ANDRÉ MACHADO LUIZ

**Prevalência do estado de portador sadio de
Neisseria meningitidis entre estudantes de medicina
da Universidade de São Paulo, Brasil**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Heloísa Lopes

São Paulo

2018

ANDRÉ MACHADO LUIZ

**Prevalência do estado de portador sadio de
Neisseria meningitidis entre estudantes de medicina
da Universidade de São Paulo, Brasil**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Heloísa Lopes

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Luiz, André Machado

Prevalência do estado de portador sadio
de *Neisseria meningitidis* entre estudantes de
medicina da Universidade de São Paulo, Brasil /
André Machado Luiz. -- São Paulo, 2018.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Marta Heloísa Lopes.

Descritores: 1.*Neisseria meningitidis* 2.Portador
sadio 3.Reação em cadeia da polimerase
4. Estudantes de medicina

USP/FM/DBD-059/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todos que, de alguma forma, serão beneficiados com estes resultados. A ciência não tem sentido se não se traduzir em benefícios à população. A finalidade da ciência não é alimentar o ego de poucos ou torná-los notórios, embora muitos acreditem nisso porque lhes falta (ou desconhecem) o amor ao próximo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marta Heloísa Lopes, minha orientadora, pelo exemplo profissional, pela paciência infinita, por compartilhar conhecimentos, experiências e tempo de trabalho para que este projeto de pesquisa fosse possível;

À Dra. Silvia Figueiredo Costa pelo estímulo à pesquisa, pelo apoio científico ao Projeto, pelo exemplo profissional de dedicação à ciência;

Aos médicos do Centro de Referência em Imunobiológicos Especiais (CRIE) do HC-FMUSP: Dra. Ana Marli Sartori, Dra. Karina Miyaji, Dra. Danise Sena Oliveira pelo apoio ao projeto, pela recepção dos alunos e pelo auxílio na organização dos dados;

Ao Sr. Aílton, pelo transporte das amostras, e a todas as funcionárias do CRIE, exemplo de dedicação e cuidados ao próximo, na mais impactante estratégia de prevenção que é a vacinação;

À Camila Rizek e Gracilene Assis, pesquisadoras do Laboratório de Investigação Médica 54 (LIM-54), pelo manejo das amostras clínicas e pela execução dos procedimentos laboratoriais deste projeto;

A todos os meus amigos (que são os melhores amigos que eu poderia ter) pelo apoio irrestrito e por não deixarem que eu desistisse desta tese;

Aos meus familiares - pai, "mães", irmãos, cunhada, tios, tias, primas, sobrinhos - pelo amor e pelo apoio dedicados a mim em todos os momentos;

Aos alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
que compuseram a casuística deste trabalho, pela participação e dedicação à
Faculdade e ao HC-FMUSP.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
processo 2011/13290-1, pelo apoio financeiro a este projeto.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Neisseria meningitidis</i>	2
1.1.1. Identificação e caracterização de <i>Neisseria meningitidis</i> através de métodos fenotípicos.....	6
1.1.2. Identificação e caracterização de <i>Neisseria meningitidis</i> através de métodos genotípicos.....	8
1.2. Epidemiologia da doença meningocócica	11
1.3. Estado de portador sadio	16
1.4. Justificativa	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo primário	21
2.2. Objetivos secundários	21
3. MÉTODOS	22
3.1. Delineamento do estudo.....	22
3.1.1. Casuística	22
3.1.2. Questões éticas.....	22
3.1.3. Amostragem	23
3.1.4. Coleta de dados epidemiológicos.....	23
3.1.3.1. Variáveis	23
3.2. Métodos laboratoriais	24
3.2.1. Coleta das amostras	24
3.2.2. Cultura em meios específicos	25
3.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
3.2.4. Tipagem molecular (TM).....	27
3.3. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS	29

4.1. Caracterização da casuística	29
4.2. Cultura em meio de Thayer-Martin, testes bioquímicos complementares e PCR a partir de DNA extraído de meio seletivo..	31
4.3. PCR a partir de DNA extraído diretamente das amostras clínicas ..	32
4.4. Fatores de risco associados à colonização	33
4.5. PCR para sorogrupagem	35
4.6. Tipagem molecular por PFGE.....	36
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	49
7. ANEXOS	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CDC - "*Centers for Disease Control and Prevention*"

DMI - Doença meningocócica invasiva

DNA - "*Deoxyribonucleic acid*", ácido desoxirribonucleico

IC - Intervalo de confiança

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

LIM - Laboratório de Investigação Médica

MenA - Meningococo A, *Neisseria meningitidis* sorogrupo A

MenB - Meningococo B, *Neisseria meningitidis* sorogrupo B

MenC - Meningococo C, *Neisseria meningitidis* sorogrupo C

MenE - Meningococo E, *Neisseria meningitidis* sorogrupo E

MenW - Meningococo W, *Neisseria meningitidis* sorogrupo W

MenX - Meningococo X, *Neisseria meningitidis* sorogrupo X

MenY - Meningococo Y, *Neisseria meningitidis* sorogrupo Y

MenZ - Meningococo Z, *Neisseria meningitidis* sorogrupo Z

MLST - "*Multilocus Sequence Typing*", Tipagem por sequência multilocus

n - tamanho de amostra

N. meningitidis - *Neisseria meningitidis*

p - probabilidade de significância

PCR - "*Polymerase Chain Reaction*", reação em cadeia da polimerase

PFGE - "*Pulsed-field Gel Electrophoresis*", eletroforese em gel em campo

PNI - Programa Nacional de Imunizações

RP - Razões de prevalência

SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação

ST - "*Sequence type*", tipo de sequência

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TM - Tipagem molecular

USP - Universidade de São Paulo

WHO/ OMS - "*World Health Organization*", Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Métodos laboratoriais para a detecção fenotípica de *Neisseria meningitidis*.....7

Figura 2 - Fluxograma da taxa de detecção de *N. meningitidis* por métodos microbiológicos e por biologia molecular (PCR) após cultivo em meio de cultura, dentre 375 amostras coletadas de 375 alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 201032

Figura 3 - Fluxograma da taxa de detecção de *N. meningitidis* a partir de DNA extraído diretamente de 190 amostras clínicas obtidas de 190 alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 201033

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxa de incidência de doença meningocócica invasiva, por 100.000 habitantes, no Brasil, 2008-201214

Gráfico 2 - Taxa de incidência de doença meningocócica invasiva, por 100.000 habitantes, por faixa etária, no Brasil, 2009 e 201215

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das amostras de <i>swab</i> de orofaringe coletadas dos 380 alunos da Faculdade de Medicina conforme o ano da graduação - Universidade de São Paulo - 2010	29
Tabela 2 - Características demográficas dos 375 alunos da Faculdade de Medicina cujas amostras de orofaringe foram analisadas - Universidade de São Paulo - 2010	30
Tabela 3 - Análise da correlação entre fatores de risco e portadores sadios de <i>Neisseria meningitidis</i> entre 190 alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - 2010	34
Tabela 4 - Distribuição por sorogrupo dos isolados em nasofaringe a partir de DNA de <i>Neisseria meningitidis</i> extraído de meio de cultura e amostras clínicas de 375 alunos da Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - 2010	36
Tabela 5 - Comparação dos estudos transversais de prevalência de portadores sadios utilizando métodos fenotípicos para identificação de espécie, com amostras coletadas de 1991 a 2017	39
Tabela 6 - Comparação dos estudos transversais de prevalência de portadores sadios utilizando métodos genotípicos para identificação de espécie, com amostras coletadas de 2010 a 2015, no Brasil.....	43

RESUMO

Luiz AM. *Prevalência do estado de portador sadio de Neisseria meningitidis entre estudantes de medicina da Universidade de São Paulo, Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: *Neisseria meningitidis* é uma das principais causas de meningite bacteriana em todo o mundo. No Brasil, a vacina meningocócica conjugada C foi introduzida no calendário básico do Programa Nacional de Imunizações em 2010 para a população abaixo de 2 anos de idade. Este estudo teve como objetivos avaliar a taxa de portadores sadios de meningococo em nasofaringe entre estudantes de medicina através de métodos fenotípicos e genotípicos. Além disso, foram analisados os fatores de risco associados ao estado de portador sadio.

MÉTODOS: Trezentos e setenta e cinco (375) estudantes da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram submetidos à coleta de swabs de nasofaringe, de outubro a novembro de 2010: desta casuística, 190 estudantes foram submetidos à coleta de dois swabs. Os swabs foram encaminhados ao Laboratório de Investigação Médica (LIM) de Bacteriologia para isolamento e caracterização das cepas: o primeiro swab foi submetido a cultivo em meio seletivo, testes bioquímicos e reação em cadeia da polimerase com primers específicos para dois genes de *Neisseria meningitidis*, *ctrA* e *crgA*. O segundo swab foi submetido à extração direta de DNA, sem cultivo prévio. Todas as cepas isoladas foram genogrupoas com primers específicos direcionados aos genogrupos A, B, C, Y e W. **RESULTADOS:** A prevalência geral de portadores sadios foi 45,6%. A taxa de portadores obtida após cultivo em meio seletivo e testes bioquímicos foi 6,1%. A taxa de colonização resultante da PCR dos produtos de cultivo em meio seletivo foi 15,4%. Destas cepas, a maioria pertencia ao genogrupo B. A partir da extração direta de DNA de 190 amostras clínicas, obtivemos 69,5% de positividade de portadores sadios, sendo o genogrupo C predominante nestas amostras. A PFGE mostrou que todas as cepas isoladas eram policlonais. Não houve relação estatisticamente significativa entre os fatores de risco avaliados e o estado de portador sadio. **CONCLUSÕES:** Este estudo avaliou a prevalência de portadores sadios em adultos jovens no Brasil antes da introdução da vacina meningocócica C conjugada no calendário vacinal de rotina. A prevalência variou de 6,1% a 69,5% dentre os diferentes métodos utilizados, com uma prevalência geral de 45,6%. Comparando-se os diferentes métodos, os métodos genotípicos mostraram-se superiores na detecção de portadores sadios, especialmente quando o DNA é extraído diretamente da amostra clínica.

Descritores: *Neisseria meningitidis*; portador sadio; reação em cadeia da polimerase; estudantes de medicina.

ABSTRACT

Luiz AM. *Prevalence of Neisseria meningitidis asymptomatic carrier status among medical students at "Universidade de São Paulo", Brazil* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

BACKGROUND: *Neisseria meningitidis* is one of the leading causes of bacterial meningitis worldwide. In Brazil, the meningococcal C conjugate vaccine was introduced as a part of basic vaccination schedule in the public health system in 2010 to the population under 2 years old. The objectives of this study were to evaluate the rate of asymptomatic carriers of meningococci in the nasopharynx among medical students by phenotypic and genotypic methods. Furthermore, the risk factors for carriage were also analyzed.

METHODS: Three hundred seventy-five (375) students from University of São Paulo Medical School underwent nasopharyngeal swab collection from October to November, 2010. From those students, 190 of them underwent collection of two swabs; they were sent to the laboratory for isolation and characterization of strains: the first one were submitted to culture on solid plates with selective medium, biochemical tests, and Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers for two genes of *Neisseria meningitidis*, *ctrA* and *crgA*. From the second swab, direct DNA extraction to PCR reactions were performed, with no previous culture. All strains isolated were genogrouped with specific primers targeting A, B, C, Y and W groups.

RESULTS: The overall carriage rate was 45,6%. Carriage rate by culture on solid plates and biochemical tests was 6.1%. The rate obtained from PCR targeting genes *ctrA* and *crgA* of colony growth on selective medium was 15.4%. From those strains, the majority belongs to genogroup B. With direct extraction of DNA from 190 clinical samples, we obtained a positivity of 69.5% of meningococcal carriage, and the genogroup C was the main genogroup from those samples. The PFGE showed that the samples were polyclonal.

CONCLUSIONS: This study has evaluated the rate of asymptomatic carriers in young people in Brazil before the vaccine introduction in the vaccine routine schedule of infants. The prevalence of nasopharyngeal carriage by meningococci among medical students was 6.1% for the phenotypic method, 15.4% by PCR after growth in selective medium and 69.5% by PCR from DNA extracted from clinical samples. In the comparison of the phenotypic and genotypic methods, it was observed that genotypic are superior to phenotypic methods, especially when direct DNA extraction from clinical specimen is performed.

Descriptors: *Neisseria meningitidis*; carrier state; polymerase chain reaction; students, medical.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome clínica da meningite foi descrita inicialmente em 1661 por Thomas Willis. Gaspard Vieusseux em Genebra, em 1805, e Danielson & Mann em Massachussets, em 1806, relataram os primeiros casos de “meningites epidêmicas” (Abio et al., 2013; de Souza & Seguro, 2008). O trabalho do patologista austríaco Anton Weichselbaum, em 1887 (Weichselbaum, 1887¹ apud Abio et al., 2013), mostrou a conexão entre *Neisseria meningitidis* e os casos de meningites epidêmicas previamente descritos por Vieusseux (Vieusseux, 1805² apud Abio et al., 2013) e Danielson & Mann (Danielson & Mann, 1806³ apud de Souza & Seguro, 2008). Vieusseux, entretanto, em suas hipóteses, afirma que “a doença parece estar relacionada mais a uma constituição do ar do que à transmissão de indivíduo para indivíduo”. Somente em 1896, Kiefer (Kiefer, 1896⁴ apud de Souza & Seguro, 2008) estabelece o conceito epidemiológico de estado de portador sadio.

¹ Weichselbaum, A. Üeber die Aetiologie der akuten Meningitis Cerebrospinalis. Fortschr Med 1887; 5:573-587.

² Vieusseux, M. Mémoire sur la maladie qui a regné a Genève au printemps de 1805. J Med Chir Pharm 1805; 11: 163-182.

³ Danielson, L. & Mann, E. The history of a singular and very mortal disease, which lately made its appearance in Medfield. Med Agric Reg 1806; 1:65-69.

⁴ Kiefer, F. Zur differential diagnose des erregers der epidemischen cerebrospinalmeningitis und der gonorrhoea. Berl Klin Wochenschr 1896; 33: 628-630.

1.1. *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis é um diplococo Gram-negativo. Em meio sólido, o meningococo cresce como uma colônia transparente, não pigmentada, não hemolítica de 1-5mm. As colônias são convexas e, caso apresentem grande quantidade de polissacarídeos, apresentam aspecto mucóide. As condições ótimas de crescimento são meio úmido, de 35 a 37°C sob uma atmosfera de 5 a 10% de dióxido de carbono. O organismo cresce em diversos meios como ágar sangue, ágar chocolate enriquecido e ágar Mueller-Hinton (Apicella, 2010).

Os principais fatores de virulência do meningococo são: 1) a cápsula polissacarídica (na qual baseia-se a classificação em sorogrupos); 2) proteínas de membrana externa que incluem *pili* tipo IV, as porinas (PorA e PorB) e moléculas de adesão, Opc; 3) mecanismos de sequestro de ferro; e 4) endotoxinas (lipopolissacárides) (Batista et al., 2017). A classificação das cepas em sorosubtipos, sorotipos e imunotipos é baseada na proteína de membrana externa classe 1 (PorA), proteína de membrana externa classe 2 ou 3 (PorB) e estrutura dos lipopolissacárides, respectivamente (Stephens, 2009; Pollard & Frasch, 2001).

O meningococo pode ser classificado em 12 sorogrupos, baseando-se na imunogenicidade da cápsula polissacarídica (Harrison et al., 2013). Os sorogrupos A, B, C, X, W e Y são os causadores da maioria das infecções invasivas em todo o mundo (WHO, 2011; Harrison et al., 2013).

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência e sua expressão depende da regulação gênica durante a patogênese. A adesão

celular e a formação de biofilme são inibidas pela cápsula e, consequentemente, a expressão é diminuída ou ausente no estado de portador sadio. Em contrapartida, a cápsula é importante para a sobrevivência do meningococo na corrente sanguínea e, neste contexto, tem sua expressão aumentada (Stephens et al., 2007).

Os antígenos da cápsula polissacarídica são potencialmente eficazes em prevenir DMI quando empregados na composição de vacinas. As vacinas polissacarídicas e conjugadas contra os sorogrupos A, C, Y e W têm como principal componente antígenos capsulares, conjugados ou não a proteínas. Entretanto, a cápsula do MenB possui epítomos contendo ácido siálico, também presente no tecido nervoso humano, o que explica a baixa imunogenicidade da cápsula do MenB, o que a descartou como possível candidata a vacina. Consequentemente, antígenos proteicos têm sido empregados no desenvolvimento de vacinas contra MenB. Há duas vacinas licenciadas contra MnB: Trumenba® e Bexsero®. (Jones et al., 2016)

O mecanismo molecular da síntese da cápsula polissacarídica é descrito por Harrison et al. (2013). Os genes envolvidos na biossíntese capsular e translocação da superfície celular estão agrupados no locus cromossômico denominado *cps*. Os genes do locus *cps* são divididos em 6 regiões: D, A, C, E, D', B. Os genes da região A codificam enzimas para a biossíntese do polissacarídeo da cápsula; os genes das regiões B e C estão envolvidos no transporte dos polissacarídeos de alto peso molecular da superfície celular. Todas as regiões, exceto a região A, são conservadas dentre os diferentes sorogrupos. Claus et al. (2002) demonstraram que, nas cepas que não exibem o operon *cps*, a região é substituída por uma região

não-codificadora, denominada “*capsule null locus*” (*cnl*). Estas cepas não capsuladas podem estar associadas ao estado de portador sadio.

O meningococo usa fatores da superfície bacteriana para aderir às células não ciliadas da nasofaringe, composta por células epiteliais não-secretórias não-ciliadas e secretórias ciliadas. A superfície do epitélio das vias aéreas é recoberta por uma camada mucosa na qual o organismo deverá penetrar. A presença do *pili* melhora a adesão mas não é indispensável. O *pili* tipo IV liga-se à proteína de superfície CD46, presente nas células epiteliais humanas, células endoteliais e glóbulos vermelhos. Proteínas de superfície da membrana externa, como as proteínas da classe V (Opa e Opc) têm um importante papel na adesão e podem ser importantes para definir a especificidade do tecido ao organismo (Virji, 2009). É difícil compreender porque o meningococo desenvolveu diversos mecanismos de invasão celular (como Opa e NadA) já que esta capacidade não contribui para a sobrevivência da espécie (Stephens, 2009).

A cápsula polissacarídica do meningococo é hidrofílica e impede a interação com a superfície celular epitelial (Apicella, 2010). Estudos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais indicam que a cápsula não é constitutivamente expressa na superfície do meningococo. A expressão da cápsula está aumentada em isolados clínicos recuperados de pacientes com doença meningocócica invasiva, e diminuída ou ausente em meningococos com tipagem genética idêntica recuperados da nasofaringe de portadores sadios (Tzeng et al., 2016).

Somente meningococos não-capsulados penetram no epitélio e a invasão do epitélio bloqueia a síntese da cápsula (Virji, 2009). Este mecanismo designado “variação de fase” é responsável pela expressão da

cápsula. A variação de fase caracteriza-se por alterações reversíveis da expressão fenotípica, que ocorrem com alta frequência, em diversas proteínas de superfície (Alamro et al., 2014).

Meningococos encapsulados na corrente sanguínea apresentam o mecanismo de variação ativado ("*on*"), enquanto bactérias isoladas em nasofaringe de portadores sadio apresentam este mecanismo inativado ("*off*"). Isto sugere que existe uma correlação entre variação de fase capsular, invasão bacteriana e surtos de doença meningocócica (Yazdankhah et al., 2004).

A defesa contra a doença meningocócica envolve tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida no reconhecimento das estruturas da superfície bacteriana. O papel da imunidade inata é pouco conhecido. Entretanto, pela baixa taxa de incidência da doença, acredita-se que a imunidade natural é capaz de prevenir a doença invasiva na maioria dos indivíduos (Pollard & Frasch, 2001).

A imunidade contra a doença meningocócica invasiva é dependente de IgG sérica que, associada ao complemento, determina atividade bactericida, através de fagocitose ou morte bacteriana direta (Stephens, 2009). Há uma relação inversa entre níveis séricos de IgG e incidência de doença invasiva, ressaltando a importância dos níveis de IgG na proteção contra a doença invasiva. A resposta celular é importante para gerar e manter esta imunidade: os linfócitos-T auxiliares são necessários para a geração e maturação da resposta humoral contra antígenos protéicos dependentes de células T, determinando memória imunológica (Robinson et al., 2002).

Neste contexto, estes antígenos protéicos vêm sendo estudados como possíveis alvos de ações terapêuticas, como o desenvolvimento de vacinas. A proteína NadA, por exemplo, mostrou ser capaz induzir anticorpos bactericidas em altos níveis em humanos, sendo um dos componentes da vacina multicomponentes MenB (Pizza & Rappuoli, 2015).

Outra importante imunoglobulina para a imunidade contra o meningococo é a imunoglobulina A (IgA): é o principal anticorpo em superfícies mucosas do trato respiratório superior sendo importante para limitar a colonização pelo meningococo e prevenir invasão epitelial precoce (Horton et al., 2009). O desenvolvimento de imunidade de mucosa tem um importante papel na prevenção da invasão das células epiteliais, sendo demonstrado o aumento nos níveis de IgA específica na saliva de portadores saudáveis (Robinson et al., 2002). Horton et al. (2005) demonstraram o aumento concomitante dos níveis de IgA anti-meningocócica salivar, idade e aumento da taxa de portadores saudáveis.

1.1.1. Identificação e caracterização de *Neisseria meningitidis* através de métodos fenotípicos

Os métodos mais frequentemente utilizados para a identificação e caracterização de *Neisseria meningitidis* são a cultura, teste da oxidase, coloração de Gram e teste de degradação de açúcares. Embora a cultura seja considerada o método padrão-ouro para a confirmação de casos clínicos, a taxa de positividade é relativamente baixa devido às condições subótimas de transporte e armazenamento, métodos empregados para a cultura e a

administração de antibióticos antes da coleta da amostra clínica (WHO & CDC, 2011).

Colônias de *N. meningitidis* são cinzas e não pigmentadas em ágar sangue, com aparência redonda, lisa, úmida, brilhante e convexa, com bordas claramente definidas. Em ágar chocolate são colônias opacas, sem cor ou acinzentadas. Antes dos testes de caracterização e identificação, os isolados devem ser inspecionados e reculturados para garantir a pureza da cultura. *N. meningitidis* pode ser identificada através do teste de oxidase, coloração de Gram e teste de degradação de açúcares (Figura 1) (WHO & CDC, 2011).

Figura 1 - Métodos laboratoriais para a detecção fenotípica de *Neisseria meningitidis* (adaptado de WHO & CDC, 2011)

O meningococo metaboliza glicose e maltose em ácido sem formação de gás mas não metaboliza sucrose e lactose (Apicella, 2010).

Nas cepas identificadas como *Neisseria meningitidis* podem ser realizadas reações de soroaglutinação com soro específico para a identificação dos sorogrupos, assim como sorotipagem e sorosubtipagem através de anticorpos monoclonais (WHO & CDC, 2011).

1.1.2. Identificação e caracterização de *Neisseria meningitidis* através de métodos genotípicos

A partir de meados da década de 1980, o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, "Polymerase Chain Reaction"), método de biologia molecular que permite a amplificação de sequências de DNA específicas numa amostra heterogênea de DNA, constituiu um dos grandes avanços no diagnóstico das meningites bacterianas (WHO & CDC, 2011). Na reação de PCR, o DNA alvo é exponencialmente amplificado através da repetição de três etapas: 1) desnaturação do DNA dupla-hélice em DNA fita simples; 2) anelamento dos primers às sequências complementares do DNA fita simples e 3) extensão dos primers na direção 5'-3' por uma DNA polimerase termoestável produzindo moléculas de DNA dupla-hélice. O número de cópias de moléculas de DNA é duplicado a cada ciclo, gerando milhões de cópias da molécula de DNA original quando a reação é finalizada. Considerando que o método não requer células vivas ou intactas, a PCR é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de patógenos bacterianos de amostras clínicas onde a morte bacteriana ou a lise da célula bacteriana ocorrem facilmente por condições inapropriadas de armazenamento ou uso prévio de antibióticos (Marques, 2012).

Nas últimas décadas, diversos ensaios envolvendo técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real (quantitativo) utilizando amostras clínicas foram desenvolvidas para a detecção de patógenos bacterianos.

Para a identificação de *N. meningitidis*, diversos genes já foram utilizados como alvo em PCR. Os primers mais comumente utilizados têm como genes alvo principalmente *ctrA*, *sodC* e *crgA* (Taha et al., 2005).

O gene de transporte da cápsula para a superfície celular, ou *ctrA*, é altamente conservado entre isolados responsáveis por doença meningocócica invasiva e é utilizado tanto em técnicas convencionais quanto em PCR tempo real. Entretanto, aproximadamente 16% dos meningococos podem perder o gene *ctrA* e, portanto, utilizam-se outros genes concomitantemente para aumentar a sensibilidade do método (Claus et al., 2002). O gene *sodC*, por exemplo, gene da Cu-Zn superóxido-dismutase, que não é geneticamente ligado ao locus capsular, é capaz de detectar o meningococo que não contém o gene *ctrA* intacto. Entretanto, Higa et al. (2013) demonstraram uma sensibilidade 7,5% menor deste gene em relação ao gene *ctrA* para a identificação de *N. meningitidis* em líquidos estéreis. Outro gene alvo nas reações de PCR, o *crgA* ("*contact-regulated gene A*") codifica uma proteína reguladora da transcrição, podendo ser ativado ou reprimido quando a bactéria entra em contato com a célula epitelial (Ieva et al., 2005).

A classificação convencional de sorogrupos, através de testes de aglutinação simples, apresenta limitações relacionadas ao método, como, por exemplo, os antisoros utilizados. Outras limitações estão relacionadas a características bacterianas, como a diminuição da expressão gênica da

cápsula de *N. meningitidis*, a tendência de determinadas cepas à autoaglutinação e a capacidade da bactéria em alterar o DNA por transformação (Baethgen et al., 2003).

Após a detecção do DNA do meningococo, a determinação do sorogrupo pode ocorrer por genogrupagem. O gene *siaD* codifica a polysialyltransferase responsável pela polimerização de homopolímeros e heteropolímeros dos polissacarídeos contendo ácido siálico nas cepas pertencentes aos sorogrupos B, C, Y e W. Alelos sorogrupo-específicos do gene *siaD* podem ser detectados por PCR com oligonucleotídeos específicos para cada sorogrupo. Já as cepas do sorogrupo A podem ser identificadas pela amplificação do gene *mynB/sacC*, responsável pela polimerização do N-acetyl-D-mannosamine fosfato (Taha et al., 2005).

Outra caracterização das cepas é possível através da tipagem por sequência multilocus (MLST, "multilocus sequence typing"). A MLST caracteriza-se pela análise de sequências de nucleotídeos e organização de um banco de dados de acesso público pela internet. O MLST identifica variações nas seqüências de nucleotídeos de fragmentos internos de 7 genes constitutivos e o perfil de alelos identifica um tipo de sequência (ST, "sequence type"). Um grupo de ST que tem quatro ou mais alelos em comum é definido como um complexo clonal, ou seja, tem um genótipo ancestral em comum (Maiden et al., 1998). Os resultados estão disponíveis via internet (<http://pubmlst.org.neisseria/>) para comparação mundial e estabelecimento de possíveis rotas de disseminação da doença meningocócica.

1.2. Epidemiologia da doença meningocócica

Após as descrições iniciais na Europa em 1805, América do Norte em 1806, ocorreram epidemias atribuídas ao sorogrupo A em Gana e Nigéria em 1905. O sorogrupo A constituiu a principal causa de doença meningocócica invasiva (DMI) na Europa antes e depois da Primeira e Segunda Guerras mundiais, com relatos de surtos em campos militares. Na década de 70 na Europa (Alemanha, França e Noruega) e década de 80 na América do Sul, o sorogrupo B foi dominante. A década de 90 foi marcada por um aumento nos casos de doença por sorogrupo C e surtos por Y e W (Harrison et al., 2009).

Na Europa, em 2011 (ECDC, 2013), 3808 casos confirmados de doença meningocócica invasiva foram notificados por 29 países da União Europeia. A taxa de incidência geral foi de 0,77 casos/ 100.000 habitantes, variando de 1,99 (Irlanda) a 0,09 (Latvia), com altas taxas de incidências no Reino Unido (1,66), Dinamarca (1,29) e Lituânia (1,29). O principal sorogrupo causador de DMI foi o sorogrupo B (73,6%), seguido pelo sorogrupo C (14,4%) e Y (8,2%).

Os mesmos autores estenderam a avaliação dos dados de notificação de 2004 a 2014. Whitakker et al. (2017) mostraram que, na Europa, mantém-se a tendência à queda de doença por MenB e MenC e tendência de aumento para MenY. Nos países que introduziram a vacina MenC conjugada (Áustria, Bélgica, França, Alemanha, Grécia, Islândia, Irlanda, Itália, Holanda, Portugal, Espanha e Reino Unido) houve redução na notificação de casos por MenC, o que não foi observado nos países que não instituíram vacinação contra MenC na rotina (República Tcheca, Dinamarca, Estônia, Finlândia, Hungria, Lituânia, Noruega, Polônia, Romênia, Eslováquia, Eslovênia e Suécia).

Na Inglaterra e na Holanda, países que introduziram a vacina MenC conjugada na rotina de vacinação, houve impacto da vacinação na taxa de portadores sadios: Maiden et al. (2008), na Inglaterra, mostraram uma redução significativa na taxa de portadores sadios de MenC sem evidência de substituição por outro sorogrupo. Na Holanda, houve uma redução de 99% na doença por MenC em vacinados e 93% em não-vacinados, atribuindo-se 36% do impacto na redução de doença por MenC à redução na taxa de portadores sadios por este sorogrupo (Bijlsma et al., 2014).

Diversos fatores influenciam o dinamismo da epidemiologia da doença meningocócica: 1) fatores do agente etiológico que determinam variabilidade genética como transferência horizontal de genes, recombinação autóloga, expressão gênica variável e *switching* capsular; 2) a idade do hospedeiro, com taxas mais elevadas de doença em crianças; 3) asplenia, polimorfismo genético, deficiências em componentes da resposta imune inata e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana aumentam o risco de infecção; 4) fatores ambientais e comportamentais como infecções concomitantes de trato respiratório superior, condições climáticas, tabagismo ativo ou passivo, aglomerações como ocorre em moradia universitária ou acampamentos militares aumentam o risco de colonização e doença invasiva (Harrison et al., 2009; Caugant et al., 1994).

No Cinturão africano da meningite, que apresenta as maiores taxas de incidência de DMI no mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define como epidemia, taxas de incidência >100 casos/100.000 habitantes/ano. Nenhum outro país ou região apresenta taxas de incidência desta magnitude. Nos outros países, a categorização em relação à endemidade, adotada pelo SAGE (*Strategic Advisory Group of Experts on Immunizations*) da OMS

considera países de alta endemicidade aqueles que apresentam taxas de incidência >10 casos/100.000 habitantes; de moderada endemicidade, aqueles com taxas de incidência entre 2-10 casos/100.000 habitantes e baixa endemicidade nos países com <2 casos/100.000 habitantes (Jafri et al., 2013; WHO & CDC, 2011).

O cinturão da meningite, na África Subsaariana, estende-se da Etiópia à Nigéria, compreende 25 países e apresenta as maiores taxas de incidência de DMI no mundo. Desde 1940, o sorogrupo predominante naquela região é o sorogrupo A. As taxas de incidência registradas nos surtos epidêmicos alcançam >100 casos/ 100.000 habitantes, com mortalidade em torno de 15% (Harrison, 2009). A tendência epidemiológica permanecia estática, com predominância de casos de DMI por sorogrupo A. Entretanto, em 2010, teve início uma campanha de vacinação da população de 1-29 anos em 26 países do cinturão da meningite, com uma vacina meningocócica conjugada para o sorogrupo A: em 2015, estudo comparando a taxa de DMI em populações completamente vacinadas mostrou uma redução de 99% em DMI por sorogrupo A (Trotter et al., 2017; WHO, 2017). Recentemente, os sorogrupos X e W têm impacto significativo nos dados de morbidade e mortalidade (Jafri et al., 2013; Xie et al., 2013; Cibrelus et al., 2015; Lingani et al., 2015).

Nos Estados Unidos, em 2013, de acordo com estimativas do *Active Bacterial Core Surveillance System* (CDC, 2013), a taxa de incidência de doença meningocócica invasiva foi 0,14/100.000 habitantes, com 450 casos e 75 mortes. Os sorogrupos B, C e Y são os principais sorogrupos, cada um responsável por 1/3 dos casos (CDC, 2015). Entretanto, a taxa de incidência em <1 ano entre 2006 e 2012 atingiu 2,64/100.000 habitantes, com predomínio de doença pelo sorogrupo B (64%) (Macneil et al., 2014).

A doença meningocócica é endêmica no Brasil, com a ocorrência periódica de epidemias. Registraram-se quatro surtos epidêmicas ao longo do tempo: 1) 1920 a 1925 (sorogrupo A); 2) 1945 a 1951 (sorogrupo A); 3) 1971 a 1977 (sorogrupos C e A) e 4) 1988 a 2002 (sorogrupos B e C) (Batista et al., 2017). As epidemias causadas pelo sorogrupo A nos anos 1920 e 1940, atingiram taxas de incidência de 12 a 25 casos/100.000 habitantes. Na década de 1970, a epidemia pelo sorogrupo C atingiu 30 casos/100.000 habitantes. Na década de 1990, houve predomínio do sorotipo B e nos anos 2000, predomina o sorogrupo C, responsável por mais de 2/3 dos casos (de Souza et al., 2008).

Entre 2008 e 2012, de acordo com os dados do DATASUS (Brasil. Ministério da Saúde, 2017), a taxa de incidência de doença meningocócica variou de 1,28 a 1,54 casos/100.000 habitantes (Gráfico 1), atingindo picos de 14,34 casos/100.000 habitantes na população abaixo de 1 ano em 2010 (Gráfico 2). Os dados de 2013 a 2015 estão sujeitos à revisão (última atualização em 05/10/2015).

FONTE: SINAN, SVS, Ministério da Saúde. DATASUS, 2018. *Dados atualizados em 02/10/2015, sujeitos à revisão

Em 2010, a vacina meningocócica C conjugada foi introduzida na rotina do PNI aos 3 e 5 meses, com dose de reforço aos 12 meses e dose única para crianças primovacinadas entre 12 e 23 meses de idade. A introdução da vacina em 2010 resultou na imediata redução nas taxas de incidência de DMI na população-alvo da vacina (Sáfadi et al., 2014a). Tauil et al. (2014) demonstraram, no Distrito Federal, 85% de redução na incidência de DMI pelo sorogrupo C em crianças abaixo de 4 anos de idade ao comparar as taxas de 2009 e 2011. Soma-se a isso, a análise dos dados do DATASUS em âmbito nacional que mostram uma tendência à queda (Gráfico 2).

FONTE: SINAN, SVS, Ministério da Saúde. DATASUS, 2018. *Dados atualizados em 02/10/2015, sujeitos à revisão

Os dados apresentados em <http://www.tabnet.datasus.gov.br> foram atualizados pela última vez em 05/10/2015, sendo que os dados de 2013 a 2015 estão sob revisão (consulta feita em 02/02/2018).

1.3. Estado de portador sadio

A maioria dos indivíduos são, em algum momento da vida, portadores sadios do meningococo em orofaringe. A doença invasiva é um desfecho raro da infecção, geralmente ocorrendo imediatamente após a aquisição da bactéria por um indivíduo suscetível (Caugant et al., 2006).

O meningococo comumente habita o epitélio humano na nasofaringe e orofaringe, sendo que o homem é o seu único reservatório. A colonização da mucosa do trato respiratório superior constitui a etapa inicial para o estabelecimento do estado de portador e doença meningocócica invasiva (Stephens, 2009).

Os portadores sadios representam uma potencial fonte de cepas virulentas capazes de causar doença meningocócica invasiva. Os fatores que promovem alterações do estado de portador sadio resultando em doença invasiva são pouco conhecidos.

O meningococo é particularmente suscetível ao ressecamento; desta forma, a transmissão requer que a bactéria esteja protegida pela cápsula polissacarídica (Caugant et al., 2006).

A transmissão do meningococo ocorre de pessoa-a-pessoa por contato direto ou contato com secreções respiratórias de um indivíduo infectado para um indivíduo suscetível. Pelo seu potencial patogênico, em curto período após a transmissão, usualmente nos primeiros 10 dias após o contato inicial, o meningococo pode invadir o epitélio e atingir a corrente

sanguínea, podendo multiplicar-se e provocar doença meningocócica invasiva (Caugant & Maiden, 2009).

A taxa de portadores sadios ao redor do globo em contexto não epidêmico é estimada em cerca de 10% (Yazdankhah & Caugant, 2004). Entretanto as taxas de incidência da DMI são, em geral, baixas e a DMI é considerada rara (Caugant & Maiden, 2009), exceto no Cinturão da Meningite, na África subsaariana, que apresenta grandes surtos em âmbitos nacionais e regionais. Trotter & Greenwood, 2007, revisaram os estudos de portadores sadios na África subsaariana mostrando taxas de portadores entre 3 e 30%. No Brasil, estudo recente publicado por Moraes et al, 2015, avaliando uma população de 11-19 anos na cidade de Campinas, estado de São Paulo, mostrou uma taxa de colonização de 9,9%.

Segundo Christensen et al, 2010, a taxa de portador sadio é dependente da idade, sendo que adolescentes e adultos jovens são o principal reservatório do meningococo.

Caugant & Maiden (2009) apontam como principais fatores de risco associados à colonização: infecções de vias aéreas superiores bacterianas ou virais concomitantes, tabagismo ativo ou passivo, gênero masculino, baixo status socioeconômico e o número e proximidade dos contatos sociais.

Outros autores sugerem que o padrão de comportamento - exposição ao tabaco, consumo exagerado de álcool, contato íntimo através do beijo, frequentar bares e discotecas - e não a idade ou gênero per se, é o principal determinante do estado de portador sadio nestas populações (Harrison et al, 2018).

Estudos longitudinais mostram que o estado de portador sadio pode durar de dias a meses. Estudos conduzidos em Uganda e Reino Unido mostraram que o portador pode manter a mesma cepa por 4 semanas a 6 meses (Caugant et al., 2006; Ala'Aldeen et al., 2000). Na Alemanha, Glitza et al., 2008, mostraram, dentre 981 adolescentes de 15-18 anos, submetidos a 3 coletas de swab de orofaringe com intervalo de 2 meses, 26,7% dos colonizados (n=270), permaneceram colonizados por, no mínimo, 23 semanas.

Há evidências de diferenças em relação à eficácia em estabelecer o estado de portador entre cepas de diferentes sorogrupos, ou seja, relacionadas à composição da cápsula polissacarídica demonstrada, por exemplo, pela menor taxa de portadores do sorogrupo C (Stephens, 2009).

A cápsula não é indispensável para o estado de portador já que as cepas não capsuladas são transmitidas de maneira eficaz. A vantagem adaptativa do *switching* entre o estado capsulado e não-capsulado está diretamente relacionada à adesão inicial e posterior invasão celular (Stephens, 2009). A adesão celular e a formação de biofilme são inibidas pela cápsula e, conseqüentemente, a expressão da cápsula é inibida ou suprimida durante o estado de portador. Entretanto, a cápsula é fundamental para a sobrevivência do meningococo na circulação e, conseqüentemente, deve estar expressa no momento da invasão da corrente sanguínea (Pizza & Rapuolli, 2014).

Diversos fatores estão relacionados à transição do estado de portador sadio para doença invasiva. O "*switching*" capsular, citado anteriormente, é um destes fatores.

Dois mecanismos determinam a perda da cápsula: a deleção do locus da cápsula (não capsulado ou meningococo cnl) e "*down-regulation*" da expressão da cápsula temporariamente ou permanentemente por mecanismos genéticos (Claus et al., 2002; Caugant et al., 2006).

Os meningococos de portadores sadios geralmente perdem os operons necessários para a síntese, modificação de lipídios e transporte da cápsula polissacarídica (Claus et al, 2002).

Diversos estudos analisam as diferenças entre as cepas de portadores sadios e as cepas causadoras de doença invasiva.

Comanducci et al. (2004) demonstraram que apenas 16,2% de 154 cepas isoladas de portadores sadios expressavam NadA, uma proteína de superfície envolvida na adesão às células do hospedeiro, que está presente em 50% das cepas hipervirulentas e em 75% dos *clusters* hipervirulentos isolados de doentes.

O risco de doença invasiva é maior após a infecção por MenC em relação a MenB (Trotter et al., 2006). Yasdankhak et al. (2004a) compararam a expressão de antígenos capsulares em 667 cepas de meningococo isoladas de portadores sadios e pacientes em três países europeus (República Tcheca, Grécia e Noruega). Neste estudo, 99,7% das cepas isoladas de pacientes com doença invasiva foram sorogrupáveis, o que ocorreu com apenas 59,6% das cepas de portadores sadios. Entre os doentes, houve predomínio de sorogrupo B (60,5%) seguido por sorogrupo C (32,3%), enquanto nos portadores predominou B (32,3%), seguido por Y (10,2%), com apenas 4,8% de sorogrupo C. Houve forte associação entre a doença e a expressão da

cápsula do sorogrupo C: a razão de chance de ocorrência de doença entre isolados do sorogrupo C foi 14 vezes maior em relação ao sorogrupo B.

Em relação à tipagem molecular por MLST e a classificação em complexos clonais, as cepas isoladas de portadores sadios são geneticamente heterogêneas, o que é esperado à medida que a nasofaringe é um nicho para adaptação e sobrevivência de *N. meningitidis* e a invasão não confere vantagens em termos evolutivos (Read et al., 2014).

1.4. Justificativa

A prevalência do estado de portador sadio do meningococo, assim como a distribuição de sorogrupos, é variável de acordo com localização geográfica e idade (Yazdankhah & Caugant, 2004; Christensen et al., 2010). Outros padrões de comportamento como exposição ao tabaco, consumo exagerado de álcool, contato íntimo através do beijo, frequentar bares e discotecas - estão implicados em maior exposição ao meningococo (Harrison et al, 2018).

Neste contexto, o estudo de portador sadio do meningococo em orofaringe em nosso meio é importante para a compreensão da epidemiologia, dinâmica de transmissão e patogênese, sendo fundamental para direcionar políticas públicas em torno da prevenção, atualmente baseada no emprego das vacinas meningocócicas conjugadas.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo primário

2.1.1.Determinar a taxa de portadores sadios de meningococo em nasofaringe entre os estudantes de medicina incluídos nesta casuística.

2.2.Objetivos secundários

2.2.1. Avaliar a frequência de fatores de risco associados ao estado de portador sadio;

2.2.2.Comparar os métodos fenotípicos e genotípicos a partir de cultura e a partir de extração direta de DNA de material clínico para a identificação do meningococo;

2.2.3. Analisar a clonalidade das amostras obtidas.

3. MÉTODOS

3.1. Delineamento do estudo

3.1.1. Casuística

Entre 01 de outubro e 30 de novembro de 2010 foram convidados a participar do estudo todos os alunos que estavam cursando graduação e pós graduação *lato sensu* (residência médica) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este foi o único critério de inclusão considerado. Nenhum critério de exclusão foi adotado neste estudo. Todos os participantes que concordaram em participar e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídos no estudo entre os meses de outubro e novembro de 2010.

3.1.2. Questões éticas

Este projeto e seu TCLE foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 08/09/2010, nº 0554/10 (anexo A).

Todos os voluntários assinaram um TCLE (anexo B) e foram garantidas as condições de confidencialidade.

3.1.3. Amostragem

Considerando um erro amostral de 5%, nível de confiança de 95%, população em estudo composta por 2000 (dois mil) estudantes de graduação e pós-graduação e um percentual máximo de colonização de 35% relatado na literatura (Harrison et al., 2009), calculou-se uma amostra necessária de 298 indivíduos. Considerando-se um acréscimo de 10% por eventuais problemas técnicos (relacionados ao transporte, ocorrências laboratoriais e perda de amostras), a amostra ideal totalizou a inclusão de, no mínimo, 330 alunos.

3.1.4. Coleta de dados epidemiológicos

Todos os participantes, após o preenchimento do TCLE e anteriormente à coleta do(s) swab(s) de orofaringe, preencheram um questionário auto-aplicável (Anexo C) para avaliar a frequência de fatores de risco associados ao estado de portador sadio.

3.1.3.1. Variáveis

As variáveis consideradas foram sexo, idade, estado civil, tipo de moradia, tabagismo, uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias e vacinação prévia com qualquer vacina meningocócica.

3.2. Métodos laboratoriais

3.2.1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de outubro a novembro de 2010, cultivadas em até 4h após a coleta. O DNA extraído foi armazenado a -70°C e as reações de PCR foram realizadas de janeiro a março de 2013.

Foram coletados 580 (quinhentos e oitenta) swabs de orofaringe dentre 380 participantes incluídos no estudo, sendo que:

- os primeiros 200 (duzentos) participantes foram submetidos à coleta de 2 (dois) swabs de orofaringe, ambos coletados no mesmo momento;
- os 180 (cento e oitenta) participantes subsequentes foram submetidos à coleta de 1 (um) *swab* de orofaringe;
- Houve a perda de 5 (cinco) amostras por problemas técnicos relacionados ao manuseio.

Todas as amostras foram colhidas pelo autor da tese, em sala do Centro de Imunizações do Hospital das Clínicas e transportadas no mesmo dia da coleta para o laboratório.

As amostras foram obtidas da parede posterior da faringe (atrás da úvula e possivelmente tonsilas) através da cavidade oral, e colocadas em meio de transporte apropriado (meio de Stuart enriquecido com carvão) (Roberts et al, 2009). Os swabs foram encaminhados para o LIM de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP para isolamento e caracterização das cepas, conforme descrito a seguir.

3.2.2. Cultura em meios específicos

3.2.2.1. Isolamento de *N. meningitidis*: 375 swabs foram cultivados em placas sólidas com meio seletivo de Thayer-Martin (Thayer et al., 1965) no laboratório até 4h após a coleta (Cunningham et al., 2001; Roberts et al., 2009). As placas inoculadas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em atmosfera úmida, com 5 a 10% de CO_2 e examinadas após 24h e 48h. As placas sem crescimento bacteriano foram consideradas amostras isentas de *Neisserias* patogênicas. Nas placas com crescimento de colônias branco-acinzentadas, opacas, de aspecto finamente granulares e tamanhos variados, redondas com bordas delimitadas ou lobulares e mucóides, após 48h de incubação, constatou-se a possível presença de *Neisseria spp.* As colônias presuntivas de *Neisseria spp.* foram submetidas a testes bioquímicos complementares: teste da oxidase, coloração de Gram, teste de degradação de açúcares.

3.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.2.3.1. Extração do DNA: o DNA dos isolados em cultura foi extraído pelo kit *Illustra™ Bacteria Genomicprep Mini Spin GE* (GE Healthcare Life Science, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O 2º swab dos primeiros 200 alunos incluídos no estudo foi submetido a extração direta de DNA de amostra clínica com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção de *Neisseria meningitidis* por métodos de biologia molecular (Dakipoulou et al., 2008; Kesanopoulos et al., 2005; Diggle et al., 2003). Foi possível a extração do DNA de 190 amostras. A extração de DNA diretamente do swab foi feita através do kit *Dneasy Blood & Tissue* (QUIAGEN) e padronizado de acordo com Taha et al. (2007).

3.2.3.2. PCR para identificação de *Neisseria meningitidis*: a PCR para identificação molecular das cepas de *Neisseria meningitidis* utilizou primers específicos para dois genes característicos de *Neisseria meningitidis*: *ctrA* e *crgA* (Taha et al, 2000). A reação foi padronizada de acordo com a literatura e os genes confirmados por sequenciamento do produto da PCR de algumas amostras. Ambas as reações (de isolado em cultura e extração direta de amostra clínica) ocorreram sob as mesmas condições, com mesmos primers e ciclos para comparação posterior (Taha et al., 2007; Maiden & Pollard, 2001), apenas alterando concentrações de reagentes devido a impurezas das amostras extraídas diretamente do swab. Em todas as reações foi utilizado controle positivo com a cepa de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C (07/318 NIBSC-UK EM 63QG). Quando necessário o sequenciamento, as amostras foram purificadas utilizando o kit “GFX™ DNA and Gel Band Purification” (GE HealthCare, EUA) conforme instruções do fabricante. O produto purificado foi quantificado através de corrida e comparação com o peso *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, EUA) em gel de agarose 2%. A reação de sequenciamento foi realizada no setor de sequenciamento do genoma humano da USP utilizando o sistema de análise DNA ABI 3730 DNA Analyser (*Applied Biosystem*, EUA). As sequências foram analisadas no LIM 54 utilizando o *software* BioEdit v7.0.9 e comparadas com o banco de dados disponível na internet (BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.2.3.3. PCR para sorotipagem: a reação de PCR para tipagem dos sorogrupos A, B, C, Y e W foi realizada nas cepas que obtiveram resultado positivo em PCR de identificação para *N. meningitidis*. As condições da reação de PCR e os primers foram utilizados de acordo com Taha et al. (2007).

3.2.4. Tipagem molecular (TM)

3.2.4.1. TM por Eletroforese em Campo Pulsado (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*): os isolados identificados como *N. meningitidis* através de PCR com primer específico foram submetidos à análise do polimorfismo de seu material genético (DNA) por PFGE através de digestão do material genômico com enzima de restrição. Foi utilizada a enzima NheI e os parâmetros de corrida eletroforética foram feitos de acordo com o descrito por Wang et al. (2010). Os perfis de banda de DNA gerados por PFGE foram inicialmente analisados visualmente e agrupados. Foram utilizados os critérios de interpretação descritos por Tenover et al. (1995).

3.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram inseridos em planilha do Excel (versão 14.7.3) e analisados no programa estatístico STATA versão 13.0 (*StataCorp LP, College Station, Texas, USA*).

Efetuuou-se a análise descritiva das variáveis coletadas no questionário auto-aplicado. Os resultados estão descritos em tabela de frequências para as variáveis qualitativas (Tabela 2).

Para a variável idade foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão.

Calculou-se a prevalência de colonização e seu respectivo intervalo com 95% de confiança (IC 95%) a partir de:

1. Métodos fenotípicos após isolamento em cultura;

2. Método genotípico após isolamento em cultura; e
3. Método genotípico a partir de DNA extraído diretamente de amostra clínica.

Para a avaliação de desfecho em um estudo transversal, o método mais comumente utilizado é a regressão logística. Contudo, como o desfecho colonização apresentou alta prevalência, utilizou-se a regressão de Poisson com variância robusta (Barros & Hirakata, 2003; Coutinho et al., 2008). As razões de prevalência (RP) brutas com seus respectivos intervalos com 95% de confiança (IC 95%) foram calculadas para examinar as possíveis associações entre o desfecho e as variáveis de confusão. Neste estudo adotou-se nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da casuística

A **Tabela 1** mostra a distribuição da casuística conforme o ano de graduação na Faculdade de Medicina.

Tabela 1 - Distribuição das amostras de <i>swab</i> de orofaringe coletadas dos 380 alunos da Faculdade de Medicina conforme o ano da graduação - Universidade de São Paulo - 2010		
	No. absoluto	%
1° ano	111	29
2° ano	109	29
3° ano	63	17
4° ano	81	21
5° ano	11	3
6° ano	5	1
Total	380	100

Nenhum médico residente foi incluído neste estudo uma vez que a amostra necessária foi alcançada durante a campanha de vacinação dos alunos, que precedeu a vacinação dos médicos residentes.

Nesta casuística, predominou o gênero masculino (56,8%), com média de idade de 21,9 anos, com apenas 3,2% morando em alojamento estudantil, 14,9% expostos ao tabagismo, tendo a minoria recebido vacina meningocócica (vacinas polissacarídicas) (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Características demográficas dos 375 alunos da Faculdade de Medicina cujas amostras de orofaringe foram analisadas - Universidade de São Paulo - 2010

Variáveis	n	%
Gênero		
Masculino	213	56,8
Feminino	162	43,2
Idade		
<20 anos	60	16
20-23 anos	242	64,5
≥24 anos	73	19,5
Média (dp)	21,9 (2,8)	
Mediana (min-max)	21 (18-39)	
Moradia		
Sozinho	43	11,5
Com os pais ou parentes	250	66,7
Com amigos	70	18,7
Moradia estudantil	12	3,2
Tabagismo		
Ativo	7	1,8
Passivo	49	13,1
Não exposto	319	85,1
Infecção de vias aéreas superiores nos últimos 30 dias		
Sim	156	41,6
Não	219	58,4
Uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias		
Sim	41	10,9
Não	334	89,1
Vacinação prévia contra o meningococo (em qualquer momento)		
Sim	53	14,1
Não	322	85,9
Contato prévio com caso confirmado de DMI		
Sim	39	10,4
Não	336	89,6

4.2. Cultura em meio de Thayer-Martin, testes bioquímicos complementares e PCR a partir de DNA extraído de meio seletivo

Dentre os 580 swabs coletados, 380 amostras (de 380 indivíduos) foram encaminhadas ao laboratório para cultivo em meio de Thayer-Martin. Por problemas técnicos, somente 375 foram cultivados em meio seletivo, havendo crescimento em 78 amostras (20,8%). Dentre as 78 amostras com crescimento em meio seletivo submetidas ao teste da oxidase, 60 amostras resultaram positivas. Estas 60 amostras, submetidas à coloração de Gram, eram cocos Gram-negativos. As 60 amostras foram submetidas ao teste de degradação de açúcares e ao PCR para genes *ctrA* e *crgA*. No teste de degradação de açúcares, 23 amostras apresentaram fenótipo típico de *Neisseria meningitidis*. Nesse contexto, a taxa de colonização a partir de isolamento em cultura e testes fenotípicos foi 23/375, ou seja, 6,1%. Dentre as 60 amostras submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes *ctrA* e *crgA*, 58 foram positivas e 2 negativas. Dentre as 58 amostras positivas, 53 apresentaram as 2 bandas e 5 apresentaram apenas o gene *crgA*, sendo confirmadas por sequenciamento completo do genoma.

Nesse contexto, a taxa de colonização a partir da PCR dos isolados em cultura foi 58/375, ou seja, 15,4% (**Figura 2**).

Figura 2 - Fluxograma da taxa de detecção de *N. meningitidis* por métodos microbiológicos e por biologia molecular (PCR) após cultivo em meio de cultura, dentre 375 amostras coletadas de 375 alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 2010

4.3. PCR a partir de DNA extraído diretamente das amostras clínicas

Dentre os 200 primeiros swabs coletados, extraiu-se DNA de 190 swabs. O DNA destas 190 amostras foi submetido a PCR para os genes *ctrA* e *crgA*. Dentre as 190 amostras, 45 resultaram negativas, 42 apresentaram apenas a banda do gene *crgA* e 103 resultaram positivas, com ambas as bandas presentes. Dentre as 42 amostras que apresentaram somente a banda do gene *crgA*, 29 foram positivas após sequenciamento completo do genoma, totalizando 132 amostras positivas dentre as 190 amostras, com taxa de colonização por PCR de amostra clínica de 69,5% (**Figura 3**).

Figura 3 - Fluxograma da taxa de detecção de *N. meningitidis* a partir de DNA extraído diretamente de 190 amostras clínicas obtidas de 190 alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 2010

4.4. Fatores de risco associados à colonização

A **Tabela 3** traz a correlação entre fatores de risco e portadores saudáveis do meningococo entre os 190 alunos cujas amostras foram submetidas tanto à cultivo em meio de Thayer-Martin quanto à PCR com DNA extraído diretamente de amostra clínica.

Tabela 3 - Análise da correlação entre fatores de risco e portadores saudáveis de *Neisseria meningitidis* entre 190 alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - 2010

	Não portadores		Portadores		RP	IC 95%	p
	n	%	n	%			
Gênero							0,913
Masculino	29	29,3	70	70,7	1		
Feminino	26	28,6	65	71,4	1,01	0,84-1,21	
Idade							0,351*
<20	5	23,8	16	76,2	1		
20-23	35	28	90	72	0,95	0,73-1,29	
≥24	15	34,1	29	65,9	0,87	0,63-1,19	
Moradia							0,800
Sozinho	10	34,5	19	65,5	1		
Com pais ou parentes	36	28,1	92	71,9	1,10	0,82-1,46	
Moradia estudantil	9	27,3	24	72,7	1,11	0,79-1,56	
Tabagismo							0,397
Não exposto	45	27,1	121	72,9	1		
Ativo	1	25	3	75	1,03	0,58-1,83	
Passivo	9	45	11	55	0,75	0,5-1,13	
Uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias							0,264
Sim	8	42,1	11	57,9	1		
Não	47	27,5	124	72,5	1,25	0,84-1,86	
Vacinação prévia (qualquer vacina meningocócica, exceto MenC conjugada)							0,423
Não	48	30	112	70	1		
Sim	7	23,3	23	76,7	1,10	0,88-1,37	
Contato prévio com caso confirmado de DMI							0,851
Não	49	29,2	119	70,8	1		
Sim	6	27,3	16	72,7	1,03	0,78-1,35	

*Qui-quadrado de tendência

Para identificar entre os estudantes os possíveis fatores associados à colonização de nasofaringe por meningococo, testou-se a relação entre estado de portador sadio e as demais variáveis do estudo.

Não foi observada diferença estatística na prevalência de portadores sadios de *N. meningitidis* para nenhuma das variáveis analisadas (**Tabela 3**).

4.5.PCR para sorogrupagem

A reação de PCR de identificação dos sorogrupos A, B, C, Y e W foi realizada nas amostras que obtiveram resultado positivo na PCR de identificação de *Neisseria meningitidis*.

Os sorogrupos C, B e Y foram testados separadamente e o sorogrupo A e W foram testados concomitantemente nas amostras de cultura e swab.

Não houve nenhuma amostra positiva para os sorogrupos A, Y e W tanto nas amostras cultivadas quanto nas amostras de DNA extraído diretamente dos swabs.

Dentre as amostras com DNA extraído de cultura em meio específico, 58 resultaram positivas para *N. meningitidis*, ou seja, 15,4% do total das amostras submetidas a crescimento em meio de cultura. Destas amostras, 12 foram positivas para sorogrupo C, 27 foram positivas para sorogrupo B e 19 não pertenciam aos sorogrupos testados (**Tabela 4**).

Já dentre as amostras com DNA extraído diretamente dos swabs, 132 amostras resultaram positivas para *N. meningitidis*, ou seja, 69,5%. Destas

amostras, 87 foram positivas somente para o sorogrupo C, 3 somente para o sorogrupo B, 5 para os sorogrupos B e C e 37 não pertenciam aos sorogrupos testados (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Distribuição por sorogrupo dos isolados em nasofaringe a partir de DNA de *Neisseria meningitidis* extraído de meio de cultura e amostras clínicas de 375 alunos da Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - 2010

	Sorogrupo				Total
	C	B	C e B	NT*	
DNA de <i>N. meningitidis</i> extraído de meio de cultura	12 (20,7%)	27 (46,5%)	0	19 (32,8%)	58 (100%)
DNA de <i>N. meningitidis</i> extraído de amostras clínicas	87 (65,9%)	3 (2,3%)	5 (3,8%)	37 (28%)	132 (100%)

*NT: Nenhum dos sorogrupos testados.

4.6. Tipagem molecular por PFGE

O DNA de todos os isolados identificados como *N. meningitidis* foi extraído e submetido à análise do polimorfismo de seu material genético por PFGE após digestão do material genômico com enzima de restrição NheI como descrito por Wang et al. (2010). Foram utilizados os critérios de interpretação de Tenover et al. (1995) e a amostragem foi policlonal.

5. DISCUSSÃO

Conhecer a taxa de portadores sadios do meningococo é fundamental para desenvolver potenciais estratégias de prevenção.

O uso de vacinas conjugadas mostrou que estas vacinas reduzem a taxa de portadores sadios dos sorogrupos contidos na vacina, tanto em indivíduos vacinados quanto na população não vacinada, caracterizando um efeito indireto da vacina (Bijlsma et al., 2014; Borrow et al., 2017): no Brasil, a vacina MenC conjugada faz parte do calendário do PNI desde setembro de 2010, a princípio, para crianças menores de 2 anos de idade. Em 2017, o Ministério da Saúde também passou a disponibilizar a vacina meningocócica C conjugada para adolescentes de 12 a 13 anos. A faixa-etária será ampliada, gradativamente, até 2020, quando serão incluídos crianças e adolescentes com 9 anos até 13 anos (Brasil, Ministério da Saúde).

Há poucos estudos avaliando a taxa de portadores sadios do meningococo no Brasil, principalmente antes da introdução da vacina MenC conjugada.

Com o objetivo de determinar a taxa de portadores sadios antes da introdução da vacina na rotina do PNI no Brasil, este estudo foi conduzido no segundo semestre de 2010, um a dois meses após a introdução da vacina, quando ainda não havia tempo hábil para interferência no estado de portador sadio.

A casuística deste estudo foi composta por uma população específica, de estudantes universitários do curso de medicina, com mediana de idade de 21 anos (18-39 anos). O estudo mostrou uma taxa geral de portadores sadios de 45,6%, ao considerar o estado de portador como uma amostra positiva por qualquer uma das metodologias empregadas - isolamento e identificação em meio de cultura; PCR de colônias em meio de cultura ou PCR com DNA extraído diretamente de swab.

Esta taxa de portadores sadios deve ser interpretada com cautela já que as metodologias utilizadas para identificação de *Neisseria meningitidis* neste estudo diferem das metodologias empregadas na maior parte dos estudos publicados até então (Anexo D).

A maioria dos estudos descritos no Anexo D empregaram métodos fenotípicos para estabelecer a taxa de portadores sadios. Este estudo utilizou, além dos métodos fenotípicos, método genotípico (PCR) para identificação de espécie. Outros fatores que influenciam na comparação dos dados são as populações estudadas, as diferentes faixas etárias e os diferentes tipos de estudos (transversal ou longitudinal).

A Tabela 5 compara a taxa de portadores sadios do nosso estudo aos estudos transversais utilizando métodos fenotípicos. As taxas de portadores sadios variaram de 0,6% a 20,4%. Estes estudos estão descritos detalhadamente no Anexo D.

Tabela 5 - Comparação dos estudos transversais de prevalência de portadores sadios utilizando métodos fenotípicos para identificação de espécie, com amostras coletadas de 1991 a 2017

Autor, Ano	Amostra	País	Ano	Faixa etária	% PS*
Caugant et al., 1994	n=943	Noruega	1991	0-94 anos	9,6%
Claus et al., 2005	n=8000	Alemanha	1999	3-26 anos	10,4%
Pavlopoulou et al., 2004	n=554	Grécia	2000	2-19 anos	4,0%
Monteros et al., 2009	n=2310	México	2004	15-19 anos	1,6%
Luiz et al, 2018 (Tese)	n=375	Brasil	2010	18-39 anos	6,1%
Rodriguez et al., 2014	n=500	Chile	2012	18-24 anos	4,0%
Kadayifci et al., 2016	n=100	Turquia	2012	0-79 anos	0,6%
Díaz et al., 2016	n=4217	Chile	2013	10-19 anos	6,5%
Nunes et al., 2016; Moura et al., 2017***	n=1200	Brasil	2014	11-19 anos	4,9%
Tryfinopoulou et al., 2016	n=1420	Grécia	2014	18-26 anos	12,7%
Alemayehu et al., 2017	n=240	Etiópia	2017	**	20,4%
Caugant et al., 2006	n=750	Uganda	**	2-19 anos	2,0%

*PS: portadores sadios

**Não especificados

***Ambas as publicações referem-se à mesma casuística

Christensen et al. (2010) demonstraram, através de revisão sistemática da literatura, que a prevalência do estado de portador de acordo com a faixa etária é não-linear, aumentando de 4,5% na infância para 7,7% aos 10 anos de idade, com pico de 23,7% aos 19 anos, com posterior declínio na idade adulta (13,1% aos 30 anos e 7,8% aos 50 anos).

Diversos estudos avaliam a taxa de portadores sadios em populações universitárias ao redor do mundo: Ala'Aldeen et al. (2000), em estudo longitudinal com estudantes do primeiro ano da Universidade de Nottingham, no Reino Unido, no início do ano letivo de 1997-98, constatou

prevalências de 12,2%, 31% e 28% nesta população. Outro estudo conduzido pelo mesmo autor em 2011, referente aos anos de 2009-2010, já utilizando métodos genotípicos para identificação de espécie, na mesma universidade, mostrou taxas de 23,2%, 55,7% e 59,1%.

Na Cidade do México, Monteros et al. (2009) conduziu um estudo transversal de 2004-05, utilizando identificação através de métodos fenotípicos. Neste estudo, que incluía 800 estudantes universitários (15-19 anos), 774 adolescentes de centros de reabilitação (15-19 anos) e 736 crianças menores de 5 anos, a taxa de portadores foi, respectivamente, zero, 2,9% e 1,6%.

Em Santiago, Chile, em outubro de 2012, Rodriguez et al. (2014) conduziram um estudo transversal com 500 estudantes universitários, de 18-24 anos, com taxa de colonização de 4%, próxima à taxa observada por Monteros et al. (2009) no México.

Na Itália, Gasparini et al. (2014), avaliando 173 adolescentes e adultos jovens de 14 a 22 anos, em estudo longitudinal, verificaram uma prevalência de 18,5% em, ao menos, 1 amostra. Para a identificação de espécie, empregaram PCR com os primers *ctrA* e *crgA*, mesmos utilizados neste estudo.

Já o estudo de Moreno et al. (2015), avaliando 1459 estudantes secundários e universitários de 15 a 21 anos na Colômbia, apresentou uma taxa de 6,85%, com pico de prevalência na população de 20-21 anos, mesma faixa etária em que observamos o pico de prevalência em nossa casuística.

No Brasil, cinco estudos de prevalência foram publicados de 2014 a 2017:

O estudo transversal de Coch Gioia et al. (2015), conduzido com 200 profissionais de saúde em um hospital universitário no Rio Grande do Sul, com idade de 18-63 anos, foi conduzido de janeiro a novembro de 2011. Este estudo, que utilizou identificação de espécie através de DNA de cultura de swab, mostrou uma taxa geral de portadores saudáveis de 9%. Entretanto, a análise da subpopulação de estudantes do hospital universitário mostrou 15% de portadores assintomáticos entre os 100 estudantes avaliados.

Os outros quatro estudos publicados avaliaram a população geral, posteriormente à introdução da vacina meningocócica C conjugada na rotina do PNI:

Sáfadi et al. (2014) avaliaram a taxa de portadores em 483 trabalhadores de 2 refinarias de petróleo após um surto de doença meningocócica C. A taxa de prevalência resultante foi 21,5%. Entretanto, como o trabalho está relacionado a um surto de doença invasiva, a comparação dos resultados com estes dados são questionáveis visto que o contexto epidêmico interfere na colonização dos contatos próximos.

Moraes et al. (2015) conduziram um estudo com estudantes de 11 a 19 anos em Campinas, em 2012, com taxa de prevalência de 9,9%, com pico na faixa etária de 17-19 anos (12,9%). Este estudo, assim como o estudo de Sáfadi et al. (2014), empregou PCR para identificação de espécie com os primers *ctrA* e *sodC*.

Nunes et al. (2016), em Salvador, avaliaram 1200 estudantes de 11-19 anos em 2014, com 4,9% de prevalência de portadores sadios. Entretanto, houve uma campanha de vacinação em massa previamente, também direcionada a adolescentes e adultos jovens, o que provavelmente interfere na comparação desta taxa com o estudo de Moraes et al. (2015).

O único estudo publicado no Brasil, incluindo população de 1 a 24 anos, foi conduzido em Embu das Artes, de outubro de 2011 a maio de 2012, por Weckx et al (2017). Neste estudo, a taxa de prevalência é semelhante às taxas da cidade de Campinas, com prevalência de 9%, com pico na faixa etária de 15-19 anos (12,6%).

O presente estudo apresenta uma taxa geral de portadores sadios muito superior às taxas apresentadas pelos demais estudos realizados no Brasil.

De modo geral, os estudos conduzidos antes de 2010, utilizavam-se de métodos fenotípicos para a identificação da espécie *Neisseria meningitidis*: cultivo das amostras em meio de cultura, avaliação morfológica das colônias e teste de oxidação de açúcares (Ala'Aldeen et al., 2000; Pavlopoulou et al., 2004; Claus et al., 2005; Caugant et al., 2006; Glitza et al., 2008; Monteros et al., 2009). A partir de 2010, a maioria dos estudos passa a utilizar métodos fenotípicos e/ou genotípicos através da PCR utilizando primers diversos (*ctrA*, *crgA*, *sodC*, *ctrB*). (Gasparini et al., 2014; Sáfadi et al., 2014; Coch Gioia et al., 2015; Moraes et al., 2015; Moreno et al., 2015; Ataee et al., 2016; Weckx et al., 2017; Kim et al., 2017; Gonzales et al., 2017; van Ravenhorst et al., 2017).

Os estudos conduzidos no Brasil (Coch Gioia et al., 2015; Moraes et al., 2015; Nunes et al., 2016; Moura et al., 2017; Sáfadi et al., 2014; Weckx et al., 2017) empregaram identificação de espécie por método genotípico, através da PCR com primers *ctrA* e/ou *sodC*, a partir de DNA bacteriano em meio de cultura. Nosso estudo utilizou os primer *ctrA* e *crgA* com DNA bacteriano em meio de cultura e DNA extraído diretamente do swab.

Consequentemente, para efeitos de comparação, a taxa de portadores do nosso estudo, utilizando os métodos similares aos empregados pelos outros estudos brasileiros supracitados, é de 15,4%, à medida que aqueles estudos não realizaram PCR a partir de DNA extraído diretamente de amostra clínica (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação dos estudos transversais de prevalência de portadores saudáveis utilizando métodos genotípicos para identificação de espécie, com amostras coletadas de 2010 a 2015, no Brasil

Autor	Amostra	País	Ano	Faixa etária	% PS*
Sáfadi et al., 2014**	n=483	Brasil	2010	18-39 anos	21,5%
Luiz et al, 2018 (Tese)	n=375	Brasil	2010	18-39 anos	15,4%
Weckx et al., 2017	n=967	Brasil	2011	1-24 anos	9%
Coch Gioia et al., 2015	n=200	Brasil	2011	18-63 anos	9%
Moraes et al., 2015	n=1208	Brasil	2012	11-19 anos	9,9%

*PS: portadores saudáveis

**Estudo realizado durante um surto de DMI em uma refinaria.

Jordens et al. (2002) compararam cultura e PCR de *swab* (como realizado em nosso trabalho), cultura e PCR de lavado de orofaringe para detecção de *N. meningitidis* em 89 estudantes. A sensibilidade da cultura e PCR de *swab* associados foi 83% contra 72% da cultura de *swab* isolada.

Diferentemente do nosso trabalho, Jordens et al. (2002) coletaram apenas 1 *swab*; a sensibilidade da cultura, do PCR e dos dois métodos associados foi, respectivamente, 72%, 56% e 83%.

Numa subpopulação do nosso estudo, com 190 amostras obtidas de 190 estudantes, conforme publicação prévia (Rizek et al., 2016), a taxa de positividade da cultura foi 12,1% enquanto a positividade da PCR realizada com PCR extraído diretamente de amostra clínica foi 69,5% ($p < 0.001$). Uma das hipóteses para explicar tal diferença pode estar relacionada à menor concentração bacteriana em portadores sadios em relação às amostras clínicas de doença invasiva, reduzindo a sensibilidade da cultura. Além disso, a presença de contaminantes, como outros grupo de bactérias comensais e células eucarióticas, poderiam reduzir ainda mais a positividade da cultura (Sacchi et al., 2009).

Em relação à distribuição de genogrupos, nos estudos conduzidos no Brasil, houve predomínio de cepas não genogrupáveis. Dentre as cepas genogrupáveis, houve predomínio do genogrupo C - todos a partir de DNA extraído de cultura em placa (Moraes et al., 2015; Nunes et al., 2016; Moura et al., 2017; Sáfadi et al., 2014; Weckx et al., 2017).

Em relação à identificação dos grupos, nosso estudo utilizou apenas a identificação genotípica (genogrupagem) através da PCR dos genes *orf2* (para identificação do sorogrupo A) e dos genes *siaD_B*, *siaD_C*, *siaD_W* e *siaD_Y* (para a identificação dos sorogrupos B, C, W e Y, respectivamente). Não foi realizada avaliação através de métodos fenotípicos (sorogrupagem). Houve um predomínio do genogrupo B (46,5%) a partir das amostras de DNA de *N. meningitidis* extraído de meio de cultura e predomínio de genogrupo C

(65,9%) a partir das amostras de DNA de *N. meningitidis* extraído das amostras clínicas.

van Ravenhorst et al. (2017) conduziram um estudo longitudinal com 1715 participantes na Holanda, de janeiro/2013 a março/2014, com uma população de 13 a 23 anos. A análise fenotípica dos sorogrupos mostrou um predomínio de cepas não-sorogrupáveis (67%) e 14% de sorogrupo B. Ao realizar sequenciamento completo do genoma, *cnl* (*capsule null locus*) estava presente em apenas 31% das 267 cepas não-sorogrupáveis; dentre as cepas não-sorogrupáveis, 27% apresentavam genogrupo B. A discrepância entre estes resultados é atribuída à menor sensibilidade da PCR direto de amostra clínica em detectar MenB quando comparada ao sequenciamento do genoma, provavelmente devido à perda do enriquecimento em cultura. Isto poderia, em parte, explicar a discrepância encontrada em nosso trabalho, no qual a detecção de MenB foi menor na PCR de amostra clínica em relação à PCR de cultura.

Claus et al. (2005) compararam a sorogrupagem com a presença do gene *siaD* em 822 isolados em 8000 crianças na Bavária: a expressão do gene da cápsula foi muito menos comum entre os isolados *siaD_C* (36%) e *siaD_Y* (58%) em relação a *siaD_B* (78%) e *siaD_W* (75%).

Em nosso trabalho, não foi observada clonalidade entre as cepas, o que geralmente é usual em cepas isoladas de portadores saudáveis.

Neste estudo avaliou-se a relação entre a prevalência de portadores saudáveis e diferentes fatores de risco. Entretanto, não houve associação significativa entre a prevalência de portadores e os fatores de risco avaliados

- idade, gênero, moradia, tabagismo, vacinação prévia, uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias, contato com caso confirmado de doença invasiva. O tamanho da amostra calculado para avaliar a prevalência de portadores sadios pode não ter sido suficiente para identificar fatores de risco associados à colonização. Os resultados da literatura em relação aos fatores de risco associados ao estado de portador sadio são muito heterogêneos (anexo D): dentre os 25 estudos descritos, 9 não avaliaram fatores de risco associados ao estado de portador sadio; 2 estudos não observaram diferenças entre portadores e não-portadores e os outros 14 estudos mostraram idade, sexo masculino, frequentar bares e festas, moradia com mais de um morador por cômodo e tabagismo como fatores associados à maior prevalência de colonização.

Nosso estudo apresenta algumas limitações: a casuística é composta por uma população específica, de estudantes de medicina de uma universidade pública, não representativa da população geral.

Por questões logísticas e de execução, não foi possível a coleta de dois swabs de todos os participantes. Consequentemente, há um viés de interpretação na taxa geral de portadores à medida que a positividade de detecção de *N. meningitidis* pelo método de extração direta do DNA da amostra foi muito superior à positividade da cultura.

Em relação à identificação dos grupos, não utilizamos métodos fenotípicos (como ELISA com anticorpos monoclonais, por exemplo) e não obtivemos dados associados à expressão dos genes, o que interfere na comparação dos dados em relação às cepas não-grupáveis com os demais estudos publicados.

Neste estudo, não avaliamos sorotipos e subsorotipos e não fomos capazes de apontar, portanto, a ocorrência de colonização por cepas hipervirulentas.

Considerações finais

Os trabalhos mais recentes sobre portadores sadios sugerem o sequenciamento completo do genoma associado a análise proteômica para melhor compreensão do estado de portador (Borrow et al., 2017; Klughammer et al., 2017; Jones et al., 2016).

Klughammer et al. (2017), utilizando genômica comparativa, diferentes tecnologias de sequenciamento e processamento de dados de bioinformática, defendem a hipótese de que a virulência dos meningococos resulta da evolução accidental de variantes invasivas durante a colonização. Sendo assim, a virulência estaria correlacionada com o *fitness* bacteriano “dentro” do hospedeiro. Consequentemente, mutantes que são gerados aleatoriamente na nasofaringe dos ancestrais colonizadores atravessam a barreira nasofaríngea e são selecionados para uma melhor sobrevivência na corrente sanguínea, preenchendo com êxito um nicho ecológico vazio dentro do hospedeiro.

Mais estudos são necessários para a melhor compreensão do estado de portador sadio, principalmente após a introdução de vacinas conjugadas capsulares e vacinas contra antígenos subcapsulares.

Este trabalho, apesar da casuística limitada e de uma população específica, foi conduzido antes da introdução da vacina MenC conjugada no calendário de vacinação do Programa Nacional de Imunizações.

Os resultados gerados a partir de uma metodologia pouco empregada em estudos anteriores (DNA extraído de amostra clínica), com uma taxa de positividade muito superior aos métodos tradicionais utilizados, mostram a necessidade de outros estudos que comparem métodos, associados a sequenciamento completo de genoma e proteômica.

Nos próximos anos, é provável que hajam mudanças epidemiológicas locais a partir do emprego de novas vacinas contra o meningococo B e a expansão do emprego da vacina contra o meningococo C. Neste contexto, o delineamento de estudos longitudinais, com estas novas metodologias auxiliarão a compreensão do estado de portador sadio e contribuirão para estratégias de prevenção da doença meningocócica invasiva.

6. CONCLUSÕES

- 1) A taxa geral de portadores sadios, definida como amostra positiva em qualquer uma das metodologias empregadas, foi 45,6%;
- 2) A taxa de portadores sadios de *N. meningitidis* a partir de cultivo em meio seletivo e identificação fenotípica (aspecto das colônias, coloração de Gram, teste da oxidase e fermentação em açúcares) foi 6,1%;
- 3) A taxa de portadores sadios por PCR de DNA extraído a partir dos produtos do meios de cultura foi 15,4%;
- 4) A taxa de portadores sadios por PCR de DNA extraído diretamente das amostras clínicas (*swab*) foi 69,5%;
- 5) A análise dos genogrupos mostrou predomínio do genogrupo B nas reações de PCR com DNA extraído de culturas e predomínio do genogrupo C nas reações de PCR com DNA extraído diretamente de amostras clínicas;
- 6) Os métodos genotípicos mostraram-se superiores para a detecção de portadores sadios;
- 7) Não houve associação dos fatores de risco avaliados com a prevalência de portadores sadios na população estudada;
- 8) A análise do polimorfismo através de PFGE não mostrou relação entre as cepas isoladas, sendo caracterizadas como policlonais.

7. ANEXOS

A. Anexo A - Aprovação CAPPesq

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/09/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0554/10**, intitulado: **"PREVALÊNCIA DO ESTADO DE PORTADOR ASSINTOMÁTICO DE MENINGOCOCO ENTRE ESTUDANTES DE MEDICINA E MÉDICOS RESIDENTES DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO BRASIL"** apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Ana Marli Christovam Sartori**
Pesquisador (a) Executante: **André Machado Luiz**

CAPPesq, 09 de Setembro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

B. Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo – HC/FMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação do sujeito da pesquisa ou responsável legal

1. Nome: _____
Documento de identidade nº: _____ Sexo: M ☐ F ☐
Data de nascimento: ____/____/____ Cidade: _____ n°: _____ Apto: _____
Endereço: _____
Bairro: _____
CEP: _____ Telefone: DDD (____) _____

2. Responsável legal: _____
Natureza (grau de parentesco): _____ Sexo: M ☐ F ☐
Documento de identidade nº: _____
Data de nascimento: ____/____/____ Cidade: _____ n°: _____ Apto: _____
Endereço: _____
Bairro: _____
CEP: _____ Telefone: DDD (____) _____

Dados sobre a Pesquisa

1. Título do Protocolo de Pesquisa:
Prevalência do estado de carreador de meningococo entre estudantes de medicina e médicos residentes da Universidade de São Paulo, Brasil
Pesquisador: André Machado Luiz CRM-SP: 116.993
Cargo/Função: Médico assistente
Instituições participantes: Centro de Referência em Imunobiológicos Especiais do HC/FMUSP e Laboratório de Investigação Médica - Bacteriologia (LIM54)

2. Avaliação do Risco da Pesquisa:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. Duração da Pesquisa: 12 meses

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo – HC/FMUSP

1 – **Desenho do estudo e objetivos:** Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que visa avaliar a prevalência de carreadores assintomáticos do meningococo na nasofaringe. O meningococo é uma das principais causas de meningite bacteriana e sepsis em todo o mundo. As doenças meningocócicas invasivas são causadas por um número limitado de cepas enquanto os isolados de nasofaringe em carreadores assintomáticos pertencem a múltiplas linhagens, muitas das quais não estão associadas à doença meningocócica. Apesar das altas taxas de carreadores assintomáticos de nasofaringe na população, a doença é rara. No Brasil, o coeficiente de incidência de doença meningocócica no Brasil foi 1,38 casos/100.000 habitantes, sendo 12,58 casos/100.000 habitantes na faixa etária de menores de um ano de idade. Os diversos estudos de carreadores assintomáticos no mundo mostram que a principal faixa etária carreadora do meningococo são adultos jovens entre 15 e 24 anos de idade. Esta população é responsável pela transmissão da doença que, como visto anteriormente, afeta principalmente crianças. A vacina contra meningococo será introduzida na rotina do Calendário Básico de Vacinação do Brasil em agosto de 2010 para crianças abaixo de 2 anos de idade por ser a faixa etária com o maior coeficiente de incidência da doença. No Reino Unido, observou que a vacinação da população entre 0 e 19 anos de idade determinou uma redução significativa do estado de portador do meningococo em adultos jovens, o que diminuiu a transmissão e, consequentemente, o número de casos da doença em todas as faixas etárias. Não há dados sobre o estado de carreador de meningococo na população brasileira. Conhecer as taxas de portadores assintomáticos de nasofaringe são essenciais para direcionar políticas públicas de vacinação.

2 – **Descrição dos procedimentos que serão realizados:** Antes que você decida participar deste estudo, os pesquisadores explicarão tudo a respeito da sua participação. Após esta explicação, você deverá ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e deverá assiná-lo após o esclarecimento de todas as suas dúvidas. Após o seu consentimento, você iniciará sua participação que está descrita a seguir:

2.1 – Após a assinatura do TCLE, um pesquisador aplicará um questionário para avaliar fatores de risco já conhecidos para a colonização por meningococo: sexo, idade, status sócio-econômico, tabagismo, atividade acadêmica ou profissional, doenças respiratórias agudas.

2.2 – A seguir, serão coletados dois (2) swabs da parede posterior da faringe (atrás da úvula e possivelmente tonsilas) através da cavidade oral.

3 – **Descrição dos desconfortos e riscos esperados no procedimento 2:** a coleta do swab da parede posterior da faringe pode causar náusea no momento da coleta.

4 – **Benefícios para o participante:** não há benefício direto para o participante.

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo – HC/FMUSP

5 – **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra Ana Marlí Christovam Sartori que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Prédio dos Ambulatórios, 4º andar, bloco 8, telefone (11)30697517. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnnet.usp.br

6 – **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:** não existem procedimentos alternativos que possam ser vantajosos. Você pode optar por não participar do estudo.

7 – **Garantia de liberdade:** é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

8 – **Direito de confidencialidade:** Todas as informações obtidas durante o estudo serão sigilosas, de forma a proteger sua identidade.

9 – **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados:** os resultados da pesquisa serão informados a todos os participantes ao final do estudo.

10 – **Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

11 – **Os pesquisadores envolvidos no estudo comprometem-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.**

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo – HC/FMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **PREVALÊNCIA DO ESTADO DE CARREADOR DE MENINGOCOCO ENTRE ESTUDANTES DE MEDICINA E MÉDICOS RESIDENTES DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL**. Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente ou representante legal* Data: ____/____/____

*para voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do investigador Data: ____/____/____

C. Anexo C - Questionário auto-aplicável

MENPORT 2010**Questionário**

Fatores de risco associados à colonização por meningococo

1. Nome: _____
2. Idade: _____
3. Sexo: () Masculino () Feminino
4. Estado civil:
() Solteiro () Casado () Outros
5. Tem filhos? Especificar número e idade.

6. Moradia:
() Mora sozinho (a)
() Mora com cônjuge e filhos
() Mora com os pais e/ou familiares
() Mora com amigos
() Moradia estudantil
7. Quantas pessoas convivem no mesmo domicílio?

8. Tabagismo:
() Ativo () Passivo* () Não exposto
- *Define-se tabagismo passivo como a inalação do fumo de derivados do tabaco (cigarro, charuto, cigarrilhas, cachimbo) por não fumantes, que convivem diariamente com fumantes em ambientes fechados.
9. Apresentou infecção de vias aéreas superiores (gripe, resfriado comum) nos últimos 30 dias?
() Sim () Não
10. Fez uso de antibióticos nos últimos 30 dias?
() Sim () Não
11. Já foi vacinado contra meningite meningocócica anteriormente?
() Não
() Sim () MenC conjugada ____/____/____
() MenAC polissac ____/____/____
() MenBC polissac ____/____/____
() MenACYW135 conjugada (não disponível no Brasil)
12. Contato prévio com caso confirmado de doença meningocócica? () Sim () Não

Anexo D - Quadro-resumo dos estudos de prevalência de portadores sadios publicados globalmente, de 1994 a 2017, em ordem crescente de ano da coleta da amostra

Autor/ Ano	Amostra	População	País	Ano (coleta)	Faixa etária	Tipo de estudo	Método id. espécie	Primers	% PS ¹	Método id. soro/ genogrupos	Resultados soro/ genogrupos	Análise de fatores de risco
Caugant et al., 1994	n=943	População geral	Noruega	1991	0-94 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	Geral: 9,6% 0-14 anos (4/217): 1,8% 15-24 anos (34/120): 28,3% >24 anos (53/606): 8,7%	Fenotípica	50% NSG ² ; predominio de MenB	Sim; faixa etária de 15-24 anos, gênero masculino e fumantes ativos
Caugant et al., 2006	n=750	Voluntários para estudo de imunogenicidade da vacina tetravalente conjugada ACWY	Uganda	2000	2-19 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	15/750 indivíduos: 2%	Fenotípica	71% NSG ²	Não avaliado
Glitz et al., 2008	n=1200	Adolescentes de 12 escolas	Alemanha	2000	15-18 anos	Longitudinal	Fenotípica	NA ⁶	Geral (901/4783): 18,8% 1ª amostra (334/1910): 17,5% 2ª amostra (345/1677): 20,6% 3ª amostra (220/1196): 18,4%	Fenotípica/ Genotípica (somente cepas não sorogrupáveis)	MenB > MenY > MenW > MenC	Não avaliado
Safadi et al., 2014	n=483	Trabalhadores de 2 refinarias de petróleo	Brasil	2010	18-39 anos	Transversal (vacinados refinaria A x não-vacinados refinaria B) 21,4% x 21,6% C: 6,3% x 4,9%	Genotípica	ctrA e sodC	104/483: 21,5% Das 104 amostras: 95, culturas e PCR <i>real-time</i> 1, cultura somente 8, PCR <i>real time</i> somente	Fenotípica/ Genotípica	Único relacionado a um surto de MenC NSG ² / NGG ³ = 46% MenC 26% > MenB 7,7%	Sim; sem relação entre portadores e não-portadores, exceto baixo nível educacional (nível secundário incompleto)
Gasparini et al., 2014	n=173	Estudantes de escolas técnicas secundárias	Itália	2011	14-22 anos	Longitudinal	Genotípica	ctrA e <i>crgA</i>	18,5% em, ao menos, 1 amostra; 62,5% dos 32 portadores foram positivos em > 1 amostra	Fenotípica/ Genotípica/ gene <i>cnI</i>	A maioria das cepas NSG ² tem operon <i>cps</i> MenB intacto; 23,5% <i>cnI</i> + e 29,4% MenB	Sim; sem significância estatística entre PS e fatores avaliados
Coch Gioia et al., 2015	n=200	Profissionais de saúde, incluindo estudantes universitários e funcionários	Brasil	2011	18-63 anos	Transversal	Genotípica	ctrA	18/200 (9%); 15/18 eram estudantes.	Fenotípica/ Genotípica	Gene <i>ctrA</i> + em 13/18 3 MenB, 1 MenE e 9NG ⁴ 5NG ⁴ : todos <i>ctrA</i> -	Sim; idade, gênero masculino, frequentar bares (1-3 vezes/mês) e número de indivíduos convivendo no mesmo domicílio associados ao estado de portador

Autor/ Ano	Amostra	População	País	Ano (coleta)	Faixa etária	Tipo de estudo	Método id. espécie	Primers	% PS ¹	Método id. soro/ genogrupos	Resultados soro/ genogrupos	Análise de fatores de risco
Moraes et al., 2015	n=1208	Estudantes de escolas públicas e privadas	Brasil	2012	11-19 anos	Transversal	Genotípica	ctrA e sodC	Geral (120/1208): 9,9% 11-13 anos (45/487): 9,2% 14-16 anos (40/450): 8,9% 17-19 anos (35/271): 12,9%	Fenotípica/ Genotípica	60,7% cepas NSG ² Men C (13,4%) > MenB (10,0%) > MenE (7,5%) > MenW (5,0%) > MenZ (2,5%) > MenZ (0,8%)	Sim; somente o nível de educação dos pais foi fator preditor do estado de portador sadio
Moreno et al., 2015	n=1459	Estudantes de escolas secundárias e universitários	Colômbia	2012	15-21 anos	Transversal	Genotípica	crgA	100/1459: 6,85% (pico 20-21 anos)	Fenotípica/ Genotípica	Dentre as 100 cepasL32 crn4+; 22 MenY (10 SG ³), 15 MenB (7 SG ³), 3 MenC (3 SG ³), 3 MenW (SG ³); 25 NGG ³	Sim; não houve diferença (gênero, beijo, tabagismo ativo e passivo, sexo oral, infecção de vias aéreas superiores)
Rodríguez et al., 2014	n=500	Estudantes universitários	Chile	2012	18-24 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	20/500: 4%	Fenotípica	NSG ² 65% MenB 15%; MenW 20%	Sim; sem relação entre portadores e não-portadores
Díaz et al., 2016	n=4217	Adolescentes e adultos jovens	Chile	2013	10-19 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	Geral: 272/4217 (6,5%) 14 anos: 5,2% 14 anos: 7,6%	Fenotípica/ Genotípica	MenB > MenC > MenY > MenW	Sim; idade, convívio com crianças em casa, número de fumantes em casa e frequentar eventos públicos
Nunes et al., 2016; Moura et al., 2017	n=1200	Estudantes de escolas municipais e estaduais	Brasil	2014	11-19 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	59/1200=4,9% (sem diferença por faixa etária) - houve campanha de vacinação em massa em Salvador, também direcionada a adolescentes e adultos jovens	Genotípica	NGG ³ 61% MenB (11,8%) > MenY (8,5%) > 6,7% MenE (6,7%) > MenZ (5,1%) > MenC (3,4%) = MenW (3,4%)	Sim; menor número de quartos para dormir, tabagismo passivo e frequentar bares e festas estavam associados a maior taxa de portador sadio entre estes adolescentes
Kim et al., 2017	n=1460	Estudantes secundaristas	Coreia do Sul	2015	15 anos (média de idade)	Transversal	Genotípica	crgA	49/1460=3,4%	Genotípica	NGG ³ (30,6%) > MenB (24,5%) > MenC (22,4%)	Sim; fumantes ativos e homens com maior prevalência
Alemayehu et al., 2017	n=240	Crianças e adolescentes	Etiópia	2017	NE ⁷	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	Geral: 49/240: 20,4% 7-10 anos (29/116): 25% 11-14 anos (19/97): 19,6% 14 anos (0/25)	Fenotípica	MenW (42,6%) > MenC (23,4%) > MenA (12,2%)	Sim; moradia com mais de 1 pessoa/ cômodo

Autor/ Ano	Amostra	População	País	Ano (coleta)	Faixa etária	Tipo de estudo	Método id. espécie	Primers	% PS ¹	Método id. soro/ genogrupos	Resultados soro/ genogrupos	Análise de fatores de risco
Ala'Aldeen et al., 2000	Ver %PS	Estudantes universitários, 1º ano	Reino Unido	1997-98	Alunos do 1º ano da Nottingham University	Longitudinal	Fenotípica	NA ⁶	10/1997 (300/2453): 12,2% 11/1997 (174/566): 31% 03/1998 (127/461): 28%	Fenotípica	Predomínio MenB (24,5%); 6% MenC; MenB e MenC totalizam 54,5% das cepas sorogrupáveis	Não avaliado
Claus et al., 2005	n=8000	Crianças e adultos jovens	Alemanha	1999-2000	3-26 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	Geral (830/8000): 10,4% 3-6 anos (16/938): 1,7% 6-11 anos (46/2299): 2,0% 10-17 anos (190/2511): 7,6% 15-21 anos (194/1073): 18,1% Militares 18-26 anos (384/1179): 32,6%	Fenotípica/ Genotípica	Predomínio de MenB (32%); predomínio <i>gene siaD₈</i> (41%)	Não avaliado
Pavlopoulou et al., 2004	n=554	Estudantes de escolas primárias e secundárias	Grécia	2000-01	2-19 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	22/554: 4% <12 anos (3/349): 0,86% >12 anos (19/205): 9,27%	Fenotípica	NSG ² 22,7% MenC 31,8% > não-portadores, MenB 22,7% > MenW 13,7% > MenA 4,5% = MenD 4,5%	Sim: sem relação entre portadores e não-portadores, exceto idade (>12 anos: > 8x taxa portadores)
Monterros et al., 2009	n=2310	Pré-escolares, estudantes universitários ; e adolescentes de centros de reabilitação	México	2004-05	<5 e 15-19 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	Geral (37/2310): 1,6% <5 anos (14/736): 1,9% Centros de reabilitação (23/774): 2,9% Universitários: 0	Fenotípica	MenY (29,7%) > MenC (24,3%)	Não avaliado
Harrison et al., 2014	n=3311	Estudantes de escolas secundárias	Estados Unidos	2006-07	Média de idade: 16 anos	Longitudinal	Fenotípica	NA ⁶	Em torno de 3% Dentre os 2799 estudantes que participaram das 3 pesquisas, 163 (5,8%) positivos em pelo menos 1 coleta; destes, 36 (22,1%) positivos nas 3 coletas 88% NSG ²	Fenotípica/ Genotípica	88% das cepas NSG ² Genogrupagem: dentre os NSG ² , 21% MenB (21%) > Men Y (14%) > MenC (2%) 56% NG ⁴ (feno e genotipicamente).	Sim: raça branca, tabagistas e idade mais avançada
Ala'Aldeen et al., 2011	Ver %PS	Estudantes universitários, 1º ano	Reino Unido	2009-10	Alunos do 1º ano da Nottingham University	Longitudinal	Genotípica	<i>crpA</i> e <i>ctrA</i> e/ou <i>porA</i>	09/2009 (191/823): 23,2% 12/2009 (310/557): 55,7% 03/2010 (224/379): 59,1%	Genotípica	Predomínio MenB; aumento de MenY	Não avaliado

Autor/ Ano	Amostra	População	País	Ano (coleta)	Faixa etária	Tipo de estudo	Método id. espécie	Primers	% PS ¹	Método id. soro/ genogrupos	Resultados soro/ genogrupos	Análise de fatores de risco
Weckx et al., 2017	n=967	Estudantes e usuários de Unidades Básicas de Saúde na região central e subúrbio da cidade de Embú das Artes	Brasil	2011-12	1-24 anos	Transversal	Genotípica	ctrA e sodC	Geral: 87/967 (9%) Pico na faixa etária de 15-19 anos (12,6%) e 10-14 anos (12,5%)	Fenotípica/ Genotípica	Genes ctrA e sodC em 58/87; sodC 29/87; dos 58: MenC 50%; MenB 34%; MenY 13%; MenX 3%; 26 NGG ³ .	Observada maior prevalência entre não-vacinados (8,5% x 4,8%) Vacina conjugada previne aquisição e caracterização do estado de portador Análise multivariada não observou maior risco para as variáveis (número de moradores, gênero, status vacinal, uso prévio de ATB)
Kadayifci et al., 2016	n=1000	População geral	Turquia	2012-13	0-79 anos (média de idade: 30 anos)	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	6/1000=0,6%	Genotípica	5/6 MenB	Não avaliado
Gonzales et al., 2017	n=937	Estudantes de escola primária, secundária e universitários	Filipinas	2013-14	5-24 anos	Transversal	Genotípica	NE ⁷	Geral: 35/937 (3,7%)	Genotípica	Predomínio de MenB	Sim; sem significância estatística entre PS e fatores avaliados
van Ravenhorst et al., 2017	n=1715	Estudantes de 13 instituições educacionais selecionados aleatoriamente	Holanda	2013-14	13-23 anos	Transversal; Longitudinal	Genotípica	ctrA ou porA	Cultura (1ª visita): 270/1715 (16%) Longitudinal: 22% < 25% < 29%	Fenotípica/ Genotípica	Fenotípico (268/270 amostras): MenB (14%) > MenY (7%) > MenE (6%); NSG ² (67%) Sequenciamento completo do genoma (267/270 amostras): MenB (27%) > MenX (14%) > MenY (13%); gene <i>cnf</i> (31%)	Sim; nível educacional, frequentar bares, beijo na última semana, ingestão de álcool e tabagismo ativo
Ataee et al., 2016	n=226	Voluntários iniciando o serviço militar	Irã	2014-15	19-28 anos	Transversal	Genotípica	ctrA	Geral: 18/226 (8%)	Genotípica	MenC (50%) > MenA (22,2%) > MenY (16,6%)	Não avaliado

Autor/ Ano	Amostra	População	País	Ano (coleta)	Faixa etária	Tipo de estudo	Método id. espécie	Primers	% PS ¹	Método id. soro/ genogrupos	Resultados soro/ genogrupos	Análise de fatores de risco
Tryfinopoulou et al., 2016	n=1420	Estudantes universitários e recrutas militares	Grécia	2014-15	18-26 anos	Transversal	Fenotípica	NA ⁶	Geral: (180/1420)=12,7% 15% recrutas e 10,4% estudantes	Genotípica	MenB (39,4%) > MenY (12,8%) > MenW (4,4%) > MenC (1,1%) 76 NGG ³ , submetidas a sequenciamento completo do genoma: 29,4% continham gene <i>cnf+</i>	Sim; tabagismo, idade de 18 a 21 anos e moradia com maior número de pessoas associado a estado de portador

Legendas:

- PS¹ Portador sadio
- NSG² Não sorogrupáveis
- NGG³ Não genogrupáveis
- NG⁴ Não grupável
- SG⁵ Sorogrupáveis
- NA⁶ Não se aplica
- NE⁷ Não especificado

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abio a, Neal KR, Beck CR. An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years. *Pathog Glob Health* 2013; 107(7): 373-380.

Ala'Aldeen DAA, Oldfield NJ, Bidmos AF, Abouseada NM, Ahmed NW, Turner DPJ, Neal KR, Bayliss CD. Carriage of meningococci by university students, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(9):1762-1763.

Ala'aldeen DAA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-Van-Tam JS, English A, Falla TJ, Hawkey PM, Slack RCB. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6):2311-16.

Alamro M, Bidmos FA, Chan H, Oldfield NJ, Newton E, Bai X, Aidley J, Care R, Mattick C, Turner DP, Neal KR, Ala'aldeen DA, Feavers I, Borrow R, Bayliss CD. Phase variation mediates reductions in expression of surface proteins during persistent meningococcal carriage. *Infect Immun* 2014; 82(6):2472-84.

Alemayehu T, Mekasha A, Abebe T. Nasal carriage rate and antibiotic susceptibility pattern of *Neisseria meningitidis* in healthy Ethiopian children and adolescents: A cross-sectional study. *PLoS One* 2017; 12(10): e0187207.

Apicella MA. *Neisseria meningitidis*. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010, 2737-52.

Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Hosseini SMJ, Kaviani F. Carriage rates of *Neisseria meningitidis* serogroups: determination among freshmen conscripts before vaccination. *Iran J Microbiol* 2016; 8(3):203-209.

Baethgen LF¹, 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* 2003; 52(9):793-9.

Barros AJ, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol* 2003; 3: 21.

Batista RS, Gomes AP, Dutra Gazineo JL, Balbino Miguel PS, Santana LA, Oliveira L, Geller M. Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review. *Asian Pac J Trop Med* 2017;10 (11): 1019-29.

Bijlsma MW, Brouwer MC, Spanjaard L, van de Beek D, van der Ende A. A decade of herd protection after introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccination. *Clin Infect Dis* 2014; 59(9): 1216-21.

Borrow R, Alarcón P, Carlos J, Caugant DA, Christensen H, Debbag R, De Wals P, Echániz-Aviles G, Findlow J, Head C, Holt D, Kamiya H, Saha SK, Sidorenko S, Taha MK, Trotter C, Vázquez Moreno JA, von Gottberg A, Sáfadi MA; Global Meningococcal Initiative. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. *Expert Rev Vaccines* 2017; 16 (4): 313-328.

Brasil. Ministério da Saúde, 2018 [internet]. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/Novo-calendario-vacinal-de-2017.pdf> (consulta em 31/01/2018).

Brasil. Ministério da Saúde, 2018 [internet]. Informações em Saúde (TABNET): Epidemiológicas e morbidade - Doenças e agravos de notificação. www.datasus.gov.br (consulta em 02/02/2018).

Caugant DA, Fogg C, Bajunirwe F, Piola P, Twesigye R, Mutebi F, Oddvar Frøholm L, Rosenqvist E, Batwala V, AAberge IS, Rottingen J, Guerin PJ. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in 2-19-year-old individuals in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100:1159-63.

Caugant DA, Hølby EA, Magnus P et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a ramdonly sampled population. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2): 323-330.

Caugant DA, Maiden MCJ. Meningococcal carriage and disease - Population biology and evolution. *Vaccine* 2009; 27(4):B64-70.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013 [internet]. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Neisseria meningitidis*, 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/mening13.pdf>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2015 [internet]. National Notifiable Diseases Surveillance System. Available from: <http://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/meningococcal-disease/case-definition/2015/>

Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:853-61.

Cibrelus L, Medah I, Koussoubé D, Yélbeogo D, Fernandez K, Lingani C, Djingarey M, Hugonnet S. Serogroup W meningitis outbreak at the subdistrict level, Burkina Faso, 2012. *Emerg Infect Dis* 2015; 21(11): 2063-66.

Claus H, Maiden MC, Maag R, Frosh M, Vogel U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 2002;148:1813-19.

Claus H, Maiden MCJ, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, Hessler F, Frosch M, Vogel U. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* 2005; 191:1263-71.

Comanducci M, Bambini S, Caugant DA, Mora M, Brunelli B, Capecchi B, Ciocchi L, Rappuoli R, Pizza M. NadA Diversity and Carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2004; 72 (7): 4217-4223.

Coutinho LMS, Scazufca M, Menezes PR. Métodos para estimar razão de prevalência em estudos de corte transversal. *Rev Saúde Pública* 2008; 42 (6): 992-8.

Cunningham R, Matthews R, Lewendon G, Harrison S, Stuart JM. Improved rate of isolation of *Neisseria meningitidis* by direct plating of pharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12):4575-4576.

Dakipoulou Z, Kesanopoulos K, Sioumala M, Tambaki A, Kremastinou J. Simultaneous single-tube PCR-based assay for the direct identification of the most common meningococcal serogroups from clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 178-182.

de Souza A, Seguro A. Two centuries of meningococcal infection: from Vieusseux to the cellular and molecular basis of disease. *J Med Microbiol* 2008; 57(11):1313-1321.

Díaz J, Cárcamo M, Seoane M, Pidal P, Cavada G, Puentes R, Terrazas S, Araya P, Ibarz-Pavon AB, Manríquez M, Hormazábal JC, Ayala S, Valenzuela MT.

Prevalence of meningococcal carriage in children and adolescents aged 10-19 years in Chile in 2013. *J Infect Public Health* 2016; 9:506-515.

Diggle MA, Clarke SC. Detection and genotyping of meningococci using a nested PCR approach. *J Med Microbiol* 2003; 52: 51-57.

Espinosa de los Monteros LE, Aguilar-Ituarte F, Jiménez-Rojas LV, Kuri P, Rodríguez-Suárez RS, Gómez-Barreto D. Prevalence of *Neisseria meningitidis* carriers in children under five years of age and teenagers in certain populations of Mexico City. *Salud Publica Mex* 2009;51:114-118.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2013 [internet]. Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe, 2011. Stockholm: ECDC; 2013. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/invasive-bacterial-diseases-surveillance-2011.pdf>

Gasparini R, Comanducci M, Amicizia D, Ansaldi F, Canepa P, Orsi A, Icardi G, Rizzitelli E et al. Molecular and serological diversity of *Neisseria meningitidis* carrier strains isolated from Italian students aged 14 to 22 years. *J Clin Microbiol* 2014; 52(6):1901-1910.

Glitza IC, Ehrhard I, Müller-Pebody B, Reintjes R, Breuer T, Ammon A, Sonntag HG. Longitudinal study of meningococcal carrier rates in teenagers. *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211:263-72.

Gonzales MLA, Bianco V, Vyse A. Meningococcal carriage in children and young adults in the Philippines: a single group, cross-sectional study. *Epidemiol Infect* 2017;145:126-132.

Harrison LH, Granoff DM, Pollard AJ. Meningococcal capsular group A, C, W and Y conjugate vaccines. In: *Plotkin's Vaccines*. Philadelphia: Elsevier, 2018. 619-43.

Harrison LH, Shutt KA, Arnold KE, Stern EJ, Ponto T et al. Meningococcal carriage among Georgia and Maryland High School Students. *J Infect Dis* 2015; 211(11):1761-8.

Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* 2009; 27S: B51-63.

Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, Corton C, Care R, Poolman JT, Zollinger WD, Frasch CE, Stephens DS, Feavers I, Frosch M, Parkhill J, Vogel U, Quail MA, Bentley SD, Maiden MC. Description and Nomenclature of *Neisseria meningitidis* Capsule Locus. *Emerg Infect Dis* 2013;19(4):566-73.

Higa FT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Lemos APS, Harrison LH, Oliveira PL, Silva CN, Sacchi CT. Use of sodC versus ctrA for real-time polymerase chain reaction-based detection of *Neisseria meningitidis* in sterile body fluids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108(2): 246-47.

Horton RE, Vidarsson G, Virji M, Williams NA, Heyderman RS. IgA1 antibodies specific for outer membrane protein PorA modulate the interaction between *Neisseria meningitidis* and the epithelium. *Microb Pathog* 2009; 46: 253-60.

Horton RE¹, Stuart J, Christensen H, Borrow R, Guthrie T, Davenport V, Finn A, Williams NA, Heyderman RS; ALSPAC Study Team. Influence of age and carriage status on salivary IgA to *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 2005;133(5): 883-9.

Ieva R, Alaimo C, Dlany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. CrgA is an inducible LysR-type regulator of *Neisseria meningitidis* acting both as a repressor and as an activator of gene transcription. *J Bacteriol* 2005; 187(10): 3421-30.

Jafri RZ, Ali A, Messonnier NE, Tevi-Benissan C, Durrheim D, Eskola J, Fermon F, Klugman KP, Ramsay M, Sow S, Zhujun S, Bhutta ZA, Abramson J. Global epidemiology of invasive meningococcal disease. *Popul Health Metr* 2013; 11:17-25.

Jones CH, Mohamed N, Rojas E, Andrew L, Hoyos J, Hawkins JC, McNeil LK, Jiang Q, Mayer LW, Wang X, Gilca R, De Wals P, Pedneault L, Eiden J, Jansen KU, Anderson AS. Comparison of phenotypic and genotypic approaches to capsule typing of *Neisseria meningitidis* by use of invasive and carriage isolate collections. *J Clin Microbiol* 2016; 54:25-34.

Jordens JZ, Williams JN, Jones GR et al. Detection of meningococcal carriage by culture and PCR of throat swabs and mouth gargles. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1):75-79.

Kadayifci EK, Merdan DG, Soysal A, Karaaslan A, Atıcı S et al. Prevalence of *Neisseria meningitidis* carriage: a small-scale survey in Istanbul, Turkey. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10(4):413-417.

Kesanopoulos K, Tzanakaki G, Levidiotou S, Blackwell C, Kremastinou J. Evaluation of touch-down real-time PCR based on SYBR green I fluorescent dye for the detection of *Neisseria meningitidis* in clinical samples. *FEMS Immunol and Med Microbiol* 2005; 43: 419-24.

Kim HW, Lee S, Kwon D, Cha J, Ahn JG et al. Characterization of Oropharyngeal Carriage Isolates of *Neisseria meningitidis* in Healthy Korean Adolescents in 2015. *Korean Med Sci* 2017; 32: 1111-1117.

Klughammer J, Dittrich M, Blom J, Mitesser V, Vogel U, Frosch M, Goesmann A, Müller T, Schoen C. Comparative Genome Sequencing Reveals Within-Host

Genetic Changes in *Neisseria meningitidis* during Invasive Disease. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169892.

Lingani C, Bergeron-Caron C, Stuart JM, Fernandez K, Djingarey MH, Ronveaux O, Schnitzler JC, Perea WA. Meningococcal meningitis surveillance in the African meningitis belt, 2004-2013. *Clin Infect Dis* 2015; 61(Suppl 5):S410-5.

MacNeil JR, Bennett N, Farley MM, Harrison LH, Lynfield R, Nichols M, Petit S, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Pondo T, Mayer LW, Clark TA, Cohn AC. Epidemiology of infant meningococcal disease in the United States, 2006-2012. *Pediatrics* 2014; 135(2):e305-11.

Maiden MC, Ibarz-Pavón AB, Urwin R, Gray SJ, Andrews NJ, Clarke SC, Walker AM, Evans MR, Kroll JS, Neal KR, Ala'aldeen DA, Crook DW, Cann K, Harrison S, Cunningham R, Baxter D, Kaczmarek E, MacLennan J, Cameron JC, Stuart JM. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J Infect Dis* 2008;197 (5): 737-43.

Maiden MC. The Impact o Molecular Techniques on the Study of Meningococcal Disease. *Methods Mol Med* 1998;15:265-91.

Maiden MCJ & Pollard AJ. In: Meningococcal disease: methods and protocols. *Humana Press Inc* 2001: 23-30.

Marques MV. Replicação do DNA e divisão celular. In: *Biologia molecular e genética bacteriana*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012.

Monteros LEE, Aguilar-Ituarte F, Jiménez-Rojas LV, Kuri P, Rodríguez-Suárez RS et al. Prevalence of *Neisseria meningitidis* carriers in children under five years of age and teenagers in certain populations of Mexico City. *Salud Publica Mex* 2009;51:114-118.

Moraes JC, Kemp B, Lemos APS, Gorla MCO, Marques EGL. Prevalence, risk factors and molecular characteristics of meningococcal carriage among brazilian adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 2015;34:1197-1202.

Moreno J, Hidalgo M, Duarte C, Sanabria O, Gabastou JM, Ibarz-Pavon AB. Characterization of carriage isolates of *Neisseria meningitidis* in the adolescents and young adults population of Bogota (Colombia). *PLoS One* 2015; 10(8): e0135497.

Moura ARSS, Kretz CB, Ferreira IE, Nunes AMPB, de Moraes JC, Reis MG, et al. Molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates recovered from 11-19-year- old meningococcal carriers in Salvador, Brazil. *PLoS One* 2017; 12(9): e0185038.

Nunes AMPB, Ribeiro GS, Ferreira' IE, Moura ARSS, Felzemburgh RDM, de Lemos APS, et al. Meningococcal Carriage among Adolescents after Mass Meningococcal C Conjugate Vaccination Campaigns in Salvador, Brazil. *PLoS One* 2016; 11(11): e0166475.

Pavlopoulou ID, Daikos GL, Alexandrou H, Petridou E, Pangalis A, Theodoridou M, Syriopoulou VP. Carriage of *Neisseria meningitidis* by greek children: risk factors and strain characteristics. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:137-142.

Pizza M, Rappuoli R. *Neisseria meningitidis*: pathogenesis and immunity. *Curr Opin Microbiol* 2015; 23(2): 68-72.

Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2001; 19: 1327-46.

Read RC. *Neisseria meningitidis*; clones, carriage, and disease. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(5): 391-5.

Rizek CF, Luiz AM, Assis GR, Costa SF, Levin AS, Lopes MH. Comparison of methods to identify *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016; 22: 58-60.

Roberts J, Greenwood B, Stuart J. Sampling methods to detect carriage of *Neisseria meningitidis*; literature review. *J Infect* 2009; 58:103-107.

Robinson K, Neal KR, Howard C, Stockton J, Atkinson K, Scarth E, Moran J, Robins A, Todd I, Kaczmarek E, Gray S, Muscat I, Slack R, Ala'Aldeen DA. Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by meningococcal carriage. *Infect Immun* 2002; 70(3):1301-9.

Rodriguez P, Alvarez I, Torres MT, Diaz J, Bertoglia MP, Carcamo M, Seoane M, Araya P, Russo M, Santolaya ME. Meningococcal carriage prevalence in university students, 18-24 years of age in Santiago, Chile. *Vaccine* 2014; 32:5677-5680.

Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, Ribeiro AF, Kemp B, Gorla MC, Albernaz RK, Marques EG, Cruciano A, Waldman EA, Brandileone MC, Harrison LH; São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 2011;6(6):e20675.

Sáfadi MA, Berezin EN, Arlant LH. Meningococcal disease: epidemiology and early effects of immunization programs. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2014a;3(2): 91-93

Sáfadi MAP, Carvalhanas TRMP, Lemos AP, Gorla MCO, Salgado M et al. Carriage rates and effects of vaccination after outbreaks of serogroup C meningococcal disease, Brazil, 2010. *Emerg Infect Dis* 2014b; 20(5): 806-811.

Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007; 369: 2196-210.

Stephens DS. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009; 27 (Suppl. 2): B71-7.

Taha MK, Alonso JM, Cafferkey M, Caugant DA, Clarke SC, Diggle MA, Fox A, Frosch M, Gray SJ, Guiver M, Heuberger S, Kalmusova J, Kesanopoulos K, Klem AM, Kriz P, Marsh J, Mölling P, Murphy K, Olcén P, Sanou O, Tzanakaki G, Vogel U. Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 144-9.

Taha MK, Fox A. Quality assessed nonculture techniques for detection and typing of meningococci. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:37-42.

Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 855-7.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.

Thayer JD, Frank PF, Martin JE Jr. Thayer-Martin selective medium for the cultivation of *Neisseria meningitidis* from the nasopharynx. *Am J Public Health Nation Health* 1965; 55:923-927.

Trotter CL, Gay NJ, Edmunds WJ. The natural history of meningococcal carriage and disease. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 556-566.

Trotter CL, Greenwood BM. Meningococcal carriage in the African meningitis belt. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:797-803.

Trotter CL, Lingani C, Fernandez K, Cooper LV, Bitá A, Tevi-Benissan C, Ronveaux O, Préziosi M, Stuart JM. Impact of MenAfriVac in nine countries of the African meningitis belt, 2010-15: an analysis of surveillance data. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 867-72.

Tryfinopoulou K, Kesanopoulos K, Xirogianni A, Marmaras N, Papandreou A, Papaevangelou V, et al. Meningococcal Carriage in Military Recruits and University Students during the Pre MenB Vaccination Era in Greece (2014-2015). *PLoS One* 2016; 11(12): e0167404.

Tzeng Y, Thomas J, Stephens DS. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42(5): 759-72.

van Ravenhorst MB, Bijlsma MW, van Houten MA, Struben VMD, Anderson AS, Eiden J, Hao L, Jansen KU, Jones H, Kitchin N, Pedneault L, Sanders EAM, van der Ende A. Meningococcal carriage in Dutch adolescents and young adults; a cross-sectional and longitudinal cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23: 573.e1-e7.

Virji M. Pathogenic *neisseriae*: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nature* 2009; 7: 274-86.

Wang Q, Shao Z, Wang X, Gao Y, Li M, Xu L, Xu J, Wang L. Genetic study of capsular switching between *Neisseria meningitidis* sequence type 7 serogroup A and C strains. *Infect Immun* 2010; 78(9):3883-8.

Weckx LY, Puccini RF, Machado A, Gonçalves MG, Tuboi S, Barros E et al. A cross-sectional study assessing the pharyngeal carriage of *Neisseria*

meningitidis in subjects aged 1–24 years in the city of Embu das Artes, São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2017; 21 (6):587–595.

Whittaker R, Dias JG, Ramliden M, Ködmön C, Economopoulou A, Beer N, Pastore Celentano L; ECDC network members for invasive meningococcal disease. The epidemiology of invasive meningococcal disease in EU/EEA countries, 2004–2014. *Vaccine* 2017; 35 (16): 2034–41.

World Health Organization (WHO). Meningococcal Vaccines: WHO position paper, November 2011. *Weekly Epidemiological Record* 2011:521–540.

World Health Organization (WHO). Continuing risk of meningitis due to *Neisseria meningitidis* serogroup C in Africa: revised recommendations from a WHO expert consultation. *Wkly Epidemiol Rec* 2017; 92: 609–24.

World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual. Geneva: World Health Organization, 2011. 323p.

Xie O, Pollard EJ, Mueller JE, Norheim G. Emergence of serogroup X meningococcal disease in Africa: need for a vaccine. *Vaccine* 2013; 31: 2852–61.

Yazdankhah S, Kriz P, Tzanakaki G, Kremastinou Kalmusova J, Musilek M, Alvestad T, Jolley K, Caugant DA & Maiden MC. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece and Norway. *J Clin Microbiol* 2004a; 42: 5146–5153.

Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 2004; 53:821–32.