i> UTILIZADAS PARA PROJETAR OS <i>PRIMERS</i> NA PADRONIZAÇÃO DO VSS-PCR. O ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS FOI REALIZADA UTILIZANDO-SE CLUSTAL W (1.83). AS REGIÕES ESCOLHIDAS PARA A DEFINIÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> ESTÃO RESSALTADAS.....	95
	ANEXO II: <i>CURRÍCULO DO AUTOR</i>	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da cápsula polissacarídica de <i>N. meningitidis</i>	18
Tabela 2: Características gerais dos três genomas de <i>N. meningitidis</i>	19

LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO

Table 1: Correlation among MLST and serotyping results and their frequency on 75 <i>N. meningitidis</i> isolates from RS from year 2000 and 2004 to 2008.....	55
Table 2: Discrimination indexes for some <i>N. meningitidis</i> typing methods	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática dos componentes da membrana externa do meningococo.....	17
Figura 2: Esquema do gene <i>opa</i> incluindo as regiões variáveis, assim como a relação dessas seqüências com a estrutura secundária da proteína Opa.....	23
Figura 3: Distribuição global dos sorogrupos de DM.....	27
Figura 4: Roteiro de investigação epidemiológica das meningites.....	31

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figure 1: Dendrogram produced by the software GelCompar of the samples analyzed by PFGE.....	56
Figure 2: Dendrogram produced by the software GelCompar of the samples analyzed by VSS-PCR.....	57
Figure 3: Dendrogram produced by the software GelCompar of the clinical samples analyzed by VSS-PCR.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CIE	Contraímunoeletroforese
CIM	Concentração inibitória mínima
CSF	Fluido cérebro-espinhal
DM	Doença meningocócica
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ET	<i>Electrophoretic Type</i>
kDa	kiloDaltons
LA	Aglutinação em látex
LOS	Lipooligossacarídeo
mAbs	Anticorpos monoclonais
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NST	Não soro-subtipável
NT	Não tipável
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Opa	<i>Opacity proteins</i>
Opc	<i>outer membrane protein class 5 precursor</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pen^I	Suscetibilidade Reduzida a Penicilina
penA	Gene que codifica para proteína ligante de penicilina, PBP2

PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PBP	<i>penicilin-binding protein</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i>
rep-PCR	Reação em cadeia da polimerase de regiões palindrômicas extragênicas repetitivas do genoma
Rmp	<i>Reduction modifiable protein</i>
RNA	RNA ribossomal
SNC	Sistema nervoso central
ST	<i>Sequence Type</i>
tRNA	RNA transportador
VSS-PCR	<i>Variable Site Specific - PCR</i>

RESUMO

A tipagem molecular é importante para vigilância e controle de surtos e epidemias da doença meningocócica, ajudando no desenvolvimento de estratégias preventivas. Os métodos disponíveis para a tipagem de meningococos são muito precisos, mas ainda são de alto custo e demorados para serem aplicados em larga escala, bem como em surtos, especialmente nos países em desenvolvimento. O objetivo deste estudo é padronizar um método de tipagem molecular para caracterização de isolados de *Neisseria meningitidis*, com base na amplificação do gene *opa* por um PCR multiplex, denominado *Variable Site Specific-PCR* (VSS-PCR). Setenta e cinco isolados de meningococo, obtidos do IPB-LACEN/RS, laboratório de referência do Estado do Rio Grande do Sul, foram utilizados para a padronização das condições da PCR e detecção de DNA por VSS-PCR. Os resultados foram comparados com os obtidos na análise utilizando MLST e PFGE. VSS-PCR identificou 51 padrões diferentes de fragmentos, formando 14 clusters, PFGE identificou 35 padrões diferentes de fragmentos, formando 5 clusters e o MLST identificou 24 STs. O poder discriminatório do VSS-PCR foi de 0,984, enquanto que o do PFGE e MLST foi de 0,979 e 0,928, respectivamente. Resistência intermediária ou total à penicilina foi identificada em 14,6% de todos os isolados de meningococo analisados. ST-461 ($p = 0,001$) e ST-32 ($p = 0,042$) demonstraram maior associação com resistência à penicilina, quando comparado a outros STs. Em conclusão, o VSS-PCR mostrou uma resposta acurada para estudos epidemiológicos e um excelente poder discriminatório. Após a sua validação, o teste poderá ser utilizado como um método de triagem para a caracterização dos isolados associados a surtos da doença meningocócica, e distinguir clones associados à resistência total/intermediária à penicilina e distinguir linhagens hiperinvasivas. Esforços estão sendo feitos para explorar a aplicabilidade do VSS-PCR para a tipagem do meningococo diretamente em amostras clínicas.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*, epidemiologia, caracterização molecular.

“ABSTRACT”

Molecular typing is important for surveillance and control of meningococcal disease epidemics and outbreaks, helping in the design of preventive strategies. The methods available for typing of meningococci are very accurate but still very expensive and time consuming to be applied in large scale such as in outbreaks, especially in developing countries. The objective of this study is to standardize a molecular typing method for characterization of *Neisseria meningitidis* isolates, based on the amplification of *opa* genes by a multiplex PCR, denominated Variable Site Specific-PCR (VSS-PCR). Seventy-five meningococcal isolates obtained from the collection of IPB-LACEN/RS, a reference laboratory from Rio Grande do Sul State, were used for the standardization of PCR conditions and DNA detection by VSS-PCR. The results were compared to those obtained in the analysis using MLST and PFGE. VSS-PCR identified 51 different band patterns, included in 14 clusters, PFGE identified 35 different band patterns, included in 5 clusters and MLST identified 24 STs. The discriminatory power of VSS-PCR was 0.984, while for PFGE was 0.979 and for MLST was 0.928. Intermediate or full resistance to penicillin was identified in 14.6% of all meningococci isolates analyzed. ST-461 ($p = 0.001$) and ST-32 ($p = 0.042$) were more likely to be associated with penicillin resistance when compared to other STs. In conclusion, the VSS-PCR method showed an accurate response for epidemiological studies and an excellent discriminatory power. After its validation, the test could be used as a screening method for the characterization of isolates associated with meningococcal disease outbreaks, to distinguish clones associated with full/moderate penicillin resistance and to distinguish hypervirulent lineages. Efforts are being made to explore the applicability of VSS-PCR to type meningococci directly from clinical specimens.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, epidemiology, molecular characterization

1 INTRODUÇÃO

1.1 Meningite meningocócica

A primeira epidemia de meningite meningocócica ocorreu em Genebra em 1805, descrita por Vieusseaux, que resultou em 33 mortes (Vieusseaux, 1805). O agente etiológico *Neisseria meningitidis* foi descrito em 1884 por Machiafava & Celli, pelo método de coloração de Gram (Machiafava & Celli, 1884 *apud* Barroso, 2000). As características bioquímicas da bactéria e seu isolamento em cultura foram descritos em 1887 por Anton Weichselbaum, em Viena (Weichselbaum, 1887 *apud* Schreiber & Mathys, 1991).

Na África, existem relatos de epidemias anteriores ao século XIX, e ainda assim, essa doença continua sendo a maior causa de mortes em algumas regiões do continente africano. Apesar de existirem antibióticos efetivos e vacinas, em 1996 a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou 153.000 casos de meningite, com mais de 16.000 mortes, na região do sub-Saara conhecida como cinturão de meningite (Tikhomirov *et al.*, 1997).

A bactéria causadora desta doença é comumente encontrada na nasofaringe de humanos, colonizando seu epitélio sem causar qualquer sintoma (Schoen *et al.*, 2007). A colonização por espécies patogênicas e não-patogênicas induz uma resposta imune que pode oferecer proteção contra o desenvolvimento da doença. Em um pequeno número de indivíduos, após a colonização, a bactéria pode burlar o sistema imune e invadir a corrente circulatória, alcançando o sistema nervoso central (SNC), causando uma infecção severa e muitas vezes fulminante. Dentre o amplo espectro de doenças causadas por esta bactéria encontramos desde febre e bacteremia até sepse fulminante e meningite (Virji, 2009).

Por ser uma doença contagiosa que pode acometer o paciente e levá-lo à morte em poucos dias ou horas, grupos do mundo inteiro têm se preocupado em estudar a bactéria, a doença e, principalmente, novos métodos de diagnóstico e de tipagem molecular com o objetivo de controlar a incidência desse microrganismo.

1.2 Características do microrganismo

Pertencente à classe β -Proteobacteria e à família *Neisseriaceae*, *N. meningitidis* caracteriza-se por ser um diplococo gram-negativo cujas células coradas aparecem caracteristicamente em forma de rim, com suas superfícies côncavas adjacentes. Quando a bactéria é isolada do sangue ou do líquido em cultura, forma colônias não pigmentadas, não hemolíticas, com tamanho variando de 0,6 a 0,8 micrômetros de diâmetro (Hart & Rogers, 1993; Volk *et al.*, 1996; Arditi & Yogev, 1997; Barroso, 2000).

Assim como os demais membros do gênero, *N. meningitidis* é aeróbia. Entretanto, o crescimento é favorecido em uma atmosfera com 3 a 10% de CO₂, assim como umidade em torno de 50%. A temperatura ideal para o crescimento bacteriano é de 36°C, temperaturas abaixo de 30°C inibem o crescimento e acima de 40°C, a bactéria não sobrevive por mais de 90 minutos (Bier, 1978; Morello *et al.*, 1991; Boslego & Tramont, 1992; Volk *et al.*, 1996; Barroso, 2000).

O meningococo mostra-se 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 (Wilson & Miles, 1964; Barroso, 2000).

1.2.1 Cápsula Polissacarídica

O meningococo, representado esquematicamente na Figura 1, possui uma cápsula polissacarídica que determina os sorogrupos e sua virulência. Atualmente existem 13 sorogrupos identificados: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, 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) (Peltola, 1983; Vedros & Genus, 1984; Andersen, 1989; Morello *et al.*; 1991; Volk *et al.*; 1996; Stephens, 2007).

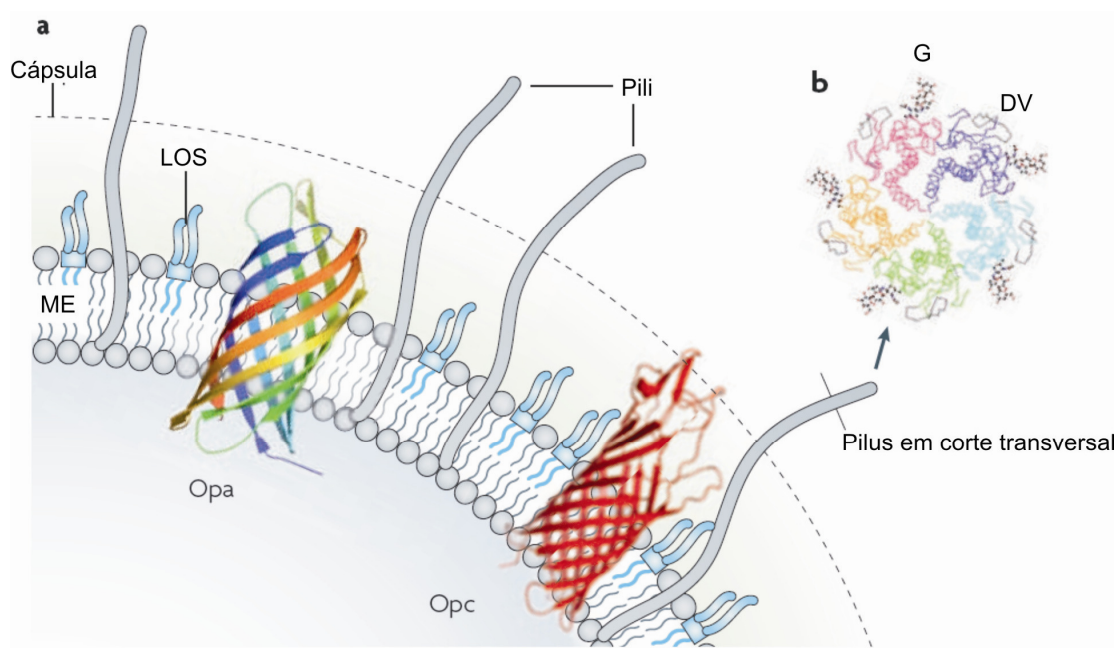


Figura 1: Ilustração esquemática dos componentes da membrana externa (ME) do meningococo. a. Componentes da ME: Cápsula, lipooligossacarídeos (LOS), adesinas de ME (Opa e Opc). b. Representação de corte transversal do Pilus com glicanos (G) e com os domínios variantes (DV). (adaptado de Virji, 2009).

A cápsula polissacarídica da maioria dos sorogrupos tem sido purificada, e a sua composição química nos grupos patogênicos é descrita na Tabela 1, juntamente com sua prevalência. Historicamente, o sorogrupo A tem sido responsável pelas epidemias de meningite meningocócica, enquanto que as endemias ou casos esporádicos dessa doença,

geralmente são atribuídos aos sorogrupos B e C (Bash *et al.*, 1995; Jackson *et al.*; 1995; Ramsay *et al.*, 1997; Connolly & Noah, 1999; Conyn *et al.*, 1999, Schoen *et al.*, 2008). A classificação por sorotipo dos isolados é baseada nas diferenças das proteínas externas à membrana e nos lipooligossacarídeos (LOS). A determinação do sorotipo é importante para estudos epidemiológicos e desenvolvimento de vacinas (Apicella, 1995).

Tabela 1: Composição química da cápsula polissacarídica de *N. meningitidis*.

Cápsula	Estrutura	Prevalência*
A	(α 1-6)- <i>N</i> -acetil-D-manosamina-1-fosfato	África Partes da Ásia Europa Ásia
B	(α 2-8)-ácido <i>N</i> -acetilneuramínico	América do Norte América do Sul Austrália Nova Zelândia Europa Ásia
C	(α 2-9)-ácido <i>N</i> -acetilneuramínico	América do Norte América do Sul Austrália África
W ₁₃₅	6-D-galactose(α 1-4)- ácido <i>N</i> -acetilneuramínico	África
Y	6-D-glicose(α 1-4)- ácido <i>N</i> -acetilneuramínico	América do Norte

*Algumas áreas do mundo as taxas da doença meningocócica foram significativamente menores, as razões para isto não são bem compreendidas. Estas incluem várias partes da América do Sul e Ásia, México e Japão. (Adaptado de Virji, 2009).

Tetellin e colaboradores (2000) descreveram o primeiro genoma do sorogrupo B de *N. meningitidis*, cepa MC58, que apresentou 2.272.351 pares de bases com 51,5% de G+C, como descrito na Tabela 2, e comparativamente com as cepas Z2491 e FAM18 (Parkhill *et al.*, 2000; Mignogna *et al.*, 2005; Bentley *et al.*, 2007). 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 gênica e contribui para a evasão do sistema imune do hospedeiro (Tettelin *et al.*, 2000).

Tabela 2: Características gerais dos genomas de três cepas de *N. meningitidis* seqüenciados até hoje.

Cepa	Z2491	MC58	Fam18
Sorogrupo	A	B	C
MLST sequence type	ST-4	ST-74	ST-11
MLST clonal complex	ST-4 complex/ subgroup IV	ST-32 complex/ET-5 complex	ST-11 complex/ET-37 complex
Tamanho do Genoma (pb)	2.184.406	2.272.351	2.194.961
Conteúdo G +C (%)	51.81	51.53	51.62
rRNA operons	4	4	4
tRNAs	58	59	59

Adaptado de Bentley *et al.*, 2007.

1.2.2 Proteínas de membrana externa

N. meningitidis é circundada por uma membrana composta por lipídios, proteínas de membrana externa (OMPs) e LOS. Além disso, meningococos patogênicos são envolvidos por uma cápsula polissacarídica ligada por esta membrana (van Deuren *et al.*, 2000). A virulência do meningococo está relacionada à expressão das OMPs (Stephens, 2007).

Para o meningococo, o mais completo conjunto de dados está disponível para os genes que codificam as OMPs. As OMPs do meningococo têm atraído estudos por duas razões principais: são componentes potenciais para vacinas e também são alvos para a sorotipagem e sorosubtipagem. A caracterização das OMPs do meningococo de acordo

com seu peso molecular, comportamento em SDS-PAGE, suscetibilidade a enzimas proteolíticas e mapeamento peptídico resultou na diferenciação de cinco classes estruturais: classes 1, 2, 3, 4 e 5, que apresentam pesos moleculares respectivamente de 45-47 kDa, 40-42 kDa, 37-39 kDa, 32-34 kDa e 26-29 kDa (Tsai *et al.*, 1981).

Todas as cepas de meningococo possuem proteínas de classe 2 ou 3, também denominadas PorB, que possibilitam determinar a sorotipagem. Essas classes de proteínas funcionam como poros seletivos para ânions, através dos quais solutos hidrofílicos atravessam a membrana externa, por um processo semelhante à difusão (Dorset *et al.*, 1984). Proteínas de classe 4, também denominada Rmp (*Reduction modifiable protein*), promovem a ligação da membrana externa com peptidoglicano e interação com porinas, estão presentes em todas as cepas de meningococo e mostram-se estruturalmente conservadas em diferentes cepas (Frasch *et al.*, 1986).

Proteínas da classe 1 também denominadas PorA e da classe 5 denominada Opa (*opacity associated protein*) e Opc (*outer membrane protein class 5 precursor*) estão presentes na maioria das cepas de meningococo. As proteínas de classe 1 funcionam como poros seletivos para cátions (Dorset *et al.*, 1984). Estudos revelam a relação entre essa classe protéica com a patogênese e a aderência do meningococo em tecidos humanos (Frasch *et al.*, 1985).

Entretanto, a modulação da adesão e invasão pode fortemente influenciar a transmissão do meningococo. Transmissibilidade e virulência são dois critérios proeminentes na patogênese de *N. meningitidis* e podem ser avaliados através de abordagens moleculares (Taha & Alonso 2008).

Além da cápsula polissacarídica, isolados de meningococo apresentam outra estrutura de superfície, o pilus (ou fímbria) que também desempenha um importante papel em sua patogenicidade. Estas estruturas são compostas por proteínas filamentosas com subunidades repetidas e idênticas (pilinas) de aproximadamente 17 a 21 kDa (Dalrymple & Mattick, 1987). Esta estrutura tem a função de aderir a bactéria ao epitélio da nasofaringe humana, contribuindo também para o seu tropismo e efeito citopático. Os danos causados pelo patógeno são proporcionais ao nível de aderência, mediada pela variabilidade estrutural do pilus (Kallstrom *et al.*, 1997; Virji, 1998; Nassif, 1999; Tzeng & Stephens, 2000)

As *pili* são projeções filamentosas da superfície celular. O meningococo expressa duas diferentes classes de pili: classe 1 e classe 2, que são antigenicamente e estruturalmente distintas e que estão envolvidas no processo de adesão. A biossíntese da formação do pilus e sua translocação através do envelope celular têm sido motivos de estudo para melhor compreensão desse processo (Poolman *et al.*, 1995). O pilus facilita a fixação inicial do meningococo às células humanas e seu movimento na superfície epitelial, e são necessárias para a transformação genética (Mers & So, 2000). Porinas estão envolvidas na interação com a célula do hospedeiro e agem como alvos para anticorpos bactericidas (Tzeng & Stephens, 2000; Stephens, 2007).

LOS são importantes fatores de virulência envolvidos na sinalização inflamatória, com estreita relação com a aderência e colonização, sendo um mediador chave da patogênese de sepse fulminante e meningite (Virji *et al.*, 1995). Estruturas capsulares e LOS do meningococo do sorogrupo B são semelhantes com oligômeros α -(2→8) do ácido siálico, presentes nos glicopeptídios humanos e no tecido cerebral de ratos, que, sendo um auto-antígeno, é um pobre imunógeno em seres humanos. Além disso, a utilização deste

polissacarídeo em uma vacina pode obter auto-anticorpos (Finne *et al.*, 1987; Pizza *et al.*, 2000; Stephens, 2007).

1.2.2.1 Opa

As proteínas Opa, de *Neisseria* spp. (inicialmente denominadas pII ou proteínas de classe 5) conferem opacidade para colônias que expressam estas proteínas, localizadas na superfície meningocócica, promovendo a interação com o hospedeiro e modulando as respostas imunológicas (Callaghan *et al.*, 2008). Opa são adesinas que desempenham um maior papel na interação com a mucosa epitelial e endotelial, e também têm sido implicadas na virulência e patogenicidade (Hauck & Meyer, 2003; Callaghan *et al.*, 2006). A variabilidade de suas seqüências correspondem a três de quatro *loops* putativos extra-membrana que se estendem desde a superfície da bactéria e, conseqüentemente, estão disponíveis para a interação com moléculas hospedeiras (Figura 2) (Malorny *et al.*, 1998; de Jonge *et al.*, 2002; Virji, 2009).

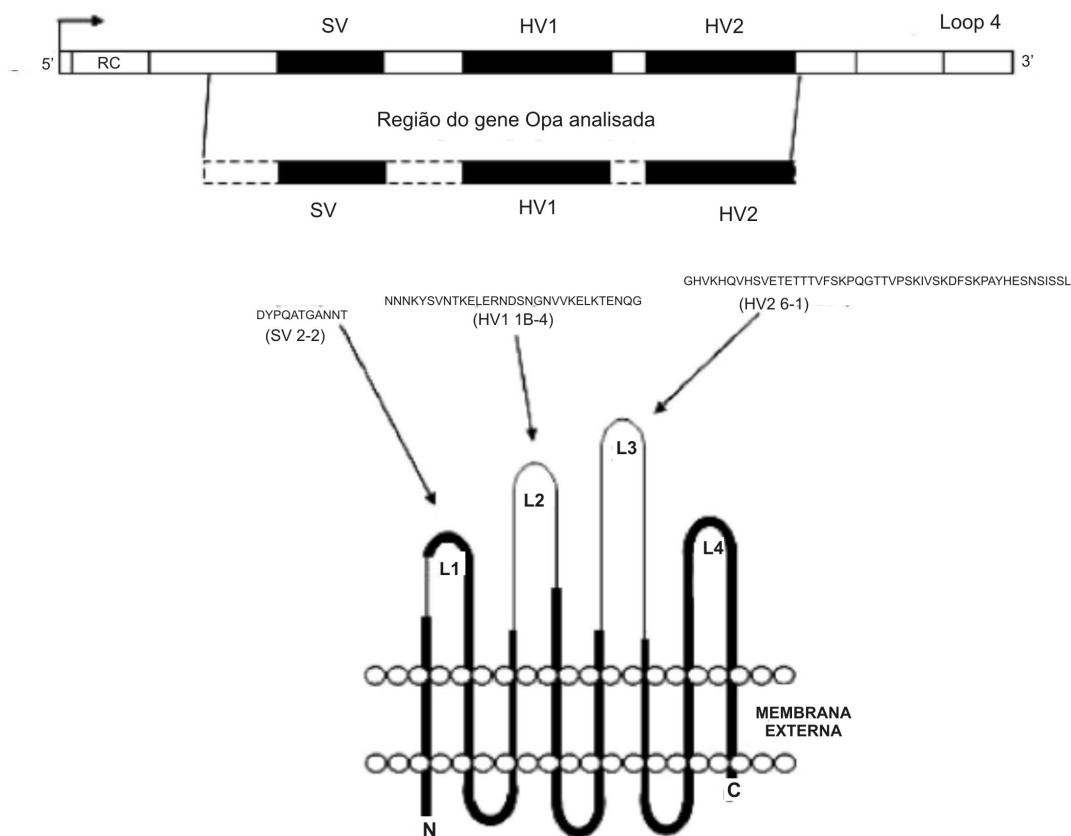


Figura 2: Esquema do gene *opa*, incluindo as regiões variáveis, assim como a relação dessas seqüências com a estrutura secundária da proteína Opa. SV, região semi-variável localizada no loop putativo 1; HV1 e HV2, duas regiões hipervariáveis, localizadas nos loops putativos 2 e 3, respectivamente; RC, região codificante de fase variável (Adaptado de Callaghan *et al.*, 2008).

As proteínas Opa são altamente diversas, com diferentes variantes exibindo interações específicas com células humanas. Essas diferenças são determinadas por combinações de variações de seqüências de aminoácidos presentes em cada uma das três regiões variáveis da seqüência da proteína Opa (Virji *et al.*, 1999; Muenzner *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2005; Callaghan *et al.*, 2006). A ampla variação estrutural ocorre tanto na mesma cepa quanto entre diferentes cepas de *N. meningitidis* em três destes loops (Hobbs *et al.*, 1994).

A maioria dos isolados meningocócicos expressa até quatro proteínas Opa variantes, codificadas em quatro *loci* (*opaA*, *opaB*, *opaD*, e *opaJ*) dispersos por todo o genoma (Parkhill *et al.*, 2000). A análise da sequência nucleotídica de uma série de genes *opa* revelou que o alto nível de diversidade de proteínas Opa é gerada por mutação e recombinação genética entre *loci* *opa*, tanto entre os *loci* no mesmo genoma ou entre diferentes *loci* do meningococo (Hobbs *et al.*, 1994). Proteínas Opa estão sujeitas a variação de fase, ou alternância reversível *on-off*. A variação de fase resulta da leitura das alterações na conformação causadas por mudanças no número de repetições de nucleotídeos pentaméricos (CTCTT) encontradas na região dos genes *opa* que codifica o peptídeo-sinal (Murphy & Bartos, 1989; Hobbs *et al.*, 1994). A maioria das diferenças entre os *loci* ocorre em duas regiões hipervariáveis (HV1 e HV2) e uma região semi-variável (SV) codificantes da região N-terminal da proteína Opa, as demais regiões dos genes são altamente conservadas (Figura 2) (Aho *et al.*, 1991; Connell *et al.*, 1990; Hobbs *et al.*, 1994).

Proteínas Opa também modulam a resposta imune do hospedeiro através de interações com células do sistema imune, incluindo neutrófilos e células T CD4+, e estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Milagres *et al.*, 1998; Virji *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2007; Callaghan *et al.*, 2008).

Essas alterações em um ou alguns *loci* dentro de uma população clonal são referidos como microevolução. A distribuição das seqüências presentes nas regiões HV dos genes *opa* sugere que a duplicação de todo ou parte dos genes *opa* em outros *loci* *opa* mudam o repertório de proteínas Opa que podem ser expressadas. A variabilidade adicional nesta família gênica parece ter sido introduzida pela troca horizontal de seqüências *opa* de outros meningococos e de *N. gonorrhoeae*. Estes resultados indicam que

os processos de recombinação e troca genética contribuíram para variabilidade na maioria dos antígenos de superfície desta população clonal de bactérias patogênicas (Hobbs *et al.*, 1994).

1.3 Suscetibilidade antimicrobiana

Muitos agentes antimicrobianos são ativos contra meningococos *in vitro*, mas apenas aqueles que penetram suficientemente no espaço cérebroespinal devem ser utilizados. Tanto penicilina parenteral ou ampicilina são drogas de escolha. Cloranfenicol é uma alternativa efetiva e de baixo custo. A terceira geração de cefalosporinas, ceftriaxona e cefotaxima, são excelentes alternativas, mas são consideravelmente de maior custo (WHO, 1998).

Os sete dias de administração do antibiótico ainda é a regra para o tratamento de DM, na maioria dos países desenvolvidos. No entanto, há boas evidências de que na DM a administração de quatro dias de penicilina G é tão eficaz como qualquer longa administração de antimicrobianos. A forma de ação longa do cloranfenicol também demonstrou ser eficaz (WHO, 1998).

Penicilina é utilizada efetivamente no tratamento de infecções meningocócicas, mas isolados com suscetibilidade reduzida a penicilina (Pen^I) tem sido reportados em muitos países (Woods *et al.*, 1994; Galimand *et al.*, 1998; Boras *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001). Muitos estudos mostram que a suscetibilidade diminuída está relacionada a clones únicos (Caniça *et al.*, 2004; Stefanelli *et al.*, 2004).

Desde 1988 um crescente aumento no número de isolados de meningococo Pen^I tem sido detectada na Espanha, Inglaterra, e na África do Sul. Na França, isolados

resistentes à penicilina foram reportados pela primeira vez em 1994 (Antignac *et al.*, 2003). Um mecanismo bem conhecido de resistência moderada à penicilina em *N. meningitidis* são alterações na estrutura da proteína ligante de penicilina (*penicillin-binding protein* – PBP2) codificada pelo gene *penA* (Taha *et al.*, 2007). As modificações de PBP2 resultam na diminuição da afinidade de PBP2 à penicilina G, bem como em alterações na estrutura do peptidoglicano na parede celular das bactérias que são responsáveis pelo fenótipo Pen^I. Essas modificações localizadas na metade C-terminal da PBP2 (aminoácidos 427 a 581), podem ser reveladas por seqüenciamento do gene *penA* (Antignac *et al.*, 2003). A prevalência da resistência devido à produção de β -lactamase é muito baixa entre os isolados de *N. meningitidis* (Taha *et al.*, 2007).

1.4 Epidemiologia

Por ser transmitido por contato direto através de secreções orais ou nasais, pessoas que têm contato íntimo com o paciente, aumentam o risco de adquirir a doença meningocócica de 500 a 2.000 vezes (Peltola, 1983). O maior impacto da doença está entre crianças, onde os índices de incidência e as taxas de casos fatais podem ser vinte vezes maiores que na população adulta (Tzeng & Stephens, 2000).

Segundo a OMS (WHO, 1998), excluindo as epidemias, ocorrem cerca de 1,2 milhões de casos de meningite bacteriana por ano no mundo, dentre os quais 135.000 são fatais. Aproximadamente 500.000 destes casos e 50.000 mortes estão relacionadas com o meningococo.

Existem diversos métodos de tipagem para a caracterização de isolados de *N. meningitidis* que permitem discriminá-los entre si. Estes métodos podem ser baseados em

características fenotípicas ou genotípicas do microrganismo. Os métodos fenotípicos baseiam-se na caracterização da cápsula polissacarídea (caracterização de sorogrupo) ou na tipagem das OMPs da bactéria (caracterização de sorotipo/sorosubtipo). Já os métodos genotípicos são baseados na caracterização de genes ou sequências de genes que determinam a expressão de macromoléculas ou fatores de virulência: LOS e ácidos graxos, proteínas ou ácidos nucleicos.

1.4.1 Distribuição dos sorogrupos

Por muitos anos, a vigilância epidemiológica e a investigação de surtos de doença causada por esta bactéria eram relacionadas somente com a caracterização sorológica dos isolados. Habitualmente, cerca de 90% dos casos clínicos estão relacionados a apenas três sorogrupos: A, B e C, embora o número de casos relacionados com o sorogrupo W135 e Y tenham aumentado nos últimos anos (Figura 3) (Murray *et al.*, 1998; WHO, 1998; Rosenstein *et al.*, 1999; Stephens, 2007).

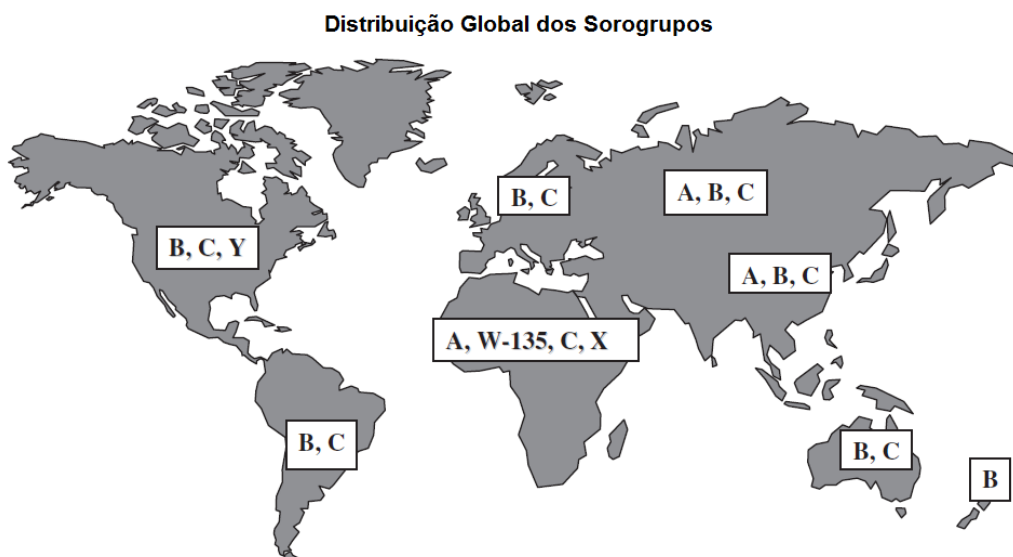


Figura 3: Distribuição global dos sorogrupos de DM (adaptado de Stephens, 2007).

Cepas do sorogrupo A historicamente têm sido descritas como as maiores responsáveis pelas epidemias e pandemias, enquanto que aquelas do sorogrupo C estão envolvidas com menos frequência com as epidemias. O meningococo do sorogrupo B está geralmente associado com casos esporádicos e surtos localizados da doença, mas no início da década de 70, epidemias da doença causadas por cepas deste sorogrupo foram relatadas em países da Europa, incluindo Noruega, Bélgica, Grã-Bretanha e Dinamarca assim como no sul da África e Brasil (Caugant *et al.*, 1986).

No continente Americano, são estimados 30.000 casos de meningite meningocócica anualmente e a taxa de letalidade é de cerca de 17% (Tikhomirov *et al.*, 1997). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), no período entre 1992 e 1996, participou de um estudo que avaliou a incidência de DM nos Estados Unidos. Este estudo mostrou que ocorrem cerca de 2.400 casos por ano, atingindo principalmente crianças e 32% de pessoas com menos de 30 anos de idade. Os sorogrupos C, B e Y causam 35, 32 e 26% dos casos, respectivamente (Rosenstein *et al.*, 1999).

O Brasil registrou uma grande epidemia de DM na década de 70, que teve seu epicentro em São Paulo, mas que se alastrou por todo o país. Na época foi realizada uma grande campanha nacional de vacinação de toda a população com vacina anti-meningocócica A+C, de origem francesa, que até então nunca havia sido utilizada em tão larga escala, não havendo comprovação anterior de sua efetividade. Possivelmente pelo efeito combinado de dois fatores, a utilização da vacina e o esgotamento de pacientes suscetíveis, a epidemia foi controlada (Brasil, 2002).

Este aparente “sucesso” contribuiu para a criação no imaginário da população brasileira, a percepção equivocada da meningite meningocócica como uma doença imunoprevenível. A partir da década de 80, houve uma mudança importante no

comportamento epidemiológico de DM no país com o sorotipo B passando a ser o mais prevalente. Para esse sorogrupo só existe uma vacina disponível, de origem cubana, que não tem utilização universal e possui baixa eficácia devido a cápsula polissacarídea de o meningococo ser fracamente imunogênico, por sua semelhança estrutural com tecidos humanos (Arditi & Yogev, 1997; Pizza *et al.*, 2000; Brasil, 2005).

Durante a primeira metade da década de 90, no Brasil, observou-se um crescimento no número de casos notificados desta doença, atingindo seu pico em 1996, com o registro de 6.963 casos. Este crescimento decorreu, em grande parte, de surtos localizados em municípios com grande contingente populacional, como São Paulo e Rio de Janeiro, além de um aumento, por causas ainda não completamente esclarecidas, no patamar de ocorrência endêmica esperada dessa doença. A partir de 1997 houve uma tendência de redução do número de casos em decorrência da adoção de medidas de controle em situação de surtos, como vacinação de bloqueio e uso das quimioprofilaxias (Brasil, 2002).

No Brasil, durante os últimos 10 anos, mais de 4500 casos de DM foram reportados anualmente, com uma taxa de letalidade de 15-20% e uma incidência de 3-4 casos por 100.000 habitantes (<http://www.saude.gov.br/sinanweb/tabnet>). Mais de 70% dos isolados foram caracterizados como sorogrupo B, aproximadamente 25% do sorogrupo C, e 5% do sorogrupo W135 (de Filippis *et al.*, 2004).

No ano de 2001 foram notificados, pelo Ministério da Saúde, 2.867 casos de DM com 555 óbitos. Mais da metade dos casos encontram-se na Região Sudeste, um dado provavelmente relacionado a uma melhor estrutura para o diagnóstico e a um sistema de notificação mais eficiente (Brasil, 2002). No ano de 2008 foram notificados, 23.599 casos de meningite (de todas as etiologias) pelo Ministério da Saúde, sendo 2.595 casos de DM

(508 óbitos) e 4.664 casos (20%) foram notificados como sendo de meningite não especificada ou não definida (<http://www.saude.gov.br/sinanweb/tabnet>).

No Rio Grande do Sul, no ano de 2001, o Setor de Epidemiologia do Estado notificou 185 casos de DM. Só a região metropolitana de Porto Alegre foi responsável por 102 casos e 19 óbitos, alcançando uma taxa de letalidade de 14,1%. Aproximadamente 50% dos casos no Estado foram atribuídos ao meningococo sorogrupo B (SES, 2001). No ano de 2008, foram notificados 105 casos de DM com 17 óbitos. (<http://www.saude.gov.br/sinanweb/tabnet>).

Levando em consideração estes dados, por mais eficiente que sejam as ações para identificar as pessoas portadoras da doença, sempre haverá pacientes que ficarão sem o diagnóstico. Em geral, o número de casos não diagnosticados é maior que os conhecidos. Deve-se montar um fluxo para o diagnóstico preciso da meningite de acordo com o modelo preconizado pelo Ministério da Saúde (Figura 4), pois somente assim é possível desenvolver ações pontuais de saúde pública e tabular dados estatísticos com precisão. Além disso, deve-se evitar a subnotificação e dados não conclusivos.

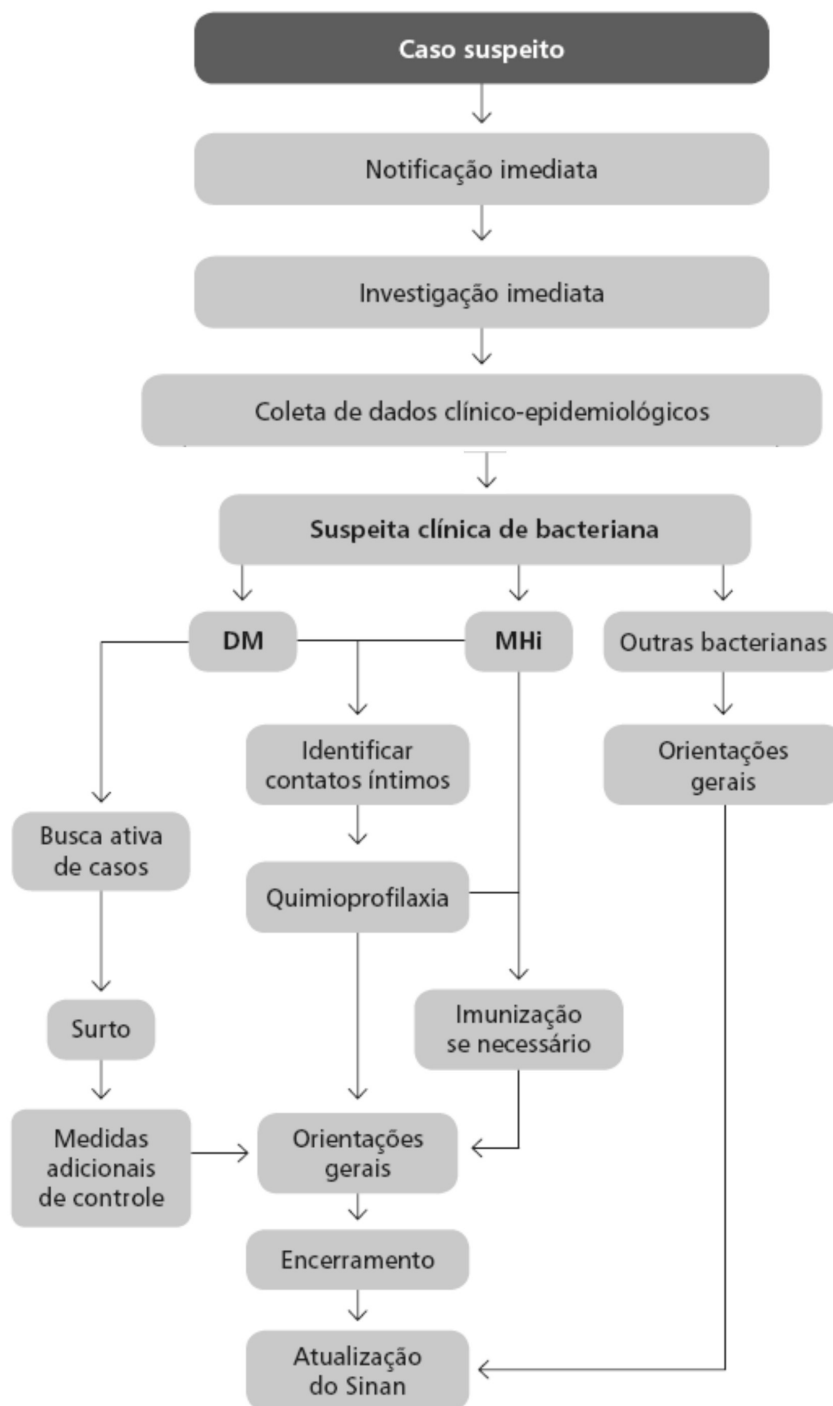


Figura 4: Roteiro de investigação epidemiológica das meningites. DM – Doença meningocócica; MHi – Meningite por *Haemophilus influenzae* (Brasil, 2005).

Apesar de algumas deficiências, as vacinas têm um importante papel no controle e prevenção da meningite bacteriana. A vacina contra *H. influenzae* faz parte do calendário básico de vacinação infantil e é recomendada para menores de um ano no esquema de três doses com intervalo de 60 dias entre as doses (esquema: 2, 4 e 6 meses de idade), a vacina para *S. pneumoniae* está disponível nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. As vacinas para *N. meningitidis* são indicadas no controle de surtos, não estando disponíveis na rotina dos serviços de saúde, sendo que a proteção oferecida por cada vacina é específica para cada bactéria e restrita a somente um sorogrupo ou sorotipo de cada microrganismo (Brasil, 2005). Por isso, faz-se necessário um sistema permanente de vigilância epidemiológica da doença, isolamento e caracterização das bactérias incidentes na comunidade.

1.5 Diagnóstico de DM

O quadro clínico de DM é grave e caracteriza-se por febre, cefaléia intensa, náusea, vômito, rigidez de nuca, prostração, erupção cutânea, meningismo, estado neurológico alterado e petéquias. A eficácia do tratamento de uma infecção bacteriana exige a detecção rápida e exata para a identificação da bactéria, realizado através do estudo do líquido cefalorraquidiano, podendo também ser utilizada a hemocultura, raspado de lesões petequiais, urina e fezes. Os principais exames para o diagnóstico de casos suspeitos de meningite são: exame quimiocitológico do líquido, bacterioscopia direta (líquor ou soro), cultura (líquor, sangue, petéquias ou fezes), contraímunoelctroforese cruzada (CIE) (líquor ou soro), aglutinação em látex (LA). Sensibilidades em torno de 85% foram relatadas para a cultura a partir de amostras de pacientes não tratados (Tunkel & Sheld, 1995; Phillips & Simor, 1998). Tanto a cultura quanto a coloração de Gram tem a sensibilidade diminuída

em mais de 50% quando realizadas a partir de amostras clínicas de pacientes tratados previamente à coleta da amostra (Tunkel & Sheld, 1995). A sensibilidade da LA é aproximadamente 70 a 80%, comparado à cultura. Os resultados falso positivos são a maior limitação desta técnica, além de não serem apropriados para a detecção de todos os sorogrupos (Requejo & Ferreira, 1993; Alkmin *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1995; van der Ende *et al.*, 1995). A CIE é uma técnica menos sensível, mais laboriosa e dispendiosa, se comparada ao LA, além de ter um tempo longo de execução (Alkmin *et al.*, 1996; Barroso, 2000).

Os recentes avanços das técnicas de biologia molecular têm possibilitado um grande desenvolvimento de novas metodologias no diagnóstico de doenças provocadas por agentes infecciosos. Muito se tem investido para o desenvolvimento destes métodos que sejam mais rápidos, sensíveis e específicos. Com esta finalidade, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada para amplificar regiões do DNA dos agentes causadores da meningite bacteriana. Esta técnica possibilita a amplificação e a detecção de fragmentos específicos de DNA de um determinado organismo, através de reações em que são utilizadas uma DNA polimerase e *primers* específicos.

Taha (2000) desenvolveu um protocolo para a caracterização de sorogrupos do meningococo através de um PCR *multiplex* com *primers* específicos. A metodologia foi utilizada com sucesso a partir de amostras clínicas de pacientes com suspeita de DM. Baethgen e colaboradores (2003) também utilizaram a metodologia descrita por Taha (2000) e a sensibilidade encontrada foi de 96,4% quando a caracterização era realizada a partir de líquido de pacientes. Sabe-se que quando a caracterização procede diretamente a partir da cultura do meningococo a sensibilidade do método chega a 100% pois não existem problemas de amplificação pela baixa concentração de bactérias na amostra.

1.6 Caracterização Fenotípica de *N. meningitidis*

Atualmente, está em uso uma variedade de técnicas empregando anticorpos monoclonais (mAbs) para identificação de sorotipos e sorosubtipos, tais como soroaglutinação (Vedros & Genus, 1984; Zollinger *et al.*, 1984), co-aglutinação, radioimunoensaio (Zollinger *et al.*, 1979; de Marie *et al.*, 1984), técnicas de *ELISA* e *dot-blotting assay* utilizando-se anti-soros policlonais ou mAbs (Abdillahi & Poolman, 1988; Morello *et al.*, 1991; Wedege *et al.*, 1990; Janda & Knapp, 2003) e LA (Wedege *et al.*, 1990).

Até o momento foram descritos 16 sorotipos e 18 sorosubtipos (Sacchi *et al.*, 1998a; 1998b). Uma cepa de *N. meningitidis* identificada como B:4:P1.15, significa que ela pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4, sorosubtipo P1.15. As nomenclaturas designadas como NT e NST, significam, respectivamente, que as proteínas de sorotipo e sorosubtipo não puderam ser caracterizadas pelo painel de mAbs disponíveis (Frasch *et al.*, 1985).

Devido ao fato de a maioria dos isolados de pacientes da América e da Europa pertencerem aos sorogrupos B ou C, e do Continente Africano ao sorogrupo A, esta característica tornou-se insuficiente para uma melhor discriminação dos casos nas investigações epidemiológicas (Caugant, 1998). Isso culminou com o desenvolvimento de metodologias que incluem a determinação do sorogrupo e dos dois principais antígenos específicos de OMPs da bactéria - PorB (sorotipo) e PorA (sorosubtipo). Este esquema foi de grande ajuda em inúmeros estudos epidemiológicos de DM, juntamente com o desenvolvimento e a distribuição de kits comerciais para a determinação do sorogrupo e mAbs para a identificação do sorotipo e sorosubtipo (van der Ende *et al.*, 1995; Tzanakaki *et al.*, 2001).

Apesar de fornecer informações importantes, a caracterização fenotípica de isolados como a determinação de sorogrupo, sorotipo e sorosubtipo apresentam inúmeras desvantagens. Muitos isolados são não tipáveis (NT) ou não sorosubtipáveis (NST) (Urwin *et al.*, 1998), particularmente aqueles encontrados em portadores assintomáticos (Caugant *et al.*, 1994). Estudos têm mostrado que, até 1982, cepas do sorogrupo B:NT:NST representavam a maior parte dos isolados do sorogrupo B e que essas cepas foram substituídas por cepas do sorogrupo B:4:P1.19,15, representavam cerca de 50% a 75% de todos os isolados do sorogrupo B a partir de 1988 a 2005. Durante 2003 a 2005, cepas NT:NST foram responsáveis por 89% de todos os casos sorogrupo C (Lemos *et al.*, 2007). Existem outras causas de falhas destes métodos, incluindo a alta diversidade dos antígenos PorA e PorB e limitações em relação aos mAbs disponíveis; uma taxa de evolução dos antígenos que não permite a geração e a manutenção de reagentes; diminuição do nível de expressão do gene *porA* em alguns meningococos, enquanto em outros a expressão deste gene é interrompida por seqüências de inserção, tornando inviável a caracterização fenotípica (van der Ende *et al.*, 1995; Feavers *et al.*, 1996; Jolley & Maiden, 2006).

Dificuldades adicionais são causadas pela forte pressão seletiva, presumivelmente imposta pela resposta imune do hospedeiro, agindo nos antígenos de superfície meningocócica e na propensão de ocorrência de fluxo gênico por transformação (Maiden, 1993). Estes fatores resultam em uma caracterização sorológica não confiável como indicador de relação genética, pois meningococos nunca associados com surtos podem ter características sorológicas comuns aos associados e vice-versa (Caugant *et al.*, 1987).

1.7 Caracterização genotípica de *N. meningitidis*

Dentre os métodos moleculares de tipagem de *N. meningitidis* a seguir destacaremos a utilidade daqueles mais importantes.

1.7.1 Multilocus Enzima-Eletroforese (MLEE)

O método MLEE tem uma abordagem *multilocus*, analisando a variação em enzimas metabólicas através da mobilidade eletroforética dessas proteínas (Selander *et al.*, 1986). Este método foi utilizado por muitos anos como padrão-ouro para a tipagem do meningococo e permitiu a caracterização de diferentes Tipos Eletroforéticos (ETs), melhorando a discriminação entre as cepas (Yakubu *et al.*, 1999), estabelecendo a existência de linhagens particulares associadas com doença invasiva, tendo um papel importante na elucidação da epidemiologia populacional desta bactéria (Selander *et al.*, 1986).

Cepas de *N. meningitidis* praticamente idênticas pelo MLEE, distinguem-se em apenas uma ou duas enzimas, resultando em diferentes alelos, atribuindo-se o termo “complexo clonal” a membros presumidamente originários de um ancestral comum. Portanto, isolados clínicos de casos esporádicos e isolados de epidemias no mundo todo podem ser agrupados em sete complexos clonais, 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).

A aplicação do MLEE em larga escala não foi bem aceita, sendo raramente utilizada na investigação de surtos devido ao alto custo e ao longo tempo de execução, sendo utilizada somente em alguns laboratórios de referência (Yakubu *et al.*, 1999).

1.7.2 Tipagem de Sequências Multilocus (MLST)

Com o advento de tecnologias que possibilitam a determinação da seqüência de nucleotídeos, foi desenvolvida a Tipagem de Sequências Multilocus (MLST), sendo então possível adicionar ainda mais informações à caracterização de isolados (Maiden *et al.*, 1998). Esta técnica estabelece relações genéticas através da análise de genes constitutivos, mostrando diferenças na seqüência de nucleotídeos que é utilizada para a identificação de alelos.

Maiden e colaboradores (1998) desenvolveram um método de análise de polimorfismos de sete genes cromossomais de *N. meningitidis* que codificam enzimas envolvidas no metabolismo (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*). A combinação dos sete alelos correspondente aos genes define o *Sequence Type* (ST), tipo de seqüência de uma dada amostra. No MLST os resultados fornecidos são facilmente comparados entre diferentes laboratórios (Taha & Alonso, 2008), sendo que estas análises também são facilitadas pela disponibilidade de um *website* para esta abordagem (<http://www.mlst.net>). Uma grande quantidade de informações está lá disponível para análise dos resultados por MLST, melhorando nossa compreensão das populações genéticas e epidemiologia molecular das cepas circulantes em todo o mundo.

Para a validação desta metodologia, foram determinadas as seqüências de aproximadamente 470 pares de bases dos 11 genes constitutivos a partir de 107 isolados de cepas invasivas de *N. meningitidis* e de portadores saudáveis (Maiden *et al.*, 1998). Pela análise de cada *locus*, os alelos foram determinados pela colocação de números arbitrários e foram então construídos dendrogramas a partir das diferenças dos alelos multilocus. As associações entre as cepas foram consistentes com aquelas determinadas pelo MLEE. Para simplificar o método, foram então escolhidos sete genes que resultavam nos mesmos

achados com a utilização das 11 seqüências alvos do MLEE (Maiden *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 2000).

Esta metodologia apresenta um excelente poder discriminatório, é reprodutível e os resultados podem ser comparados inter e intra-laboratorialmente. Outra vantagem é que a suspensão de bactérias ou DNA purificado pode ser utilizado, eliminando a necessidade do transporte do meningococo viável entre laboratórios (Yakubu *et al.*, 1999).

Desde então o MLST tem sido utilizado mundialmente não só para a análise de isolados de *N. meningitidis* (Feavers *et al.*, 1999), mas também para outros microrganismos como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *S. aureus* (Enright & Spratt, 1998; 1999).

O grupo de Clarke e colaboradores (2001) investiu na semi-automação do MLST para ser implantado no serviço de referência para a vigilância epidemiológica na Escócia. Apesar de diminuir bastante o tempo de execução da metodologia, faz-se necessária a utilização de *kits* comerciais e de pessoal treinado para sua aplicação. Apesar de eficiente, este método ainda é muito caro e laborioso para ser implantado como rotina de vigilância em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos.

Temos ainda disponíveis e recomendados pela Sociedade Européia de DM os seguintes alvos para tipagem: *fetA*, *porA* e o sequenciamento de outros genes, assim como *porB*, *opa* e *penA* que são também utilizados para tipagem de isolados de meningococo e aumentam o poder discriminatório da tipagem molecular (Jolley & Maiden, 2006; Fox *et al.*, 2007).

1.7.3 Tipagem de Opa por PCR

O desenvolvimento de metodologias que utilizam a PCR para a tipagem molecular tem sido amplamente utilizado para diversos microrganismos (Friedman *et al.*, 1995; Giorgini & Taha, 1995; Guibourdenche *et al.*, 1997). Estes métodos têm demonstrado excelentes resultados quando são utilizados para o estudo epidemiológico de surtos, já que as medidas de controle da disseminação da doença necessitam de uma resposta rápida.

Como citado anteriormente, para ocorrer a colonização do epitélio da nasofaringe do hospedeiro pela bactéria, a mesma necessita do *pili* para sua fixação. Logo após, as formas patogênicas de *Neisseria* spp. tais como *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* expressam uma família de proteínas de membrana externa, as proteínas Opa (Muenzner *et al.*, 2000). Estas proteínas são capazes de mediar várias interações entre o patógeno e as células do hospedeiro incluindo o reconhecimento de receptores de célula de superfície humana, o engolfamento pelas células epiteliais e a fagocitose da bactéria (Dehio *et al.*, 1998; Virji *et al.*, 1999).

Atualmente, encontra-se disponível um banco de dados mundial de seqüências de opa de *N. meningitidis*, fundado pela Universidade de Oxford, para servir a comunidade de pesquisa. Sequências completas ou parciais dos genes que codificam estas proteínas podem ser analisadas pelo BLAST comparando-as com as seqüências depositadas neste banco de dados (<http://neisseria.org/nm/typing/opa/>).

A utilização de oligonucleotídeos que amplifiquem esta região do genoma do meningococo pelo método de PCR seria capaz de demonstrar as diferenças entre os isolados, facilitando ainda mais a tipagem molecular, reduzindo o custo e sendo de fácil e rápida execução.

1.7.4 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

PFGE sem dúvida é o método mais utilizado para análise das diferenças encontradas em todo o cromossomo (Bygraves & Maiden, 1992; Yakubu & Pennington, 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 do DNA cromossomal com enzimas de restrição (Bjorvatn *et al.*, 1984; Kristiansen *et al.*, 1986; 1992; Weis & Lind, 1996). Encontramos também os métodos baseados em um ou poucos elementos genéticos como 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). Com exceção do PFGE, nenhum destes outros métodos parece ter sido uma escolha de consenso para o estudo de surtos de DM.

PFGE se baseia na resolução eletroforética de grandes moléculas de DNA após a digestão de todo o cromossomo bacteriano com endonucleases de restrição que clivam o genoma de forma pouco frequente (Nicolas *et al.*, 1997), permitindo distinguir o surto de *N. meningitidis* entre isolados que foram relacionados pela tipagem sorológica (Popovic *et al.*, 2001). A tipagem molecular conduz também à detecção do aparecimento de novos clones bacterianos (Taha & Alonso, 2008).

Porém, as limitações deste método estão no tempo de execução da técnica, complexidade dos padrões gerados, custo de equipamentos e de material de consumo.

2 JUSTIFICATIVA

Surtos localizados de DM podem ocorrer, podendo evoluir a epidemias e/ou se disseminar por vários países ou continentes, constituindo pandemias (Caugant, 1998). Visto isso, o monitoramento da população bacteriana circulante, bem como estudos descrevendo os grupos clonais virulentos em circulação é fundamental para o entendimento da dinâmica de DM, fornecendo as bases epidemiológicas para as estratégias de controle em níveis regionais e mundiais (Stephens, 1999; Lemos, 2005).

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 de DM, estamos propondo uma nova alternativa que, apresenta resultados promissores em sua fase inicial de padronização.

O Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do RS, trabalhando em conjunto com o Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), e Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central de Saúde Pública do Estado (IPB-LACEN/RS), ambos da FEPPS, contam com uma equipe de pesquisadores que tem como uma de suas principais metas, desenvolver e padronizar novas metodologias que possam auxiliar no diagnóstico e na caracterização de microrganismos causadores de doenças infecciosas. Esta equipe já disponibilizou a padronização de um método molecular, baseado em PCR, para o diagnóstico de meningite meningocócica (Baethgen *et al.*, 2003) o qual foi implantado como rotina na Seção de Biologia Molecular do IPB-LACEN/RS.

Além do diagnóstico para a confirmação de casos, é de fundamental importância para o Setor de Epidemiologia do Estado obter informações mais precisas a respeito da dinâmica de transmissão de *N. meningitidis* na população, além daquelas obtidas pela

caracterização fenotípica dos isolados. Levando esse aspecto em consideração, o nosso grupo realizou um estudo epidemiológico no período de 1995 a 2003, e a caracterização molecular de *N. meningitidis* por MLST (Baethgen *et al.*, 2008). No período de 2003 a 2005 investigou-se a alta prevalência de linhagens hipervirulentas de *N. meningitidis* e a emergência do clone W135:P1.5,2:ST-11, bem como a determinação da diversidade de tipos de PorA (Weidlich *et al.*, 2008).

Dessa forma, para o entendimento da transmissão da meningite meningocócica e caracterização de isolados da bactéria causadora desta doença, é muito importante o desenvolvimento e a padronização de um método de tipagem por PCR que contribua com as análises epidemiológicas referentes a surtos, avaliando sua aplicação diretamente em amostras clínicas ou isolados de cultura de pacientes com DM.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse projeto tem como objetivo geral padronizar e validar um método de tipagem molecular, que utiliza a amplificação do gene *opa* por PCR, para caracterização de isolados de *N. meningitidis* através de sua comparação com os métodos de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

3.2 Objetivos específicos

1. Organizar um banco de isolados de meningococo de pacientes do Rio Grande do Sul que será analisado através de testes bioquímicos e imunológicos, convencionalmente utilizados para a caracterização microbiológica;
2. Analisar todos os isolados pela técnica de PCR que utiliza a amplificação do gene *opa*;
3. Verificar a distribuição clonal dos isolados e compará-los com os dados da literatura;
4. Caracterizar os isolados considerados clonais pela técnica de PCR através de MLST para confirmar a sua clonalidade;
5. Identificar os fatores de risco para a infecção causada por *N. meningitidis*;
6. Comparar os resultados obtidos pelas novas metodologias com aqueles obtidos pelos métodos de tipagem sorológica;
7. Avaliar a utilidade da metodologia de PCR a ser desenvolvida e padronizada como método molecular de tipagem tanto para amostras clínicas quanto para cultura;
8. Comparar os resultados obtidos pelo método de tipagem por PCR com aqueles obtidos pelo PFGE e MLST visando validar a relação epidemiológica dos isolados.

4 MANUSCRITO: Rapid Molecular Typing Method for Detection and Characterization of *Neisseria meningitidis* Outbreaks

O manuscrito apresentado a seguir como corpo principal desta dissertação encontra-se em fase de correção. Descreve uma nova metodologia para tipagem molecular de isolados de *N. meningitidis* como alternativa para caracterização de surtos em um pequeno número amostral e curto período de tempo. Esta metodologia utiliza um PCR multiplex para amplificação do gene *opa*, sendo que os *primers* foram projetados com base nas regiões conservadas e hipervariáveis do gene *opa* de *N. meningitidis*. A técnica foi denominada VSS-PCR (*Variable Site Specific-PCR*), sendo uma alternativa de baixo custo e extremamente viável para a sua aplicação nos laboratórios de rotina. Esta metodologia foi comparada com a técnica de PFGE que é utilizada para analisar microevoluções dentro de uma localização geográfica e o MLST que examina a genética evolutiva de longo prazo ou a epidemiologia global, para a análise das variações genéticas nos isolados circulantes na população.

Todo o trabalho de padronização do método proposto, descrito no artigo foi executado pelo primeiro autor. Os dados utilizados para comparação de resultados deste trabalho fizeram parte da tese de doutorado de Ludmila F. Baethgen. Trabalhando como aluna de aperfeiçoamento científico, participei integralmente de todas as metodologias desenvolvidas pelo grupo da meningite. A confecção dos primers utilizados no VSS-PCR foi realizada na Escola de Saúde Pública – UC Berkeley por Ludmila F. Baethgen juntamente com Binh Diep sob a orientação do Prof. Lee W. Riley.

Rapid Molecular Typing Method for Detection and Characterization of *Neisseria meningitidis* Outbreaks

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

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBCM - 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 de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN/RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, RS, Brazil.

⁵Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF, Brazil.

⁶Divisão de Vigilância Epidemiológica, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil.

⁷School of Public Health, University of California, Berkeley, USA.

⁸Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

*Corresponding author.

Mailing address: 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

Molecular typing is important for surveillance and control of meningococcal disease epidemics and outbreaks, helping in the design of preventive strategies. The methods available for typing of meningococci are very accurate but still very expensive and time consuming to be used in large scale such as in outbreaks, especially in developing countries. The objective of this study is to standardize a molecular typing method for characterization of *N. meningitidis* isolates, based on the amplification of *opa* genes by a multiplex PCR, the Variable Site Specific-PCR (VSS-PCR). A total of 75 meningococcal isolates were obtained from the collection of IPB-LACEN/RS, a reference laboratory from Rio Grande do Sul State. The samples were used for the standardization of PCR conditions and DNA detection by VSS-PCR. The results were compared to those obtained by MLST and PFGE. VSS-PCR identified 51 different DNA patterns, included in 14 clusters, PFGE identified 35 different band patterns, included in 5 clusters and MLST identified 24 STs. The discriminatory power of VSS-PCR was 0.984, while PFGE was 0.979 and MLST was 0.928. Intermediate or full resistance to penicillin was identified in 14.6% of all meningococci isolates analyzed. ST-461 ($p = 0.001$) and ST-32 ($p = 0.042$) were more likely to be associated with penicillin resistance when compared to other STs. In conclusion the VSS-PCR method showed an accurate response for epidemiological studies and an excellent discriminatory power. After its validation, the test could be used as a screening method for the characterization of isolates associated with meningococcal disease outbreaks, to distinguish clones associated with full/moderate penicillin resistance and to distinguish hypervirulent lineages.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, epidemiology, molecular characterization

INTRODUCTION

Meningococcal disease (MD) has repeatedly caused outbreaks and endemic disease and represents a major life-threatening communicable infections worldwide (Achtman, 1995; Baethgen *et al.*, 2008; Taha & Alonso, 2008; Weidlich *et al.*, 2008). MD is an important cause of morbidity and mortality worldwide (Manchanda *et al.*, 2006; Maiden, 2006). Excluding epidemics, at least 1.2 million cases of bacterial meningitis are estimated to occur each year and 135,000 of these patients die. Approximately 500,000 of the cases and 50,000 deaths are due to the meningococcus. In nonepidemic conditions, meningococci cause 10-40% of cases of purulent meningitis (WHO, 1998).

In Brazil, different epidemic periods of meningococcal disease (MD) have been reported and documented in the last 80 years (Lemos *et al.*, 2007). In the 70's and 80's outbreaks occurred in several cities due to serogroups A and C (Brasil, 2005; Baethgen *et al.*, 2008). From 1990 to 2001, the serogroup B was the most common isolated (Lemos *et al.*, 2006) and from 2003 to 2005 an increase in serogroup C prevalence was observed (Lemos *et al.*, 2007; Baethgen *et al.*, 2008; Weidlich *et al.*, 2008).

Epidemics and/or outbreaks surveillance and control require careful identification and fine molecular typing to help and adapt any preventive strategy (Taha & Alonso, 2008). With this aim, several typing methods have been applied to the meningococcus isolates worldwide, such as (i) pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Bygraves & Maiden, 1992; Popovic *et al.*, 2001), (ii) multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) (Caugant *et al.*, 1986) and (iii) multilocus sequence typing (MLST) (Maiden *et al.*, 1998).

The first one has proved to be useful for outbreak strains emerging that can be clonal in nature and reappear repeatedly over long periods of time and large geographic areas (Achtman, 1995; Morelli *et al.*, 1997; Caugant, 1998). The other typing methods especially MLST, have been applied to surveillance studies and have demonstrated the existence of distinct phylogenetic groupings (termed lineages, or clonal complexes), which are responsible for the large majority of MD worldwide (Maiden *et al.*, 1998; Bille *et al.*, 2008). These methods were highly reliable but very expensive and time consuming to be applied as a screening method during outbreaks, especially in developing countries.

In an attempt to provide an alternative method we have chosen to develop a PCR typing method that is based on the Opa adhesins. These adhesins play a major role in interactions with mucosal epithelia and endothelia and have been implicated in

meningococcal virulence (Hauck & Meyer, 2003; Callaghan *et al.*, 2006). The variable sequences of these proteins correspond to three of four putative extra loops that extend from the surface of the bacterium and are consequently available for interaction with host molecules (Malorny *et al.*, 1998; de Jonge *et al.*, 2002; Virji, 2009).

Opa proteins are subject to phase variation, or reversible on-off switching. Phase variation results from reading frame alterations caused by changes in the number of pentameric nucleotide repeats (CTCTT) found in the signal peptide-encoding region of *opa* genes (Stern & Meyer, 1987). Antigenic variation occurs as a consequence of varying expression from multiple *opa* loci in the bacterial chromosome encoding protein family members with different antigenic characteristics. Most of the differences between loci occur in two hypervariable (HV1 and HV2) regions and a semivariable (SV) region encoding the N-terminus of the mature Opa, with the remaining regions of the genes being highly conserved (Aho *et al.*, 1991; Connell *et al.*, 1988).

Such changes in one or a few loci within a clonal population are referred to as microevolution. The distribution of sequences present in hypervariable (HV) regions of the *opa* genes suggests that duplication of all or part of *opa* genes into other *opa* loci changed the repertoire of Opa proteins that could be expressed. Additional variability in this gene family appears to have been introduced by horizontal exchange of *opa* sequences from other meningococcal strains and from *N. gonorrhoeae* (Hobbs *et al.*, 1994).

In this work we have standardized and validated a method of molecular typing, which uses the amplification of the gene *opa* by a multiplex PCR, for characterization of isolates of *N. meningitidis* from Rio Grande do Sul State. The strains were isolated from patients in the network of Public Health of Rio Grande do Sul, making possible the analysis of genetic variations in isolates circulating in the population.

MATERIALS AND METHODS

Study Location. The cultures were taken from the Bacteriology Section, Institute of Biological Research – Reference Laboratory of Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS). The tests for meningococcal disease case confirmation by biochemical and serogroup identification, and penicillin susceptibility evaluation were carried out at IPB-LACEN/RS. The culture positive cases were identified as gram-negative diplococci on the basis of growth characteristics, oxidase and catalase positivity. The viable isolates were submitted to Bacteriology Section of Instituto Adolfo Lutz (IAL), National Reference Center for Meningitis for serosubtyping. The molecular characterization was performed at Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS) and Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot-UFRGS).

Study Type. This retrospective study included the analysis by conventional and molecular characterization (PCR typing, MLST and PFGE) of biological samples (culture isolates or cerebrospinal fluid) from 2004 to 2008 year period. We also applied PFGE characterization in meningococci isolates from the year 2000, previously studied by our group (Baethgen *et al.*, 2008) for comparison.

Bacterial Strains. In this study we have analyzed 56 *N. meningitidis* isolates obtained from culture of cerebrospinal fluid (CSF) or blood of cases of meningitis and/or septicemia reported in epidemiological years 2000, together with other 19 isolates and clinical specimens from 2004 to 2008. The reference strain M5741 (B:4,7:P1.19,15), donated by Centers for Disease Control and Prevention (CDC) was used to standardize MLST and VSS-PCR technique in the laboratory.

Serological Typing. The serogroups were confirmed by slide agglutination kit, with monoclonal antisera for serogroups A, B, C, W135 and Y (Pastorex[®] Meningitis- Bio-Rad, France). Isolates were serotyped and serosubtyped by dot-blotting of cell suspensions with extended panel of monoclonal antibodies (mAbs) (Wedegge *et al.*, 1990, Lemos *et al.*, 2006).

Susceptibility to Penicillin. Penicillin MICs for isolates were determined by E-test[®] (AB Biodisk, Solna, Sweden) strips on Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood and incubating at 37°C under 5% CO₂. Results were interpreted using the following MIC

breakpoints, recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards: susceptibility to penicillin (Pen^s), ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$; intermediate resistance (Pen^I), >0.06 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$; resistance (Pen^r), ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (CLSI/NCCLS, 2009). Nitrocefin[®] (Glaxo Research 87/312, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) was used to test all isolates for β -lactamase production.

MLST. The PCR amplification of seven housekeeping genes (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* and *pgm*), followed by sequencing of the products obtained by amplification was applied to characterize the isolates. The differences in the sequences were analyzed using software available on the Internet (<http://pubmlst.org/neisseria/>) that enables the determination of profiles. MLST characterization was performed in isolates of *N. meningitidis* from 2004 to 2008 period, and was compared to the first year of non-epidemic MD in RS (year 2000) from the IPB-LACEN/RS collection, as previously described by Baethgen *et al.* (2008). The chromosomal DNA was extracted by boiling a suspension of colonies incubated overnight on chocolate agar at 37°C in 5% CO_2 . Protocols and primers used for amplification and sequencing of seven genes are listed on the MLST website (<http://neisseria.mlst.net>). PCR products were purified by standard method polyethylene glycol/ethanol as indicated on the MLST website. The sequencing reactions were performed using the DYEnamic[™] ET Dye Terminator Kit and the products were analyzed in a MegaBACE 1000 DNA analysis system (GE Healthcare Life Sciences).

MLST analysis. The forward and reverse sequences were analyzed using the STADEN package. Nucleotide sequences with Phred values >20 were considered for analysis. Sequences were submitted to Neisseria MLST website to assign sequence types (STs) and clonal complexes (Jolley *et al.*, 2004).

PFGE. Molecular subtyping was done by PFGE as previously described by Popovic *et al.* (2001). Briefly, the meningococcal isolates were stored at -70°C in trypticase soy broth with 30% glycerol and subcultured on chocolate agar at 37°C in a 5% CO_2 incubated overnight. The bacteria were removed from the plates to tubes containing 7 mL of BHI and incubated at 37°C in a 5% CO_2 overnight. Using a spectrophotometer, the optical density of the bacterial cell suspensions was adjusted to 1.3 at 610 nm. An equal volume of the suspension was mixed with 1.2% Agarose Pulsed Field Certified (BioRad), pipetted into a plug mold, and allowed to solidify. The plugs were placed in a lysozyme lysis buffer solution (1 mg of lysozyme per ml, 50mM sodium chloride, 0.2% sodium

deoxycholate, 0.5% sodium lauryl sarcosine, 10 mM Tris-Cl [pH 7.2]) at 37°C for 2 hours. The lysozyme lysis buffer was replaced with 1 mg/mL proteinase K (50 mM EDTA, 1% sodium lauryl sarcosine) buffer, and then placed in a 56°C bath overnight. The plugs were then washed six times for 30 min each time with 3 mL of TE buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]), washed once with the appropriate restriction endonuclease buffer for 1 hour, and incubated at 37°C for 2 hours with *Bgl*III restriction enzyme. A 1% agarose gel was made and poured into a mold with the slots into which the plugs were placed, and then sealed into place with agarose. The gel was then placed in the clamped homologous electric fields CHEF-DR[®] II Pulsed Field Electrophoresis Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif), and was run with switch times of 4 to 40 seconds for 21 hours, at 5,6 volts per minute.

PCR Typing Method. The method based on amplification by PCR was developed and standardized with primers based on the *opa* gene. The multiplex PCR was designed with oligonucleotides based on differences between the sequences of the gene already published in GeneBank for different isolates of *N. meningitidis*. The primers and their sequences are as follows: LB01, 5'- GTGCGCATTCCATCCAC-3'; LB02, 5'- GTTACAGAAAATGGAAAGAAAG-3'; LB03, 5'- ATGGGCGTGGAAGCTG-3'; LB04, 5'- CAAACTCAACGATAAATTCGA-3'; LB05, 5'- TCTTTGACAGGGCCTCC-3'; LB06, 5'- TGATAGGCGTTTTGCG-3'.

The PCR amplification mixture contained a 4 µl aliquot of extracted DNA solution and a reaction mixture containing 0.5 pmol of primers, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5mM MgCl₂, and 0.5 U of *Taq* polymerase (Cebiot; UFRGS, Brazil). The reactions were performed with an automated thermal cycler (PTC 100 Thermal Cycler, MJ Research). DNA samples were denatured by incubation at 94°C for 2 min before amplification for 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 57°C for 1 min, and primer extension at 72°C for 1 min were followed by an elongation step at 72°C for 1 min. The amplified product was analyzed on an 8% polyacrylamide gel stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (*Biotium*, Inc) and visualized by UV. Gel images were captured on a Gel Doc 2000 imaging system (Bio-Rad, Hercules, Calif.). The patterns of fragments were analyzed visually and with the software Gel Compar (version 4.1; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The epidemiological

relationships of these isolates, analyzed by this approach were compared to those obtained by PFGE and MLST.

PFGE and VSS-PCR analysis of the results. Restriction profiles were analyzed using GelCompar software (version 4.1; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Dendrograms were created using the unweighted-pair group method with arithmetic averages. The banding patterns were analyzed with the Dice coefficient. This was congruent with a similarity index of approximately 80%. PFGE and VSS-PCR types were therefore defined as two or more isolates sharing $\geq 80\%$ similarity on the dendrogram. An arbitrary number was assigned to each type.

RESULTS

Among the 75 viable isolates analyzed by MLST, 24 STs were identified, including a new one called ST-7403. Database analysis grouped the isolates into eight clonal complexes and three single STs. Among the serogroup B, eleven different STs were detected, belonging to the ST-32/ET-5 complex, one belonging to the ST-103 complex, and one belonging to the ST-461 complex. Among the serogroup C isolates, three STs belonged to ST-103 complex, one to the complex ST-8, and one to the ST-5726. Serogroup Y strain belongs to the ST-23 complex/Cluster A3. Two serogroup W135 isolates belonging to the ST-11 complex were observed (Table 1). The MLST identified 20 types and the ST-33, 103, 461 and 259 were the most frequently found. Isolates characterized as ST-461 were associated with resistance to penicillin.

Among the 47 isolates analyzed by PFGE, we identified 35 different band patterns, forming at least 5 clusters with the number of fragments ranging from 9 to 19 per isolate. The patterns assigned to the most common type, grouping 11 isolates from different patients with approximately 80% similarity. Six isolates showed unique patterns.

Comparing MLST to PFGE results, the ST-33 was divided into 4 distinct types (cluster A), while the ST-259 was divided into 4 types (E, E1, E2, E3 and E4). Isolates of ST-103 were grouped in the cluster C, divided into types C, C1 and C2, as well as the ST-461, cluster B (B, B1, B2, B3 and B4), while the ST-11 formed a single cluster (D) (Figure 1).

From the 75 viable isolates analyzed by VSS-PCR, we identified 51 different fragment patterns, forming 14 clusters with at least 2 isolates each. The number of fragments ranged from 3 to 12 per isolate. Patterns assigned to the cluster A were the most common, grouping 13 isolates from different patients with approximately 80% similarity, 12 characterized as ST-33 and one as ST-2400. Nine isolates showed unique patterns. It was possible to distinguish the isolate group belonging to clonal complex ET-5/ST-32 from the other hypervirulent groups.

The ST-33 was divided into 8 different types (cluster A and C) while the ST-259 was divided into 5 (cluster B). The isolates of ST-103 were grouped in the cluster D, into types D, D1, D2 and D3, as well as the ST-461, cluster L (L, L1, L2, L3, L4, L5 and L6), as well as the ST-11, cluster I. The two isolates from the same patient, an isolate from

blood culture (RS278/00) and the CSF culture (RS282/00) did not show any pattern difference, and we have classified as cluster H (Figure 2).

From the other 19 isolates the VSS-PCR for liquor samples was also applied and we identified 14 distinct patterns, with 4 to 13 fragments per isolate. The isolates of ST-461 were grouped into a cluster, into types A, A1, A2 and A3. Eleven isolates had unique patterns that were not grouped in any cluster. The ST-259 was divided into 2 distinct types (restricted to cluster C), while the ST-11 was restricted to cluster B (Figure 3).

It was possible to determine the discriminatory power of the methods in the population of the isolates from RS. Considering that VSS-PCR generated 51 distinct patterns, the MLST generated 29 distinct types and the PFGE 35 distinct types and that the most frequent type by VSS-PCR grouped 7 isolates of type A (10.6%), the MLST grouped 17 isolates of ST-33 (22.7%) and PFGE grouped 5 (10.6%) isolates of the cluster A, it was possible to determine the discriminatory power of the methods in this population sample. Using Simpson's index of diversity (Hunter & Gaston, 1988), the discriminatory power of VSS-PCR were 0.984, the MLST were 0.928, while the PFGE were 0.979, as in table 2.

Isolates with reduced susceptibility or resistant to penicillin- Of the total of 75 isolates tested from 2000 and from 2004 to 2008 years, 14 (18.7%) showed intermediate or full resistance to penicillin. STs and the phenotypes involved in the reduction of susceptibility were: 1 isolate B:4,7:P1.19,15 (ST-32), 1 isolate B:15:P1.7,16 (ST-32), 1 isolate with phenotype B:19:P1.7,16 (ST-32), 4 isolated B:4,7:P1.19,15 (ST-33), 1 isolate with phenotype B:4,7:NST (ST-33), 2 isolates with phenotype B:19.1:P1.19 (ST-461) and 3 isolates B:19.1:NST (ST-461). Only one isolate with phenotype B:19.1:NST (ST-461) showed resistance to this drug. The presence of reduced susceptibility to penicillin in clones ST-461 and ST-32 proved to be statistically significant ($p = 0.001$ and $p = 0.042$, respectively), when compared to other clones. None isolate showed activity to chromogenic β -lactamase.

N° of isolates	%	Phenotype	MLST	
			Clonal Complex	ST
17	22.66	B:4,7:P1.19,15		33
1	1.33	B:4,7:NST		33
12	16	B:15:P1.7,16		259
3	4	B:15:P1.7,16		463
2	2.66	B:4,7:P1.19,15		32
2	2.66	B:4,7:P1.19,15		5728
1	1.33	B:4,7:P1.19,15		5707
2	2.66	B:4,7:P1.19,15	ST-32/ET-5 complex	639
1	1.33	B:15:P1.7		32
1	1.33	B:15:P1.7,16		32
1	1.33	B:19:P1.17,16		32
1	1.33	B:17:P1.7,16		5723
1	1.33	B:17:P1.9		2400
1	1.33	B:19,14:P1.7,16		5724
1	1.33	B:4,7:P1.19		1880
7	9.33	B:NT:P1.3		103
1	1.33	C:23:P1.14-6	ST-103 complex	3780
1	1.33	C:NT:NST		5338
1	1.33	C:NT:NST		5727
3	4	B:19,1:P1.19	ST-461 complex	461
6	8	B:19,1:NST		
1	1.33	Y:19,14:P1.12	ST-23 complex/Cluster A3	23
2	2.66	W135:2a:P1.2	ST-11 complex	11
1	1.33	C:2b:P1.3	ST-8 complex	6354
1	1.33	B:19,10:P1.14	ST-41/44 complex	303
1	1.33	B:4,7: NST	ST-269 complex	7403
1	1.33	B:10:P1.14		5725
1	1.33	B:14:NST		5729
1	1.33	C:21:P1.14		5726

Table 1. Correlation among MLST and serotyping results and their frequency on 75 *N. meningitidis* isolates from RS from year 2000 and 2004 to 2008.

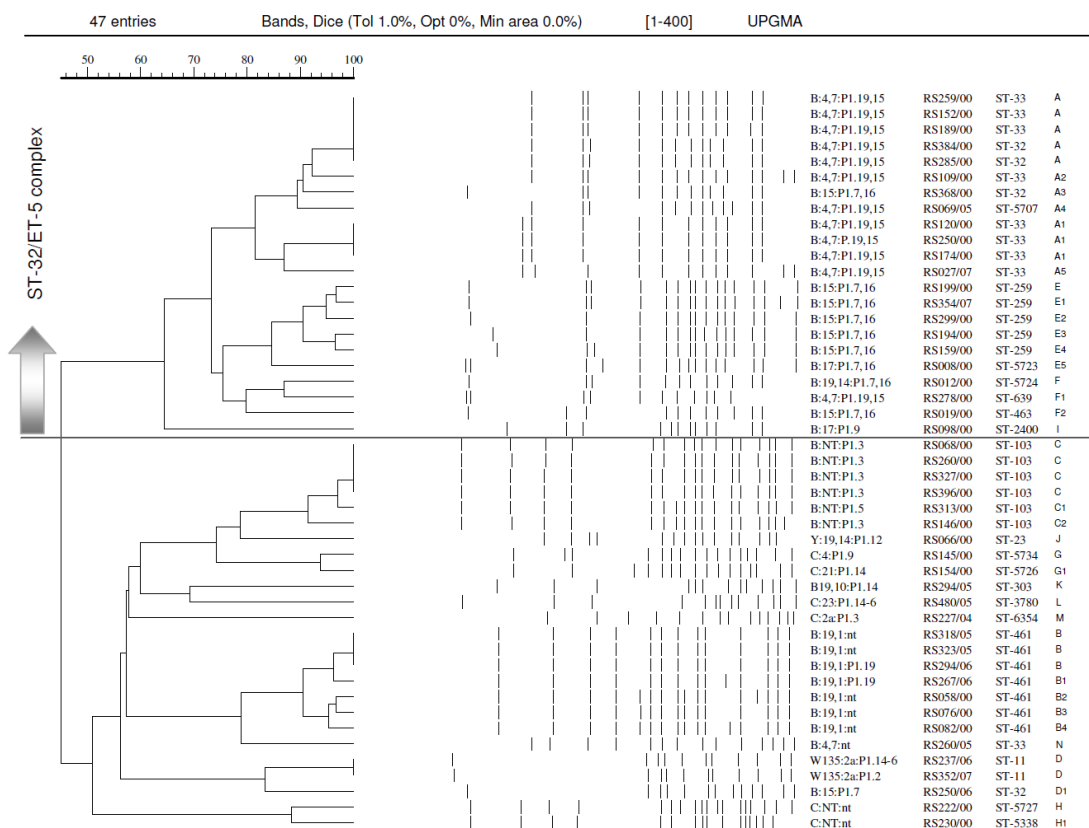


Fig.1: Dendrogram produced by the software GelCompar of the samples analyzed by PFGE. Thirty-five distinct electrophoretic types were determined and designated A to N. The dot delimits the clones associated with the clonal complex ET-5/ST-32.

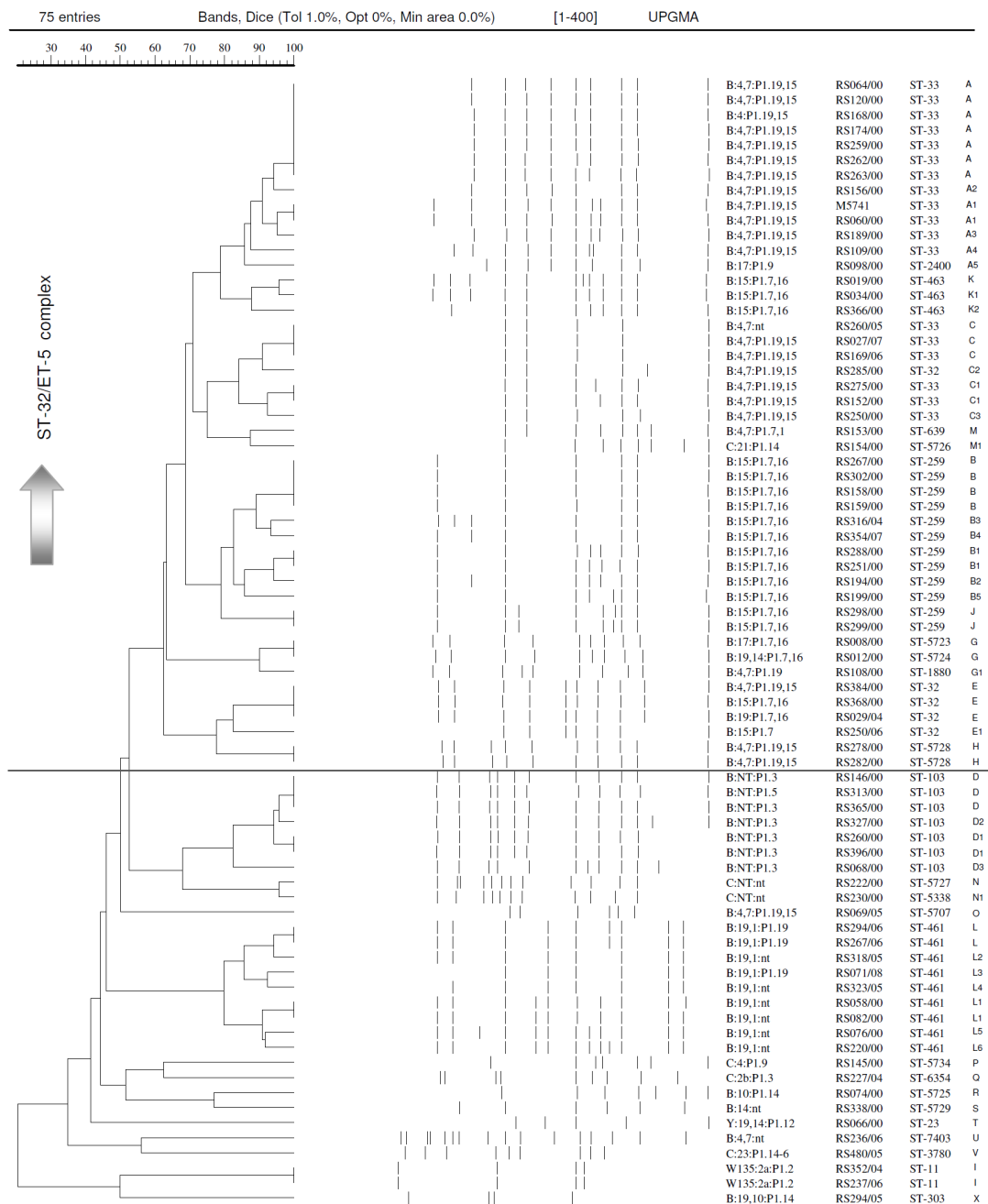


Fig. 2: Dendrogram produced by the software GelCompar of the samples analyzed by VSS-PCR. Fifty-one distinct electrophoretic types were determined and named A to X. The dot delimits the clones associated with clonal complex ET-5/ST-32.

Table 2. Discrimination indexes for some *N. meningitidis* typing methods

Method	N° of isolates	N° of types	Size (%) of major type	Discrimination index
MLST	75	29	17 (22.7)	0.928
PFGE	47	35	5 (10.6)	0.979
VSS-PCR	75	51	7 (9.3)	0.984

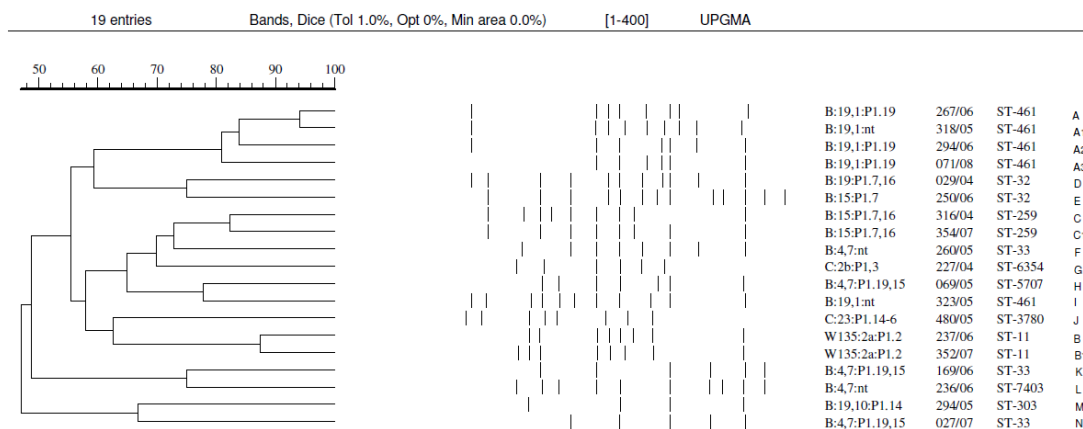


Fig.3: Dendrogram produced by the software GelCompar of the clinical samples analyzed by VSS-PCR. Nineteen distinct electrophoretic types were determined and designated A to N.

DISCUSSION

The population structure of *N. meningitidis* is complex, with the rate of its diversification varying considerably. For the serogroups B and C meningococci, which diversify relatively rapidly, PFGE, ribotyping, RAPD, MLEE and other PCR-based methods can be applied in localized outbreaks. However, other methods (e.g., MLEE and MLST) are necessary. Whether an evaluation of long-term or global epidemiology of meningococci is required (Yakubu *et al.*, 1999).

Through the analysis of the results generated by the serological typing of 75 isolates of meningococcus in the studied period, there was a wide diversity of serotypes and serosubtypes among serogroups B (89%) and C (7%) isolates, although only some of them are prominent. The high level of genetic diversity among the serogroup B isolates indicates that the meningococci have multiple clonal origins and that strains within a clonally related group are derived from genetic variation during clonal expansion (Yang *et al.*, 2007).

In this work we describe the development and implementation of a rapid strain typing method based on PCR that may assist outbreak investigations by distinguishing between sporadic and outbreak-associated strains of *N. meningitidis*. The results showed a good correlation to the data obtained by MLST and PFGE, the reference techniques for epidemiological studies of meningococci.

Both the VSS-PCR and the PFGE showed a confineable discrimination between the samples of the ST-32/ET-5 complex. The number of fragments generated by PFGE varied from 9 to 20 and the VSS-PCR varied from 3 to 12, which considerably making the analysis easier, both visually or by software.

The STs found between the years 2004 to 2008 are similar to those reported in 2000, except the following STs: ST-5707, ST-3780, ST-11, ST-6354, ST-303, and one new ST (ST-7403).

Weidlich *et al.* (2008) showed that 74% of the isolates belonged to 3 hypervirulent lineages, being the ST-32 complex (52%) the most prevalent. In this study, fifty-one of the isolates (68%) belonged to 5 hypervirulent lineages: ST-32/ET-5 complex, ST-23/Cluster A3 complex, ST-11/ET-37 complex, ST-41/44 complex/lineage 3, and ST-8/cluster A4, associated with some of the most endemic and epidemic meningococcal disease of the

latter half of the 20th century. ST-8 complex is related to the hypervirulent lineages and have been responsible for a significant proportion of serogroup C disease worldwide because both express related PorA and PorB proteins (class 2), and the founder STs share three alleles at seven loci analyzed in the MLST scheme (Claus *et al.*, 2003).

In this study we have obtained one isolate belonging to the ST-41/44 complex/lineage III that is known as the responsible for increased incidence of meningococcal serogroup B disease in The Netherlands and other European countries after 1982 (Caugant *et al.*, 1990; Scholten *et al.*, 1994). Most hypervirulent clone complexes (ST-32 and ST-41/44) and the persistence of the clonal complex ST-11 related to major epidemics worldwide, especially in Africa (de Filippis & Vicente, 2005). Another important issue that should be taken into account is the possible spreading of strains of the ST-11/ET-37 associated to the ET-15 variant in South American countries, which should be tracked because this hypervirulent clone has been detected in Canada in 1986 (Ashton *et al.*, 1991) spreading to several countries (Krizova & Musilek, 1995; Pollard *et al.*, 2004). This clone is known to be responsible for high fatality rates (Mayer *et al.*, 2002; Kriz, 2004; Pollard *et al.*, 2004), and so far, it is restricted to the northeast region of Brazil (de Filippis & Vicente, 2005).

As described previously by Baethgen *et al.* 2008, only 3 cases of phenotype P1.5,2 were identified between 1995 and 2003, but all occurred before the year 2000. According to the study of Weidlich *et al.* 2008, the ST-11/ET-37 complex was the third most prevalent clone found in RS during the 2003 and 2005 period (14% of isolates). The significant increase in the number of serogroup W135 cases in RS may be related to the emergence of the hypervirulent clone W135:P1.5,2: ST-11.

In addition, the emergence of a new clone complex found only in Brazil, ST-639, genetically related to the ST-32/ET-5 complex, may potentially spread to other countries of Latin America, among the susceptible population, changing the epidemiological pattern of meningococcal disease in these countries (de Filippis & Vicente, 2005). In this study we have found two isolates belonging to ST-639 and these data confirm the high prevalence and diversity of serogroup B strains in Brazil, as previously reported (Sacchi *et al.*, 1994, 1998; de Filippis *et al.*, 2004), mainly when it is genetically related to the ST-32/ET-5 complex.

The two isolates from the year 2006 belonging to the ST-461 serogroup B:19.1:P1.19 were from the same hospital. The VSS-PCR technique revealed that they belong to the same cluster L (Fig. 2). The same occurred to samples from 2005 belonging to the same ST (B:19.1:NST) and belonging to the same PFGE pattern (cluster B) (Fig. 1).

Both short-term and long-term epidemiological studies depend on reliable typing methods which can be used to determine whether bacteria spread between individuals (Vogel *et al.*, 1998). Hospital practices, such as administration of antibiotics prior to collection of CSF, can generate results of false-negative cultures. However, this may be reduced by the inclusion of probable cases based on clinical criteria, since this use of the VSS-PCR directly in clinical specimens should facilitate the analysis of these samples.

The new PCR method showed an accurate epidemiological response, provided the care and limitations related to the methods based on PCR are observed. Also, the technique has low operational cost and easy implementation and interpretation. VSS-PCR showed an excellent discriminatory power and further validation may be used primarily for the characterization of isolates associated with outbreaks of DM. The method for typing of strains circulating in RS state was able to discriminate the isolates, including the differentiation of clones associated with moderate resistance to penicillin.

VSS-PCR has several advantages over PFGE for strain typing of bacterial pathogens. VSS-PCR is less labor intensive, safer, cheaper, more rapid, and has equal or better discriminatory power when compared to PFGE. The discriminatory power of VSS-PCR and PFGE were nearly equivalent in our comparison analyses, 0.984 and 0.979, respectively. VSS-PCR seems to have slightly better resolution for separating unrelated clusters of meningococcal isolates. VSS-PCR described here allows determination within 2 days after colony isolation and could readily be implemented in most laboratories for this purpose. Informed decisions on whether to offer prophylactic therapy to unrelated contacts could then be reached.

VSS-PCR was found to be inexpensive, safe, rapid, and relatively easy to perform, and would be a useful tool for public health officials in future outbreak investigations of meningococcal disease. Efforts are underway to explore the applicability of VSS-PCR to the typing of meningococci directly from clinical specimens.

Acknowledgments

L.S.N. is a recipient of a CNPq fellowship. The VSS-PCR primers design and the first analysis were done at UC Berkeley, together with Binh Diep, directed by Lee Riley from School of Public Health Professor, and supported by Fogarty Program fellowship to Ludmila Baethgen (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, Chan & Maiden *et al.*, 2004). Special thanks are due to Leonard Mayer for providing the reference strain M5741. And to Seção de Bacteriologia from IAL/SP for serological typing. This work was supported by grants from the Brazilian science funding agencies MCT/CNPq and FAPERGS, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT-FEPPS), Brazil, and Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot - UFRGS), Brazil.

REFERENCES

- Achtman M.** Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. Trends Microbiol., 3, 186–192, 1995.
- Aho EL, Dempsey JA, Hobbs MM, Klapper DG, Cannon JG.** Characterization of the opa (class 5) gene family of *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol.; 5(6):1429-37, 1991.
- Ashton FE, Ryan JA, Borczyk A, Caugant DA, Mancino L, Huang D.** Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. J Clin Microbiol., 29:2489-2493, 1991.
- 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.** Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. Tropical Medicine and International Health, 13 (1): 31–40, 2008.
- Bille E, Ure R, Gray SJ, Kaczmarek EB, McCarthy ND, Nassif X, Maiden MCJ, Tinsley CR.** Association of a Bacteriophage with Meningococcal Disease in Young Adults. PLoS ONE, 3(12): e3885, 2008.
- Brasil (2005).** 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, 2005.
- Bygraves JA & Maiden MCJ.** Analysis of the clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. Journal of General Microbiology, 138: 523-531, 1992.
- Callaghan MJ, Jolley KA & Maiden MCJ.** Opacity-Associated Adhesin Repertoire in Hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. Infection and Immunity, 74 (9): 5085–5094, 2006.
- 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, Bol P, Høiby EA, Zanen HC, Frøholm LO. Clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing systemic disease in The Netherlands, 1958-1986. *J Infect Dis.*, 162(4):867-74, 1990.

Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*, 106:505–25, 1998.

Claus H, Weinand H, Frosch M & Vogel U. Identification of the Hypervirulent Lineages of *Neisseria meningitidis*, the ST-8 and ST-11 Complexes, by Using Monoclonal Antibodies Specific to *NmeDI*. *J. of Clinical Microbiol.*, 41 (8): 3873–3876, 2003.

CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2009.

Connell TD, Black WJ, Kawula TH, Barritt DS, Dempsey JA, Kverneland KJr, Stephenson A, Schepart BS, Murphy GL, Cannon JG. Recombination among protein II genes of *Neisseria gonorrhoeae* generates new coding sequences and increases structural variability in the protein II family. *Mol Microbiol.*, 2(2):227-36, 1988.

de Filippis I, Salles CA, Zahner V, do Nascimento CR, Momen H. Genetic diversity of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil, evaluated by multilocus enzyme electrophoresis. *Lett Appl Microbiol.*, 39:232– 239, 2004.

de Filippis I & Vicente ACP. 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, 2005.

de Jonge MI, Bos MP, Hamstra HJ, Jiskoot W, van Ulsen P, Tommassen J, van Alphen L, van der Ley P. Conformational analysis of opacity proteins from *Neisseria meningitidis*. *Eur. J. Biochem.*, 269:5215–5223, 2002.

Hauck CR & Meyer TF. ‘Small’ talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6:43–49, 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.*, 12:171–180, 1994.

Hunter PR & Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J. of Clinical Microbiol.*, 26 (11): 2465-2466, 1988.

Jolley KA, Chan MS & Maiden MCJ. mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics*, 5: 86 - 94, 2004.

Kriz P. Surveillance of invasive meningococcal disease in the Czech Republic. *Euro Surveill* 1:9, 2004.

Krizova P & Musilek M. Changing epidemiology of meningococcal invasive disease in the Czech republic caused by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2 (P1.5) ET-15/37. *Cent Eur J Public Health*, 3:189 - 194, 1995.

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, Yara TY, Gorla MC, de Paiva MV, de Souza AL, Gonçalves MI, Almeida SCG, Valle GRF, Sacchi CT. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbio.*, 45(4):1266-73, 2007.

Maiden MCJ, 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 MCJ. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60:561–88, 2006.

Malorny B, Morelli G, Kusecek B, Kolberg J, Achtman M. Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. *J. Bacteriol.* 180:1323–1330, 1998.

Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal Disease: History, Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Antimicrobial Susceptibility and Prevention. *Indian Journal of Medical Microbiology*, Review Article, 24 (1):7-19, 2006.

Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, Schmink SE, Noble CA, Tondella MLC, 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. *The Journal of Infectious Diseases*, 185:1596–605, 2002.

Morelli G, Malorny B, Muller K, Seiler A, Wang J, del Valle J, Achtman M. Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. *Mol. Microbiol.*, 25: 1047–1064, 1997.

Pollard AJ, Ochnio J, Ho M, Callaghan M, Bigham M, Dobsong S. Disease susceptibility to ST11 complex meningococci bearing serogroup C or W135 polysaccharide capsules North America. *Emerg Infect Dis.*, 10:1812– 1815, 2004.

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 MD outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 75–85, 2001.

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* 32:1783–1787, 1994.

Sacchi CT, de Lemos AP, Camargo MC, Whitney AM, Melles CE, Solari CA, Frasc CE, Mayer LW. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 4 in Sao Paulo, Brazil, 1990 to 1996. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 40:65–70, 1998.

Scholten RJPM, Bijlmer HA, Valkenburg HA, Dankert J. Patient and strain characteristics in relation to the outcome of meningococcal disease: a multivariate analysis. *Epidemiol Infect.*, 112: 115–124, 1994.

Stern A & Meyer TF. Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae. *Mol. Microbiol.*, **1**:5–12, 1987.

Taha MK & Alonso JM. Molecular epidemiology of infectious diseases: the example of meningococcal disease. *Research in Microbiology*, **159**: 62-66, 2008.

Virji M. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nature*, **7**: 274-286, 2009.

Vogel U, Morelli G, Zurth K, Claus H, Kriener E, Achtman M, Frosch M. Necessity of Molecular Techniques To Distinguish between *Neisseria meningitidis* Strains Isolated from Patients with Meningococcal Disease and from Their Healthy Contacts. *J. Clinical Microbiology*, **36** (9): 2465–2470, 1998.

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

Weidlich L, Baethgen LF, Mayer LW, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Rios SS, Kmetzsch C, Rossetti MLR, Zaha A. High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. *J Infect.*, **57** (4): 324-331, 2008.

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

Yakubu DE, Abadi FJR & Pennington TH. Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. *J. Med. Microbiol. Rev.*, Vol. **48**: 1055-1064, 1999.

Yang J, Zhang X, Xu X, Xu L, Li M, Yang L, Zhu Y, Shao Z, Liang X, Xu J, Wang Y, Jin Q. Genotypic analysis of serogroups other than A, B or C of *Neisseria meningitidis* in China. *Scand. J. Infect. Dis.*, **39**, 819–821, 2007.

5 DISCUSSÃO

Estratégias de vigilância em saúde pública são de fundamental importância para o controle de DM, visto que esta doença pode provocar epidemias. Para isso, são necessários estudos epidemiológicos, moleculares e genéticos para a caracterização detalhada do meningococo e da população atingida por esta enfermidade. Estes estudos apresentam várias limitações e permanecem como um desafio na prática clínica. Com isso, a busca de novos métodos moleculares tem sido o objetivo de pesquisadores da área da saúde para que possam aperfeiçoar e facilitar a sua aplicabilidade em casos de pacientes infectados e com suspeita de envolvimento em surtos. Assim, o objetivo principal deste estudo foi padronizar um método de tipagem molecular para caracterização de isolados de *N. meningitidis*, que utiliza como alvo a amplificação do gene *opa* e validá-lo através da comparação com outros dois métodos, já bem aceitos (MLST e PFGE), que analisam as variações genéticas dos isolados circulantes na população.

Uma gama de técnicas de tipagem molecular está disponível para auxiliar em investigações epidemiológicas de DM. Elas servem para determinar a afinidade genética entre as cepas. Entretanto, métodos baseados na PCR utilizados para a detecção e tipagem do DNA de espécimes clínicos meningocócicos mostram bom potencial. PFGE e outros métodos baseados em PCR são úteis para a identificação de micro-variações necessárias para distinguir entre cepas circulantes dentro de uma localização geográfica, podendo revelar pequenas diferenças entre cepas relacionadas. O MLST é um método altamente conservador de genotipagem, baseado em sequências de genes constitutivos (*housekeeping*), sendo um método padrão para estudar populações bacterianas, facilitando assim a epidemiologia em nível mundial examinando sua genética evolutiva ao longo do tempo (Morelli *et al.*, 1997; Nicolas *et al.*, 1997; Vogel, 1998; Yakubu *et al.*, 1999).

Pelo fato do VSS-PCR ser um método de PCR multiplex, algumas limitações devem ser observadas, como a concentração dos *primers* e do DNA, e o tempo de eletroforese, devendo ser mantida a regularidade na execução do método, bem como a utilização de reagentes do mesmo lote, pois estes fatores podem influenciar nos padrões obtidos. A utilização de uma cepa controle é de grande importância, pois o padrão de fragmentos obtidos deve se repetir em cada experimento. Não sendo observados criteriosamente estes detalhes, a caracterização dos demais isolados pode acarretar em um padrão de fragmentos inadequados e, conseqüentemente, levar a uma interpretação incorreta dos resultados.

Na técnica de PFGE as condições de eletroforese foram escolhidas para a separação de fragmentos entre 10 e 340 kb. Fragmentos abaixo de 8 kb podem escapar da detecção de fluorescência devido à sua baixa intensidade e não foram utilizados para a interpretação. Embora PFGE seja altamente adequado para diferenciar bactérias quase idênticas em número limitado de cepas, é pouco adequado para elucidar as relações entre um grande número de bactérias menos relacionadas (Nicolas *et al.*, 1997), sendo um método de tipagem muito sensível à caracterização de microevoluções genéticas.

Tanto a curto e longo prazo estudos epidemiológicos dependem de métodos de tipagem confiáveis que podem ser utilizados para determinar as bactérias circulantes entre os indivíduos. Um método de tipagem de *N. meningitidis* deve ter uma elevada capacidade discriminatória e reprodutível. O VSS-PCR apresentou um maior poder discriminatório de (0,984) quando comparado aos demais métodos utilizados. Isto era teoricamente esperado, uma vez que está baseado em um gene, que apresenta regiões hipervariáveis, enquanto que o MLST apresentou um índice discriminatório inferior (0,928), por ser baseado na análise de genes constitutivos da bactéria, estando menos sujeitos a variações, conforme descrito

anteriormente. Já o PFGE apresentou um índice discriminatório superior ao do MLST (0,979), porém quando aplicado a grandes coleções de isolados, seus resultados se tornam complexos para elucidar relações epidemiológicas.

Tanto as técnicas de VSS-PCR e o PFGE mostraram uma boa diferenciação dos isolados pertencentes ao complexo clonal ST-32/ET-5, dos isolados dos demais complexos. O número de fragmentos gerados por PFGE variou de 9 a 19 e pelo VSS-PCR variou de 3 a 12 fragmentos por isolado, o número reduzido de fragmentos facilita a interpretação dos resultados.

O estudo de caracterização de suscetibilidade à penicilina demonstrou uma taxa de 18,7% de isolados Pen^I e Pen^R nenhum isolado apresentou associação com a produção de β -lactamase. A fita de E-test® (AB Biodisk, Suécia) apresenta a concentração de 0,094 μ g/ml, um valor intermediário entre o que é considerado sensível e o que é considerado moderadamente resistente pelo CLSI/NCCLS (2009). Mastrantonio *et al.* (2003), utilizando este mesmo método consideram os valores de CIM >0.06–1 μ g/mL como isolados moderadamente resistentes à penicilina. Portanto, se considerarmos este último critério, a taxa de isolados moderadamente resistentes à penicilina é de 28%. Em outros países as taxas de isolados com diminuição da suscetibilidade à penicilina variam de 0 a 24,6% (Gottfredsson *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006).

Dos nove isolados caracterizados como ST-461, seis (66,6%) apresentaram valores de CIM compatíveis com suscetibilidade intermediária ou plena à penicilina. Esta associação demonstrou ser estatisticamente significativa ($p = 0,001$) quando comparada à ocorrência de suscetibilidade reduzida nos demais clones.

O VSS-PCR foi capaz de discriminar adequadamente os isolados distinguindo os clones pertencentes às linhagens hipervirulentas, inclusive os isolados Pen^I. A atenção é impulsionada pelo conceito de que cepas Pen^I podem ainda estar em evolução e em processo de aquisição de novas alterações no gene *penA*, antecipando o surgimento de cepas resistentes, como observado para *S. pneumoniae* e *N. gonorrhoeae* (Spratt, 1988). Na Itália, antes de 2002, meningococos Pen^I representaram 7,5% dos isolados, mas, desde então, a percentagem aumentou significativamente (para 27,4%) com a presença do fenótipo C:2b:P1.5 (Stefanelli *et al.*, 2004). Em Portugal, nos anos de 2001 e 2002 foi demonstrado que 27,5% dos isolados Pen^I estão relacionados com o fenótipo C:2b:P1.2,5 (Ferreira *et al.*, 2006). Em Cuba, no período de 1993 a 1999, 22,5% dos casos de DM pelo fenótipo B:4:P1.15 apresentaram suscetibilidade reduzida à penicilina (Sosa *et al.*, 2001).

Pelo MLST obtivemos cinco STs mais freqüentes (68%), ST-33 (n=18; 24%), ST-259 (n=12; 16%), ST-461 (n=9; 12%), ST-103 (n=7; 9%) e ST-32 (n=5; 7%). Sendo o mais prevalente o complexo clonal hipervirulento ST-32/ET-5 (n=46; 61%). Outros estudos também confirmaram como sendo este o complexo mais prevalente encontrado desde 1992 no mundo. Cepas do complexo foram espalhando-se globalmente, como no Reino Unido, onde a circulação de pelo menos 3 STs deste complexo foram relatados (Bygraves *et al.*, 1999).

Neste estudo 68% dos isolados pertencem a linhagens hipervirulentas, dentre os isolados do complexo ST-32/ET-5, o ST-33 foi o tipo mais comum encontrado no RS, seguido pelo ST-259, e depois pelo complexo ST-23/ClusterA3, ST-11/ET-37, complexo ST-41/44(linhagem 3), e ST-8 (cluster A4), os quais foram associados com algumas das principais endemias e epidemias de DM na segunda metade do século 20. Segundo o

estudo de Weidlich *et al.* (2008) 74% dos isolados pertenciam a 3 linhagens hipervirulentas entre 2003 a 2005, sendo também o complexo ST-32/ET-5 (52%) o mais prevalente.

O complexo ST-103 tem estado presente em São Paulo (SP) desde 1989 e tornou-se associado ao sorogrupo C na epidemia de 2000, onde foram encontrados apenas quatro diferentes STs entre sorogrupo C do complexo ST-103 de cepas isoladas em SP (Lemos *et al.*, 2007). Cepas isoladas do sorogrupo C de áreas onde a doença é endêmica ou de surtos geralmente pertencem aos complexos ST-11 ou ST-8 (Maiden & Stuart, 2002). O complexo ST-8 foi uma causa comum da doença na década de 1970 nos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Islândia, e em muitos outros países europeus, e foi responsável por uma grave epidemia do sorogrupo B, na Cidade do Cabo, África do Sul, que começou em 1979 (Caugant *et al.*, 1987; 1990). Este clone pode estar relacionado aos sorogrupos B e C, os organismos geralmente caracterizados fenotipicamente como 2b:P1.10 (Caugant, 1998). Mas, em contraste com estes relatos, cepas do sorogrupo C (complexo ST-8) de SP têm o fenótipo peculiar 2b:P1.3, sendo que nunca foi relatada sua associação à epidemias (Sacchi *et al.*, 1992).

Caracterização de cepas de *N. meningitidis* somente por sorogrupo e serotipagem não pode revelar o potencial patogênico e estrutura clonal das cepas circulantes em uma área definida. Ultimamente, MLST tem sido utilizado para reconhecimento de grupos clonais virulentos, tais como ST-11, ST-8, ST-103, ST-32 (Lemos *et al.*, 2007). Quando utilizados em conjunto, métodos fenotípicos e genotípicos podem também complementar-se mutuamente, como tem sido demonstrado com o sorogrupo W135 Hajj na investigação do surto em 2000 na Arábia Saudita (Mayer *et al.*, 2002). Consequentemente, a escolha de métodos de tipagem para serem utilizados em determinadas investigações pode ser baseada

no tipo e extensão de cada um dos surtos, na estrutura de cada laboratório, seus requisitos e capacidades.

VSS-PCR mostrou-se altamente reprodutível, de baixo custo, quando comparado aos demais métodos utilizados, rápido e relativamente de fácil execução, podendo ser um instrumento útil para investigações de surtos de DM. VSS-PCR tem várias vantagens sobre PFGE para tipagem de bactérias patogênicas, apresentando igual ou melhor poder discriminatório quando comparada com PFGE, necessitando de poucos equipamentos de laboratório e de uma pequena quantidade do isolado em cultura.

VSS-PCR mostrou uma resposta epidemiológica precisa, devendo ser observados cuidados e as limitações relacionadas com os métodos baseados em PCR. Além disso, a técnica possui um baixo custo operacional, fácil execução e interpretação, obtendo-se o resultado em no máximo dois dias. VSS-PCR mostrou um excelente poder discriminatório podendo ser utilizado principalmente para a caracterização dos isolados associados a surtos de DM. O método de tipagem de cepas circulantes no estado do RS foi capaz de discriminar os isolados, incluindo a diferenciação de clones associados a resistência moderada à penicilina.

O método VSS-PCR aqui descrito permite a determinação do grau de similaridade entre diferentes amostras dentro de no máximo dois dias após o isolamento da colônia. Assim, devido a sua praticidade, poderia facilmente ser implantado na maioria dos laboratórios de rotina. Estamos explorando a aplicabilidade para a tipagem de meningococos diretamente de espécimes clínicos, uma vez que não tendo a amostra em cultura viável, mesmo assim a técnica poderia ser aplicada, reduzindo ainda mais o tempo de obtenção do resultado e ampliando o número de cepas caracterizadas.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A caracterização de *N. meningitidis* por MLST no período de 2000 a 2008 demonstrou alta prevalência de cepas geneticamente relacionadas a clones hipervirulentos, e alta diversidade entre as cepas do complexo mais prevalente, ET-5/ST-32.

O estudo de caracterização da suscetibilidade a penicilina dos isolados demonstrou uma taxa de 14,6% de suscetibilidade reduzida com uma associação significativa ao clone ST-461 e ao ST-32, quando comparada aos demais clones. Nenhum isolado demonstrou atividade para a β -lactamase.

PFGE permitiu a validação do VSS-PCR, por ser um método bem estabelecido para a caracterização de surtos, garantindo a confirmação dos resultados do método proposto.

O método VSS-PCR apresentou um excelente poder discriminatório, possui um baixo custo operacional sendo de fácil execução e interpretação, podendo ser utilizado em estudos de surtos de DM.

Os resultados obtidos na utilização da técnica VSS-PCR para a detecção de *N. meningitidis* foram adequados para a sua utilização na investigação de surtos de DM, o que a torna acessível para uso na rede pública de saúde. O uso desta técnica a partir de amostras clínicas tornará possível sua realização, caracterizando epidemiologicamente os isolados mesmo quando a cultura do meningococo não está disponível ou viável.

A partir dos resultados deste trabalho, espera-se incentivar as autoridades de saúde do estado do RS a apoiar a criação de um programa regular de caracterização molecular das

cepas de meningococo, a fim de detectar surtos e prevenir possíveis epidemias, já que o estado possui infra-estrutura para isso e dispomos de técnicas adequadas.

A técnica de VSS-PCR avaliada neste trabalho pode ser utilizada como rotina de investigação clínica, concomitantemente aos métodos convencionais de identificação do meningococo, e a outros métodos moleculares a fim de determinar se os resultados demonstrados neste trabalho confirmam-se na rotina laboratorial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS NAS SEÇÕES 1, 2 e 5

Abdillahi H & Poolman JT. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microb Path*, 4(1):27-32, 1988.

Aho EL, Dempsey JA, Hobbs MM, Klapper DG, Cannon JG. Characterization of the opa (class 5) gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.*; 5(6):1429-37, 1991.

Alkmin MGA, Landgraf IM & Melles CE. Avaliação do teste de látex comparativamente a cultura e a imunoeletroforese cruzada no diagnóstico de meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(1): 19-24, 1995.

Alkmin MGA, Landgraf IM, Vieira MFP. Contribuição da imunoeletroforese cruzada em líquido cefalorraquidiano e/ou soro no diagnóstico de infecções por *Neisseria meningitidis* grupo B no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1): 13-17, 1996.

Andersen BM. Endotoxin release from *Neisseria meningitidis*: relationship between key bacterial characteristics and meningococcal disease. *Scand. J. Infect. Dis.*, (suppl.): 64, 1989.

Antignac A, Boneca IG, Rousselle JC, Namane A, Carlier JP, Vázquez JA, Fox A, Alonso JM, Taha MK. Correlation between Alterations of the Penicillin-binding Protein 2 and Modifications of the Peptidoglycan Structure in *Neisseria meningitidis* with Reduced Susceptibility to Penicillin G. *J Biol Chemistry*, 278(34): 31529–31535, 2003.

Apicella MA. Gram-negative cocci: *Neisseria meningitidis*. In: Mandel, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandel, G. L.; Bennett, J. E. & Dolin, R. 4th edition, Churchill Livingstone Inc, NY, p. 1896-1908, 1995.

Arditi M & Yogev R. Common etiologic agents of bacterial meningitidis. In: The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases. Shulman, S. T.; Phair, J. P.; Peterson, L. R. & Warren, J. R. 5th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, p. 316-322, 1997.

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. Epidemiologia da Doença Meningocócica no Rio Grande do Sul, Caracterização molecular e da resistência à penicilina em isolados de *Neisseria meningitidis*. Tese (doutorado): Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. 133p, 2007.

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. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. *Tropical Medicine and International Health*, 13 (1): 31–40, 2008.

Barroso DE. Doença Meningocócica In: Medicina Tropical – Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Batista, R. S.; Gomes, A. P.; Igreja, R. P.; Huggins, D. W. Ed. Cultura Médica, 521-549, 2000.

Bash MC, Lesiak KB, Banks SD, Frash CE. Analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein gene variable regions and type identification using genetic techniques. *Infection and Immunity*, 63: 1484-1490, 1995.

Bentley SD, Vernikos GS, Snyder LAS, Churcher C, Arrowsmith C, Chillingworth T, Cronin A, Davis PH, Holroyd NE, Jagels K, Maddison M, Moule S, Rabinowitsch E, Sharp S, Unwin L, Whitehead S, Quail MA, Achtman M, Barrell B, Saunders NJ, Parkhill J. Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C Strain FAM18. *PLoS Genet* 3(2): e23, 2007.

Bevanger L, Bergh K, Gisas 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.

Bier O. Neissérias. Bacteriologia e Imunologia – em suas aplicações à medicina e à higiene. 19 ed. São Paulo: Melhoramentos, p. 438-446, 1978.

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.

Boras A, Bozinovic D, Tenover FC, Popovic T. First report of *Neisseria meningitidis* intermediately resistant to penicillin in Croatia. J. Clin. Microbiol. **39**:823, 2001.

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 NRW. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, p.1532-1538, 1992.

Brasil (2002). Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Brasília, 2002.

Brasil (2005). 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, 2005.

Brown S, Riley G, & Jamieson F. *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin in Ontario, Canada 1997–2000. Can. Commun. Dis. Rep. 27:73–75, 2001.

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.

Bygraves JA, Urwin R, Fox AJ, Gray SJ, Russell JE, Feavers IM, Maiden MCJ. Population Genetic and Evolutionary Approaches to Analysis of *Neisseria meningitidis* Isolates Belonging to the ET-5 Complex. J of Bacteriology, 181 (18): 5551-5556, 1999.

Callaghan M. J., Jolley K. A., Maiden M. C. J. Opacity-Associated Adhesin Repertoire in Hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. Infection and Immunity, 74 (9): 5085–5094, 2006.

Callaghan MJ, Buckee CO, Jolley KA, Kriz P, Maiden MCJ, Gupta S. The Effect of Immune Selection on the Structure of the Meningococcal Opa Protein Repertoire. PLoS Pathog 4(3): 1-7, 2008.

Canica M, Dias R, Nunes B, Carvalho L, Ferreira E. Invasive culture-confirmed *Neisseria meningitidis* in Portugal: evaluation of serogroups in relation to different variables and antimicrobial susceptibility (2000–2001). *J. Med. Microbiol.* 53:921–925, 2004.

Caugant DA, Froholm LO, Bovre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander R. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 4927-4931, 1986.

Caugant DA, Froholm LO, Bovre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander RK. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 53: 389-394, 1987.

Caugant DA, Bol P, Høiby EA, Zanen HC, Frøholm LO. Clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing systemic disease in The Netherlands, 1958-1986. *J Infect Dis*, 162(4):867-74, 1990.

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: 323-330, 1994.

Caugant D. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*, 106: 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/menigitis_manual.pdf).

Clarke SC, Diggl MA & Edwards GFS. Semiautomation of multilocus sequence typing for the characterization of clinical isolates of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 39 (9): 3066-3071, 2001.

CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2009.

Connell TD, Shaffer D & Cannon JG. Characterization of the repertoire of hypervariable regions in the Protein II (*opa*) gene family of *Neisseria gonorrhoeae*. *Molecular Microbiology*, 4(3): 439-449, 1990.

Connolly M. & Noah N. Is serogroup C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. *Epidemiology and Infection*, 122: 41-49, 1999.

Conyn-van Spaendonk MAE, Reintjes R, Spanjaard L, van Kregten E, Kraaijeveld AG, Jacobs PHA. Meningococcal carriage in relation to an outbreak of invasive disease due to *Neisseria meningitidis* serogroup C in the Netherlands. *Journal of Infection*, 39: 42-48, 1999.

Dalrymple BP & Mattick JS. An analysis of the organization and evolution of type 4 (MePhe) fimbrial subunit proteins. *J. Mol. Evol.*, 25: 261-269, 1987.

de Filippis I, Salles CA, Zahner V, do Nascimento CR, Momen H. Genetic diversity of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil, evaluated by multilocus enzyme electrophoresis. *Lett Appl Microbiol.*, 39:232– 239, 2004.

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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 53, 161-167, 2005.

de Jonge MI, Bos MP, Hamstra HJ, Jiskoot W, van Ulsen P, Tommassen J, van Alphen L, van der Ley P. Conformational analysis of opacity proteins from *Neisseria meningitidis*. *Eur. J. Biochem.*, 269:5215–5223, 2002.

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.

Dorset DL, Engel A, Massalski A, Rosenbusch JP. Three Dimensional Structure of a Membrane Pore: Electron Microscopical Analysis of *Escherichia coli* Outer Membrane Matrix Porin. *Biophys J.* 45(1):128-129, 1984.

- Dehio C, Gray-Owen S & Meyer T.** The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends in Microbiol.*, 6 (12): 489-495, 1998.
- Enright MC & Spratt BG.** A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 144: 3049-3060, 1998.
- Enright MC & Spratt BG.** Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7 (12): 482-487, 1999.
- Feavers IM, Fox AJ, Gray S, Jones DM, Maiden MCJ.** Antigenic diversity of meningococcal outer membrane protein PorA has implications for epidemiological analysis and vaccine design. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3: 444-450, 1996.
- Feavers IM, Gray S, Urwin R, Russel JE, Bygraves JA, Kaczmarek EB, Maiden MCJ.** Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (12): 3883-3887, 1999.
- 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.
- Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U.** An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol*, 138(12): 4402-7, 1987.
- Fox AJ, Taha MK & Vogel U.** Standardized nonculture techniques recommended for European reference laboratories. *FEMS Microbiol Rev* 31: 84-88, 2007.
- Frasch CE, Zollinger WD & Poolman JT.** Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis*. 7(4):504-10, 1985.
- Frasch CE, Tsai CM & Mocca LF.** Outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: structure and importance in meningococcal disease. *Clin Invest Med*. 9(2):101-7, 1986.
- Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson Jr, WD, Riley LW.** Double-repetitive-element PCR method for subtyping *M. tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 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: 868–874, 1998.
- Giorgini D & Taha MK.** Molecular typing of *Neisseria meningitidis* serogroup A using the polymerase chain reaction and restriction endonuclease pattern analysis. *Mol. Cell Probes*, 9: 297-306, 1995.
- Gottfredsson M, Diggle MA, Lawrie DI, Erlensdóttir H, Hardardóttir H, Kristinsson KG, Clarke S.** *Neisseria meningitidis* sequence type and risk for death, Iceland. *Emerg Infect Dis.* 12 (7): 1066-73, 2006.
- Guibourdenche M, Giordini D, Guèye A, Larribe M, Riou JY, Taha MK.** Genetic analysis of a meningococcal population based on polymorphism of pilA-pilB locus: a molecular approach for meningococcal epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 745-750, 1997.
- Hart CA & Rogers TRF.** Meningococcal disease. *Journal of Medical Microbiology*, 39: 3-25, 1993.
- Hauck CR & Meyer TF.** ‘Small’ talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6:43–49, 2003.
- Hobbs MM, Seiler A, Achtman M, Cannon J.** Microevolution within a clonal population of a pathogenic bacteria: recombination, gene duplication and horizontal genetic exchange in the *opa* gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.*, 12 (2): 171-180, 1994.
- Jackson LA, Schuchat A, Reeves MW, Wenger JD.** Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States: an emerging threat. *Journal of the American Medical Association*, 273: 383-389, 1995.
- 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.
- Jolley KA & Maiden MC.** AgdbNet - antigen sequence database software for bacterial typing. *BMC Bioinformatics.* 7:314, 2006.

Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.*, 25: 639-647, 1997.

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, Hopen 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.

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.

Lee HSW, Boulton IC, Reddin K, Wong H, Halliwell D, Mandelboim O, Gorringer AR, Gray-Owen SD. Neisserial Outer Membrane Vesicles Bind the Coinhibitory Receptor Carcinoembryonic Antigen-Related Cellular Adhesion Molecule 1 and Suppress CD4+ T Lymphocyte Function. *Infect Immun*, 75 (9): 4449–4455, 2007.

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.

Lemos AP, Yara TY, Gorla MC, de Paiva MV, de Souza AL, Goncalves MI, Almeida SCG, Valle GRF, Sacchi CT. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol*; 45 (4): 1266-73, 2007.

Levin JC & Stein DC. Cloning, Complementation, and Characterization of an *rfaE* Homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. of Bacteriology*, 178 (15): 4571–4575, 1996.

Maiden MCJ. Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetical exchange on the biology of *Neisseria meningitidis*. FEMS Microbiol. Lett., 112: 243-250, 1993.

Maiden MCJ, 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 MCJ & Stuart JM. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. Lancet; 359: 1829–30, 2002.

Malorny B, Morelli G, Kusecek B, Kolberg J, Achtman M. Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. J. Bacteriol. 180:1323–1330, 1998.

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): 422-8, 2003.

Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, Schmink SE, Noble CA, Tondella MLC, 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. The Journal of Infectious Diseases, 185:1596–605, 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.

- Mignogna G, Giorgi A, Stefanelli P, Neri A, Colotti G, Maras B, Schininà ME.** Inventory of the proteins in *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *J Proteome*, 4(4):1361-70, 2005.
- Milagres LG, Gorla MC, Sacchi CT, Rodrigues MM.** Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with an outer membrane vaccine. *Infect Immun.*, 66(10): 4755-61, 1998.
- Moore J, Bailey SE, Benmechernene Z, Tzitzilonis C, Griffiths NJ, Virji M, Derrick JP.** Recognition of saccharides by the OpcA, OpaD, and OpaB outer membrane proteins from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 280:31489–31497, 2005.
- Morelli G, Malorny B, Muller K, Seiler A, Wang J, del Valle J, Achtman M.** Clonal descent and microevolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. *Mol. Microbiol.*, 25: 1047–1064, 1997.
- Morello JA, Janda WM & Doern GV.** *Neisseria* and *Branhamella*. In: Manual of Clinical Microbiology. Balows, A.; Hansler, W. J. Jr.; Herrmann, K. L.; Isenberg, H. D. & Shadomy, H. J. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, p. 258-276, 1991.
- Muenzner P, Dehio C, Fujiwara T, Achtman M, Meyer TF, Gray-Owen S.** Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells. *Infect. Immun.*, 68 (6): 3601-3607, 2000.
- Murphy TF & Bartos LC.** Surface-Exposed and Antigenically Conserved Determinants of Outer Membrane Proteins of *Branhamella catarrhalis*. *Infect Immun*, 57 (10): 2938-2941, 1989.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA.** Medical Microbiology. 3rd ed. Mosby, St. Louis – Missouri, p. 222-231, 1998.
- 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, Parzy D & Martet G. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of clonal relationships among *Neisseria meningitidis* A strains from different outbreaks. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 16 (7): 541-4, 1997.

Parkhill J, Achtman M, James KD, Bentley SD, Churcher C, Klee R, Morelli G, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Davies M, Davis P, Delvin K, Feltwell T, Halmin N, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Mungall K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Simmonds M, Skelton J, Whitehead S, Spratt BG, Barrell BG. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature*, 404 (6777): 502-506, 2000.

Peltola H. Meningococcal disease: still with us. *Reviews of Infectious Diseases*, 5 (1): 71-91, 1983.

Pérez-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.

Perkins MD, Mirrett S & Reller LB. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J. Clin. Microbiol*, 33 (6): 1486-1491, 1995.

Phillips EJ & Simor AE. Bacterial meningitis in children and adults. Changes in community acquired disease may affect patient care. *Postgrad Med*, 103 (3): 102-117, 1998.

Pizza M, Scarlato V, Masignani 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, Broecker 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 (5459): 1816-20, 2000.

Poolman JT, Kriz-Kuzemenska P, Ashton F, Bibb W, Dankert J, Demina A, Frøholm LO, Hassan-King M, Jones DM, Lind I, Prakash K, Xujing H. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*: results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2(1):69-72, 1995.

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 MD outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. J. Clin. Microbiol., 39: 75–85, 2001.

Ramsay M, Kaczmarski E, Rush M, Mallard R, Farrington P, White J. Changing pattern of case ascertainment and trends in meningococcal disease in England and Wales. Communicable Disease Report, 7: R49-R54, 1997.

Requejo HIZ & Ferreira AW. Diagnostico rápido de meningites bacterianas pelo teste de látex aglutinação. Laes/Haes, 81: 32-40, 1993.

Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML, Danila R, Cieslak P, Shutt KA, Popovic T, Schuchat A, Harrinson LH, Reingold AL. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. J. Infect. Dis., 180: 1894-1901, 1999.

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, 1992.

Sacchi CT, Lemos AP, Brandt ME, Whitney AM, Melles CE, Solari CA, Frasch 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, Frasch 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.

Schoen C, Joseph B, Claus H, Vogel U, Frosch M. Living in a changing environment: Insights into host adaptation in *Neisseria meningitidis* from comparative genomics. Journal of Medical Microbiology 297: 601–613, 2007.

Schoen C, Blom J, Claus H, Glu AS, Brandt P, Muller T, Goesmann A, Joseph B, Konietzny S, Kurzai O, Schmitt C, Friedrich T, Linke B, Vogel U, Frosch M. Whole-

genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. PNAS 105 (9): 3473–3478, 2008.

Schreiber W & Mathys FK. Meningite epidêmica. In: Infectio: doenças infecciosas na história da medicina. Basileia: Editiones Roche, p. 112-115, 1991.

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.

SES. Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Coordenação de Controle de Doenças Transmissíveis agudas – Equipe de Controle Epidemiológico, Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde & Sociedade de Pediatria do Rio Grande do Sul. I Simpósio Regional Sul e Sudeste sobre a Vigilância Epidemiológica das Meningites, 29 p., 2001.

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. Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Nature. 332 (6160): 173-6, 1988.

Stephens DS. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. Lancet., 353(9157): 941-942, 1999.

Stephens DS. Conquering the Meningococcus. FEMS Microbiol Rev 31: 3–14, 2007.

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: 3103–3106, 2004.

Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. J. Clin. Microbiol. 38 (2): 855-857, 2000.

Taha MK, Vázquez JA, Hong E, Bennett DE, Bertrand S, Bukovski S, Cafferkey MT, Carion F, Christensen JJ, Diggle M, Edwards G, Enríquez R, Fazio C, Frosch M, Heuberger S, Hoffmann S, Jolley KA, Kadlubowski M, Kechrid A, Kesanopoulos K, Kriz P, Lambertsen L, Levenet I, Musilek M, Paragi M, Sagner A, Skoczynska A,

- Stefanelli P, Thulin S, Tzanakaki G, Unemo M, Vogel U, Zarantonelli ML.** Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51 (8): 2784-92, 2007.
- Taha MK & Alonso JM.** Molecular epidemiology of infectious diseases: the example of meningococcal disease. *Research in Microbiology,* 159: 62-66, 2008.
- 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 J.D.; Hickey, E.K.; Haft, D.H.; Salzberg, S.L.; White, O.; Fleischmann, R.D.; 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, Massignani 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.
- Tikhomirov E, Santamaria M & Esteves K.** Meningococcal disease: public health burden and control. *World Health Statistical Quartely,* 50: 170-177, 1997.
- Tsai CM, Frasch CE & Mocca LF.** Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol,* 146(1): 69-78, 1981.
- Tunkel AR & Sheld WM.** Acute meningitis. In: *Principles and practice of infectious diseases* Mandell GL, Benett, JE, Dolin R, eds., 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 831- 65, 1995.
- Tzanakaki G, Urwin R, Musilek M, Kriz P, Kremastinou J, Pangalis A, Blackwell CC, Maiden MCJ.** Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. *J. Clin. Microbiol.,* 39 (4): 1235-1240, 2001.
- Tzeng YL & Stephens DS.** Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microb. Infec.,* 2: 687-700, 2000.
- Urwin R, Feavers IM, Jones DM, Maiden MCJ, Fox AJ.** Molecular variation of meningococcal serotype 4 antigen genes. *Epidemiol. Infect.* 121:95– 101, 1998.

- van Deuren 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.
- van der Ende A, Schuurman IG, Hopman CT, Fijen CA, Dankert J.** Comparison of commercial diagnostic tests for identification of serogroup antigens of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 3326-3327, 1995.
- Vedros NA & Genus I.** *Neisseria*. In: Krieg, N. R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams and Wilkins, p. 290-296, 1984.
- Vieusseaux M.** Memoire sur le maladie qui a regne a geneve du printemps de 1805. *Journal de Médecine Chirurgie Pharmacie*, 11: 163, 1805.
- Virji M, Makepeace K, Peak IR, Ferguson DJ, Jennings MP, Moxon ER.** Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* 18: 741-754, 1995.
- Virji M.** Glycosylation of the meningococcus pilus protein. *ASM News*, 64 (7): 398-405, 1998.
- Virji M, Evans D, Hadfield A, Grunert F, Teixeira AM, Watt SM.** Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* identification of Opa adhesiotopes on the N-domain of CD66 molecules. *Mol. Microbiol.*, 34 (3): 538-551, 1999.
- Virji M.** Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nature*, 7: 274-286, 2009.
- Vogel U, Morelli G, Zurth K, Claus H, Kriener E, Achtman M, Frosch M.** Necessity of Molecular Techniques To Distinguish between *Neisseria meningitidis* Strains Isolated from Patients with Meningococcal Disease and from Their Healthy Contacts. *J. Clinical Microbiology*, 36 (9): 2465-2470, 1998.
- Vogel U, Claus H, Frosch M, Caugant DA.** Molecular basis for distinction of the ET-15 clone within the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (2): 941-942, 2000.

- Volk WA, Gehardt BM, Hammarskjöld ML, Kadner RJ.** Neisseriaceae. In: Essentials of Medical Microbiology. 5th edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers,. p. 348-352, 1996.
- Wedege 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.
- Weidlich L, Baethgen LF, Mayer LW, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Rios SS, Kmetzsch C, Rossetti MLR, Zaha A.** High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. *J Infect.*, 57 (4): 324-331, 2008.
- Weidlich L.** Caracterização molecular de cepas de meningococo circulantes no Rio Grande do Sul e detecção de *Neisseria meningitidis* por PCR em tempo real. Tese (doutorado): Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. 93p, 2008.
- 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.
- WHO (1998).** Control of epidemic meningococcal disease. WHO practical guidelines. 2nd edition, World Health Organization (<http://www.who.int/emcdocuments/meningitis/whoemcbac983.html>).
- Wilson GS & Miles AA.** Neisseria. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunology. Baltimore: The Williams & Wilkins, p. 665-692, 1964.
- Woods CR, Smith AL, Wasilauskas BL, Campos J, Givner LB.** Invasive disease caused by *Neisseria meningitidis* relatively resistant to penicillin in North Carolina. *J. Infect. Dis.* 170:453–456, 1994.
- 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.

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.

Yakubu DE, Abadi FJR & Pennington TH. Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. *J. Med. Microbiol.*, 48: 1055-1064, 1999.

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.

ANEXOS

U37255 CGGGCACGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 138
 X63110 CGGGCACGGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 252
 X63109 CAGCCGACGCCCGTATTATGTGCAGGCGGATTTAGCTTATGCCGCCGAACGTATTACCCA 152

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

Primer foward LB01

AF001203 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 202
 U37257 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 251
 U77881 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 282
 X63108 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGAGTGTGAGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 271
 AF016292 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGACTTCGGCGA 188
 U03405 CAGAAACATCCGTACGCATTCATCCACCCCTCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 188
 AF001201 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 202
 U03410 -----
 AF001202 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTATGATTTCCGGCGG 202
 AF016290 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTATGATTTCCGGCGG 188
 U03406 CAGAAACATCCGTACGCATTCATCCACCCCTCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 188
 U03412 CAGAAACATCCGTACGCATTCATCCACCCCTCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 188
 U03409 -----
 U03411 -----
 AF016289 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGG 188
 X63111 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGAGTGTGAGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 247
 AF016287 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGAGTGTGAGTTCGGCTACGATTTCCGGCGG 188
 AF016291 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGACTTCGGCGG 188
 AF031334 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 194
 U03408 -----
 U03404 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 409
 AF001204 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGA 202
 AF016285 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTATGATTTCCGGCGG 188
 AF016286 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTATGATTTCCGGCGG 188
 U37255 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGG 252
 X63110 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGG 366
 X63109 CAGAAACATCCGTGCGCATTCATCCACCCCGGGTGTGGTTCGGCTACGATTTCCGGCGG 272

AF001203 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 262
 U37257 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 311
 U77881 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 342
 X63108 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 331
 AF016292 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 248
 U03405 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACGACAATAAATATTCCTG 248
 AF001201 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 262
 U03410 -----GCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 47
 AF001202 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 262
 AF016290 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACAACAATAAATATTCCTG 248
 U03406 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACGACAATAAATATTCCTG 248
 U03412 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAATGGAACGACAATAAATATTCCTG 248

```

U03409 -----GCCAGTTACAGAAAAATGGAACAACAATAAATATTCCGT 38
U03411 -----GCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAACAACAATAAATATTCCGT 47
AF016289 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAACAACAATAAATATTCCGT 248
X63111 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTATAGAAAAATGGAACAACAATAAATATTCCGT 307
AF016287 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAGCAACAATAAATATTCCGT 248
AF016291 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAACGACAATAAATATTCCGT 248
AF031334 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTATTCTAA 254
U03408 ----AGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTATTCTAA 56
U03404 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTATTCTAA 469
AF001204 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTCTTCTAC 262
AF016285 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTCTTCTAC 248
AF016286 CTGGAGAATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTCTTCTAC 248
U37255 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTCTTCTAC 312
X63110 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAAATGGAAGAAAAGTAATTCTTCTAC 426
X63109 CTGGAGGATAGCGGCAGATTATGCCAGTTACAGAAAGTGAACAACAATAAATATTCCGT 332

```

***** * * * * *

Primer foward LB02

```

AF001203 CAACACAAAAGA-----GTTGGAAAAACAAGCATAACAAT---AAGAAAGACCTGAAGAC 313
U37257 CAACACAAAAGA-----GTTGGAAAAACAAGCATAACAAT---AAGAAAGACCTGAAGAC 362
U77881 CAACACAAAAGA-----GTTGGAAAAACAAGCATAACAAT---AAGAAAGACCTGAAGAC 393
X63108 CAACACAAAAGA-----GTTGGAAAAACAAGCATAACAAT---AAGAAAGACCTGAAGAC 382
AF016292 AAACACAAAAGA-----GTTGGAAAAACAAGATAACAAT---AAGAGAGACCTGAAGAC 299
U03405 CAACACAAAAAATGTGCGAGTTGAAAGCAATGGCAAC---AGGCAAGACCTGAAGAC 305
AF001201 AAACACAAAAGAGGTGCAAGAAACAATAGCAATGGCACCACCTGGAAAGAAGCTGAAGAC 322
U03410 CAACACAAAAGAGGTGCTAAGAC---ATAGCAATGGCAAC---TGGCAAGAAGCTGAAGAC 101
AF001202 CAACACAAAAGAGGTGGAAAGAAACAATACCAGTGGCAAC---TGGAAAGAAGCTGAAGAC 319
AF016290 CAACACAAAAGAGGTGGAAAGAAACAATACCAGTGGCAAC---TGGAAAGAAGCTGAAGAC 305
U03406 CAACACAAAATAATGTGCGAGTTGAAAGCAATGGCAAC---AGGCAAGACCTGAAGAC 305
U03412 CAACACAAAATAATGTGCGAGTTGAAAGCAATGGCAGC---AGGCAAGACCTGAAGAC 305
U03409 CAACACAAAAGAGTTGG---AAAACA-AGCA-TAACAAT---AAGAAAGACCTGAAGAC 89
U03411 CAACACAAAAGAGGTGC---TAAGCATAGCAATGGCAAC---TGGCAAGAAGCTGAAGAC 101
AF016289 TAACACAAAAGAGTTGCAAAAAACAATAGCAGTGGCAGT---TGGCAAGAAGCTGAAGAC 305
X63111 CAACACAAAAGAGTTGCAAAAAACAATAGCAGTGGCAGT---TGGCAAGAAGCTGAAGAC 364
AF016287 CAACACAAAAGTGTGAAAGAAAACCCAGG-----GCAAC---AGGATAAAAGCTGAAGAC 299
AF016291 CAACACAAAAGAGTTGCAAAAGAAACAAGGAGCATGGCAAC---TGGTAGAAGCTGAAGAC 305
AF031334 AAAAGTTACTGAATT-----TAAACAC-CAAAACGGCAAC---AAACAAGAAGCAAAAAC 305
U03408 AAAAGTTACTGAATT-----TAAACAC-CAAAACGGCAAC---AAACAAGAAGCAAAAAC 107
U03404 AAAAGTTACTGAATT-----TAAACAC-CAAAACGGCAAC---AAACAAGAAGCAAAAAC 520
AF001204 TAA---TACAGAAAA---TAGCGAGACTCAACAGAACC---GCATAAAGAT-TGAAAC 310
AF016285 TAAA---AAAGTTAC-----TGAAGAG-ATAAACAACAAC---TACAAAAGAAACCCAAAAC 296
AF016286 TAAA---AAAGTTAC-----TGAAGAG-ATAAACAACAAC---TACAAAAGAAACCCAAAAC 296
U37255 TAAA---AAAGTTAC-----TGAAGAT-ATAGCAGACAAC---TACAAAAGAAACCCAAAAC 360
X63110 TAAA---AAAGTTAC-----TGAAGAT-ATAGCAGACAAC---TACAAAAGAAACCCAAAAC 474
X63109 CAACATAAAAAAGGG-----GAGAGAA-ACCCAGGACAAT---AGGGAAGAAGCTGAAGAC 383

```

** * * * *

```

AF001203 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 373
U37257 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 422
U77881 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 453
X63108 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 442
AF016292 GGAAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 359
U03405 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTGTCCGCCGTTTA 365
AF001201 GGAAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 382
U03410 AGAAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCACTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 161
AF001202 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 379
AF016290 GGAAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
U03406 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTGTCCGCCATTTA 365
U03412 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTGTCCGCCGTTTA 365
U03409 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACGTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 149
U03411 AGAAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCACTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 161
AF016289 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
X63111 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 424
AF016287 GGAAAAATCAGGAAAACGGTACATTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 359
AF016291 GGAAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
AF031334 AGAACATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCACTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 365
U03408 AGAACATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCACTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 167
U03404 AGAACATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCACTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 580
AF001204 AGGACATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 370
AF016285 AAAACATCAGGAAAACGGGAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 356
AF016286 AAAACATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 356
U37255 AGAACATCAAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 420
X63110 AGAACATCAAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 534
X63109 GGAAAAATCAGGAAAACGGCAGCTTCCACGCCGCTTCTTCTCTCGGCTTATCCGCCATTTA 443

```

* * * * *

X63111	TAAACCAAGGGGTTGGCGTTACAGAGCCAGGCAAGATCGTAGAAGGTCGGACCCC--CAAA	602
AF016287	TGCACCAACGGGAGACGCTACAGTGGGAGGCACTATCCCAGAGAGACCGAGTAG--CAAA	537
AF016291	TACACCAACGAAAGGCGCTAAAGTTGGAGGACAGATCACACACAATTTCGATGAG--CAAA	543
AF031334	TAA--CAATGGAGG-----CCCTGTCCCACAAG-----GTCCGACCCC--CAAA	516
U03408	TAA--CAATGGAGG-----CCCTGTCCCACAAG-----GTCCGACCCC--CAAA	318
U03404	TAAACCAACGAAAGGTGTACACAGCCAGGCAAGCTTGTATCAGGTCCGACCCC--CAAA	749
AF001204	TAAACCAAATGGAGG-----CCCTGTCAAAGAAG-----GTCCGACCCC--CAAA	524
AF016285	TAAACCAACGCAAGGCGCTGCACAGGGAGGTCCTATTATAC--AAACTGATCCCAGCAA	525
AF016286	TAAACCAAAGAACGGCTCTCCACAGGGAGGCCCTATTATAC--AAACTGATCCCAGCAA	525
U37255	TAAACCGACGGCAACCTCTCCACAGGGAGGCCCTATTATAC--AAACTGATCCCAGCAA	589
X63110	TAAACCGACGGCAACCTCTCCACAGGGAGGCCCTATTATAC--AAACTGATCCCAGCAA	703
X63109	TAAACCGACGGCAACCTCTCCACAGGGAGGCCCTATTATAC--AAACTGATCCCAGCAA	621

Primer reverse LB06

* *

Primer reverse LB05

AF001203	C--GCCTATCA CGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	599
U37257	C--GCCTATCA C-AAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	647
U77881	C--GCCTATCA CGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	679
X63108	C--GCCTATCA CGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	668
AF016292	C--GCCTATCA CGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTAGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	582
U03405	C--GCCTATCACGAAAGCCACAGCATCCGCCGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	591
AF001201	CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	617
U03410	CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	393
AF001202	CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCACCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	614
AF016290	CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCACCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	600
U03406	CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	603
U03412	CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	576
U03409	CCTGCCTATCACGAAAGCAAC-----	348
U03411	CCTGCCTATCACGAAAGCA-----	358
AF016289	CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGTATCAGCAGCTTAGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	603
X63111	CCTCCCTATCACGAAAGCAACAGTATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	662
AF016287	CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	597
AF016291	CCTCCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	603
AF031334	CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCGTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	576
U03408	CCTGCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCGTGGGTCTTGGTGTCTCGCC-----	372
U03404	CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	809
AF001204	CCTGCCTATCACGAAAGCAACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	584
AF016285	CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCGTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	585
AF016286	CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCGTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	585
U37255	CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	649
X63110	CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	763
X63109	CCTCCCTATCACGAAAGCCACAGCATCAGCAGCTTGGGTCTTGGTGTCTCGCCGGTGTGTC	681

* * * * *

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

Primer reverse LB07

AF001203	CGCTTGAAAAACCCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTTGGGCA TGCCTACCCTTC	719
U37257	CGCTTGAAAAACCCCGCTTCAAACCCA CGAAGTCTCATTTGGGCA TGCCTACCCTTC	767

U77881 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 799
X63108 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 788
AF016292 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 702
U03405 -----
AF001201 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 737
U03410 -----
AF001202 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 734
AF016290 CGCTTGAAAAACACCCGATTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCGCTTC 720
U03406 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGCCTCATTGG----- 706
U03412 -----
U03409 -----
U03411 -----
AF016289 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 723
X63111 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCGCTTC 782
AF016287 CGCTTGAAAAACACCCGATTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCGCTTC 717
AF016291 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCGTGCCTACCGCTTC 723
AF031334 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 696
U03408 -----
U03404 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCC----- 896
AF001204 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCGTGCCTACCACTTC 704
AF016285 CGCTTG-AAAACACCCGATTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCGCTTC 704
AF016286 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCGCTTC 705
U37255 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCGCTTC 769
X63110 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCGCTTC 883
X63109 CGCTTGAAAAACACCCGCTTCAAACCCACGAAGTCTCATTGGGCA TGCCTACCACTTC 801

AF001203 TGA----- 722
U37257 TGATTCCC----- 775
U77881 TGA----- 802
X63108 TGATTCCCCGATACCGATGCCGTCTGAACCTTCAGACGATTTTGTATTACCTGCCGTT 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 TGATTCCC----- 778
X63110 TGATTCCCCGATACCGATGCCGTCTGAACCTTCAGACGATTTTGTATGCACCTGCCGTTT 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	ACAGACGCGGGGCGGGCGTGGG	965
X63109	-----	

ANEXO II: Currículo do Autor

CURRICULUM VITAE resumido

Nunes, L. S.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Luciana de Souza Nunes

Local e data de nascimento: Sobradinho, RS, Brasil, 16/08/1984

Endereço profissional: Centro de Biotecnologia, UFRGS Avenida Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43421, Campus do Vale, Agronomia

CEP: 91501-970 - Porto Alegre, RS – Brasil

Telefone profissional: (51) 3308-6070

E-mail: lusnunes@ibest.com.br

2. FORMAÇÃO

Graduação

Curso: Farmácia

Instituição: Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Brasil

Período: 2001-2004

Título: Estudo dos pacientes com infecção no trato urinário causada por *Escherichia coli* no município de Santa Cruz do Sul.

Orientador: Andréia Rosane de Moura Valim.

Pós-graduação *stricto sensu*

Curso: Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período: 2007-Atual

3. ESTÁGIOS

- **2009- Atual.** Bolsista do CNPq: Eletroforese bidimensional de extratos protéicos de *Trypanosoma rangeli* e análise de amostras contendo proteínas recombinantes de *T. rangeli* por espectrometria de massas.
- **2005 – 2007.** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Participando dos seguintes projetos:

- Vigilância epidemiológica e avaliação de um método molecular de diagnóstico para meningite bacteriana.
- Delineamento do perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Neisseria meningitidis* e determinação dos sorotipos de por Biologia Molecular.
- Diagnóstico de Meningite Bacteriana através de técnicas de Biologia Molecular.
- **08/2003 – 01/2005.** Monitoria, Prolab, Laboratório de Ensino de Química. Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Brasil.
- **08/2004 – 12/2002.** Estágio curricular realizado em Atenção Farmacêutica e dispensação. Dimed Distribuidora de Medicamentos, PANVEL, Brasil.
- **01/2002 – 05/2002.** Estágio curricular em Laboratórios Manipulação na Vico Farma Farmácia e Manipulação, VICO FARMA, Brasil.

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- BAETHGEN LF; MORAES C; KLEIN CC; NUNES LS; CAFRONE PI; LEMOS AP; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. TM & IH. Tropical Medicine and International Health, v. 13, p. 31-40, 2008.
- WEIDLICH L; BAETHGEN L; MAYER L; MORAES C; KLEIN C; NUNES LS; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI M; ZAHA A. High prevalence of *Neisseria meningitidis*

hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. *The Journal of Infection*, 57(4): 324-331, 2008.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Resumos expandidos publicados em anais de congressos:

- BAETHGEN LF; WEIDLICH L; MORAES C; KLEIN CC; NUNES LS; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. Epidemiologia da Doença meningocócica e epidemiologia molecular de *Neisseria meningitidis* no Rio Grande do Sul. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.

Resumos publicados em anais de congressos:

- NUNES LS; BAETHGEN LF; WEIDLICH L; MORAES C; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. Tipagem molecular para caracterização de isolados de *Neisseria meningitidis* associados à doença meningocócica no Rio Grande do Sul. In: 1º Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana, 2009, Santa Cruz do Sul.

- NUNES LS; BAETHGEN LF; WEIDLICH L; MORAES C; KLEIN CC; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. Caracterização Molecular de Isolados de *Neisseria meningitidis* associados à Doença Meningocócica no Rio Grande do Sul. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008, Brasília.

- TEICHMANN A; NUNES LS; ASSUNÇÃO LS; AGRA H; RENNER J; BENITEZ LB; ROCHA MP; RIEGER A; VALIM AM. Incidência de resistência aos antibióticos apresentada por *Escherichia coli* uropatogênica e identificação do gene *sul2* em isolados ambulatoriais e hospitalares. In: XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia VII Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 2008, Porto Alegre.

- WEIDLICH L; BAETHGEN LF; KLEIN CC; NUNES LS; MORAES C; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. PorA subtype and sequence type distribution of *Neisseria meningitidis* isolated in the south of Brazil. In: XVIII IEA World Congress of Epidemiology, 2008, Porto Alegre.

- VALIM AM; TEICHMANN A; POSSUELO LG; AGRA H; NUNES LS; ASSUNÇÃO LS; RIEGER A; BENITEZ LB; ROCHA MP. Genotipagem e caracterização do perfil de

suscetibilidade de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli*. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

- WEIDLICH L; BAETHGEN LF; KLEIN CC; NUNES LS; MORAES C; RIOS SS; ROSSETTI MLR; MAYER LW; ZAHA A. Detecção de *Neisseria meningitidis* em amostras clínicas através de PCR em tempo real. In: 24° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

- NUNES LS; BAETHGEN LF; WEIDLICH L; MORAES C; KLEIN CC; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; DIEP B; RILEY L; ZAHA A. Padronização de método de tipagem molecular para caracterização de isolados de *Neisseria meningitidis* associados à doença meningocócica no Rio Grande do Sul. In: 24° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

- KLEIN CC; BAETHGEN LF; WEIDLICH L; MORAES C; NUNES LS; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. Análise Epidemiológica e Determinação da Suscetibilidade à Penicilina em Isolados de *Neisseria meningitidis* Associados a Casos de Doença Meningocócica no Rio Grande do Sul. In: 24° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

- KLEIN CC; BAETHGEN LF; WEIDLICH L; MORAES C; NUNES LS; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. Avaliação do Perfil de Suscetibilidade à Penicilina em Isolados de *Neisseria meningitidis* e Epidemiologia da Doença Meningocócica no Rio Grande do Sul. In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.

- TEICHMANN A; AGRA H; RIEGER A; RENNER J; BENITEZ LB; NUNES LS; ROCHA MP; VALIM AM. Análise de dados epidemiológicos dos pacientes portadores de itu e genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli*. In: XII Seminario de Iniciação Científica e XI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2006, Santa Cruz do Sul.

- TEICHMANN A; NUNES LS; AGRA H; RENNER J; ROCHA MP; BENITEZ LB; RIEGER A; VALIM AM. Genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* e análise de dados epidemiológicos dos pacientes. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, xv Feira de Iniciação Científica, I Salão UFRGS Jovem, 2006, Porto Alegre.

- WEIDLICH L; BAETHGEN LF; MORAES C; KLEIN CC; NUNES LS; ROSSETTI MLR; ZAHA A; MAYER LW. *Neisseria meningitidis* PorA Subtype Distribution in the

South of Brasil. In: 5th International Pathogenic Neisseria Conference 2006 (IPNC 2006 Australia), 2006, Queensland.

- MORAES C; BAETHGEN LF; WEIDLICH L; KLEIN CC; NUNES LS; CAFRUNE P; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; KO A. Epidemiologia molecular e caracterização do perfil antimicrobiano dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* no Rio Grande do Sul. In: 3ª Jornada Científica da FEPPS, 2006, Porto Alegre.

- WEIDLICH L; BAETHGEN LF; MORAES C; KLEIN CC; NUNES LS; RIOS SS. Detecção de *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* em líquido de pacientes com suspeita de meningite bacteriana através da tecnologia de PCR em Tempo Real. In: 3ª Jornada Científica da FEPPS, 2006, Porto Alegre.

- KLEIN CC; BAETHGEN LF; WEIDLICH L; MORAES C; NUNES LS; RIOS SS; KMETZSCH C; ROSSETTI MLR; ZAHA A. Análise de Isolados de *Streptococcus pneumoniae* do Estado do Rio Grande do Sul através da Técnica de Box-PCR. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006, Porto Alegre.