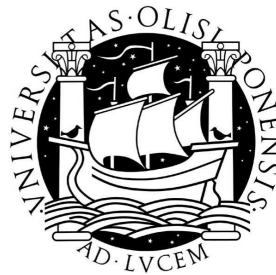


Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia
Departamento de Microbiologia e Imunologia



**Sistema Dinâmico da Doença
Meningocócica em Portugal: caracterização
e modelo de transmissão**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor no ramo de conhecimento de
Farmácia, na especialidade de Microbiologia

Maria João Mendes Simões Pedro

Tese orientada por:

Professor Doutor José Moniz Pereira

Professor Doutor João Pedro Bettencourt de Mello Mendes

Professora Doutora Laura Maria Lourenço Brum da Cruz Martins

2012

À memória do Professor Doutor Henrique
Ribeiro, distinto Médico e Entomologista,
Homem de invulgar carácter que me marcou
infinitamente

A meus filhos João e Joana

A meu marido

Agradecimentos

Este trabalho não teria tido início sem o entusiasmo da Professora Doutora Laura Brum que, conhecendo a minha vontade de me dedicar a uma área científica específica, me incentivou a estudar com profundidade a doença meningocócica e acreditou nas minhas capacidades. Agradeço a sua amizade e todos os seus contributos para esta tese.

Quando tomou forma no meu espírito a hipótese que viria a ser o tema desta tese, e procurei encontrar quem me guiasse pelos caminhos da metodologia, estava longe de saber que o Professor Doutor Pedro Mendes viria a ser o mais imprescindível dos mestres que já tive. Agradeço-lhe profundamente todos os ensinamentos e muito mais do que isso, agradeço os desafios que me lançou, a sua enorme disponibilidade e paciência.

Agradeço ao Professor Doutor Moniz Pereira o interesse que encontrou neste projecto e os comentários que foi fazendo, o que muito contribuiu para melhorar a qualidade deste trabalho.

A todos os elementos que foram sendo parte da equipa do Laboratório Nacional de Referência de *Neisseria meningitidis*, o Filipe Almeida, a Marisa Cunha, a Adelaide Marques, a Paula Cristovão, a Célia Bettencourt, e a todos os que não sendo da equipa deram seu melhor contributo sempre que necessário, o João Rodrigues, a minha querida Lúcia Reis, a Konstantina Sarioglou, a Andrea Santos, a Paula Lavado e a Inês João, agradeço o rigor do vosso trabalho e a vossa amizade.

Às minhas deliciosas “terroristas” Ana Pelerito e Rita Cordeiro, Biotecnólogas e especialistas em Bioterrorismo e à Mónica Oleastro, agradeço a amizade e todos os ensinamentos de Genética que me transmitiram e que, estou certa, continuarão a transmitir-me.

À Raquel Guiomar, responsável pelo Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe, agradeço os dados que gentilmente me disponibilizou e que muito contribuíram para enriquecer a discussão desta tese.

A todos os colegas e amigos agradeço apoio científico e pessoal que me dedicaram.

Um agradecimento muito especial à Pequi, amiga de muito longa data que teve a paciência de me ouvir e contribuir com o seu matemático saber para melhorar o meu trabalho.

Aos meus filhos e ao meu marido, agradeço terem-me permitido alhear-me algumas vezes das suas vidas. Contudo, felicito-me por ter estado presente em factos marcantes na vida da família que aconteceram no período em que mergulhei na minha tese. Sem o vosso carinho e sem a vossa compreensão teria sido muito mais duro, senão impossível, completar esta tarefa.

A componente experimental desta tese foi realizada no âmbito do projecto POCI/SAU-ESP/60747/2004 “Caracterização molecular de estirpes de *Neisseria meningitidis* isoladas na população portuguesa”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Preâmbulo

O trabalho que agora termino, decorre da minha paixão antiga pela Microbiologia e da sensibilidade que fui adquirindo para as questões da Saúde Pública desde que entrei no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em Dezembro de 2001.

As meningites bacterianas logo constituíram um tema de estudo e, em Junho de 2002, eu integrava uma equipa que viria a fazer trabalho de reconhecido mérito em Luanda, fundamental para que, alguns anos depois, a vacina para *Haemophilus influenzae* fosse administrada por rotina às crianças de Angola.

Entretanto, no final de 2002, foi introduzido em Portugal o Sistema de Vigilância Integrada da Doença Meningocócica e a rede de laboratórios que foi estabelecida no âmbito desta vigilância foi sendo reforçada com cada vez maior número de participantes. Este foi o ponto de partida para o meu envolvimento no estudo aprofundado da doença meningocócica e da sua epidemiologia, que é complexa e sofre a influência de múltiplas variáveis que interagem entre si num sistema dinâmico.

Este é o contributo de uma microbiologista para o estudo da epidemiologia da doença meningocócica. O modelo de transmissão de meningococos desenvolvido com base na metodologia de Dinâmica de Sistemas permite observar o comportamento dinâmico da doença meningocócica. Dos outputs do modelo podem resultar recomendações dirigidas à população em geral ou dirigidas a técnicos com responsabilidades em políticas de saúde.

Maria João Simões

Fevereiro de 2012

Resumo

Neisseria meningitidis é um comensal frequente na nasofaringe humana que ocasionalmente causa doença meningocócica invasiva (DM). A DM constitui um problema de Saúde Pública devido à incidência alta em crianças, com elevadas taxas de letalidade e sequelas.

A vacinação constitui uma medida de controlo. Receia-se que a introdução da vacina conjugada que apenas protege para meningococos C (MenC) origine a substituição dos serogrupos de meningococos, cenário já conhecido após vacinação de crianças com vacina conjugada para pneumococos, que é igualmente comensal da nasofaringe humana com elevada variabilidade genética.

É questão desta tese saber se, depois da introdução da vacina MenC em Portugal, o nicho deixado por estirpes C virá a ser ocupado por outros serogrupos, aumentando a incidência da DM causada por serogrupos não incluídos na vacina.

Respondeu-se e esta questão com a descrição da epidemiologia da DM, caracterização da doença em Portugal e desenvolvimento de um modelo, baseado na metodologia de Dinâmica de Sistemas, que traduz o comportamento dinâmico da DM. O modelo permite conhecer a importância relativa das variáveis que afectam a epidemiologia e simular cenários de evolução da doença.

As características epidemiológicas (incidência e serogrupos/grupo etário, genótipos, proporção de complexos clonais hiper virulentos em estirpes invasivas, efeito da vacina MenC) revelaram-se semelhantes em Portugal e noutros países europeus.

O total anual de doentes devolvido pelo modelo é sobreponível ao número de doentes na base de dados nacional. A idade, número de fumadores e capacidade de infecção/invasão das estirpes são as variáveis que mais afectam o modelo.

Meningococos de serogrupos não C não ocuparam o nicho deixado pelas estirpes C depois da introdução da vacina. Contudo, a recombinação genética, base da clonalidade da população bacteriana associada a doença invasiva, ocorre continuamente, pelo que é espectável a emergência de estirpes não C, endémicas se bem adaptadas, ou epidémicas se com elevada capacidade de infecção/invasão.

Palavras Chave – Doença meningocócica, serogrupos C e não C, sistema dinâmico, simulação de cenários, vacina para meningococos C.

Abstract

Neisseria meningitidis is a common commensal in the human nasopharynx that occasionally causes invasive meningococcal disease (MD). The MD is a public health problem due to the high incidence in children, with high rates of mortality and sequelae.

Vaccination is an effective control measure. After the introduction of a conjugate vaccine that only protects for serogroup C meningococci (MenC), the replacement of meningococcal serogroups can be feared. Such scenario is already known after vaccination of children with pneumococcal conjugate vaccine, which is also a human commensal of the nasopharynx with high genetic variability.

The question of this thesis is whether, after the introduction of the MenC vaccine in Portugal, the niche left by C strains will be occupied by other serogroups, increasing the incidence of MD caused by serogroups not included in the vaccine.

To find an answer to this question, it was described the epidemiology of MD, characterized the disease in Portugal and developed a model based on the methodology of System Dynamics, which reflects the dynamic behavior of MD. The model shows the relative importance of variables affecting the epidemiology of MD and allows the simulation of scenarios for evolution of the disease.

The epidemiological characteristics – incidence and serogroups / age group, genotypes, the proportion of hyper-virulent clonal complex in invasive strains, the effect of MenC vaccine – showed similarities in Portugal and in other European countries.

The total number of patients by year returned by the model is overlapped with the number of patients in the national database. Age, number of smoking people and the ability of infection / invasion of the strains are the variables that most affect the model.

Meningococci of non C serogroups did not occupy the niche left by C strains after the introduction of the vaccine. However, being the genetic recombination the base of the clonality of bacterial population associated with invasive disease, which occurs continuously, the emergence of non C strains can be expected, endemic if they are well adapted or epidemic if they have high capacity for infection / invasion.

Key words – Meningococcal disease, serogroup C and nonC, system dynamics, scenarios simulation, meningococcal C vaccine.

Índice

Agradecimentos	i
Preâmbulo	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Siglas e acrónimos	xv
Índice de figuras	xviii
Índice de Tabelas	xxv
Capítulo I-Introdução	1
1. História da doença meningocócica	3
2. Descrição do problema	8
3. Questão para investigação	12
3.1. Metodologia	13
Capítulo II- A doença meningocócica como um sistema dinâmico	17
1. Patogénese da doença meningocócica	19
1.1 Base genética da virulência de meningococos	23
1.2 Factores de virulência bacterianos	24
1.2.1 Pili do tipo IV	24
1.2.2 Proteínas de membrana externa	26
1.2.3 Cápsula polissacarídica	27
1.2.4 Lipooligossacáridos e endotoxina	28

1.3	Susceptibilidade do hospedeiro	29
1.3.1	Interacção da bactéria com as células do hospedeiro	29
1.3.2	Barreira física	30
1.3.3	Imunidade inata	30
1.3.4	Resposta inflamatória e produção de citocinas	31
1.3.5	Imunidade humoral	32
1.4	Sequelas e letalidade	34
2.	Profilaxia e tratamento da doença meningocócica	37
2.1	Vacinas	37
2.1.1	Vacinas para meningococos do serogrupo C	37
2.1.2	Vacina para meningococos do serogrupo B	38
2.1.3	Novas vacinas em desenvolvimento	40
2.2	Tratamento	40
2.3	Quimioprofilaxia	42
	Capítulo III- Variabilidade genética de <i>Neisseria meningitidis</i>	45
1	Biologia da população de <i>Neisseria meningitidis</i>	47
1.1.	Caracterização de estirpes	48
1.1.1.	Caracterização do grupo	49
1.1.2.	Caracterização de proteínas de membrana externa	49
1.1.3.	Caracterização do tipo electrofóretico e do tipo de sequência	51
1.1.4.	Genótipos e nomenclatura	54
1.2.	O fenómeno com alteração capsular	56
2	Dispersão geográfica de estirpes hiper virulentas	57

2.1	Subgrupos genómicos do serogrupo A	59
2.2	O complexo ST-32/complexo ET-5	60
2.3	O complexo clonal ST-11/complexo ET-37	61
2.4	O complexo clonal ST-8/cluster A4	62
2.5	O complexo clonal ST-41-44/Linhagem III	62
2.6	O complexo clonal ST-269	63
2.7	O serogrupo Y	63
2.8	O serogrupo X	63
	Capítulo IV - A doença meningocócica em Portugal	65
1	Introdução	67
2	Material e metodologia laboratorial	69
2.1	Estudo de incidências, da apresentação e evolução clínica da doença meningocócica	69
2.2	Técnicas laboratoriais	70
2.2.1	Caracterização do serogrupo	71
2.2.2	Caracterização do tipo	72
2.2.3	Caracterização do subtipo	72
2.2.4	Caracterização genotípica por MLST	73
2.2.5	Fenómeno de alteração capsular	74
2.2.6	Estudo de susceptibilidade aos antibióticos	76
3	Resultados	78
3.1	Incidência por grupo etário	80
3.2	Incidência por serogrupos	81
3.3	Caracterização genotípica	83

3.3.1	Identificação do sequence type (ST) e de complexos clonais hiper virulentos	83
3.3.2	Caracterização do tipo, subtipo e identificação do genótipo	87
3.4	Estudo de susceptibilidade aos antibióticos	89
3.5	O fenómeno de alteração capsular	90
4	Discussão	93
4.1	Incidências	94
4.2	Genótipo e estirpes hiper virulentas	98
4.3	Alterações capsulares	105
4.4	Resistência aos antibióticos	106
5	Conclusões	108
Capítulo V - Modelação da doença meningocócica como um sistema dinâmico		109
1.	Introdução	111
2.	Representação do processo numa linguagem de níveis e fluxos	113
2.1.	Conceitos e variáveis chave	113
2.2.	Definição e quantificação das variáveis	114
2.2.1	População por grupo etário (INE)	114
2.2.2	Taxa de mortalidade por grupo etário	116
2.2.3	População (em cada grupo etário)	116
2.2.4	Hábitos tabágicos, taxa de fumadores e efeito de fumo por grupo etário	118
2.2.5	Portadores não C em cada grupo etário	124
2.2.6	Total de portadores não C	127
2.2.7	Novos contactos e novos genótipos	132
2.2.8	Taxa de estirpes invasivas hiper virulentas em cada grupo etário	133

2.2.9	Taxa de imunização de portadores e taxa de imunização de doentes	134
2.2.10	Imunizados não C em cada grupo etário	135
2.2.11	Taxa de letalidade	136
3.	Modelação da doença meningocócica por estirpes não C	137
3.1	Doentes não C em cada grupo etário	138
4.	Testes de validação do modelo	145
4.1	Grau de concordância entre os valores do modelo e os dados históricos	145
4.2	Análise de sensibilidade do modelo	148
4.3	Testes em condições extremas	152
5.	Simulação de cenários	154
6.	Discussão	159
	Capítulo VI - Conclusões	167
1.	Conclusões	169
2.	Estudos futuros	172
	Referências bibliográficas	175
	Anexos	195

Siglas e acrónimos

cc – complexo clonal

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (previamente NCCLS)

DM – Doença meningocócica

ECDC – European Center for Disease Prevention and Control

EMGM – European Monitoring Group of Meningococci, actualmente European Meningococcal Disease Society

ET- Electrophoretic type

EU-IBIS - European Invasive Bacterial Infections Surveillance

Fab – Fragmento de ligação ao antigénio

FC – Zona constante

FRET (sondas) - Fluorescence resonance energy transfer

Hib – Haemophilus influenza tipo b

Hie - Haemophilus influenza tipo e

Hif - Haemophilus influenza tipo f

IL-6 – Interleucina 6

INE – Instituto Nacional de Estatística

INS – Inquérito Nacional de Saúde

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LNR – Laboratório Nacional de Refrência

LOS – Lipo-ologossacáridos

MenB – Meningococos do serogrupo B

MenC – Meningococos do serogrupo C

MLST – *Multilocus Sequencing Typing*

NST – Não sub tipável

NT – Não tipável

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBP – *Penicilin Binding Proteins*

PNV – Plano Nacional de Vacinação

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SG – Síndrome gripal

ST – *Sequence type*

Tessy – The European Surveillance System

TNF- α – *tumor necrosis factor-alpha*

UFC – Unidade Formadora de Colónia

VPC-7 - Vacina pneumocócica conjugada heptavalente

VR – Região variável

Índice de figuras

Figura 1 - Cronologia da investigação em doença meningocócica.....	4
Figura 2 – DCC representativo das interrelações entre portadores assintomáticos, contagiados e doentes, ignorando quaisquer outras variáveis que afectam a dinâmica da DM. Nos ciclos de reforço que se estabelecem, o número de contagiados será tanto maior quanto maior for o número de portadores assintomáticos e o número de doentes será tanto maior quanto maior for o número de portadores assintomáticos e de contagiados.	14
Figura 3 – Esquema de transmissão de meningococos. A dinâmica de colonização/invasão é diferente nas crianças e na restante população	19
Figura 4 - Estrutura das meninges: três finas membranas sobrepostas que revestem e protegem o Sistema Nervoso Central. Fonte: http://www.icb.ufmg.br/ (Data de acesso: Agosto 2009).....	21
Figura 5 – DCC representativo de algumas das variáveis que contribuem para o sistema dinâmico de DM (a actividade social, os hábitos tabágicos ou exposição passiva ao fumo de tabaco e infecção respiratória), número de portadores assintomáticos, de contagiados e de doentes.	22
Figura 6 – DCC que adiciona à representação gráfica das inte-relações das variáveis já referidas anteriormente o efeito positivo das doenças debilitantes e negativo da idade da população	23
Figura 7 – Observação, em microscopia electrónica, de células epiteliais infectadas com <i>Neisseria meningitidis</i> . (A) Numerosas bactérias estão em contacto com a célula à esquerda. (B) A amplificação da imagem revela microvilosidades da célula epitelial a envolver a célula bacteriana. Fonte: Deghmane <i>et al.</i> , 2000.....	25
Figura 8 - Representação esquemática de oligossacáridos de <i>N. meningitidis</i>	28
Figura 9 – <i>Neisseria meningitidis</i> em sobrenadante de cultura. (1) As setas mais densas apontam as invaginações da parede celular que constituem as vesículas de endotoxina. As setas mais finas apontam as vesículas de endotoxina libertada no meio (X 95 000). (2,3 e 4) As setas indicam vesículas de exotoxina ligadas e libertadas no meio (X 45 000). Fonte: Devoe <i>et al.</i> 1973.....	29
Figura 10 – Via clássica e via alternativa de activação do sistema do complemento (adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/Alternative_complement_pathway ; Data de acesso: Dez. 2009).....	31

Figura 11 - DCC representativo das interrelações de algumas das variáveis que afectam a epidemiologia DM, com enfoque na mobilidade de populações, frequentemente aumentada devido à realização de grandes eventos que são eles próprios justificação para o aumento da actividade social e aproximação entre pessoas.....	33
Figura 12 – DCC representativo das interrelações das variáveis que afectam a epidemiologia da DM. O aumento do número de casos frequentemente causa alarme público que constitui um mecanismo de pressão para vacinação em massa.....	34
Figura 13 - DCC representativo das interrelações entre as variáveis que afectam a epidemiologia da DM, com enfoque nas variáveis que afectam o número de mortos e na influência que a mortalidade (particularmente em crianças e adolescentes) tem no reforço de medidas profiláticas.....	35
Figura 14 - Representação esquemática de uma vesícula de membrana externa e dos principais constituintes da vacina anti meningococos do serogrupo B (adaptado de Holst <i>et al</i> , 2009).....	39
Figura 15 – Estrutura da parede celular de meningococos.....	49
Figura 16- Modelo molecular da porina PorA. As 8 ansas projectam-se na superfície da membrana celular (Fonte: Derrick <i>et al.</i> , 1999).....	50
Figura 17– Parte da sequência de aminoácidos da proteína PorA com identificação das ansas notáveis pela sua variabilidade entre estirpes. (Fonte: Van der Ley <i>et tal.</i> , 1991) ...	50
Figura 18 - Localização de genes <i>housekeepin</i> no mapa do genoma de <i>Neisseria meningitidis</i> (adaptado de Maiden, 1998)	52
Figura 19– Distribuição do risco de doença meningocócica nos países africanos com evidência da zona designada por Cinturão Africano da Meningite.	58
Figura 20- Programa do termociclador para reacção de sequenciação	71
Figura 21– Distribuição dos casos de doença meningocócica ao longo do ano epidemiológico	79
Figura 22– Distribuição do número médio de casos semanais de DM e de gripe, entre Julho de 2002 (semana 1) e Junho de 2007 (semana 60)	79
Figura 23 – Incidência da DM em Portugal ao longo dos oito anos epidemiológicos em análise (2002 a 2010)	80
Figura 24 – Proporção das incidências dos serogrupos por grupo etário nos anos epidemiológicos 2002-2003 (a) e 2006-2007 (b)	82

Figura 25 – Taxas de incidência de DM por serogrupo C, por grupo etário, ocorrida em Portugal no período 2002-03 a 2009-10.....	82
Figura 26 –Taxas de incidência de DM por serogrupos não C, por grupo etário, ocorrida no período 2002-03 a 2009-10.....	83
Figura 27 – Proporção de estirpes hiper virulentas de meningococos de serogrupos C e não C por grupo etário	86
Figura 28 – Proporção de complexos clonais de meningococos de serogrupos não C isolados em Portugal entre Outubro de 2002 e Junho de 2010	87
Figura 29 – Subtipos mais frequentes em estirpes de serogrupos não C, isoladas em Portugal entre Outubro de 2002 e Julho de 2010	89
Figura 30- Dendrograma construído com os perfis electroforéticos de 33 estirpes incluídas no estudo de alterações capsulares. O programa utilizado foi o Bionumerics v2.0 (<i>Applied Maths</i>) com o algoritmo <i>single linkage</i> com um erro associado de 3%.	92
Figura 31– Percentagem de casos de DM com e sem confirmação laboratorial, registados entre 2002-2003 e 2009-2010	93
Figura 32– Distribuição de estirpes invasivas do serogrupo C por ano, em países onde a vacina MenC foi introduzida até 2002. Fonte: EU-IBIS 2007.....	95
Figura 33 – Proporção de serogrupos confirmados e estimados nos anos ante e pós a introdução da vacina MenC em países que a introduziram regularmente nos esquemas de vacinação.....	95
Figura 34– Número médio de casos de DM por serogrupo C em países com vacinação implementada entre 1999 e 2002 (dados por ano civil) e em Portugal (dados por ano epidemiológico).....	96
Figura 35 - Proporção de casos de DM (confirmados e estimados) causados por estirpes B por grupo etário, registados entre 1999 e 2006. A) em países europeus*; B) em Portugal .	96
Figura 36- Proporção de casos de DM (confirmados e estimados) causados por estirpes C por grupo etário, registados entre 1999 e 2006. A) Em países europeus sem vacinação. B) Em países europeus com vacinação. Fonte: EU-IBIS network 2007(código de cores igual ao da figura 37)	97
Figura 37 - Proporção de casos de DM em Portugal (confirmados e estimados) causados por estirpes C por grupo etário, registados entre 2002-2003 e 2006-2007, antes e após a introdução da vacina MenC no PNV.....	97

Figura 38 - Incidência mensal de DM registada em Portugal no período em que se registou grande incidência de estirpes C (2002-03 a 2005-06), no período pós endémico de estirpes C (após 2006-07) e em 2004-2005, ano de intensa actividade gripal e em que se realizou no país o Campeonato Europeu de Futebol, entre 12 de Junho e 4 de Julho de 2004.	98
Figura 39- Proporção de PorA_VR1 de estirpes de <i>Neisseria meningitidis</i> responsáveis por doença invasiva em 18 países europeus e em Portugal, desde Janeiro de 2007 a Junho 2010.	99
Figura 40 - Proporção de PorA_VR2 de estirpes de <i>Neisseria meningitidis</i> responsável por doença invasiva em 18 países europeus e em Portugal, desde Janeiro de 2007 a Junho 2010.	99
Figura 41 - Proporção de complexos clonais de estirpes de meningococos de serogrupos não C isoladas em Portugal e em 14 países europeus* entre 2002 e 2010	100
Figura 42 – Proporção de estirpes invasivas de meningococos de serogrupos não C de complexos clonais hiper virulentos, isoladas em Portugal e em 14 países europeus* entre 2002 e 2010.	101
Figura 43 - Proporção complexos clonais hiper virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em 14 países europeus*, entre 2003 e 2010	101
Figura 44 - Proporção complexos clonais hiper virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em Portugal, entre 2002/03 e 2010.	102
Figura 45 - Evolução da taxa de estirpes de cc hiper virulentos isolados em Portugal entre Julho de 2002 e Junho de 2010 e da taxa de letalidade observada no mesmo período. Pela observação das linhas de tendência das duas curvas pode inferir-se que, também em Portugal, há relação entre os dois eventos.	103
Figura 46 - Apresentação clínica da doença meningocócica e respectivas percentagens anuais ...	104
Figura 47 - Evolução da taxa de letalidade por tipo de apresentação clínica da DM	104
Figura 48 - Taxa de letalidade registada em Portugal entre 2002 e 2010, por grupo etário e por serogrupo de <i>N. meningitidis</i>	105
Figura 49 - Evolução da dimensão da população portuguesa num período de dez anos (2002-2011), aqui exemplificada no grupo etário menor de um ano	115
Figura 50 – O nível “População <1 ano” contem o número de indivíduos que nascem menos os que morrem ou crescem	116

- Figura 51- Representação das inter-relações entre variáveis que afectam a dimensão da população onde não existem portadores assintomáticos, aqui exemplificada no grupo etário inferior a um ano 117
- Figura 52 - Inter-relações entre as variáveis que afectam a dimensão da população onde podem existir portadores assintomáticos, aqui exemplificada no grupo etário com idade $\geq 5 < 10$ anos..... 118
- Figura 53 - Representação gráfica da influência dos fumadores na dinâmica da DM 119
- Figura 54 - Alteração da exposição passiva ao fumo de tabaco em ambiente familiar Fonte: INFOTABAC-DGS, 2009 120
- Figura 55 - Prevalência em Portugal de fumadores diários e ocasionais com idade superior ou igual a 15 anos, registada entre 1998 e 2008 122
- Figura 56 - Evolução da taxa de fumadores aqui exemplificada na população $\geq 10 < 20$ anos, estimada para o período de dez anos (2002-2011) 124
- Figura 57 - Percentagem de portadores de *N. meningitidis* por grupo etário e género na população norueguesa em 1991 (Fonte: Caugant et al., 1994)..... 125
- Figura 58 - Inter-relações entre as variáveis que afectam a dimensão de portadores não C, aqui exemplificado no grupo etário ≥ 5 e < 10 anos, grupo etário onde não existem fumadores 127
- Figura 59 - Inter-relações entre as variáveis que afectam a dimensão de portadores não C, aqui exemplificado no grupo etário ≥ 20 anos..... 127
- Figura 60– Árvore filogenética estabelecida com base na análise do genoma completo de 20 estirpes de *N. meningitidis*. Observam-se três *clades* filogenéticos (PC32/269, PC8/11 e PC 41/44) e estirpes sem proximidade genética entre si. Adaptado de Budroni *et al.*, 2011 129
- Figura 61- Proporção de estirpes de colonização dos complexos clonais ST-11, ST-32+ST-269 e ST-41/44, observada em 15 países europeus entre 2000 e 2010 (com indicação do número de estirpes comensais caracterizadas no respectivo intervalo de tempo). Não se observam estirpes de colonização ST-8 130
- Figura 62 - Exemplo de representação gráfica da percentagem de estirpes de colonização com factor de invasão 26 e do seu efeito contínuo ao longo do tempo no número de portadores destas estirpes..... 130
- Figura 63 - Representação das inter-relações entre as variáveis que afectam o número total de portadores não C com a diferenciação dos portadores de estirpes com diferente “factor de invasão” 132

- Figura 64 – Representação gráfica da influência dos grandes eventos na dinâmica da DM. Na presença de portadores visitantes e de novos genótipos, para os quais a população residente não está naturalmente imunizada, o número de portadores aumenta e, conseqüentemente, aumenta o número de indivíduos que adoecem133
- Figura 65 -Proporção de cc hiper-virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em Portugal e em nove países europeus*, entre 2002 e 201. Note-se que a percentagem de estirpes HV em crianças com 5 a 10 anos (ponto fora da curva) corresponde a um número baixo de observações (Fonte: <http://pubmlst.org/neisseria/>, data de acesso 2010-12-04).....134
- Figura 66 - Fluxos que afectam o nível “Doentes não C” aqui exemplificado no grupo etário <1 ano139
- Figura 67 – Modelo completo da epidemiologia da doença meningocócica em crianças menores de um ano143
- Figura 68- Modelo completo da epidemiologia da doença meningocócica em crianças com idade superior ou igual a um ano e inferior a cinco anos.....143
- Figura 69 - Modelo completo da epidemiologia da doença meningocócica em crianças com idade ou superior a cinco anos e inferior a dez anos.....144
- Figura 70 - Modelo completo da epidemiologia da doença meningocócica em indivíduos com idade superior ou igual a dez anos e inferior a vinte anos144
- Figura 71 - Modelo completo da epidemiologia da doença meningocócica em indivíduos com idade superior ou igual a vinte anos144
- Figura 72 - Grau de concordância entre o número total de casos de DM devolvido pelo modelo e o número de casos notificado na base de dados nacional145
- Figura 73 - Grau de concordância entre o número de casos de DM devolvido pelo modelo nos diferentes grupos etários e o número de casos notificado na base de dados nacional.146
- Figura 73 (cont.) – Grau de concordância entre o número de casos de DM devolvido pelo modelo nos diferentes grupos etários e o número de casos notificado na base de dados nacional147
- Figura 74 – Análise de sensibilidade do número de doentes com idade inferior a um ano ao número de nascimentos, numa simulação de um período de dez anos148
- Figura 75 - Análise de sensibilidade do total de doentes à variável “taxa de fumadores “ do conjunto da população fumadora, numa simulação de um período de dez anos ..149

Figura 76 – Sensibilidade do número de doentes nos grupos etários sensíveis à exposição passiva ao fumo do tabaco das mães fumadoras, numa simulação de um período de dez anos.....	150
Figura 77 - Sensibilidade do total de doentes à taxa de imunização de portadores	150
Figura 78 - O teste de sensibilidade do modelo, numa simulação num período de dez anos, mostra que não existe sensibilidade do número total de doentes à taxa de imunização de doentes.....	151
Figura 79 - Sensibilidade do número de doentes à taxa de portadores, numa simulação de um período de dez anos, quando se fez variar a taxa de portadores em crianças de cinco a nove anos entre 0 e 4% (foi considerada de 2% no desenvolvimento do modelo), a taxa de portadores em indivíduos com idade de 10 a 19 anos entre 13 e 17% (foi considerada de 15,3% no desenvolvimento do modelo)e a taxa de portadores em indivíduos com idade superior ou igual a 20 anos entre 8 e 12% (foi considerada de 10% no desenvolvimento do modelo).....	151
Figura 80 - Comparação entre o número total de casos de DM na situação extrema de se registar uma redução uniforme de 75% na taxa de fumadores do país e o número de doentes devolvido pelo modelo quando a taxa de fumadores é a estimada com base nos dados dos INS, num período de dez anos.....	152
Figura 81 - Comparação entre o número de casos de DM na situação extrema de não existirem mães fumadoras e o número de doentes devolvido pelo modelo quando a taxa de fumadoras é a estimada com base nos dados dos INS, aqui exemplificada no grupo etário inferior a um ano, num período de dez anos	152
Figura 82 - Comparação entre o número de casos de DM observado no modelo e o que se iria observar se a taxa de portadores duplicasse ou fosse reduzida a metade, num período de dez anos	153
Figura 83 - Evolução no número total de doentes não C, simulando um aumento crescente e contínuo (de 7% a 12%) na taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 7, de 2010-11 a 2015-16.....	155
Figura 84 - Evolução no número total de doentes não C, simulando um aumento crescente e contínuo (de 0,05% a 1%) na taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 26, de 2010-11 a 2015-16.....	155
Figura 85 - Número total de casos de doença meningocócica causada por estirpes de serogrupos não C, registados na base de dados nacional e observados no modelo dinâmico.....	160

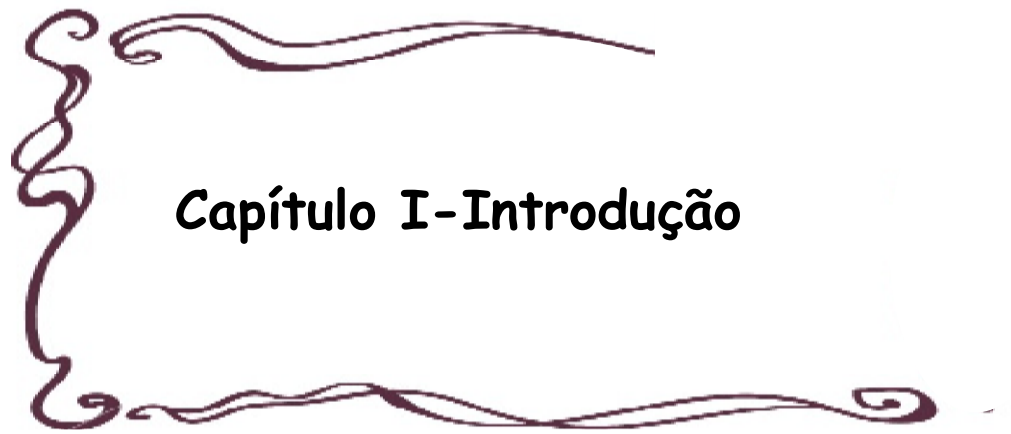
- Figura 86 - Evolução do número anual de casos de DM (registado na base de dados nacional e no modelo) e número estimado de indivíduos em 31 de Dezembro de cada ano (INE) com idade inferior a um ano (a) e com idade superior ou igual a um e inferior a cinco anos (b), relativo ao período entre 2002 e 2010.....161
- Figura 87 - Número anual de casos de DM registados na base de dados nacional e no modelo entre 2002 e 2010 e número estimado de fumadores para o mesmo período161
- Figura 88 - Taxas de incidência semanais de sindroma gripal por 100 000 habitantes, nas épocas gripais 2008/2009 e 2009/2010, com indicação da área de actividade basal.....163
- Figura 89 - Distribuição dos casos de sindroma gripal, por grupo etário, nas épocas gripais de 2008/2009 e 2009/2010164
- Figura 10 - Número total de casos de SG e respectivas taxas de incidência semanais de sindroma gripal na época 2003/2004165
- Figura 91 - Número total de casos de SG e respectivas taxas de incidência semanais de sindroma gripal na época 2004/2005165
- Figura 92 - Representação esquemática das duas subpopulações de *Neisseria meningitidis*: a população base, constituída por muitos e diferentes genótipos (círculos negros) e a população clonal (cones invertidos) que se sobrepõe à população base, com origem em alguns genótipos bem adaptados (círculos vermelhos) e que se diversificam dando origem a complexos clonais (assinalados por setas).171

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Países onde têm sido utilizadas vacinas com base em vesículas de membrana externa de meningococos e fenótipo das estirpes utilizadas na sua preparação ...	39
Tabela 2 - Antibióticos utilizados no tratamento empírico de meningite bacteriana	41
Tabela 3 - Antibióticos usados em profilaxia da doença meningocócica (DGS, 1999).....	42
Tabela 4 - Linhagens hiper-invasivas de <i>Neisseria meningitidis</i> (adaptado de Maiden, 2002 a)	55
Tabela 5 - Interpretação dos perfis de restrição de acordo com os critérios de Tenover	76
Tabela 6 – Interpretação da CMI de <i>Neisseria meningitidis</i> (critério do CLSI)	77
Tabela 7 - Concentrações de Penicilina utilizada para a determinação de CMI	77
Tabela 8 – Número de casos de doença meningocócica ocorrida em Portugal nos anos epidemiológicos de 2002-03 a 2009-10. Diferenciação entre casos classificados como confirmados e prováveis (percentagem relativamente ao total de casos).....	78
Tabela 9 – Número de casos confirmados por cultura e por PCR (percentagem relativamente ao total de casos confirmados)	79
Tabela 10 – Incidência da DM por grupo etário, entre Julho de 2002 e Junho de 2010	80
Tabela 11 – Número de casos de DM (confirmados e estimados) por serogrupo, registados entre Julho de 2002 e Junho de 2010	81
Tabela 12 – Número de estirpes invasivas e número de estirpes caracterizadas por MLST, com referência ao ano do seu isolamento (período entre 2002 e 2010)	84
Tabela 13 – Número de estirpes de cada serogrupo caracterizadas por MLST, com referência ao ano do seu isolamento (percentagem relativamente ao total de estirpes do mesmo serogrupo, isoladas ou identificadas por PCR no mesmo ano).....	84
Tabela 14 – Distribuição por grupo etário das estirpes invasivas de meningococos responsáveis por DM confirmada, ocorrida entre Julho de 2002 e Junho de 2010, e número de estirpes caracterizadas por MLST no mesmo período	85
Tabela 15 – Número total de estirpes do serogrupo C caracterizadas. Número de estirpes de cc hiper virulentos e não hiper virulentos e respectiva proporção por grupo etário ...	85

Tabela 16– Número total de estirpes de serogrupos não C caracterizadas. Número de estirpes de cc hiper virulentos e não hiper virulentos e respectiva proporção por grupo etário.....	86
Tabela 17 – Genótipos de meningococos do serogrupo C isolados entre Outubro de 2002 e Junho de 2010.....	88
Tabela 18 – Concentração mínima inibitória de Penicilina para <i>Neisseria meningitidis</i> responsável por doença invasiva em Portugal, entre Julho de 2002 e Junho de 2010 ...	89
Tabela 19 – Estirpes invasivas de meningococos isoladas em Portugal entre Outubro de 2002 e Junho de 2010, caracterizadas com tipo 2a ou 2b	90
Tabela 20 – Resultados da análise por PFGE das estirpes de meningococos dos serogrupos C e B com o tipo 2a e 2b, isolados em Portugal entre Outubro de 2002 e Junho de 2010 ...	91
Tabela 21 - Incidência da DM em 20 países Europeus no período entre 2002 e 2008	94
Tabela 22 – Proporção de estirpes invasivas do serogrupo C, isoladas em 14 países europeus* entre 2002 e 2010 (Fonte: pubmlst.org, consultado em 10-03-2011)	102
Tabela 23 – Número de casos de doença meningocócica em cada forma de apresentação clínica	103
Tabela 24 - Número de óbitos por grupo etário e respectiva taxa de letalidade registada entre Julho de 2002 e Junho de 2010	105
Tabela 25 - Distribuição das estirpes recombinantes por ano epidemiológico.....	106
Tabela 26 107 CMI de Penicilina para <i>Neisseria meningitidis</i> observadas em quatro países europeus entre 2002 e 201.....	107
Tabela 27 - Variáveis que descrevem o comportamento do sistema.....	113
Tabela 28 - Incidências (por 100 mil) da DM em nove grupos etários	114
Tabela 29 - Incidências (por 100 mil) da DM nos cinco grupos etários considerados no desenvolvimento do modelo	115
Tabela 30 - Taxa total de fumadores na população portuguesa e nos dois grupos etários considerados no desenvolvimento do modelo da DM, com influência na dimensão da população de portadores assintomáticos (os valores assinalados a vermelho correspondem a valores dos INS, os restantes são valores estimados)	123

Tabela 31 - Taxas de referência de portadores assintomáticos de meningococos não C por grupo etário.....	126
Tabela 32- Associação entre complexo clonal, doença e estado de portador (Adaptado de Yazdankhah <i>et al.</i> , 2004). Cálculo do “factor de invasão”, sendo este a razão normalizada entre a percentagem de estirpes invasivas e a percentagem de estirpes do mesmo cc encontradas em portadores assintomáticos	128
Tabela 33 Relação entre complexo clonal de estirpes HV e quantificação do “factor de invasão” considerado no desenvolvimento do modelo.....	129
Tabela 34 – Proporção de cc hiper-virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em Portugal e em nove países europeus, entre 2002 e 2010	133
Tabela 35 - Proporção de casos de DM registados entre 2002 e 2010 com confirmação laboratorial e serogrupo conhecido	138
Tabela 36 - Idade estimada das mães de crianças e jovens nos quais a incidência da DM sofre influência dos hábitos tabágicos da mãe	139
Tabela 37 - Prevalência de mulheres fumadora nos grupos etários correspondentes a mães de crianças e jovens com idade inferior a vinte anos, no período entre 1998 e 2008 (os valores assinalados a vermelho correspondem a valores dos INS, os restantes são valores estimados).....	140
Tabela 38 - Valor das variáveis que afectam o fluxo “Adoecendo não C” nos cinco grupos etários, no ano referência 2007-2008 e valor das constantes C_{HV} e C_{nHV}	142
Tabela 39 – Cenários para simulação de transmissão de meningococos	162
Tabela 40 – Percentagem de estirpes invasivas do serogrupo C identificadas em três países europeus com vacinação por rotina e em Portugal, com indicação do ano de implementação da vacina nos respectivos PNV e taxa de redução de estirpes um ano e dois anos após o início da vacinação por rotina.....	160



Capítulo I-Introdução

1. História da doença meningocócica

Ainda que a descrição de doenças semelhantes a infecção invasiva por meningococos date do século XVI, foi em 1850 que, pela primeira vez, uma epidemia de meningite ficou documentada. Ocorreu em Eaux Vives, próximo de Genebra, Suíça, e foi descrita por Vieusseux (Anónimo, OMS 1998) (Figura 1).

Vieusseux fez uma notável descrição da sépsis meningocócica, a que chamou “*fièvre cérébrale maligne non contagieuse*” e considerou a hipótese de transmissão por via aérea e não por contacto directo – “*le mal parut tenir à une constitution particulière de l'air, et non à une contagion se communiquant de proche en proche*”. Na verdade, faltava a Vieusseux conhecer o fulcro da transmissibilidade e epidemiologia da doença, o estado de portador assintomático, que Kiefer viria a esclarecer no final do século (Souza *et al.*, 2008).

Em 1884, Marchiafava e Celli haviam já identificado “micrococos” intracelulares numa amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR), mas só no final da década, em 1887, o médico austríaco Anton Weichselbaum provou a relação de causalidade entre a bactéria e a doença, quando isolou uma bactéria, a que chamou *Diplococcus intracellularis meningitidis*, a partir do LCR de seis dos oito doentes com meningite bacteriana (Deuren *et al.*, 2000, Manchanda *et al.*, 2006). Dos restantes dois doentes, Weichselbaum isolou cocos em cadeia, presumivelmente pneumococos (Cartwright, 2006). À data, era ainda desconhecida a possibilidade de haver uma multiplicidade de microrganismos como agentes causais de meningite.

Três anos depois, Kiefer isolou a mesma bactéria da nasofaringe de doentes e dos seus contactos. Esse facto constituiu o primeiro passo para uma melhor compreensão da epidemiologia e patogénese da doença meningocócica (DM) (Cartwright, 2006).

Durante o século XIX a doença meningocócica esteve associada a surtos e epidemias, muitos deles em casernas militares. Os casos esporádicos, sabemos hoje, seriam difíceis de diferenciar de outras “febres” com exantema ou púrpura. A mortalidade era muito elevada (superior a 70%) e as sequelas nos sobreviventes muito graves.

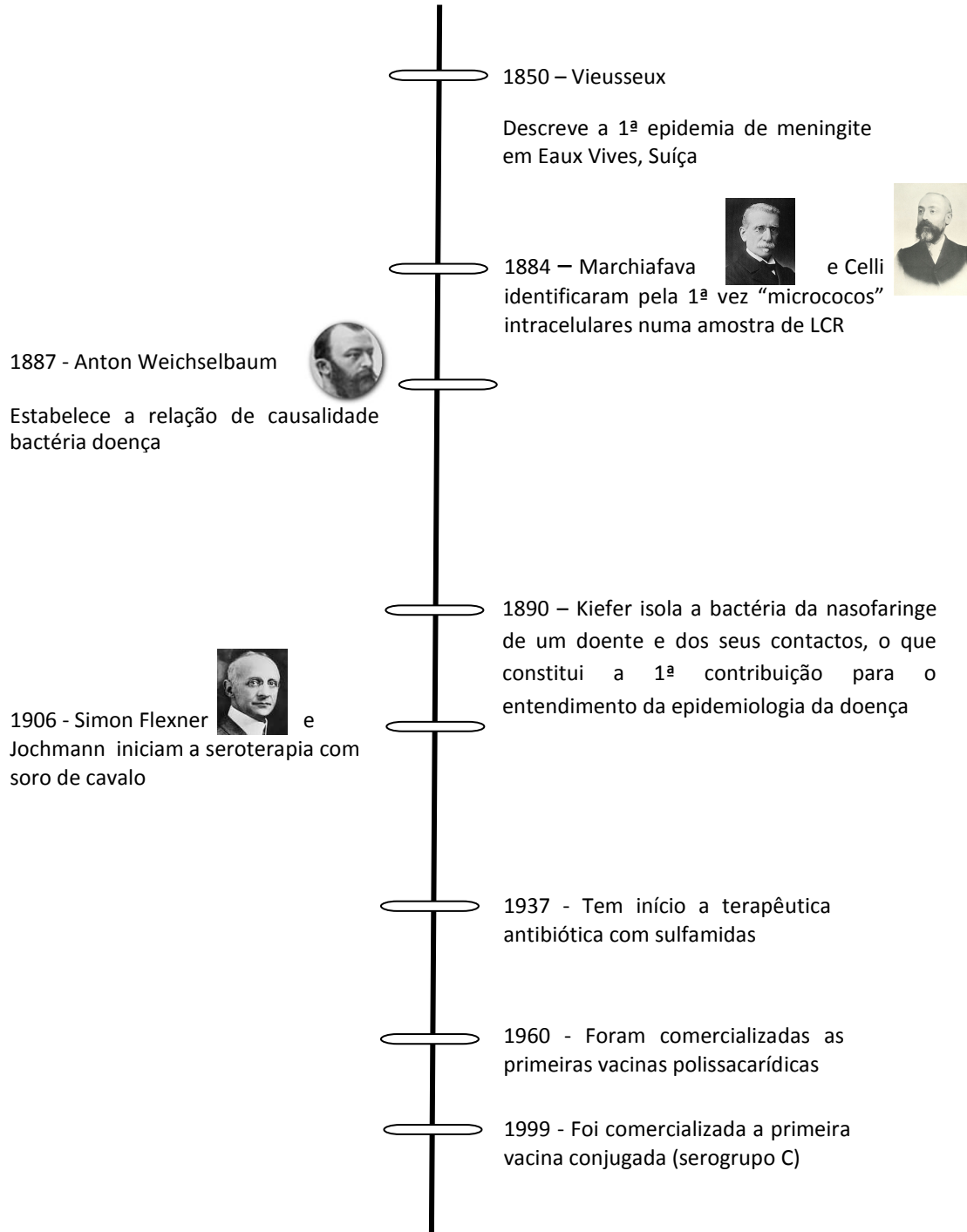


Figura 1 - Cronologia da investigação em doença meningocócica

No início do século XX, Jochmann na Alemanha (1905) e Simon Flexner nos Estados Unidos (1906) prepararam antissoro de cavalo injectando bactérias vivas e mortas em cavalos. Rapidamente Jochmann persuadiu a Merck (a mais antiga indústria farmacêutica do mundo) a produzir o antissoro em larga escala. A introdução da terapia com soro de cavalo imunizado, em injeção intratecal, reduziu a mortalidade de quase 100 para 30%. A introdução das sulfonamidas, em 1937, constituiu um avanço terapêutico importante por ter feito decrescer a taxa de letalidade para valores próximos de 15%.

A resistência às sulfonamidas implicou a sua substituição por penicilina e cloranfenicol a partir de meados de século XX. Embora a penicilina seja ainda hoje o antibiótico recomendado no tratamento da DM, o aparecimento de estirpes com susceptibilidade diminuída à penicilina (referidas em numerosos países desde a década de 1980), implicou a introdução do ceftriaxone nos esquemas terapêuticos.

Na década de 1960 foram desenvolvidas as primeiras vacinas polissacarídicas anti A e C que, embora não conferissem uma imunidade duradoura nem protecção a crianças com menos de dois anos, vieram contribuir para o controlo de surtos e de epidemias (Gotschlich *et al.*, 1969). As vacinas polissacarídicas conjugadas, inicialmente apenas para o serogrupo C e actualmente já disponíveis também para os serogrupos A, W135 e Y, constituem uma poderosa arma na luta contra a infecção.

Múltiplos constituintes bacterianos são hoje alvo de investigação com o objectivo de desenvolver uma vacina para o serogrupo B. As alterações antigénicas em proteínas membranares que se têm identificado e relacionado com um aumento de incidência da DM (Harrison *et al.*, 2009) são potencialmente preocupantes na perspectiva da produção de vacinas baseadas em proteínas de membrana externa, algumas em desenvolvimento, outras já utilizadas no controlo de surtos por meningococos do serogrupo B.

Neisseria meningitidis coloniza e infecta unicamente o homem, possivelmente pela sua incapacidade de retirar ferro de outras fontes que não sejam humanas (transferrina e lactoferrina) e causa a única forma de meningite bacteriana capaz de ser epidémica.

Após colonização, as estirpes mantêm-se como comensais na nasofaringe ou, após um período normalmente curto, penetram na corrente sanguínea. Uma vez em circulação, a multiplicação bacteriana pode ser controlada pelos mecanismos naturais de defesa, possivelmente quando o nível de bacteriémia é baixo, e a infecção resume-se a uma síndrome gripal. Contrariamente, quando a multiplicação bacteriana em circulação fica sem controlo, as manifestações clínicas da infecção invasiva dependem das

características de virulência da estirpe, nomeadamente do nível de endotoxina libertado e do *satus* do sistema imunitário do doente. A forma menos grave da doença

ocorre quando a infecção se confina às meninges, tecido para o qual os meningococos têm um particular tropismo. A forma mais grave, a sépsis fulminante, ocorre poucas horas após o início dos sintomas, frequentemente sem sinais meníngeos.

Apesar dos avanços conseguidos no seu controlo, a doença meningocócica é, nos países industrializados, a principal causa de infecção infantil e, no mundo inteiro, está ainda associada a uma elevada mortalidade e morbilidade. A letalidade associada à DM depende em parte das características de virulência bacteriana e do sistema imunitário do doente, mas a instituição precoce de antibioterapia adequada é determinante no prognóstico. As medidas de controlo da DM incluem um diagnóstico correcto aos primeiros sinais da infecção, a utilização de antibióticos aos quais a bactéria tenha uma boa sensibilidade, a identificação correcta dos contactos para administração de antibioterapia profilática e a utilização de vacinas.

Os doentes que sobrevivem (cerca de 90%), adquirem um nível de anticorpos circulantes bactericidas que os protegem de futuras infecções meningocócicas.

Na maior parte dos países Europeus verificou-se um aumento da incidência da DM a meio da década de 1990, principalmente devido ao aumento do número de casos por serogrupo C. A maior parte destas estirpes foram caracterizadas como ST-8 e ST-11/ET-37, incluindo este último complexo o clone ET-15, ao qual está associada uma elevada letalidade e uma proporção elevada de sequelas graves.

Em Portugal, durante toda a década de 1990 a incidência da doença foi alta. Entre 1998 até 2002 notou-se uma tendência crescente no número de casos, atingindo-se neste último ano uma taxa de incidência de 3.81 casos/100 mil. No ano epidemiológico 2002-2003 as estirpes do serogrupo C representaram 49% (127/257) dos casos notificados com confirmação laboratorial. Na sequência do alarme público causado pelo número crescente de casos de DM que se vinha registando, pediatras e pais promoveram a vacinação em massa de crianças e adolescentes no Inverno de 2002. O número de casos de DM por serogrupo C diminuiu a partir daí abruptamente. Em Janeiro de 2006, a vacina conjugada anti meningocócica para o serogrupo C foi introduzida no Plano Nacional de Vacinação e, nesse mesmo ano, foi realizada vacinação complementar em regime de campanha a crianças com idade compreendida entre dois e nove anos. Em 2007 a campanha estendeu-se a jovens com idade até 18 anos (DGS 2005b). Esta vacina foi primeiramente introduzida no mercado inglês em 1999, após estudos de eficácia comprovada na aquisição de imunidade para as estirpes C de meningococos, mas sem se

conhecer o impacto da vacinação em massa na ecologia da população bacteriana comensal e hiper virulenta.

2. Descrição do problema

A doença meningocócica (DM) constitui um problema de saúde pública no mundo inteiro, com um número estimado de 500 000 casos e mais do que 50 000 mortes registadas anualmente (Anónimo, OMS 1998).

A DM é endémica em muitos países industrializados, com uma incidência baixa no conjunto da população (1 a 2 por 100 mil). Contudo, a DM representa um grave problema de saúde pública devido à elevada taxa de incidência em crianças com idade inferior a quatro anos (20 a 50 por 100 mil), à elevada letalidade (8 a 10%), ao número de sequelas graves (cerca de 20%) e ao facto de ser potencialmente epidémica.

A incidência e epidemiologia da DM são influenciadas por factores de virulência bacterianos e pela susceptibilidade do hospedeiro. A colonização da nasofaringe com *Neisseria meningitidis* e a infecção invasiva depende dos seguintes factores:

- taxa de portadores assintomáticos na comunidade;
- factores ambientais;
- factores comportamentais que promovam contactos próximos;
- infecções do tracto respiratório;
- maturidade e integridade do sistema imunitário do hospedeiro;
- características de virulência e de transmissibilidade das estirpes bacterianas;
- medidas de controlo e de profilaxia.

Cada um destes factores sofre, por sua vez, influência de alguns outros, sem contudo se conhecer a sua exacta medida. Conhece-se, por exemplo, o efeito do fumo de tabaco sobre a taxa de portadores e sobre a predisposição para infecções do tracto respiratório. Os contactos próximos, que tanto podem ter origem na vivência em espaços fechados ou sobrelotados como no relacionamento romântico, promovem a transmissão de meningococos entre indivíduos e, conseqüentemente, fazem aumentar a taxa de portadores. O paradigma clássico da influência dos factores ambientais observa-se nos países que integram o Cinturão Africano da Meningite. Aqui, na época seca, quando as poeiras irritam e fragilizam as mucosas do trato respiratório e as temperaturas nocturnas são muito baixas e potenciam infecções respiratórias, regista-se uma incidência muito alta de DM com ondas epidémicas devastadoras (Sultan *et al.*, 2005).

Os meningococos têm a capacidade de rapidamente sofrerem alterações genéticas, particularmente sob pressão selectiva devida à imunidade natural ou induzida pela vacina. O principal mecanismo através do qual sofrem alterações genéticas é o de transferência horizontal de genes, podendo incorporar longas sequências de DNA presente no meio, presumivelmente durante a fase de colonização da nasofaringe com, pelo menos, duas estirpes diferentes (Linz *et al.*, 2000). As alterações capsulares com alteração do serogrupo das estirpes são um exemplo de transferência horizontal de genes. Tem havido evidências da implicação das alterações capsulares nos surtos de DM. Crê-se que a estirpe epidémica W135, responsável pela epidemia em Meca durante o Hajj de 2000 e que posteriormente se dispersou globalmente, tenha resultado de alteração capsular de uma estirpe C (Aguilera *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2002). Nesta espécie bacteriana pode também ocorrer conversão genética, essencialmente uma recombinação intra gene que não requer DNA de outro microrganismo, daí resultando variação antigénica face a pressão imunológica. O microrganismo é ainda capaz de variação de fase e variação da expressão genética das quais resultam alterações fenotípicas.

Esta grande variabilidade genética dos meningococos justifica alguma apreensão quando se promovem campanhas de vacinação em massa com novas vacinas que não protegem para todos os serogrupos, receando repetir-se o cenário de alteração de serótipos observado em *Streptococcus pneumoniae*, depois da introdução da vacina pneumocócica conjugada (Hicks *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2009). À semelhança do que acontece com os meningococos, o principal reservatório de pneumococos é a nasofaringe humana de portadores assintomáticos, havendo contudo uma dinâmica de colonização diferente uma vez que é em crianças com menos de seis anos que se observa a mais alta taxa de colonização assintomática (Gray *et al.*, 1980).

Cinco anos após a introdução da vacina pneumocócica conjugada heptavalente (VPC-7) (*Prevenar 7**) nos Estados Unidos (em 2000), verificou-se um decréscimo de cerca de 40% na incidência de doença pneumocócica invasiva (de 25,1 por 100 mil habitantes em 1999 para 12,6 por 100 mil em 2004). Apesar do sucesso da vacina, verificou-se em indivíduos vacinados um aumento da taxa de portadores e do número de casos de otite média causada por serótipos não vacinais, bem como um aumento na incidência da doença pneumocócica invasiva causada por serótipos não incluídos na VPC-7. Parece assim que a redução da taxa de portadores de alguns serótipos proporciona o aparecimento de um nicho ecológico que pode ser preenchido por serótipos não incluídos na vacina (Hicks *et al.*, 2004). Se estes subtipos tiverem um elevado potencial de invasão e infecção (elevada virulência), o fenómeno de substituição de subtipos pode reduzir os benefícios da vacinação.

*Serotipos da vacina Prevnar 7: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F

O risco de substituição de subtipos em indivíduos que receberam a vacina pneumocócica conjugada tem vindo a ser avaliado em vários estudos com o objectivo de monitorizar os subtipos circulantes, o potencial decréscimo da eficácia da vacina conjugada e o desenho de novas vacinas. Estudos realizados na década de 1990 revelaram que, na Gâmbia, a taxa de portadores de serótipos não vacinais foi de 79% em crianças que receberam três doses de vacina conjugada e foi de 42,5% no grupo controlo e que na África do Sul a taxa de portadores de serótipos não vacinais foi de 21% em crianças não vacinadas e de 39% em crianças vacinadas (Lipsitch, 1999).

Num estudo realizado em oito comunidades de Massachusetts durante o Inverno de 2006-07, incidindo em crianças entre três meses e sete anos, verificou-se nas estirpes de pneumococos de colonização uma quase completa substituição dos serótipos incluídos na Prevenar 7 por serótipos não vacinais, sete anos após a introdução da vacina conjugada nos Estados Unidos. Importante foi também o significativo aumento na prevalência dos serótipos não vacinais 19A, 35B, 23A e 7F (Huang *et al.*, 2009).

O estudo de crianças vacinadas menores de cinco anos, realizado em Inglaterra no Inverno de 2008-09, registou também a substituição, na população pneumocócica de colonização, de serótipos vacinais por serótipos não vacinais. Destes os mais frequentes foram os 33F, 7F, 10A, 34, 15B, 31, 21, 3, 19A, 15C, e 23A. Não tendo aumentado a incidência da doença invasiva na população em geral, pode concluir-se da fraca virulência dos serótipos predominantes em portadores (Flasche *et al.*, 2011).

A VPC-7 foi introduzida no mercado português em 2001 (Queiroz *et al.*, 2004) e, apesar de não ter sido incluída no PNV, a cobertura vacinal na região Norte do país tem sido crescente, sendo que em 2005 aproximava-se de 50% das crianças com menos de um ano (Queiroz *et al.*, 2008). Por falta de estudos de portadores realizados em Portugal antes da introdução da vacina, não pode falar-se de substituição de serótipos, contudo, um estudo de portadores realizado em 2007, incidindo em crianças vacinadas e não vacinadas da região de Coimbra, com idades compreendidas entre seis meses e seis anos, revela que a prevalência de tipos vacinais e não vacinais é equivalente em crianças vacinadas e os tipos não vacinais são largamente predominantes em crianças vacinadas (Rodrigues *et al.*, 2009).

A constatação do fenómeno de substituição de serótipos de pneumococos e o aumento de incidência de doença invasiva por serótipos não vacinais, ainda que não acompanhado por um aumento absoluto de incidência de doença invasiva, motivou a introdução de novos serótipos na vacina conjugada. Os seis serótipos adicionados na vacina *Prevenar-13* (1, 3, 5, 6A, 7F, e 19A) são os responsáveis pela grande maioria dos

casos de doença invasiva mas são raramente encontrados em portadores (Flasche *et al.*, 2011).

Provavelmente a utilização da vacina conjugada no controlo de infecções pneumocócicas resultou na substituição de serótipos e em alterações na epidemiologia da infecção. Como resultado da pressão resultante da vacinação dirigida aos serótipos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, o nicho deixado pelas estirpes vacinais foi sendo ocupado por novos serótipos de uma espécie bacteriana que, tal como os meningococos, tem uma elevada capacidade de transformação genética por transferência horizontal de genes (Vestrheim *et al.*, 2011).

Depois da comercialização da vacina Hib e da vacinação em massa de crianças a partir de 1990, surgiu o mesmo receio de possível perda de eficácia da vacina a longo prazo e da substituição do tipo b por outros dos seis tipos (designados de a-f, Pittman *et al.*, 1931) de *Haemophilus influenzae* (Blanchard-Rohner *et al.*, 2008; Tsang, 2007). A redução do número de portadores assintomáticos de *H. influenzae* na nasofaringe, depois da introdução da vacina conjugada Hib, alertou para a possibilidade teórica de outros tipos ocuparem o lugar das estirpes tipo b e de virem a causar doença invasiva.

Um estudo que incidiu sobre doença invasiva por *H. influenzae* registada em 13 países europeus no período de 1996 a 2006, revela uma marcada redução na incidência de doença causada por estirpes do tipo b após a introdução da vacina conjugada nos planos de vacinação de cada país. Contudo, a incidência de doença invasiva por estirpes não capsuladas é agora mais alta do que por estirpes tipo b, as quais eram responsáveis por 80% dos casos de doença invasiva, maioritariamente em crianças menores de cinco anos, antes da vacinação por rotina de crianças. As infecções causadas por estirpes capsuladas não tipo b revelaram-se extremamente raras e maioritariamente causadas por Hif e Hie (Ladhani *et al.*, 2010).

Conhecidos os cenários pós vacinação em massa de crianças com as vacinas conjugadas Hib e pneumocócica, poderá reconstituir-se que após a introdução da vacina conjugada para meningococos do serogrupo C estirpes de outros serogrupos venham a ocupar o nicho deixado por estirpes C.

3. Questão para investigação

A doença meningocócica tem uma clínica e epidemiologia complexas, onde muitas variáveis interagem entre si num sistema dinâmico. Os estudos de análise de variância e correlação estatística, largamente utilizados em epidemiologia, assumem linearidade e independência mútua entre todas as variáveis independentes, o que tende a ser falacioso no contexto de um sistema complexo com interacções indirectas e mútuas entre variáveis. Relações diferidas no tempo tornam os estudos ainda mais complexos. A metodologia mais ajustada a este tipo de estudo é a de Dinâmica de Sistemas que utiliza relações mútuas de causa-efeito entre variáveis. Esta metodologia tem sido usada em áreas médicas, permitindo planejar e fundamentar decisões em política de saúde, particularmente em epidemiologia e políticas de vacinação (Ritchie-Dunham e Galván, 1999; Álvarez *et al.*, 1998).

Tendo em conta a experiência de países europeus com políticas de vacinação já implementadas, é previsível conhecer o impacto imediato da vacina MenC na incidência da DM por estirpes C em Portugal. Mas, num horizonte temporal mais vasto, irá a introdução desta nova variável no sistema dinâmico da DM traduzir-se em alterações na epidemiologia da doença? Por pressuposto, a introdução no mercado português da vacina conjugada anti meningococos do serogrupo C afectou também a transmissão e taxa de portadores de estirpes C sendo, conseqüentemente, a dinâmica da infecção por meningococos deste serogrupo diferente da dinâmica das infecções causadas por estirpes de serogrupos não C.

É questão fundamental desta tese saber se, depois da introdução em Portugal da vacina conjugada para meningococos do serogrupo C, irá o nicho deixado por estas estirpes ser ocupado por outros serogrupos e se, conseqüentemente, irá a incidência da DM, causada por serogrupos não incluídos na vacina, aumentar.

Para responder a estas questões há que compreender em que condições e em que contexto, endémico e/ou epidémico, podem estirpes de serogrupos não C ocupar o nicho deixado pelas estirpes do serogrupo C, depois da introdução da vacina conjugada para meningococos do serogrupo C. O desenvolvimento de um modelo que traduza a interrelação entre as variáveis que afectam este sistema dinâmico permite conhecer a importância relativa das variáveis que afectam a epidemiologia da DM e simular cenários de evolução da doença.

3.1. Metodologia

O processo investigação compreende as seguintes etapas:

1. Definição do problema em linguagem corrente

Esta etapa foi já cumprida no ponto 2 do presente capítulo

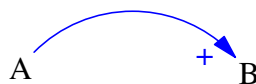
- Identificação do problema;
- Definição das variáveis e dos conceitos chave;

2. Formulação da hipótese dinâmica

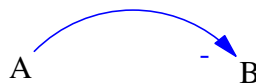
Esta etapa será descrita no capítulo II.

- Definição da fronteira do modelo de simulação;
- Descrição, em linguagem corrente, dos processos e sua representação em diagramas de ciclo causal;

A representação da inter-relação entre variáveis, segundo a metodologia de Dinâmica de Sistemas, constitui o diagrama de ciclo causal (DCC). Nestes DCC as variáveis são ligadas entre si por setas entre causa e efeito, assinaladas com sinal positivo ou negativo, para indicar o tipo (ou sentido) da influência entre as duas variáveis. Uma relação causal entre duas variáveis A e B com um sinal “+” significa mudança na MESMA direcção (influência directa), isto é, se tudo o resto for igual, quando A aumenta, B tende a aumentar, ou quando A diminui, B tende a diminuir.

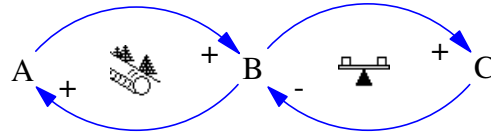


De modo análogo, uma relação com um sinal “-” significa mudança na direcção OPOSTA (influência inversa), isto é, sendo tudo o resto igual, quando A aumenta, B tende a diminuir ou quando A diminui, B tende a aumentar.



Estas duas relações permitem construir diagramas causais tão complexos quanto se queira. É normal representar A afectando B. Contudo, tal representação é incompleta, pois o resultado de B constitui uma nova condição no sistema que por sua vez pode influenciar A. Neste contexto é de particular importância referir o ciclo de realimentação (*feedback loop*) que pode surgir na estrutura dum sistema, e que pode ser positivo ou negativo. Num ciclo positivo (ou ciclo de reforço) não há influências

negativas ou há um número par de relações causais com sinal “-“. Num ciclo negativo (ou ciclo de equilíbrio) há um número ímpar de relações causais com sinais “-“.



Podemos fazer a representação gráfica do processo de contágio a partir do qual se estabelece o estado de portador assintomático ou, muito esporadicamente, se adoece, com recurso a um diagrama de ciclo causal (Figura 2).

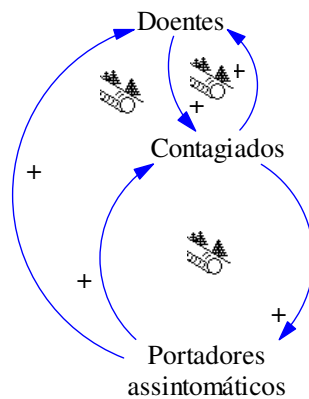




Figura 2 – DCC representativo das interações entre portadores assintomáticos, contagiados e doentes, ignorando quaisquer outras variáveis que afectam a dinâmica da DM. Nos ciclos de reforço que se estabelecem, o número de contagiados será tanto maior quanto maior for o número de portadores assintomáticos e o número de doentes será tanto maior quanto maior for o número de portadores assintomáticos e de contagiados.

Os processos de reforço funcionam como motores de crescimento ou de declínio. Qualquer movimento produz mais movimento na mesma direcção, o que é sugerido pela sua representação gráfica .

Os processos de balanço funcionam na orientação de um objectivo para a sua meta. Um sistema em balanço tende a ser estável, com uma representação gráfica sugestiva . Estes processos são predominantes nos sistemas biológicos que procuram estabilidade e condições para sobreviverem num ambiente em mudança.

- Representação dos processos.

Por si só, um diagrama causal não permite verificar a dinâmica que emerge do comportamento dos sistemas. Tal só é possível com recurso ao simulador, que é construído a partir do diagrama causal utilizando os conceitos da Dinâmica de Sistemas para representação de *feedback* e interdependências entre variáveis.

3. Formulação de um modelo de simulação

Esta etapa será descrita nos capítulos IV e V

- Definição das condições iniciais e das inter-relações entre as variáveis;

Considerando o carácter sazonal da DM em Portugal, as variáveis foram definidas para cada ano epidemiológico, definido este como o período que decorre entre o dia um de Julho e 30 de Junho do ano seguinte. Deste modo foi possível obter uma configuração Gaussiana dos casos de infecção meningocócica, com o mais alto número de casos registados durante os meses de Inverno.

- Quantificação das variáveis


Para a quantificação de algumas das variáveis utilizadas no desenvolvimento do modelo foram estudadas experimentalmente as características da DM ocorrida em Portugal nos oito anos epidemiológicos que decorreram entre 2002-2003 e 2009-2010, particularmente a epidemiologia molecular da doença.

4. Validação do modelo


Esta etapa será descrita no capítulo V

A validação vai permitir assegurar que o modelo representa fielmente a realidade. A validação consiste em comparar estatisticamente as curvas produzidas pelo modelo com as produzidas a partir dos dados.





**Capítulo II- A doença meningocócica
como um sistema dinâmico**



1. Patogénese da doença meningocócica

Neisseria meningitidis é um comensal da nasofaringe humana. A transmissão entre indivíduos faz-se por contacto directo ou pela inalação, a uma distância inferior a um metro, de partículas de saliva contaminadas (Nelson *et al.*, 1996). Apenas uma minoria de portadores assintomáticos adoece (Figura 3).

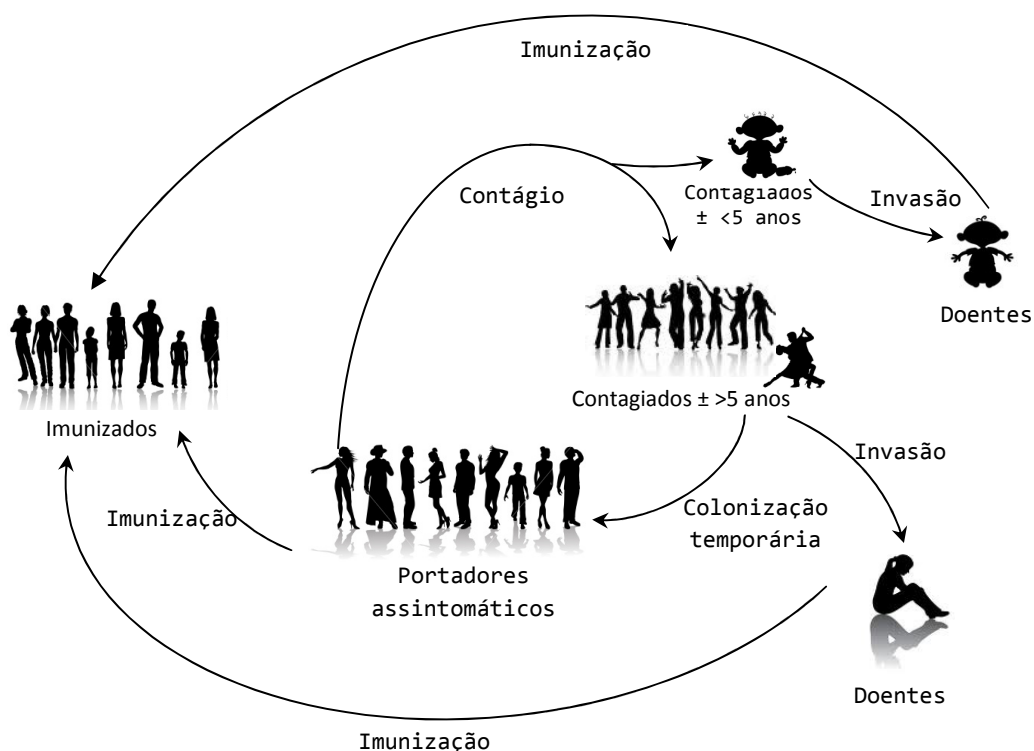


Figura 3 – Esquema de transmissão de meningococos. A dinâmica de colonização/invasão é diferente nas crianças e na restante população

A taxa de portadores resulta da combinação das características de virulência e facilidade de transmissão das bactérias e do tempo de colonização do hospedeiro. Não havendo uma proporção directa entre portadores e doentes, é certo que quanto maior for o número de portadores maior é o número de doentes.

Na Europa, a taxa de portadores é muito baixa nos primeiros anos de vida, aumenta abruptamente durante a adolescência atingindo taxas máximas entre os 20 e 24 anos.

Na população mais velha a taxa de portadores é inferior a 10% (Cartwright *et al.*, 1987; Blackwell *et al.*, 1990; Caugant *et al.*, 1994; Claus *et al.*, 2005; Christensen *et al.*, 2010).

O estado de portador pode ser transitório (30 a 40%), pode manter-se apenas durante alguns dias ou breves semanas (~33%) ou manter-se durante vários meses após o contágio (25%) (Stephens, 1999). Depois do contacto da bactéria com o hospedeiro, três situações podem acontecer:

1 - A bactéria pode manter-se como parte da flora comensal da nasofaringe. A evidência de níveis aumentados de IgA na saliva de portadores assintomáticos confirma que a imunização natural ocorre durante a fase de colonização da nasofaringe (Robinson *et al.*, 2002; Horton *et al.*, 2005). Embora não suficiente para impedir posterior colonização, a imunidade ao nível da mucosa parece ter um papel importante na prevenção da invasão das células epiteliais (Griffiss, 1995). Além da resposta local, há também uma resposta humoral com o aumento do nível de anticorpos com actividade bactericida específica, mas com alguma reactividade cruzada com estirpes heterólogas (Jones *et al.*, 1998; Kriz *et al.*, 1999; Jordens *et al.*, 2004). Compreende-se assim que a colonização da nasofaringe é desejável, uma vez que representa a possibilidade de imunização do hospedeiro e diminui o risco de DM (Goldscheider *et al.*, 1969b);

2 - A bactéria é rapidamente eliminada da mucosa do tracto respiratório superior;

3 - A bactéria invade a corrente sanguínea. A infecção ocorre quando os mecanismos naturais de defesa são ineficazes para controlar a multiplicação bacteriana na corrente sanguínea. Surge então meningococémia e, quando a bactéria atravessa a barreira hemato-encefálica e atinge o líquido cefalorraquidiano (LCR), causa meningite meningocócica. Na sequência da bacteriémia, podem também ser observadas outras manifestações clínicas como artrite ou pericardite.

Os mecanismos moleculares da relação entre meningococos e as células do sistema nervoso central são mal conhecidos, mas esta bactéria mostra uma preferência particular para se ligar às membranas meníngeas humanas e para se multiplicar no espaço subaracnoideu, onde o nível de componentes do complemento e de imunoglobulinas é naturalmente baixo, devido à barreira hematoencefálica (Tofte *et al.*, 1979) (Figura 4). Os meningococos multiplicam-se aí de forma descontrolada, e iniciam uma resposta inflamatória aguda (com libertação de citocinas), confinada ao espaço subaracnoideu, normalmente sem envolvimento cerebral. A inflamação resulta num exsudado acinzentado rodeando o cérebro, constituído predominantemente por leucócitos polimorfonucleares ou, numa fase tardia da infecção, por macrófagos e

linfócitos. Os polimorfonucleares infiltram-se na parede dos vasos no espaço subaracnoideu e trombos podem ocluir o lúmen vascular, vindo a causar danos

neurológicos. A inflamação também progride para o ouvido interno e, associada a trombose dos vasos sanguíneos locais, é muitas vezes causa de perda de capacidades auditivas (em cerca de 10% dos doentes).

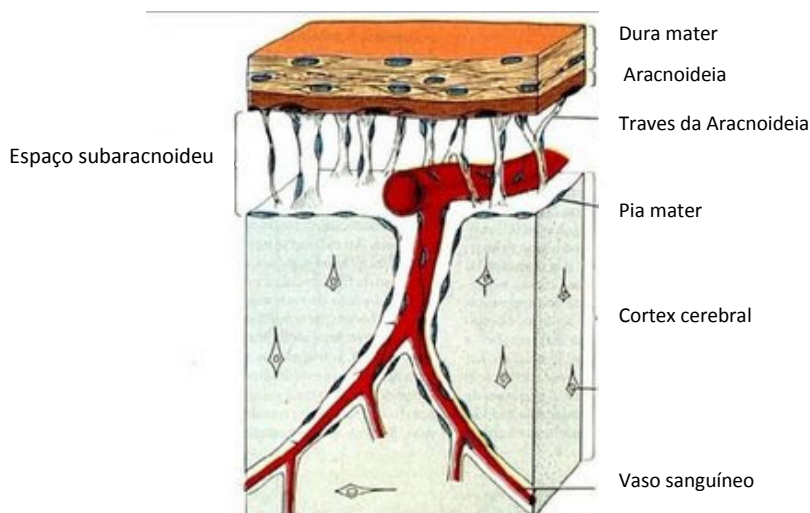


Figura 4 - Estrutura das meninges: três finas membranas sobrepostas que revestem e protegem o Sistema Nervoso Central. Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/>, data de acesso 02-08-2009

O contágio e o estado de portador são potenciados por comportamentos sociais tais como a frequência de bares, discotecas e o beijo íntimo. As lesões do trato respiratório superior são facilitadoras da passagem de meningococos comensais para a corrente sanguínea e, conseqüentemente, são factores de risco de DM. Incluem-se nas causas destas lesões a permanência em ambientes muito secos que provocam a secura da mucosa, trauma induzido pela inalação de poeiras em zonas geográficas secas e ventosas, infecções do tracto respiratório superior e os hábitos tabágicos (Stephens, 2007; MacLennan *et al.*, 2006; Coen *et al.*, 2006). O tabaco mostrou comprometer a actividade dos monócitos e macrófagos, aumentar a aderência das bactérias ao epitélio do tracto respiratório superior cujas células perdem a sua actividade ciliar e diminuir a produção de anticorpos circulantes (Cope *et al.*, 1992; Dye e Adler, 1994). *In vitro*, o fumo de tabaco inibe a migração dos neutrófilos, a fagocitose e a produção de imunoglobulinas (Cope *et al.*, 1992, Fischer *et al.*, 1997). Assim, quer pelo efeito mecânico que exerce sobre a mucosa quer pela diminuição da resposta imune, o fumo de tabaco pode fomentar o contágio ou a doença invasiva por *Neisseria meningitidis*.

A gripe (e outras infecções respiratórias de origem viral e bacteriana) faz aumentar o número de casos de DM, quer directamente pelas lesões que provoca nas mucosas que ficam assim mais vulneráveis à infecção bacteriana quer porque a tosse e os espirros que a acompanham facilitam a transmissão de meningococos entre indivíduos, aumentando assim o número de portadores (Figura 5) (Hament *et al.*, 1999).

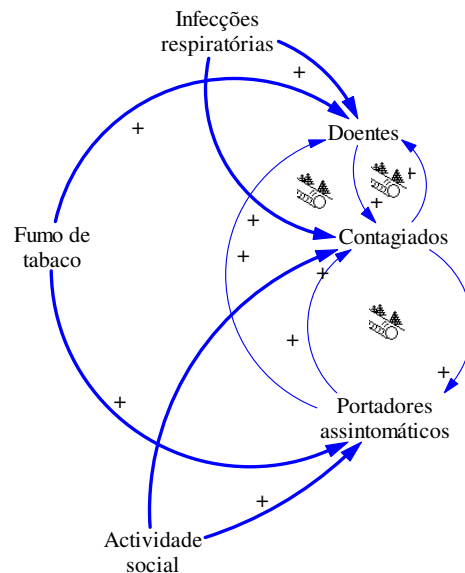


Figura 5 – DCC representativo de algumas das variáveis que contribuem para o sistema dinâmico de DM (a actividade social, os hábitos tabágicos ou exposição passiva ao fumo de tabaco e infecção respiratória), número de portadores assintomáticos, de contagiados e de doentes.

A infecção invasiva, depois da colonização nasofaríngea, é dependente de factores de virulência bacterianos e da susceptibilidade do hospedeiro.

A susceptibilidade individual à doença invasiva depende fundamentalmente do nível de anticorpos circulantes (Goldschneider *et al.*, 1969). Considerando que a maturidade do sistema imunitário, e consequentemente a produção de anticorpos, depende da idade, a DM é principalmente uma doença da infância. Deficiências no sistema imunitário aumentam o risco ou severidade da DM. Defeitos do sistema do complemento estão associados a DM recorrente ou fatal. A doença meningocócica está também associada a doenças debilitantes ou imunossupressoras como o síndrome nefrótico, hipogamaglobulinémia, esplenectomia e infecção por HIV (Figura 6).

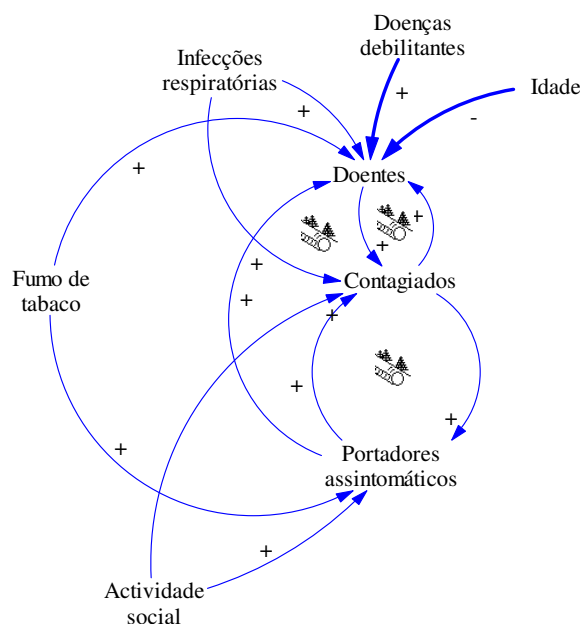


Figura 6 – DCC que adiciona à representação gráfica das inte-relações das variáveis já referidas anteriormente o efeito positivo das doenças debilitantes e negativo da idade da população

1.1 Base genética da virulência de meningococos

Algumas estirpes de meningococos, associadas ou não a altas taxas de transmissão, raramente causam doença e são isoladas normalmente de portadores assintomáticos. Outras estirpes, particularmente quando recém-introduzidas na população, embora podendo ser pouco transmissíveis estão associadas a altas taxas de infecção após o contacto com a nasofaringe, (Jones *et al.*, 1998). As metodologias moleculares aplicadas ao estudo dos meningococos abrem perspectivas para uma melhor compreensão da patogénese da doença meningocócica.

O sistema de classificação de meningococos com base em *multilocus sequencing typing* (MLST), fundamentado na comparação de sequências de DNA de genes *housekeeping*, evidencia que a grande maioria dos casos de DM são causados por um número limitado de estirpes geneticamente relacionadas, designadas por hiper virulentas (HV) (Maiden *et al.*, 1998). A razão para esta maior virulência de algumas estirpes começou recentemente a ser melhor compreendida com os estudos de Tinsley Nassif e colaboradores, a partir da sequenciação do genoma completo de estirpes patogénicas de *Neisseria meningitidis* (Tinsley *et al.*, 2001). As estruturas celulares que foram referidas anteriormente e se demonstraram necessárias para ocorrer doença invasiva,

como a existência de cápsula ou de pili do tipo IV, ou sistemas de aquisição do ferro, existem dispersas na população bacteriana, independentemente da sua capacidade de causar doença. Haverá então características ainda não completamente compreendidas que contribuem para a capacidade de alguns meningococos causarem doença.

Estudos baseados na comparação dos genomas de estirpes com diferentes potenciais de patogenicidade permitiram identificar genes particularmente associados a estirpes invasivas. Foi assim identificado um novo profago da família de bacteriófagos filamentosos (bacteriófago M13-like) integrado no cromossoma bacteriano e especificamente presente em estirpes hiper virulentas (Bille *et al.*, 2005). A essa ilha de patogenicidade com 8-kb chamaram MDA (*Meningococcal Disease-Associated*) e verificaram ser prevalente em estirpes isoladas de doentes com idade superior a dois anos (88% em isolados de crianças de 2-12 anos ou com mais de 28 anos e 93% em isolados de indivíduos de 13 a 28 anos) (Bille *et al.*, 2008).

Posteriores estudos moleculares demonstraram que o DNA fágico pode desintegrar-se do cromossoma, existir no citoplasma como DNA circular de cadeia dupla e sair da célula na forma de cadeia simples (cadeia +) por um mecanismo secretório mediado pelos pili. Existem múltiplos sítios de inserção no cromossoma e múltiplas cópias do fago no genoma (Moxon *et al.*, 2005).

Apesar de ter sido estabelecida esta relação DNA fágico-estirpe hiper virulenta, e de o profago ser, aparentemente, um factor de patogenicidade de *Neisseria meningitidis*, o papel do profago, nomeadamente a sua relação com a célula hospedeira, continua por ser compreendida (Tinsley *et al* 2006).

1.2 Factores de virulência bacterianos

O facto mais marcante da virulência dos meningococos é a sua capacidade de modelar a expressão dos seus antigénios de superfície, que podem sofrer variação de fase, podendo uma célula dar origem a um grande número de variantes que expressam proteínas com características estruturais e funcionais diferentes (variação antigénica). Assim pode a bactéria evadir-se do sistema imunitário do hospedeiro e modelar a adesão e invasão de diferentes células. Este fenómeno de variação de fase ocorre com uma frequência entre um e dez por 10 000 células e por geração (Taha e Deghmane, 2002).

1.2.1 Pili do tipo IV

São os pili do tipo IV que promovem a adesão de meningococos às células do hospedeiro. A adesão de *Neisseria meningitidis* às células epiteliais e endoteliais é um

passo determinante na infecção meningocócica (Chen *et al.*, 2011; Merz *et al.*, 2000) e foi reconhecida como um sinal para a transcrição de genes bacterianos (Cornelis, 1997).

A variação de fase e a variação antigénica da pilina tem implicações na virulência dos meningococos, e as alterações na estrutura primária alteram quer a imunoractividade da proteína quer o processo de adesão (Taha *et al.*, 2002).

A expressão de pilis do tipo IV e da proteína PilC1 é essencial no processo de adesão inicial (localizada) das estirpes capsuladas de *Neisseria meningitidis* às células alvo humanas (os pili são as únicas estruturas celulares capazes de atravessar a cápsula). Nesta fase, a bactéria encontra-se à superfície da célula epitelial rodeada por microvilosidades desta célula hospedeira (7).

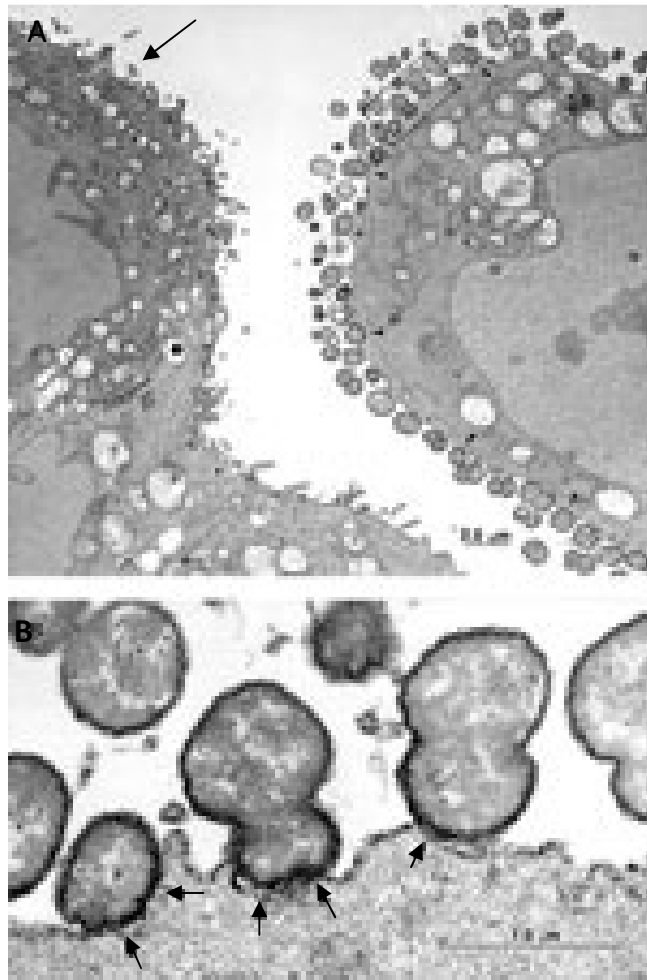


Figura 7 – Observação, em microscopia electrónica, de células epiteliais infectadas com *Neisseria meningitidis*. (A) Numerosas bactérias estão em contacto com a célula à esquerda. (B) A amplificação da imagem revela microvilosidades da célula epitelial a envolver a célula bacteriana. Fonte: Deghmane *et al.*, 2000.

Estabelecida a adesão inicial segue-se o processo de adesão íntima, durante a qual a bactéria é envolvida pela membrana celular da célula infectada e passa através do epitélio por um processo de endocitose (Nassif *et al.*, 1995). Nesta fase, verifica-se um efeito negativo na expressão de pilC1 e dos restantes genes que codificam as outras pilinas e a bactéria perde os pili. O gene *crgA* (contact-regulated gene A), cuja expressão é regulada pelo contacto com a célula do hospedeiro, parece ter esse papel regulador.

O gene *crgA* liga-se, durante a fase de adesão íntima, aos promotores dos genes *sia* (*polysialyltransferase genes*), envolvidos na biossíntese do ácido siálico capsular (serogrupos B, C, Y E W135), reprimindo assim directamente a síntese da cápsula.

1.2.2 Proteínas de membrana externa

Estão identificadas cinco classes de proteínas de membrana externa (classe 1 a 5) em *Neisseria meningitidis* (Tsai *et al.*, 1981). A identificação, nas células humanas, de receptores para as proteínas de classe 5, Opa e Opc, veio demonstrar a importância destas proteínas na fase de adesão íntima e na interacção da bactéria com a célula do hospedeiro.

Existem três a quatro cópias do gene *opa* em *loci* independentes e cada um está sujeito a variação de fase, devido a alterações no número de *tandem repeat* (CTCT)_n, resultando assim uma população bacteriana heterogénea, expressando uma ou várias proteínas Opa, ou mesmo nenhuma (Taha *et al.*, 2002). Este mecanismo permite à bactéria evadir-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro e torna esta proteína num mau alvo para o desenvolvimento de vacinas.

Todos os meningococos expressam proteínas de membrana externa de classe 1 (PorA) e de classe 2 ou classe 3 (PorB). Estas são proteínas das porinas que se sabe estarem envolvidas na interacção com as células humanas e serem alvo dos anticorpos bactericidas (Tzeng e Stephans, 2000). Também a expressão da proteína PorA está sujeita a variação de fase.

Constituem também importantes factores de virulência as proteases IgA1, que são proteínas de membrana externa capazes de clivar a imunoglobulina IgA1 na região de charneira, separando o fragmento de ligação ao antigénio (fab) e a zona constante (Fc) (Plaut *et al.*, 1975). A actividade desta exoenzima compromete a função de aglutinação dos anticorpos e os mecanismos de remoção promovidos pelas células da mucosa do hospedeiro.

Verificou-se existir uma maior actividade da protease IgA1 nas estirpes invasivas de *Neisseria meningitidis* do que nas estirpes isoladas de portadores assintomáticos,

independentemente do gene *iga* estar presente na quase totalidade das estirpes (Vitovski *et al.*, 1999).

A aptidão das bactérias na obtenção de ferro a partir dos organismos hospedeiros é um factor determinante para a sua capacidade de colonizar, multiplicar e infectar (Gorringe *et al.*, 2002). Também para os meningococos a aquisição de ferro é chave para a sua patogénese, bem patente pelos múltiplos sistemas de aquisição de ferro e múltiplos receptores proteicos para o ferro. Estas bactérias possuem receptores na membrana externa para a transferrina, lactoferrina, hemoglobina e um receptor (FetA) para o sideróforo enterobactin. Não sendo competentes para produzir os seus próprios sideróforos, os meningococos são capazes de reter os sideróforos produzidos por outras bactérias, incluindo os de *E. coli*.

Durante a fase de colonização da nasofaringe as principais fontes de ferro são a lactoferrina e transferrina. Possivelmente os sideróforos produzidos por outras espécies comensais da nasofaringe induzem a expressão de FetA, o que constitui uma vantagem para os meningococos. Esta espécie está bem adaptada à aquisição de ferro em circulação, pelos seus receptores para a transferrina e hemoglobina.

No soro de portadores assintomáticos foram detectados anticorpos circulantes para muitos dos receptores bacterianos que, reconhecidamente, são susceptíveis de sofrer variação de fase. Uma vantagem adicional dos múltiplos mecanismos de captura de ferro é a possibilidade de, com maior sucesso, a bactéria evadir-se do sistema imunitário (Gorringe *et al.*, 2002).

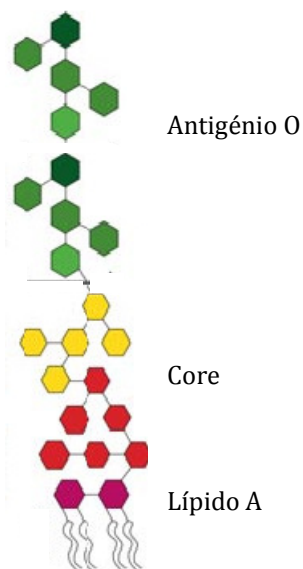
1.2.3 Cápsula polissacarídica

Os polissacáridos capsulares e a sua diversidade bioquímica são a base da serogrupagem de meningococos. Conhecem-se 13 serogrupos mas apenas cinco, os serogrupos A, B, C, W135 e Y, são responsáveis pela grande maioria de doença invasiva (Billker *et al.*, 2002). O serogrupo X está frequentemente implicado em doença invasiva em algumas regiões africanas mas muito raramente é identificado noutras áreas geográficas (Harrison *et al.*, 2009).

A cápsula polissacarídica é um dos principais factores de virulência presente na totalidade das estirpes invasivas. Protege a célula bacteriana da fagocitose, opsonização e da actividade bactericida mediada pelo complemento. A presença de cápsula faz diminuir a adesão às células epiteliais mediada pelas proteínas de membrana externa Opa e Opc (Billker *et al.*, 2002).

1.2.4 Lipooligossacáridos e endotoxina

Os lipopolissacáridos membranares de *Neisseria meningitidis* são mais curtos do que os de muitas espécies bacterianas e perderam cadeias repetitivas de antígeno O. São por isso designadas lipooligossacáridos (LOS) (Figura 8).



Estes componentes da membrana externa estão envolvidos na adesão bacteriana à mucosa e, conseqüentemente, potenciam a colonização. Os LOS apresentam uma elevada heterogeneidade estrutural inter e intra estirpes que resulta da variação de fase na expressão da glicosiltransferase que participa na sua biossíntese, o que se reflecte em diferenças imunoquímicas que são a base da classificação dos imunotipos de meningococos (Zollinger *et al.*, 1997, Billker *et al.*, 202).

Figura 8 - Representação esquemática de oligossacáridos de *N. meningitidis*

Adaptado de <http://www.biomin.net/pt/solucoes/gerenciamento-de-riscos-causados-por-endotoxinas/>

Consultado em Novembro 2011

As endotoxinas são importantes factores de virulência, libertados durante a multiplicação e lise dos meningococos sob a forma de vesículas de membrana externa, nas quais mais de 50% são LOS (Devoe *et al.*, 1973) (Figura 9).

Durante a infecção invasiva, estas estruturas, que são as maiores responsáveis pela indução da síntese de citocinas, podem ser visualizadas no plasma ou no LCR com recurso à microscopia electrónica (Brandtzaeg *et al.*, 1992). Os LOS são os mediadores chave na patogénese da sépsis fulminante e da meningite uma vez que a sua concentração no soro ou no LCR dos doentes está directamente relacionada com a gravidade e a evolução clínica da doença (Virji *et al.*, 1995; Kahler e Stephans, 1998).

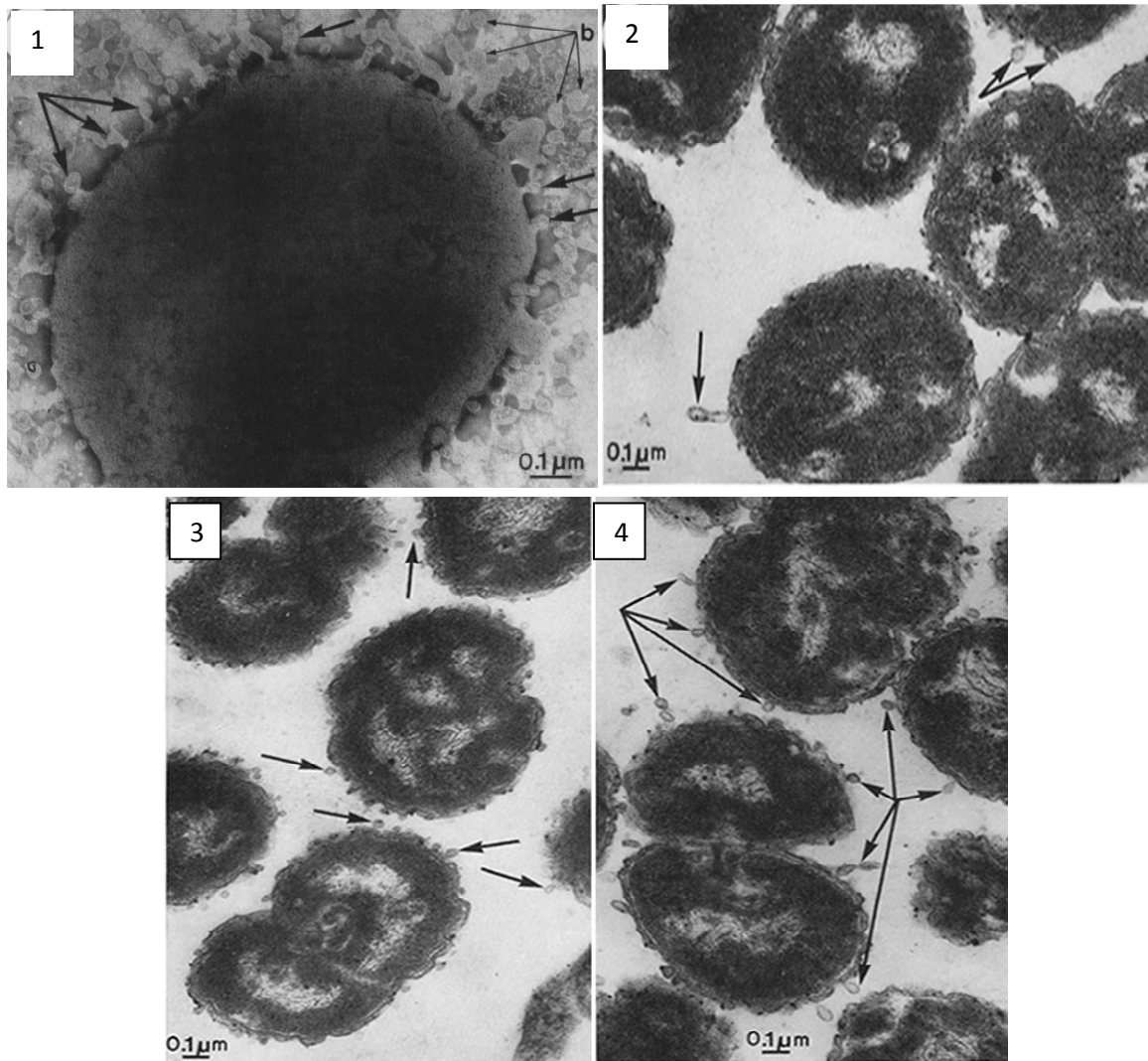


Figura 9 – *Neisseria meningitidis* em sobrenadante de cultura. (1) As setas mais densas apontam as invaginações da parede celular que constituem as vesículas de endotoxina. As setas mais finas apontam as vesículas de endotoxina libertada no meio (X 95 000). (2,3 e 4) As setas indicam vesículas de exotoxina ligadas e libertadas no meio (X 45 000). Fonte: Devoe *et al.* 1973.

1.3 Suscetibilidade do hospedeiro

1.3.1 Interação da bactéria com as células do hospedeiro

Nos portadores assintomáticos, a colonização mantém-se restrita à superfície da mucosa nasofaríngea devido ao papel protector da resposta humoral do sistema imunitário. O

estado de portador pode manter-se durante vários meses mas é normalmente transitório (Billker *et al.*, 2002). A fagocitose promovida pelos macrófagos que acorrem ao local, provoca a libertação de citocinas proinflamatórias, responsáveis por uma faringite ligeira associada à colonização. A evolução deste processo inflamatório localizado pode representar o fim da colonização ou favorecer a doença invasiva, por destruir a integridade da “barreira” epitelial.

As secreções nasofaríngeas contêm níveis altos de imunoglobulinas, umas produzidas localmente (IgA) e outras com origem sistémica (IgM e IgG), que controlam a colonização e a penetração nas células do epitélio, presumivelmente impedindo a adesão e invasão. Estes anticorpos específicos promovem uma protecção eficaz, contudo, porque a sua produção não é conseguida em menos de uma semana após colonização, a defesa inicial é dependente da resposta inata (Billker *et al.*, 2002).

1.3.2 Barreira física

Durante a fase de colonização da nasofaringe, a secreção de muco e a actividade das células ciliadas constituem uma barreira física à infecção invasiva. A colonização ou infecção do tracto respiratório superior por bactérias que inibem a actividade ciliar das células ciliadas do tracto respiratório (infecção por *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e outros), constituem um importante factor de virulência (Stephens *et al.*, 1986) e pode contribuir para o primeiro passo na colonização na mucosa da nasofaringe com *Neisseria meningitidis*.

Factores que afectam a integridade da mucosa, como o fumo de cigarro e infecções virais, aumentam o risco de contágio e de infecção invasiva (Cartwright *et al.*, 1991).

As imunoglobulinas IgA1, produzidas abundantemente pelas células da mucosa, ligam-se à superfície das bactérias, promovem a sua aglutinação e ligação à mucina, contribuindo assim para sua *clearence*. A clivagem das imunoglobulinas, já referida anteriormente (1.2.2 Proteínas de membrana externa), dá origem a fragmentos Fab ainda com alguma capacidade de se ligar a receptores bacterianos e ainda promover alguma protecção (Vidarsson *et al.*, 2005).

1.3.3 Imunidade inata

A activação do complemento (Figura 10) é um passo determinante na evolução da infecção meningocócica. A via alternativa de activação do complemento, que se inicia pela ligação directa do componente C3 à superfície da célula bacteriana, não requer a presença de anticorpos específicos, pelo que é mais rapidamente eficiente do que os mecanismos de defesa com origem na produção de anticorpos específicos bactericidas (Billker *et al.*, 2002).

A protecção promovida pelos anticorpos bactericidas inicia-se com a activação da via clássica do complemento. A ligação de C1q a Fc das imunoglobulinas (fragmento de ligação específica ao complemento de IgM, IgG1, IgG2 e IgG3) inicia a activação da via clássica do complemento. A activação subsequente dos componentes do complemento até aos componentes terminais C5-C9, conduz à lise da membrana bacteriana.

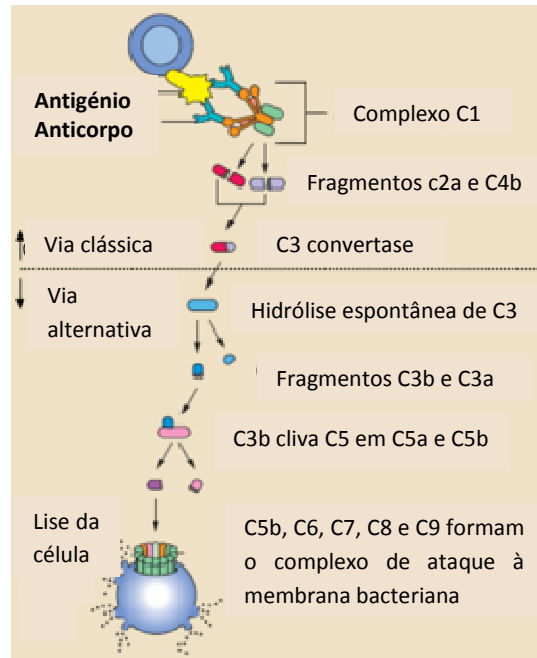


Figura 10 – Via clássica e via alternativa de activação do sistema do complemento (adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/Alternative_complement_pathway, data de acesso: Dez. 2009)

Deficiências congénitas ou adquiridas do complemento, como deficiências de C3 ou dos componentes terminais (C5 a C9) estão associadas a infecções meningocócicas recorrentes. Em adultos, 10 a 20% das infecções meningocócicas invasivas estão associadas a deficiências no complemento (Hoare *et al.*, 2002).

1.3.4 Resposta inflamatória e produção de citocinas

A sobrevivência e multiplicação dos meningococos na corrente sanguínea depende de factores de virulência bacterianos, como já anteriormente foi referido, mas também da fragilidade dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Na fase de infecção invasiva, os meningococos interagem com componentes do sistema imunitário do hospedeiro. Em particular a endotoxina libertada pelos meningococos é um potente indutor da resposta inflamatória e os neutrófilos, monócitos, macrófagos e as células endoteliais são os principais produtores de citocinas. A produção de citocinas, em particular IL-6 e TNF- α ,

capazes de induzir a produção de proteínas de fase aguda, a leucocitose e a activação do complemento, é um elemento chave neste processo e na evolução clínica da infecção meningocócica (Billker *et al.*, 2002).

1.3.5 Imunidade humoral

A incidência da DM está inversamente relacionada com o título de anticorpos específicos bactericidas em circulação. A mais alta taxa de incidência é verificada em crianças de seis a 24 meses de idade, nas quais os anticorpos maternos já desapareceram e a maturação do seu sistema imunitário ainda não está completa (Goldschneider *et al.*, 1969). Durante a vida, a produção de anticorpos específicos é induzida pela colonização repetida e intermitente com diferentes estirpes de meningococos e até com *Neisseria lactamica*. A produção de anticorpos também é induzida durante a doença invasiva.

Nas crianças, a presença de meningococos no trato respiratório superior é rara. Pelo contrário, a bactéria *Neisseria lactamica* é um comensal frequente neste grupo etário. Pelo facto de se desenvolver imunidade natural aos meningococos durante a infância, presume-se que a presença de *N. lactamica* deva ter um papel importante processo de imunização natural (Bennett *et al.*, 2008). Algumas bactérias, como *Escherichia coli* K1 e *Bacillus pumilus*, têm cápsula estrutural e imunogénicamente idêntica aos polissacáridos capsulares de meningococos. Tal facto sugere que a presença destas bactérias entéricas possa contribuir para a defesa contra infecção meningocócica invasiva, devido à produção de anticorpos com reactividade cruzada (Kasper *et al.*, 1973, Vann *et al.*, 1976).

A mobilidade da população humana, nomeadamente pelos fenómenos de imigração ou do turismo, promove a dispersão geográfica de estirpes de meningococos e a introdução de novos génotipos no país. Os grandes eventos como os festivais de música ou acontecimentos desportivos, que fazem mover muitos participantes que são na sua grande maioria jovens (o grupo etário onde a taxa de portadores é mais elevada), constituem uma oportunidade para aumentar essa dispersão. Os novos portadores transmitem novas estirpes a uma população não naturalmente imunizada para essas novas estirpes, que fica por isso mais vulnerável à infecção. Dependendo das características de virulência das estirpes e da sua capacidade de colonização/transmissão, as consequências dos movimentos populacionais são, a curto prazo, difíceis de estimar, mas têm sido causa de surtos e epidemias no mundo inteiro (Figura 11).

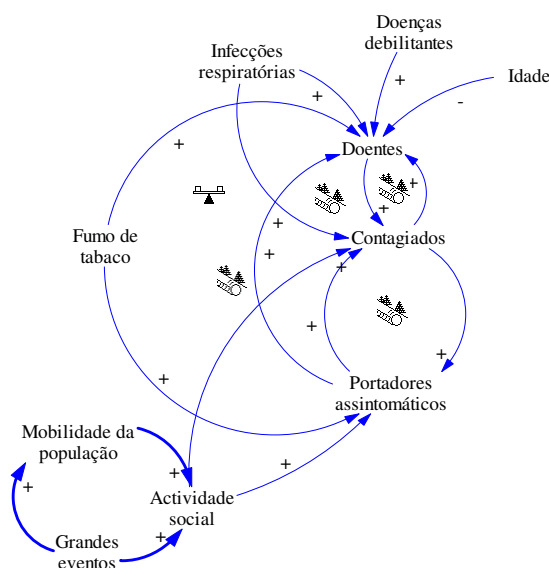


Figura 11 - DCC representativo das interrelações de algumas das variáveis que afectam a epidemiologia DM, com enfoque na mobilidade de populações, frequentemente aumentada devido à realização de grandes eventos que são eles próprios justificação para o aumento da actividade social e aproximação entre pessoas

A prevenção da doença, quando possível, faz-se por indução de imunidade que resulta da vacinação, específica para o grupo capsular para o qual a vacina se dirige.

Constata-se que a ocorrência de surtos ou de casos relacionados de DM gera a atenção dos meios de comunicação social e da opinião pública, o que constitui frequentemente um mecanismo de pressão para a implementação mais alargada de medidas de controlo, nas quais se incluem a profilaxia antibiótica oferecida aos contactos dos casos índice e a vacinação da população susceptível, com o fim de interromper a transmissão em cadeia da estirpe envolvida (Figura 12). Uma profilaxia adequada (não necessariamente alargada a um elevado número de indivíduos) implica a utilização precoce de antibióticos com penetração na mucosa do tracto respiratório e aos quais os meningococos sejam sensíveis.

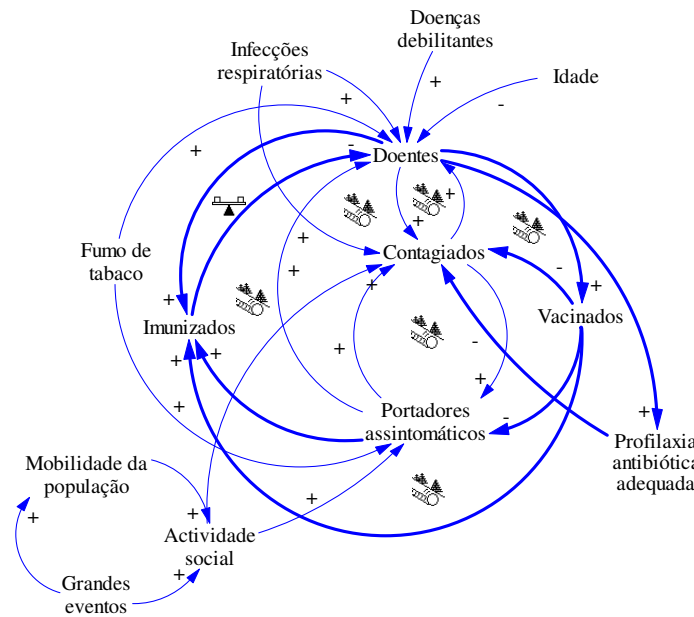


Figura 12 – DCC representativo das interações das variáveis que afectam a epidemiologia da DM. O aumento do número de casos frequentemente causa alarme público que constitui um mecanismo de pressão para vacinação em massa.

1.4 Sequelas e letalidade

Depois de atravessar a mucosa e atingir a corrente sanguínea, os meningococos podem dar origem a vários tipos de infecções que evoluem de forma diferente. Raramente causam uma meningococcemia benigna e transitória. A forma mais frequente da infecção localizada é a de meningite. Sem tratamento antibiótico a infecção é fatal. Embora a taxa de mortalidade dependa, entre outros factores, da precocidade com que se inicia a terapêutica antibiótica, a mortalidade de meningite meningocócica é de cerca de 2%.

A mais alta taxa de mortalidade verifica-se nos quadros de sepsis fulminante (40 a 50%) e de septicémia (cerca de 20%), na sequência de shock. Petéquias e rash são os sinais característicos de sepsis meningocócica sendo a sua extensão um indicador da gravidade da doença.

A maioria dos doentes apresentam manifestações clínicas de meningite e sepsis, com petéquias e hemoculturas positivas. A mortalidade neste grupo de doentes situa-se entre a de meningite e a de sepsis.

As infecções com localização diferente da anteriormente referida são principalmente pneumonia, artrite e pericardite. A mortalidade destas infecções localizadas é baixa.

As sequelas graves ocorrem em 8 a 10% dos sobreviventes e são mais frequentes em infecções por meningococos do serogrupo C. Entre as sequelas mais frequentes de meningite contam-se a surdez (6,4%), atraso psicomotor (2,1%) e zumbidos (1,4%), mas estas são pouco frequentes quando comparadas com sequelas de outras causas de meningite bacteriana. As sequelas de sepsis meningocócica são graves. Resultam de trombose vascular e deficit na circulação periférica que dão origem a necrose da pele e isquémia periférica. Dos sobreviventes de sepsis, 3-4% fazem amputação de membros e esta proporção aumenta para 14 a 39% nos casos de *shock séptico* (Riordan *et al.*, 2001).

Se é certo que a hipervirulência das estirpes está associada a uma mais elevada capacidade de invasão da corrente sanguínea e evasão dos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, não existe uma relação directa entre mortalidade e hipervirulência. A mais elevada taxa de letalidade é observada em indivíduos com mais de 65 anos, grupo etário no qual é esperado registar-se maior número de comorbilidades.

A ocorrência de casos fatais de DM é frequentemente notícia na comunicação social pelo que constitui uma forma de pressão da sociedade sobre os decisores de políticas de saúde e promove frequentemente o reforço das medidas profiláticas, quer pela vacinação (quando aplicável) quer com antibioterapia (Figura 13).

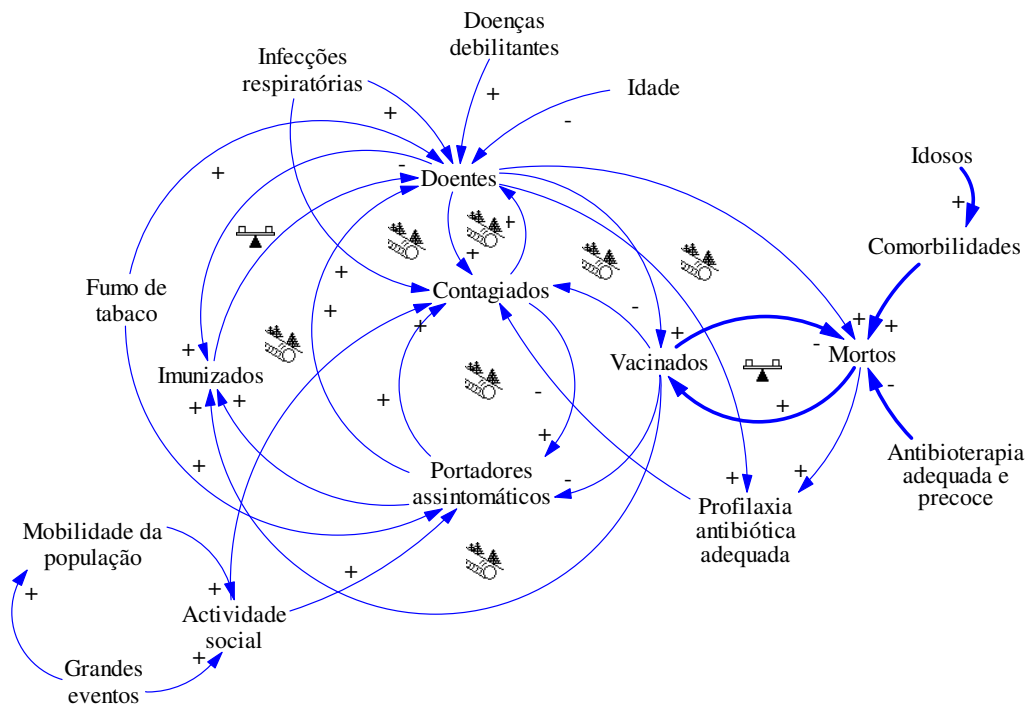


Figura 13 - DCC representativo das interações entre as variáveis que afectam a epidemiologia da DM, com enfoque nas variáveis que afectam o número de mortos e na influência que a mortalidade (particularmente em crianças e adolescentes) tem no reforço de medidas profiláticas

O aparecimento de resistências aos antibióticos, particularmente à Penicilina, constitui um risco para o controlo da infecção e justifica a monitorização das concentrações inibitórias mínimas que tem sido implementada nos países da comunidade europeia.

2. Profilaxia e tratamento da doença meningocócica

A dinâmica da DM, bem como a evolução clínica dos casos, é marcadamente influenciada pela eficácia das medidas de controlo adoptadas. Em boa parte, a emergência de surtos ou de epidemias resulta da capacidade de transmissão e de invasão da estirpe bacteriana responsável pelo caso índice, mas a não adopção de medidas de contenção contribui para a dispersão geográfica e temporal da estirpe invasiva.

Constituem medidas básicas de controlo a vacinação dos indivíduos susceptíveis e a profilaxia antibiótica administrada a indivíduos que contactaram de perto com doentes.

2.1 Vacinas

A infecção invasiva por meningococos ocorre na ausência de anticorpos bactericidas específicos. A vacinação é a forma mais eficaz de prevenir a doença.

O aumento do número de casos de DM por serogrupo C, registados na década de 1990 por toda a Europa, implicou a implementação de políticas de vacinação em alguns países. A vacina até então disponível, e largamente utilizada na contenção de surtos e epidemias, era a de polissacáridos purificados específicos de serogrupos. Esta vacina não tem eficácia em crianças com menos de dois anos nem confere memória imunológica em adultos (Gotschlich *et al.*, 1969). A produção de vacinas conjugadas, primeiramente para *Haemophilus influenzae* tipo b, o reconhecimento da sua eficácia em crianças com idade inferior a dois anos e a estimulação dos linfócitos T com indução de memória imunológica, encorajou os investigadores a utilizar o mesmo conceito no desenvolvimento de vacinas para meningococos (Trotter *et al.*, 2007).

2.1.1 Vacinas para meningococos do serogrupo C

As primeiras vacinas conjugadas para meningococos do serogrupo C (MenC) foram desenvolvidas e introduzidas no mercado do Reino Unido em 1999. Poucos anos depois foram licenciadas vacinas conjugadas quadrivalentes, conferindo protecção para os serogrupos A, C, W135 e Y.

Em Portugal a vacina MenC foi comercializada em 2001 e introduzida no PNV em Janeiro de 2006. Estão comercializadas três marcas de vacinas conjugadas com a toxina mutante diftérica ou com o toxoide tetânico (DGS 2005a, DGS 2005b). São recomendadas três doses, nas idades 3, 5 e 15 meses. Se a data de início da vacinação se situar entre os 10 e

11 meses, são recomendadas apenas 2 doses, sendo a segunda dada após os 12 meses. Para indivíduos que iniciam a vacinação após os 12 meses, recomenda-se a administração de apenas uma dose. Simultaneamente, em 2006 foi efectuada vacinação complementar em regime de campanha a crianças nascidas entre Janeiro de 1997 e Setembro de 2004 (2 a 9 anos) que tivessem recebido uma ou nenhuma dose antes dos 12 meses de idade. Em 2007, a campanha estendeu-se até aos 18 anos de idade (DGS 2005b).

A vacina conjugada para o serogrupo C tem uma eficácia que se estima ser superior a 90% (Alonso 2001, Ramsay *et al.*, 2001). Estudos de vigilância e monitorização dos efeitos da vacina vieram revelar que, para além da protecção directa resultante da imunização, a vacina contribui indirectamente para o controlo da infecção meningocócica por se observar uma redução na incidência da infecção na população não vacinada (Ramsay *et al.*, 2003). Num estudo levado a cabo no Reino Unido, entre Julho de 2001 e Junho de 2002, Ramsay observou uma redução de 67% na taxa de ataque na população não vacinada, consistente com a redução da taxa de portadores de estirpes do serogrupo C. Este fenómeno é designado como protecção de grupo (Ramsay *et al.*, 2003).

2.1.2 Vacina para meningococos do serogrupo B

O desenvolvimento de vacinas para meningococos do serogrupo B (MenB) tem constituído um desafio, uma vez que os polissacáridos capsulares B são fracamente imunogénicos e a sua utilização em vacinas representaria um risco para doença auto-imune, devido à semelhança entre o ácido poli-siálico capsular e os resíduos glicosil de proteínas de adesão das células neuronais humanas (Finne *et al.*, 1983; Feavers *et al.*, 2009).

Até ao presente, as vacinas preparadas com base nas vesículas de membrana externa de estirpes selvagens são as únicas que têm demonstrado eficácia contra meningococos do serogrupo B que, desde o final da década de 1980, têm causado epidemias devido a um subtipo predominante, que persistem durante décadas em Cuba, Noruega, Chile, Brasil e Nova Zelândia (Tabela 1), (Sierra *et al.*, 1991; Vermont *et al.*, 2003; Findlow *et al.* 2006; Boutriau *et al.*, 2007; Holst *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Países onde têm sido utilizadas vacinas com base em vesículas de membrana externa de meningococos e fenótipo das estirpes utilizadas na sua preparação

Países onde a vacina foi ensaiada	Vacina
Chile	B:15:P1.3
Cuba, Brasil, Chile	B:4:P1,19,15 (Monovalente VA-MENGOC-BC)
Cuba	B:4:P1.19,15 + B:4:P1.7-2,4 (Bivalente)
Noruega	B:5-2,10 + B:12-1,13 + B:7-2,4 + B:19,15-1 + B:7,16 + B:5-1,2-2 (Hexavalente)
Noruega	B:4:P1.7,16 (Monovalente MenBvac®)
Noruega, Nova Zelândia	B:4:P1.7-2,4 (Monovalente MenZB®)
Noruega	B:15:P1.7,16 (Monovalente)

Dos constituintes das vesículas de membrana externa, representados de forma esquemática na figura 14, a proteína PorA é a mais imunogénica, pelo que a resposta de anticorpos é quase exclusivamente dirigida aos epítomos desta proteína, particularmente em crianças (Holst *et al*, 2009).

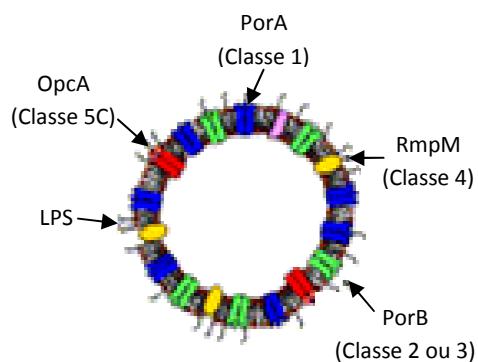


Figura 14 - Representação esquemática de uma vesícula de membrana externa e dos principais constituintes da vacina anti meningococos do serogrupo B (adaptado de Holst *et al*, 2009)

Nestas porinas, que existem apenas na espécie *meningitidis*, existe uma grande variabilidade nas sequências aminoácidas das zonas variáveis 1 e 2, localizadas respectivamente nas ansas I e IV da molécula proteica em folha β . Os anticorpos anti-ansas de superfície I e IV são bactericidas e promovem protecção pela activação da via do complemento (Derrick *et al* 1999). A grande variabilidade genética entre a população bacteriana inviabiliza o uso alargado destas vacinas.

2.1.3 Novas vacinas em desenvolvimento

Idealmente, uma vacina MenB deverá ser segura e imunogénica na população pediátrica, promover protecção contra uma grande variedade de estirpes e ser fácil de preparar em larga escala.

A investigação em curso sobre esta matéria demonstrou haver a possibilidade de reactividade cruzada induzida por antigénios de meningococos B. Sendo já possível identificar, a partir do genoma completo, as sequências aminoacídicas de antigénios (vacinologia reversa), o desafio é agora reconhecer a combinação correcta de antigénios de modo a desenvolver uma vacina universal anti meningococos do serogrupo B (Poolman *et al.*, 2002).

Foram já identificadas e produzidas em *E. coli* novas proteínas de membrana externa (proteínas e lipoproteínas conservadas de superfície, adesinas e toxinas putativas), que são alvos promissores para novas vacinas. Presentemente, encontra-se em fase III de ensaios clínicos a vacina *Multicomponent Meningococcal Serogroup B Vaccine* (4CMenB, Novartis) dirigida a meningococos do serogrupo B, que contem três proteínas recombinantes seleccionados com base na sua capacidade de induzir anticorpos bactericidas promotores de uma protecção alargada: NHBA (Neisseria Heparin Binding Antigene), NadA (Neisserial adessin A) e fHbp (factor H binding protein), construídas a partir de externa proteínas de membrana de uma estirpe com o subtipo P1.7-2,4, nas quais a proteína PorA é imunodominante. Prevê-se que a sua produção com adjuvante apropriado proporcione uma eficácia superior a 95% (Welsch *et al.*, 2003, Giuliani *et al.*, 2006, <http://www.novartis.com/newsroom/media-releases/en/2010/1443940.shtml>, consultado em Dezembro 2010).

Actualmente, as vacinas baseadas em *N. lactamica* (comensal em crianças e capaz de promover imunidade natural aos meningococos) e nas suas proteínas de membrana externa ou vesículas de membrana externa, são também alvo de investigação (Oliver *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Porque não possuem polissacárido capsular nem proteína PorA, esta bactéria comensal pode ser utilizada em vacinas anti-meningocócicas, independentes do serotipo e subtipo da estirpe alvo (Bennett *et al.*, 2008).

2.2 Tratamento

Embora a introdução da terapêutica antibiótica tenha melhorado enormemente o prognóstico dos doentes, a morbidade e mortalidade associada à doença meningocócica mantém-se alta. A prioridade no tratamento destes doentes implica o rápido diagnóstico e início de terapêutica antibiótica adequada, para prevenir a progressão da infecção para choque séptico. Esta é a principal causa de morte em

infecção invasiva por *Neisseria meningitidis*. Mais raramente a morte ocorre por aumento da pressão intracraniana.

Numa fase precoce da doença, e na ausência de sinais e sintomas específicos (rigidez da nuca ou presença de petéquias), os pais e outros responsáveis podem negligenciar a procura de cuidados médicos. Nas unidades de saúde, o diagnóstico, se realizado por clínicos pouco experientes, pode ser confundido com o de doenças febris sem gravidade, frequentes na infância (Sorensen *et al.*, 1992).

Embora muitos antibióticos tenham actividade *in vitro* contra os meningococos, apenas os que têm suficiente penetração no líquido cefalorraquidiano devem ser utilizados. As drogas de eleição são a Penicilina a Ampicilina e o Ceftriaxone. O uso do Ceftriaxone é recomendado pela OMS desde 1997 para o tratamento empírico de meningite bacteriana devido ao seu largo espectro e à sua longa semi vida (8 horas no soro, 14 horas do LCR), pelo que é de cómoda administração com toma única diária durante um período de apenas um a dois dias (OMS, 2007). Em países de fracos recursos a primeira escolha é frequentemente o cloranfenicol, privilegiando o seu baixo custo em desfavor da sua toxicidade. O trimethoprim-sulfametoxazole não deve ser utilizado no tratamento empírico dado o número cada vez mais elevado de estirpes resistentes. Nos países industrializados os antibióticos de primeira escolha são β lactâmicos. Em Portugal não existem recomendações para o tratamento da DM, mas os esquemas terapêuticos adoptados nos diferentes serviços hospitalares não divergem significativamente das propostas pela OMS (Tabela 2) (Anónimo, OMS 1998).

Tabela 2 - Antibióticos utilizados no tratamento empírico de meningite bacteriana

Antibiótico	Dose		Via de administração	Duração
	Crianças	Adultos		
Penicilina G	400 000 U/Kg	3-4 MU*/4 a 6 h	Intra venosa	≥4 dias
Ampicilina ou Amoxicilina	250mg/Kg	2-3g /6horas	Intra venosa	≥4 dias
Ceftriaxone	50-80mg/Kg	1-2g/12a24h	Intra venosa	≥4 dias
Cefotaxima	250 mg/kg	2 g q. 6 h	Intra venosa	≥4 dias

*Mega Unidades

Dados da literatura de referência indicam que existe um número cada vez maior de estirpes de meningococos com susceptibilidade diminuída à penicilina G. Essas estirpes, que foram inicialmente identificadas em Espanha em 1985, são designadas como Pen^I, resultam de modificações das PBP 2 que traduzem alterações no gene *penA*. Definem-se como tendo uma CMI entre 0,094 mg/L e 2 mg/L (Taha M-K *et al.*, 2006). As estirpes produtoras de β lactamases são muito raras e foram isoladas em Espanha, África do Sul

e Canadá. A CMI à Penicilina destas estirpes nunca é inferior a 2 mg/L, podendo mesmo ultrapassar valores de 256 mg/L. Uma CMI superior a 1mg/L conduz a falência terapêutica uma vez que este limiar corresponde à concentração do antibiótico no LCR durante a terapêutica com Penicilina G (Taha M-K *et al.*, 2006).

Em França, 33% das estirpes de meningococos são já Pen^I e em Espanha essa percentagem é ainda maior (37%) (Antignac *et al.*, 2003; Taha *et al.*, 2006). A diminuição da sensibilidade de meningococos ao Ceftriaxone não está documentada.

2.3 Quimioprofilaxia

A severidade da doença meningocócica e a fácil transmissão do agente infeccioso entre os contactos de um caso índice, exigem estratégias eficazes de controlo da infecção. A quimioprofilaxia está indicada nos contactos próximos de cada doente para erradicação de *Neisseria meningitidis* da nasofaringe de portadores e, conseqüentemente, para interromper a sua transmissão. Só é eficaz se forem administrados antibióticos que atingem níveis séricos apropriados e a aplicação tópica (faríngea) de antibióticos não produz efeito. Administra-se preferencialmente nas primeiras 24 horas que se seguem à hospitalização do doente, não sendo recomendada após o décimo dia de aparecimento do caso inicial. A droga de eleição é a Rifampicina, embora esteja contra-indicada nos casos de hipersensibilidade à droga, antecedentes de hepatopatia grave, porfiria e alcoolismo. Como fármacos alternativos recomendam-se a Ciprofloxacina nos adultos e o Ceftriaxone nas grávidas (DGS, 1999).

Na ausência de recomendações de sociedades científicas, cada país tem adoptado esquemas de profilaxia próprios. Em Portugal o esquema profilático a observar é o seguinte (Tabela 3) (DGS, 1999) :

Tabela 3 - Antibióticos usados em profilaxia da doença meningocócica (DGS, 1999)

Antibiótico	Dose			Via de administração	Duração
	<1 mês	≥1 mês	≥18 anos		
Rifampicina	5 mg/Kg /12h	10 mg/Kg/12h	600 mg/12h	Oral	2 dias
Ciprofloxacina	-	-	500 mg/24h	Oral	dose única
Ceftriaxone*	125 mg	125 mg	250mg/24h	Intramuscular	dose única

*Droga de eleição na grávida

A Rifampicina deve também ser administrada aos doentes antes da alta hospitalar sempre que o tratamento da doença invasiva tiver sido feito com antibióticos que não evitem o estado de portador (Penicilina e Cloranfenicol) (DGS, 1999).

Relativamente a estes antibióticos utilizados na profilaxia dos contactos, não está documentada resistência dos meningococos à Ciprofloxacina e, embora raras, a literatura refere estirpes resistentes à Rifampicina isoladas de doentes e de portadores sujeitos a quimioprofilaxia com este antibiótico (Stefanelli *et al.* 2001).



**Capítulo III- Variabilidade genética
de *Neisseria meningitidis***



1 **Biologia da população de *Neisseria meningitidis***

Conhecer a população de *Neisseria meningitidis* implica conhecer as variações, qualitativas e quantitativas, que ocorrem na população natural. As metodologias moleculares hoje disponíveis são um instrumento essencial no estudo da biologia de populações, pois permitem detectar diferenças genéticas nas estirpes bacterianas. Constitui um desafio saber a contribuição relativa dos processos que geram essas variações, principalmente mutações pontuais e recombinação, e das forças que subsequentemente determinam a evolução, nomeadamente selecção e evolução genética (Feil *et al.*, 2001).

Neisseria meningitidis tem uma competência natural para alterações genéticas. O processo de transformação, mais do que os de conjugação ou de transdução, é o que mais contribui para a variabilidade genética observada nesta espécie e dá origem a alterações bem localizadas (Feil *et al.*, 2001).

A troca de material genético implica a presença simultânea de diferentes estirpes no mesmo nicho. Os meningococos, como comensais frequentes da nasofaringe humana, têm oportunidade de “receber” material genético de outros meningococos de colonização e até mesmo de outras espécies comensais de *Neisseria* que co-existem no mesmo nicho.

Apesar da elevada taxa de recombinação genética e, conseqüentemente, da grande diversidade genética da população de meningococos, reconhece-se o carácter clonal raro das estirpes invasivas. Maynard Smith sugere que a população de meningococos está dividida em duas partes: 1) uma população natural livremente recombinante, constituída por um grande número de génotipos pouco frequentes; 2) clones (e complexos clonais) bacterianos recentemente emergidos, ecologicamente bem sucedidos (Smith *et al.*, 1993). Esse sucesso revela-se nos estudos de caracterização de estirpes invasivas e isoladas de portadores assintomáticos, quando se observa que esses clones são os mais frequentes em portadores e os mais transmitidos, independente da sua capacidade de causar doença invasiva (Smith *et al.*, 1993). Embora se desconheçam as razões da facilidade de transmissão desses clones, é possível que a resposta imune do hospedeiro exerça alguma influência. O sucesso das estirpes mais virulentas resulta do facto de estas serem as mais frequentemente isoladas no laboratório clínico, independentemente de elas poderem ser raras no total da população.

A vigilância epidemiológica e as decisões em saúde pública requerem métodos de caracterização fiáveis, que permitam observar a dispersão bacteriana entre indivíduos, quer sejam estes portadores assintomáticos quer sejam doentes.

Os primeiros métodos de caracterização de meningococos foram os imunológicos, que detectavam variações na cápsula, nas proteínas de membrana externa e nos lipo-oligossacáridos (Frasch *et al.*, 1985). As características antigénicas dos polissacáridos capsulares são a base da classificação de serogrupos de meningococos. A diversidade antigénica das proteínas de membrana externa de classe 1 permite a classificação do subtipo e as de classe 2 e 3, a definição do tipo. Os lipo-oligossacáridos podem distinguir-se pelas suas características antigénicas nas quais se baseia a classificação do imunotipo.

A caracterização bacteriana com base nas características fenotípicas das estirpes comporta numerosas limitações, nas quais se incluem um limitado painel de anticorpos monoclonais disponível, sempre insuficiente quando se trata de uma bactéria com uma tão alta taxa de recombinação genética. Além da diversidade genética, os meningococos exibem frequentemente variação de fase o que torna inadequados os métodos fenotípicos de caracterização. Estes métodos têm uma fraca reprodutibilidade intra e inter laboratórios, os resultados dificilmente podem ser comparados entre laboratórios e não possibilitam a “quantificação” das relações genéticas entre estirpes bacterianas.

Os métodos moleculares de tipagem devem ser fortemente discriminativos, de modo a ser possível evidenciar que estirpes com um recente ancestral comum têm um mesmo, ou muito semelhante, tipo molecular. Este alto poder de discriminação pode conseguir-se pela identificação de regiões genómicas altamente variáveis (ribotipia, electroforese em campo pulsado, etc.) ou pela identificação de variações lentamente acumuladas no genoma, sem consequências na viabilidade bacteriana (*multilocus enzyme electrophoresis* e *multilocus sequence typing*) (Maiden *et al.*, 1998). Este último tipo de técnicas é essencial para manter uma vigilância epidemiológica a longo prazo.

1.1. Caracterização de estirpes

Os constituintes antigénicos relevantes, úteis para a caracterização de *Neisseria meningitidis*, localizam-se na parede celular: na cápsula polissacarídica e na membrana externa da parede bacteriana (Figura 15).

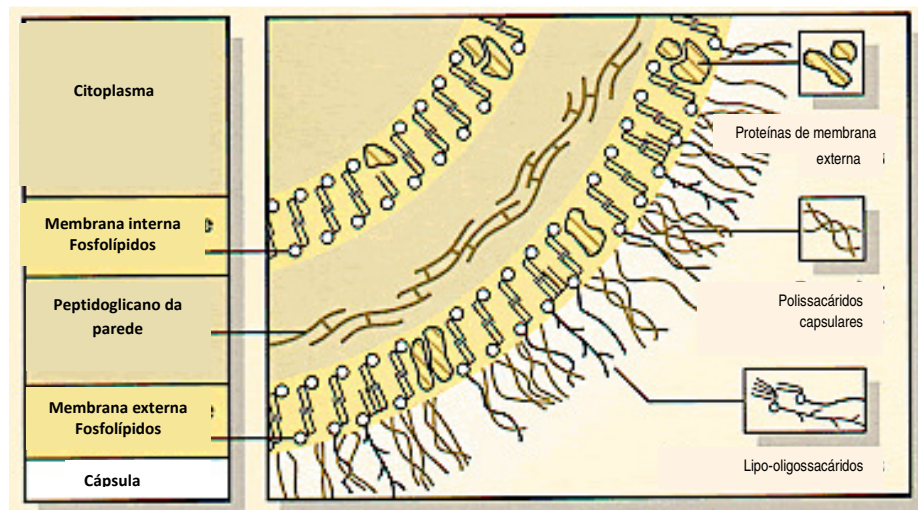


Figura 15 – Estrutura da parede celular de meningococos. (Adaptado de: http://www.chori.org/Principal_Investigators/Moe_Gregory_R/moe_research.html; data de acesso Março de 2011)

1.1.1. Caracterização do grupo

São conhecidos 13 serogrupos, cinco dos quais estão associados a estirpes invasivas (serogrupos A, B, C, Y e W135) (Branham, 1953). As estirpes dos serogrupos A, B e C causam aproximadamente 90% de todas as infecções no mundo. As restantes são causadas por estirpes W135 e Y (Schwartz *et al.*, 1989). Muito raros e restritos apenas a algumas zonas geográficas, são os serogrupos X, Z e 29E.

Os genes que codificam as enzimas necessárias à biossíntese dos polissacáridos capsulares de *N. meningitidis* fazem parte de um complexo génico dentro do gene *cps* (Edwards *et al.*, 1994). Neste complexo génico existem cinco regiões funcionais designadas de A a D. A região A contém genes específicos de grupo com variantes do gene *siaD* que codifica para a síntese da polisialiltransferase necessária à síntese do ácido siálico capsular dos grupos B, C, W135 e Y (Claus *et al.*, 1997). O polissacárido do serogrupo A não contém ácido siálico. A biossíntese da cápsula A é controlada por uma *cassette* de genes contendo quatro *open reading frames*, designadas *sacA* a *sacD*, provavelmente responsáveis pela polimerização do *N*-acetil-D-manosamina fosfato, que não foram encontrados no genoma de meningococos de outros serogrupos (Molling *et al.*, 2002).

1.1.2. Caracterização de proteínas de membrana externa

O antígeno alvo da sero-subtipagem é a proteína de classe 1 da membrana externa PorA, uma das porinas inseridas na parede celular (Hitchcock, 1989). A análise de sequências nucleotídicas do gene *porA* de estirpes de referência de *N. meningitidis*

demonstrou que a diversidade antigénica do subtipo residia em zonas com sequências peptídicas variáveis da proteína PorA. Estas regiões variáveis correspondem a ansas expostas para o exterior, na estrutura da proteína (Figura 16 e Figura 17) (Maiden *et al.*, 1991).

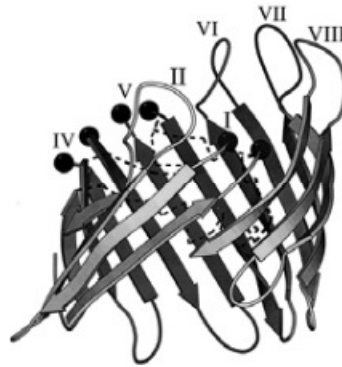


Figura 16 - Modelo molecular da porina PorA. As 8 ansas projectam-se na superfície da membrana celular (Fonte: Derrick *et al.*, 1999).

Existem na molécula proteica duas regiões variáveis, designadas por VR1 e VR2, e uma região semi variável, designada por VR3, correspondendo respectivamente às ansas I, IV e V. Estas zonas variáveis explicam a grande diversidade de sero-subtipos que os meningococos apresentam.

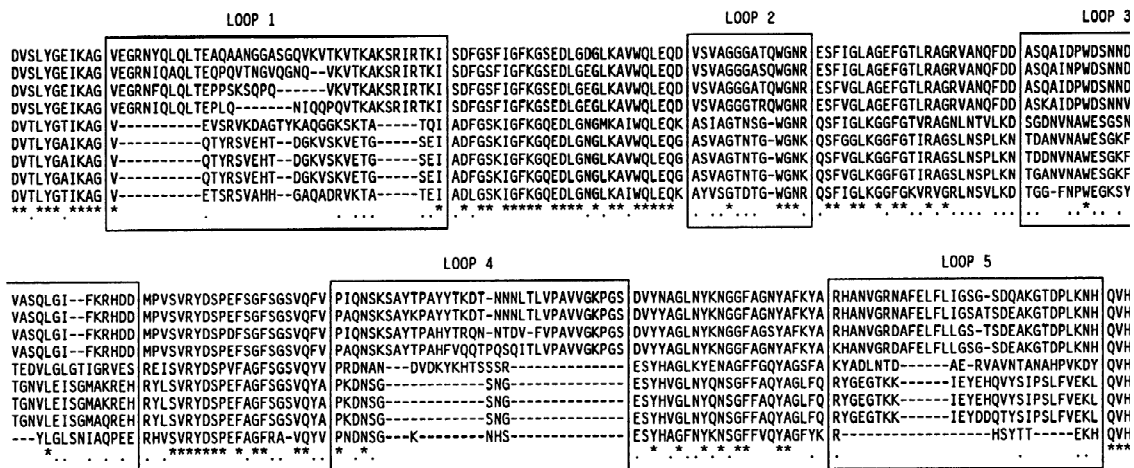


Figura 17– Parte da sequência de aminoácidos da proteína PorA com identificação das ansas notáveis pela sua variabilidade entre estirpes. (Fonte: Van der Ley *et al.*, 1991)

A diversidade antigénica da proteína levanta problemas respeitantes à sua caracterização por métodos imunológicos. De facto, existem mais de 135 sequências nucleotídicas de VR1, agrupadas em 10 famílias e 375 sequências nucleotídicas de VR2, agrupadas em 18 famílias. Esta tão grande diversidade que permanentemente vai ocorrendo, inviabiliza a produção de anticorpos monoclonais. Verifica-se que, com o

painel de anticorpos monoclonais disponível, cada vez há um maior número de estirpes não subtipáveis (NST) e um grande número de reacções cruzadas. Não é possível, com o uso de anticorpos, diferenciar a maioria das variantes dentro da mesma família. Por esta razão, adoptou-se a técnica de sequenciação dos dois alelos do gene *porA* que codificam para VR1 e VR2, para caracterização do subtipo de *Neisseria meningitidis*. A nomenclatura é a proposta por Russell (Russell *et al*, 2004):

- A designação do subtipo é precedida por P1 (proteína de classe 1);
- A sequência de cada zona variável (VR1 ou VR2) é identificada por um número que designa a família e um outro que designa a variante dentro da mesma família;
- Os números que designam a família e a variante são separados por um hífen;
- A designação das duas zonas variáveis é ordenada (VR1 precede VR2) e separada por uma vírgula (exemplo P1.5-2,10-1).

A outra porina localizada na membrana externa de meningococos é designada por PorB e é o alvo da caracterização do tipo. Esta porina compreende duas classes de proteína de membrana externa, classe 2 e 3, designadas assim com base no seu tamanho identificado em SDS-PAGE.

Nesta proteína, as variações nucleotídicas ocorrem dispersas em seis ansas expostas para o exterior da molécula. Dada a diversidade antigénica, o painel de anticorpos disponível tornou-se também insuficiente para caracterização imunológica do tipo de meningococos e o número de estirpes não tipáveis (NT) foi sendo cada vez maior. A caracterização por sequenciação seria tão dispendiosa, uma vez que todo o gene *porB* teria que ser sequenciado, e a informação adicional seria tão pouco relevante, que esta caracterização deixou de ser feita a partir de 2007, por recomendação do EMGM.

Para uma mais completa tipagem das estirpes, é recomendada a caracterização da proteína FetA, uma proteína de membrana externa receptora do ferro.

1.1.3. Caracterização do tipo electrofóretico e do tipo de sequência

Considerando que os genes *housekeeping* (Figura 18) estão sujeitos a uma pressão selectiva estável, estes podem ser utilizados como marcadores genéticos, alvo de tipagem molecular.

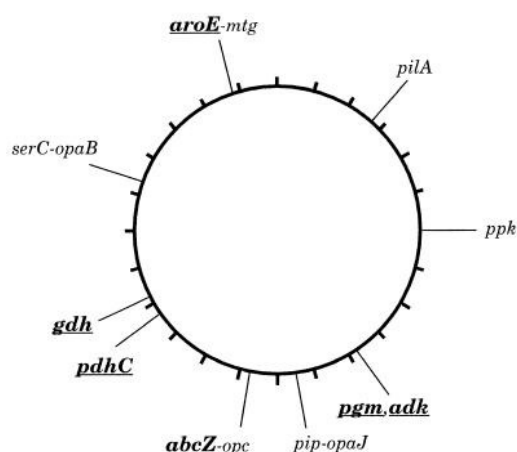


Figura 18 - Localização de genes *housekeeping* no mapa do genoma de *Neisseria meningitidis* (adaptado de Maiden, 1998)

A primeira técnica capaz de reconhecer variações alélicas e identificar linhagens que têm uma mais alta capacidade de causar doença foi a de *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE).

Esta técnica detecta variações nucleotídicas que se traduzem em diferenças nas sequências de aminoácidos de enzimas, reveladas pelas diferenças nas suas mobilidades electroforéticas em gel de amido. O perfil electroforético das 20 enzimas analisadas constitui uma medida indirecta de alterações genéticas. Contudo, muitas alterações na estrutura primária não têm tradução na mobilidade electroforética da proteína, o que é uma limitação da técnica para estudo da diversidade genética. Esta técnica de difícil execução tem ainda como desvantagem a dificuldade na comparação inter laboratorial de resultados. (Selandes *et al.*, 1986).

Estudos realizados a partir dos dados obtidos da tipagem de meningococos por MLEE identificaram as linhagens mais frequentemente associadas a infecção invasiva grave, agrupadas em *clusters* (complexos clonais) de tipos electroforéticos muito próximos nos dendrogramas que resultaram dos perfis electroforéticos (Caugant *et al.*, 1986 a). Maiden definiu como “hiper-invasivas” as estirpes que têm uma maior capacidade de causar doenças e, de entre essas, as estirpes “hiper-virulentas” estão habitualmente associadas a doença particularmente severa (Maiden, 2002 a). As linhagens hiper virulentas emergem esporadicamente da população bacteriana e lentamente diversificam-se à medida que alterações dispersas no genoma se vão acumulando. Estas alterações, como foi já referido, resultam muito mais frequentemente de recombinação genética do que de mutações.

Com o advento das técnicas de sequenciação automática, foi desenvolvida a técnica de *multilocus sequence typing* (MLST), com a intenção de que as duas técnicas, MLEE e MLST, originassem resultados concordantes (Maiden *et al.*, 1998). A sequenciação de múltiplos genes essenciais possuindo, contudo, algum nível de diferenciação, deve identificar cada uma das linhagens hiper virulentas tal como na técnica de MLEE, distingui-las entre si e da grande maioria das estirpes de meningococos.

A técnica de MLST baseia-se na identificação/classificação de alelos presentes em cada um dos *loci* de sete genes essenciais. De cada *locus* é feita a sequenciação de um fragmento interno de cerca de 500 pb e cada sequência diferente é designada como um alelo diferente, identificado com um número. Os alelos presentes em cada um dos sete *loci* dão origem a um perfil alélico que define um tipo de sequenciação ou ST (*sequence type*) de cada estirpe. Com base no perfil alélico obtido por MLST é possível conhecer a proximidade genética entre estirpes, uma vez que estirpes que partilham pelo menos quatro alelos, são elementos do mesmo complexo clonal e podem ser consideradas como tendo um ancestral comum (Maiden *et al.*, 1998). Em muitos casos é possível identificar um ST central que normalmente tem o perfil alélico predominante.

A técnica de MLST permite avaliar o peso relativo dos fenómenos de recombinação e de mutação ocorridos ao longo do processo de diversificação clonal. Permite identificar clones hiper virulentos (HV) existentes ou emergentes e a sua dispersão global.

As técnicas de MLEE e de MLST vieram demonstrar que existe uma muito maior diversidade genética em estirpes isoladas de portadores do que nas estirpes isoladas de doença invasiva (estirpes hiper virulentas) e que a maioria das estirpes invasivas de *Neisseria meningitidis* se agrupa num número limitado de complexos clonais: ST-8, ST-11, ST-32, ST-41/44 e ST-269 (Yazdankhah *et al.*, 2004). Presumivelmente, um complexo clonal emerge da diversificação de um clone bem adaptado, de baixa virulência e facilmente transmissível entre hospedeiros.

A caracterização por MLST de estirpes do cc ST-11/ET-37 evidenciou que o clone ET-15 é uma variante de um genótipo já conhecido deste complexo, com uma mutação pontual na posição 640 do gene *fumC* (gene *housekeeping*). As estirpes do clone ET-15 têm-se revelado mais virulentas do que as dos restantes elementos do mesmo complexo clonal, estando associadas a uma taxa de letalidade mais alta e a uma maior proporção de sequelas graves (Krizova *et al.*, 1995). Por ser esta uma potencial causa de letalidade aumentada, a diferenciação de estirpes ET-15 é importante e foi realizada nas estirpes incluídas neste estudo.

Aos complexos clonais estão associadas características de virulência e de transmissibilidade que justificam as quatro formas que, sob o ponto de vista

epidemiológico, a doença meningocócica pode apresentar – endêmica, hiper-endêmica, surtos localizados e epidémica (Tzanakaki *et al.*, 2001).

1.1.4. Genótipos e nomenclatura

Presentemente a tipagem de estirpes de meningococos é inteiramente realizada por métodos moleculares. O fenótipo é agora geneticamente definido e as suas características só não serão conhecidas na ausência do gene. Deverá então alterar-se a designação para genótipo.

De acordo com as recomendações do EMGM publicadas em 2007 (Jolley *et al.*, 2007) a designação do genótipo deve referir o **grupo: as duas VR de PorA: o tipo de FetA: o ST (coplexo clonal)**. A notificação Δ representa a ausência de gene e o hífen (-) significa um ST não incluído em nenhum complexo clonal (Jolley *et al.*, 2007). Exemplo – B:P1.5-2, Δ :F1-8:ST-16(-). Esta nomenclatura é a adoptada para designar as estirpes de meningococos caracterizadas no âmbito deste trabalho ou referidas na literatura de referência.

Sob o ponto de vista evolucionista, os clones são entidades efémeras, quando comparados com estirpes clonais de *Escherichia coli*, nas quais se reconhece uma baixa taxa de recombinação. Cada clone emerge de um único genótipo bem adaptado, cuja frequência aumenta sob pressão selectiva, até alcançar uma frequência observável na população bacteriana (comensal e invasiva). Tipicamente os clones existem durante décadas. Durante esse tempo diversificam-se por acumulação de DNA recombinante ou por mutações pontuais, dando origem a complexos clonais. As altas taxas de recombinação genética, características nesta espécie, tornam os clones instáveis. Após o aparecimento e dispersão rápidos (duração variável), as estirpes clonais desaparecem.

Presume-se então que as estirpes de complexos clonais hiper-virulentos (Tabela 4) e não hiper-virulentos, que têm sido isoladas de portadores assintomáticos e de doentes, venham a desaparecer e venham a ser “substituídas” por outras. O impacto das novas estirpes emergentes na população depende de vários factores, nomeadamente da velocidade de dispersão, dos factores de virulência que acumulem e do grau de adaptação à pressão da resposta imunológica humana.

A tabela 4 indica as oito linhagens hiper-virulentas mais frequentemente responsáveis por doença invasiva no mundo inteiro.

Tabela 4 - Linhagens hiper-invasivas de *Neisseria meningitidis* (adaptado de Maiden, 2002 a)

Designação (MLEE)	Designação (MLST)	Característica epidemiológica	Associação ao serogrupo
Subgrupos do serogrupo A:			
Subgrupo I/II	Complexo ST-1	Pandémico	A
Subgrupo III	Complexo ST-5	Pandémico/epidémico	A
Subgrupo IV	Complexo ST-4	Epidémico	A
Cluster A4	Complexo ST-8	Epidémico, esporádico	B e C
Complexo ET-37	Complexo ST-11	Epidémico, esporádico	Principalmente C. Também B, Y e W123
Complexo ET-5	Complexo ST-32	Hiper-endémico	Principalmente B mas também C
Linhagem 3	Complexo ST-41	Hiper-endémico, esporádico	Principalmente B mas também C
	Complexo ST-269	Epidémico(?), esporádico (?)	Principalmente B mas também W135

Sob o ponto de vista evolucionista, os clones são entidades efémeras, quando comparados com estirpes clonais de *Escherichia coli*, nas quais se reconhece uma baixa taxa de recombinação. Cada clone emerge de um único genótipo bem adaptado, cuja frequência aumenta sob pressão selectiva, até alcançar uma frequência observável na população bacteriana (comensal e invasiva). Tipicamente os clones existem durante décadas. Durante esse tempo diversificam-se por acumulação de DNA recombinante ou por mutações pontuais, dando origem a complexos clonais. As altas taxas de recombinação genética, características nesta espécie, tornam os clones instáveis. Após o aparecimento e dispersão rápidos (duração variável), as estirpes clonais desaparecem.

Presume-se então que as estirpes de complexos clonais hiper-virulentos e não hiper-virulentos, que têm sido isoladas de portadores assintomáticos e de doentes, venham a desaparecer e venham a ser “substituídas” por outras. O impacto das novas estirpes emergentes na população depende de vários factores, nomeadamente da velocidade

de dispersão, dos factores de virulência que acumulem e do grau de adaptação à pressão da resposta imunológica humana.

1.2. O fenómeno com alteração capsular

Sendo a vacinação a forma mais eficaz de controlo da doença, as consequências do seu emprego regular, ou de campanhas de vacinação em massa, devem ser monitorizadas, já que a vacina pode induzir alterações capsulares indesejáveis. As estirpes de meningococos podem alterar o fenótipo capsular por recombinação após aquisição de alelos que codificam para a biossíntese da cápsula. Este fenómeno de alteração da cápsula (*capsular switching*) é um exemplo de mecanismo genético que proporciona à bactéria alterações súbitas, particularmente quando sujeita a pressão selectiva, resultante da imunidade natural ou induzida por vacinação. A transferência horizontal de genes ocorre presumivelmente durante a fase de co-colonização da nasofaringe com pelo menos duas estirpes diferentes (Linz *et al.* 2000; Swartley *et al.* 1997). A detecção destas estirpes recombinantes já foi relatada quer em países sem política de vacinação implementada (Stefanelli *et al.* 2003; Kriz *et al.* 1999) quer em países onde se registaram campanhas de imunização em massa (Alcalá *et al.* 2002). Esta capacidade de alterarem as características da cápsula, confere aos meningococos vantagens selectivas uma vez que assim se evadem da acção bactericida, da opsonização ou acção neutralizante de anticorpos anticapsulares previamente existentes, resultantes da imunidade natural ou induzida pela vacina (Swartley *et al.* 1997). Em Portugal, se bem que a vacina conjugada anti-meningococos do serogrupo C só tenha sido introduzida no PNV em Janeiro de 2006, no Inverno de 2002 registou-se uma vacinação em massa por iniciativa dos pais ou dos médicos pediatras, devido ao aumento do número de casos de DM e consequente alarme público. O fenómeno de alteração capsular deve por isso ser monitorizado, com a intenção de se detectar o aumento do número total de casos de doença devido a uma hipotética falência vacinal. A verificar-se, a falência vacinal modifica a dinâmica esperada da DM e é por isso uma variável a ser considerada no desenvolvimento do modelo.

2 Dispersão geográfica de estirpes hiper virulentas

A primeira descrição de surto do que parecia ser meningite meningocócica foi feita por Vieusseux. Em 1805 este médico suíço observou em Genebra uma doença que persistiu durante três meses, afectou sobretudo crianças e jovens e causou 33 mortes.

A mobilidade das populações, quer por motivos de turismo quer de procura de trabalho em países distantes, facilita a dispersão geográfica das estirpes de meningococos e a introdução de novos génotipos em novos territórios. Os novos portadores transmitem novas estirpes a uma população não naturalmente imunizada para essas novas estirpes, ficando por isso mais vulnerável à infecção. Dependendo das características de virulência e de colonização/transmissão das estirpes, as consequências dos movimentos populacionais são, a curto prazo, difíceis de estimar, mas têm sido no mundo inteiro, causa de surtos e epidemias.

Reconhece-se o carácter regional da incidência da DM e da distribuição dos serogrupos, bem como a significativa flutuação cíclica na ocorrência de surtos e epidemias.

A caracterização antigénica e genotípica de *Neisseria meningitidis* (serogrupo, subtipo e ST) têm sido fundamentais para compreender a história natural e a evolução da bactéria, bem como a dispersão das estirpes bacterianas e da doença meningocócica. Estudos de caracterização molecular de estirpes isoladas de portadores assintomáticos e de doentes revelaram que:

- Apesar da sua reputação, os meningococos são normalmente comensais inocentes da nasofaringe de adolescentes e adultos.
- A população de meningococos caracteriza-se por uma grande diversidade genética
- Apenas uma minoria de génotipos (estirpes hiper virulentas) são responsáveis pela maioria dos casos de infecção invasiva
- As diferentes linhagens hiper virulentas tendem a estar associadas a características epidemiológicas particulares
- Algumas linhagens hiper virulentas estão particularmente associadas a doença severa (Brehony *et al.*, 2007)

A incidência anual da DM varia nas diferentes regiões geográficas entre 1 por 100 000 e 1000 por 100 000 habitantes. Em Portugal, os maiores surtos de meningite meningocócica de que há registo ocorreram em 1943 (1516 casos). Nas últimas décadas a DM tem tido um carácter endémico, com taxas de incidência que se mantiveram altas, variando entre 1.82 e 3.23 casos por 100 mil habitantes. A partir de 2003 a taxa de

incidência diminuiu, situando-se no intervalo de 1.25 a 1.99 casos/100 mil, citado como esperado para a maioria dos países industrializados em situação não epidémica, durante o mesmo período (DGS 2007) e para valores inferiores a 0,3 casos /100 mil a partir de 2006 (dados não publicados do INSA e DGS).

A África subsaariana tem um padrão epidemiológico muito particular, que se caracteriza por um padrão cíclico de epidemias, causadas principalmente por *Neisseria meningitidis* do grupo A. Aqui, a incidência aumenta no fim da época seca e declina rapidamente após o início das chuvas. Durante os picos epidémicos a incidência da DM pode atingir 1 000 por 100 000 habitantes (Deuren, 2000). A região designada como “Cinturão Africano da Meningite” foi primeiramente descrito por Lapeyssonnie em 1963 e compreendia 10 países – Burkina Faso, Gana, Togo, Benin, Níger, Nigéria, Chad, Camarões, República Centro-Africana e Sudão (Lapeyssonnie L, 1963). Mais tarde, a Etiópia, Mali, Guiné, Senegal e Gambia foram incluídos no que passou a designar-se Cinturão Alargado da Meningite (Figura 19).

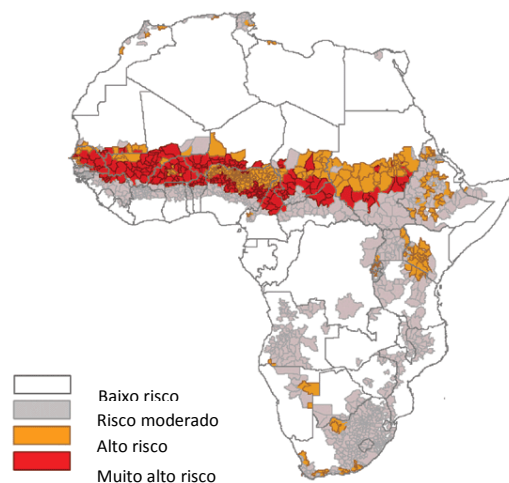


Figura 19 – Distribuição do risco de doença meningocócica nos países africanos com evidência da zona designada por Cinturão Africano da Meningite.

Fonte: http://www.travmed.com/health_guide/images/Chapter10/Meningitis,%20Central%20Africa.gif, data de acesso:04-12-2010)

2.1 Subgrupos genómicos do serogrupo A

Estirpes do serogrupo A podem causar grandes epidemias, com taxas de incidência superior a 500 por 100 000 habitantes, envolvendo por vezes vários países ou continentes num curto período de tempo.

A caracterização genotípica das estirpes epidémicas do serogrupo A indica que as grandes epidemias causadas por estirpes deste serogrupo se devem à dispersão global de apenas alguns clones bacterianos (Harrison *et al.*, 2009). Dos oito subgrupos genéticos, apenas o I e o III sofreram essa dispersão pandémica. Os restantes, embora associados a graves epidemias, têm mostrado uma distribuição geográfica mais contida:

- O subgrupo IV-1 foi causa de doença endémica e epidemias na África Ocidental, entre o início dos anos 1960 e 1980.
- Durante as duas Guerras Mundiais o subgrupo IV-2 esteve na origem de epidemias nos Estados Unidos e Reino Unido.
- Os subgrupos V, VII e VIII têm sido isolados na China
- O subgrupo VI tem sido identificado apenas na Rússia e Europa Oriental
- O subgrupo I foi isolado pela primeira vez no Reino Unido em 1941. No início dos anos 1960 foi identificado no Norte de África e em países do Cinturão Africano da Meningite. No início da década de 70 causou epidemias no Brasil, Estados Unidos e Canadá. No final da mesma década foi responsável por epidemias na Nigéria e no Ruanda. Tem sido isolado na África do Sul desde 1968, onde causou uma epidemia entre refugiados moçambicanos em 1991. Na Nova Zelândia e Austrália causou epidemias nas décadas de 80 e 90.

O subgrupo III causou duas pandemias com origem na China. A primeira, com início na década de 60, dispersou-se até à Rússia, Roménia, península da Escandinávia e Brasil. No início da década de 80 teve início a segunda pandemia que se dispersou inicialmente para o Nepal e Índia. Depois do Hajj de 1987, o clone dispersou-se da Arábia Saudita para todos os continentes, transmitida pelos peregrinos de regresso aos seus países de origem. Foram registados casos de DM nos Estados Unidos, Reino Unido e França entre os viajantes e seus contactos contudo, as medidas de controlo implementadas anularam a transmissão e não se registaram epidemias. No continente Africano, onde o subgrupo III não fora previamente identificado, o clone dispersou-se causando graves epidemias, ciclicamente desde 1988 até agora. Inicialmente a Etiópia, Sudão, Chad e Quênia e, a partir de 1990, outros países africanos dentro e fora

da tradicional região epidémica sofreram epidemias. Em 1996 uma nova epidemia causada pelo subgrupo III devastou a região subsaariana de África, tendo-se registado mais de 150 000 casos de DM e 16 000 mortes. Em 1999 o Sudão registou a terceira epidemia em 10 anos e o Senegal foi atingido pela primeira vez por uma epidemia por subgrupo III (Caugant, 2001).

2.2 O complexo ST-32/complexo ET-5

As estirpes do complexo ST-32/complexo ET-5 são maioritariamente epidémicas e do serogrupo B. Caracteristicamente, as estirpes epidémicas estão associadas a uma elevada taxa de letalidade, consequência da elevada proporção de casos que decorrem com septicemia. É também característico o pico de incidência em adolescentes e a sua lenta transmissibilidade, da qual resultam ondas epidémicas prolongadas, com um aumento gradual do número de casos até ao pico epidémico e um declínio bastante lento (Caugant, 1998).

Um estudo retrospectivo revelou que a primeira estirpe do complexo ST-32/complexo ET-5 foi isolada de um doente da Noruega, em 1969. Cinco anos mais tarde tinha início uma epidemia na Noruega e, desde então, epidemias têm sido registadas em vastas regiões geográficas:

- A epidemia na Noruega, em 1975, foi a primeira de que há registo. Em uma década alastrou da região norte a todo o país. A caracterização antigénica das estirpes epidémicas evidenciou que o fenótipo B:15:P1.7,16 era predominante (Lystad *et al.*, 1991)
- Simultaneamente, Espanha registava o aumento de DM por serogrupo B e surtos em várias regiões. As estirpes epidémicas revelaram-se do complexo ET-5, predominando o fenótipo B:4:P1.19,15 (Caugant *et al.*, 1986 b)
- A partir de estes dois focos, nos anos seguintes o complexo ST32/complexo ET-5 dispersou-se pela Europa ocidental, onde se registou um aumento de incidência de DM e a ocorrência de surtos localizados
- Em 1980, registaram-se graves epidemias em Cuba causadas por estirpes com o mesmo fenótipo das estirpes epidémicas espanholas. Estas alcançaram a

Florida e, em 1981-1982, registaram-se surtos nas comunidades cubana e hispânica de Miami (Caugant *et al.*, 1986 b)

- Em 1985 registou-se uma grave epidemia na cidade chilena de Iquique que se dispersou por todo o país. As estirpes apresentavam novos epítomos expressando o fenótipo B:15:P1.3 (Caugant *et al.*, 1986 b; Cruz *et al.*, 1990)
- No final da década de 80 registou-se no Estado de São Paulo um grave aumento da incidência de DM, que se verificou relacionar-se com estirpes ET-5 recém introduzidas no Brasil. As estirpes eram antigenicamente semelhantes às estirpes epidémicas de Cuba (Sacchi *et al.*, 1992)
- No início dos anos 1990 o complexo ET-5 foi identificado na Argentina
- Em meados da década de 90, após um período de incidência baixa de doença no Norte da Europa, registaram-se graves surtos na Islândia e Finlândia
- Em Marrocos, entre 1992 e 1994 um terço das estirpes invasivas isoladas eram B:4:P1.19,15 do complexo ET-5
- Em 1994 registou-se um aumento de incidência de DM por serogrupo B nos Estados americanos de Washington e Oregon, associada a estirpes do complexo ET-5, com as características antigénicas das estirpes epidémicas da Noruega (Reeves *et al.*, 1995)
- No período entre 1998 e 2003 a estirpe norueguesa (B:15:P1.7,16) foi prevalente no Brasil (Baethgen *et al.*, 2008)
- Entre 2003 e 2005 registaram-se surtos na região de Dieppe (Seine-Maritime, Norte de França) associados a uma taxa de letalidade particularmente elevada (16%) (Rouaud *et al.*, 2006).

2.3 O complexo clonal ST-11/complexo ET-37

O complexo ST-11/complexo ET-37 compreende um conjunto de clones que têm estrado associados a doença epidémica. Compreende estirpes dos quatro serogrupos que contêm ácido N-acetil neuramínico (B, C, W135 e Y), todas expressam uma proteína de membrana externa de classe 2, normalmente 2.2a, e frequentemente o subtipo P1.5,2 ou P1.5,2b (Wang *et al.*, 1993). A primeira estirpe identificada do complexo ET-37 era do serogrupo B e foi isolada nos Estados Unidos da América em 1917.

- A primeira epidemia documentada ocorreu nos anos 60, em recrutas do exército americano (Wang *et al.*, 1993)

- No início da década de 70 o Brasil registou surtos de DM por estirpes C do complexo ET-37, que antecederam a epidemia por subgrupo III;
- No final da mesma década a África do Sul conheceu epidemias por estirpes do serogrupo B;
- Durante toda a década de 1980, estirpes do serogrupo C deste complexo clonal foram responsáveis por casos esporádicos e surtos localizados nos Estados Unidos, Canadá, Europa e África (serogrupo C, W135 ou Y) (Wang *et al.*, 1993). Na maioria das estirpes epidémicas do Canadá verificou-se existir uma mutação no *luc* da fumarase, característica de um novo ET designado ET-15;
- No conjunto de países europeus notificadores para o projecto EU-IBIS ou ECDC em apenas alguns (Espanha, Bélgica, Holanda, Irlanda, Islândia, Portugal e Reino Unido) observou-se um aumento de casos por serogrupo C, devido à dispersão do complexo clonal ST-11, entre o final dos anos 1990 e o início de 2000 (Harrison *et al.*, 2009).

2.4 O complexo clonal ST-8/cluster A4

Este complexo contém estirpes dos serogrupos B e C que estão associadas a ondas epidémicas e hiper endémicas. Caracteristicamente expressam uma proteína de membrana externa de classe 2, normalmente 2.2b.

A primeira estirpe do cluster A4 foi identificada na Holanda em 1961.

2.5 O complexo clonal ST-41-44/Linhagem III

Estirpes de um complexo clonal designado linhagem III foram identificadas pela primeira vez na Holanda, em 1980. Durante toda a década de 1990 este cc tornou-se o mais prevalente no país, representando cerca de 20% das estirpes invasivas. Embora não esteja associado a grandes epidemias, notou-se na Holanda um aumento de estirpes do serogrupo B (B:4:P1.4) concomitante com uma maior frequência de estirpes do cc ST-41-44/linhagem III. Posteriormente estirpes idênticas foram identificadas noutros países europeus, na Nova Zelândia e no Chile, evidência de que este complexo clonal dispersou-se já por vários continentes (Caugant, 1998).

2.6 O complexo clonal ST-269

O cc ST-269 é um complexo de estirpes emergente com grande heterogeneidade genética, ainda mal conhecido, no qual se incluem estirpes isoladas de portadores assintomáticos e estirpes invasivas, maioritariamente do serogrupo B. Os primeiros registos de estirpes do cc ST-269 referem-se a dois casos de doença invasiva na Holanda, em 1970 (Law *et al.*, 2006).

Apesar de não se conhecerem registos de grandes surtos, estirpes deste complexo parecem estar a dispersar-se e gradualmente e a tornarem-se endémicas na Europa e no Norte do continente americano.

2.7 O serogrupo Y

Até à década de 1990 as estirpes do serogrupo Y representaram apenas 2% das estirpes invasivas notificadas no sistema de vigilância americano (*US surveillance for meningococcal disease*). A proporção de casos de DM por estirpes deste serogrupo aumentou para 10,6% em 1992 e 32,6% em 1996 (Rosenstein *et al.*, 1999).

Também no Canadá se observou o aumento de incidência de doença invasiva por serogrupo Y. O aumento da proporção de casos por serogrupo Y começou a ser notado na província de Ontário, que registou 17% de DM por serogrupo Y entre 1999 e 2001, e em 2003 a proporção de casos no país era já de 21,9% (Public Health Agency of Canada, 2006).

Num estudo realizado em 434 estirpes invasivas de meningococos isolados na Colômbia entre 1994 e 2006, conclui-se que a proporção de casos por serogrupo Y aumentou de 0% em 1994 para 50% em 2006 (Agudelo *et al.*, 2008).

2.8 O serogrupo X

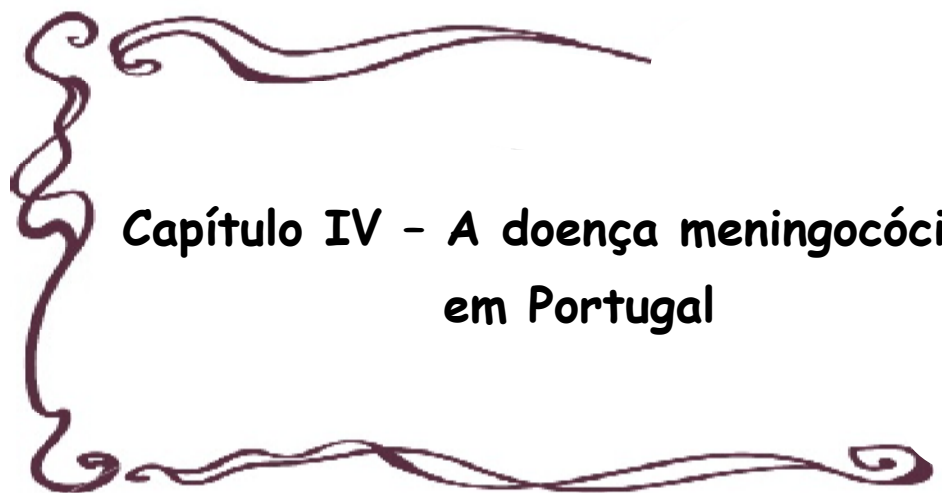
Pequenos surtos de DM causados por estirpes do serogrupo X foram observados pela primeira vez em África na década de 1960, no Níger e no Gana e posteriormente na América do Norte, Austrália e Europa. Nalguns casos a doença invasiva por estirpes do serogrupo X está associada a deficit de imunidade, particularmente deficiências do complemento e SIDA (Gagneux *et al.*, 2002).

Até aos anos 2000 a incidência de casos por serogrupo X manteve-se baixa em África, com nove casos registados no Gana em 2000 e 134 casos registados no Níger entre 1995 e 2000. Contudo, entre Janeiro e Junho de 2006, registou-se um surto no Níger com 51% de 1139 casos confirmados de meningite meningocócica causados por meningococos do

serogrupo X. No mesmo período registaram-se pequenos surtos em localidades fronteiriças, o que constitui um alerta para a possibilidade de dispersão de estirpes virulentas do serogrupo X em regiões da costa ocidental de África (Materu *et al.*, 2007).

As estirpes africanas caracterizam-se por uma mais baixa variabilidade genética comparativamente às estirpes isoladas na Europa e Estados Unidos. Possivelmente, para isso contribui o facto de ser baixa a taxa de portadores assintomáticos em África, nos períodos inter-epidémicos, havendo assim uma menor probabilidade de transferência horizontal de material genético durante o período de colonização (Gagneux *et al.*, 2002).

A introdução de vacinas no plano de vacinação de alguns países industrializados tem demonstrado ter um forte impacto na epidemiologia da doença meningocócica. Assinale-se, por exemplo, a experiência no Reino Unido, onde o número de casos de DM causado por estirpes do serogrupo C mais do que duplicou entre os anos epidemiológicos 1994-95 e 1995-96 e a tendência crescente na incidência da doença se manteve até 1999, a proporção de casos por serogrupo C (principalmente do fenótipo C:2a:P1.5:ST-11) decresceu de 34,4% em 1999 para 4,2% em 2003-04, depois da introdução da vacina MenC no plano nacional de vacinação (Kaczmarski *et al.*, 2006).



**Capítulo IV - A doença meningocócica
em Portugal**

1 Introdução

O sistema da Doença Meningocócica é descrito utilizando variáveis que são definidas com base em dados demográficos e epidemiológicos da DM bem como em dados laboratoriais que resultam da caracterização de estirpes de meningococos.

Em Portugal, a partir de Setembro de 2002, a notificação da DM incluiu, para além da notificação clínica já obrigatória a partir de 1939, a notificação laboratorial, por imposição do Programa de Vigilância Integrada da Doença Meningocócica, criado em Setembro de 2002 por circular normativa da Direcção Geral da Saúde (DGS, 2002) (anexo I).

A partir de então, a DGS estabeleceu uma parceria com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) para conduzirem esta vigilância que obriga não só a confirmação laboratorial de todos os casos clinicamente suspeitos, por métodos culturais ou não culturais, mas também a caracterização de estirpes.

Competiu ao INSA desenvolver e implementar as metodologias laboratoriais necessárias para o diagnóstico e caracterização de estirpes invasivas de *Neisseria meningitidis* e estabelecer uma rede laboratorial de modo a reunir estirpes e informação. Em Outubro de 2002, o INSA criou a rede de vigilância VigLab-Doença Meningocócica, que inclui todos os laboratórios da rede hospitalar nacional pública e privada e o Laboratório Nacional de Referência de *N. meningitidis* do actual Departamento de Doenças Infecciosas (DDI) do INSA. Este laboratório recebe dos laboratórios hospitalares todas as estirpes de *N. meningitidis* isoladas em cultura e, de casos clinicamente suspeitos com cultura negativa, recebe amostras clínicas (soro e/ou líquido) para pesquisa de ADN por PCR em tempo real (Anexo II).

A componente experimental desta tese tem por objectivo obter dados que permitam quantificar as variáveis que afectam o sistema dinâmico da DM e que serão consideradas no desenvolvimento do modelo. O trabalho laboratorial foi realizado no Laboratório Nacional de Referência de *Neisseria meningitidis* do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, incidiu sobre amostras clínicas e estirpes de meningococos recebidas neste laboratório no âmbito do Sistema de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença Meningocócica, entre 1 de Outubro de 2002 e 30 de Junho de 2010 e compreende as seguintes tarefas:

- Pesquisa de DNA de *Neisseria meningitidis* em amostras clínicas com cultura negativa para confirmação de doença invasiva. A introdução desta pesquisa na

rotina laboratorial permitiu conhecer com mais rigor o número de casos de doença e, conseqüentemente, melhorar a qualidade dos dados relativos a incidências;

- Caracterização do grupo;
- Pesquisa de alterações capsulares;
- Caracterização molecular de estirpes cultiváveis e não cultiváveis. O conhecimento dos genótipos que circulam em Portugal ao longo do tempo permite conhecer a dinâmica da sua introdução e dispersão no país, o que constitui um dado fundamental para o desenvolvimento do modelo da DM;
- Testes de susceptibilidade aos antibióticos utilizados em terapêutica e na profilaxia dos contactos. Os resultados decorrentes deste estudo contribuem para avaliar a qualidade das medidas de controlo da doença invasiva.

Além da vacinação, a instituição precoce de antibioterapia adequada e a quimioprofilaxia dos contactos são factores determinantes no controlo da DM.

Com o objectivo de quantificar a influência das medidas de controlo na dinâmica da DM estudou-se a susceptibilidade à Penicilina por ser este um dos dois antibióticos beta lactâmicos utilizado na terapêutica da DM. Não se estudou a susceptibilidade ao Ceftriaxone por não ser conhecida a diminuição de susceptibilidade a este antibiótico. Estudou-se também a susceptibilidade aos antibióticos utilizados na profilaxia dos contactos, a Ciprofloxacina e a Rifampicina.

Seria desejável que o método de difusão em disco de Kirby e Bauer fosse adequado à determinação do padrão de sensibilidade de *Neisseria meningitidis* aos antibióticos. Isso possibilitaria a realização do teste nos laboratórios hospitalares e a confirmação, em tempo útil, da eficácia dos antibióticos usados empiricamente em terapêutica e em profilaxia. Contudo, apesar dos vários estudos que têm sido feitos com o objectivo de otimizar o teste de difusão em disco, principalmente para detectar a susceptibilidade à Penicilina, muitos argumentos contra a sua utilização têm sido considerados válidos, nomeadamente pela EMGM (Nicolas *et al.*, 1998, Block *et al.*, 1998, Campos *et al.*, 1987 e 1992). A determinação da concentração mínima inibitória é então o método de escolha e, não estando ao alcance da maior parte dos laboratórios de rotina, é uma competência dos laboratórios de referência.

2 Material e metodologia laboratorial

2.1 *Estudo de incidências, da apresentação e evolução clínica da doença meningocócica*

Sendo a doença meningocócica uma doença sazonal, com um pico de incidência que em zonas temperadas se regista no inverno (Andrew *et al.*, 2002), considerou-se que a análise dos dados de incidências, bem como de todos os outros que contribuem para um melhor conhecimento da doença e da sua epidemiologia, deve ser feita por ano epidemiológico e não por ano civil. Este critério diverge do que tem sido utilizado pela Direcção Geral da Saúde na elaboração dos seus relatórios (em co-autoria com o INSA), e pela European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network (EU-IBIS). Admitimos que a discussão dos resultados, sobretudo a interpretação de tendências, não ficará prejudicada quando for sujeita a comparação com dados europeus, uma vez que se trata de um período de oito anos, com um grande número de observações.

Definiu-se *ano epidemiológico* como o período que decorre entre 1 de Julho de um ano e 30 de Junho do ano seguinte, obtendo assim uma distribuição Gaussiana dos casos de DM, com o número máximo de casos entre Dezembro e Março.

As infecções respiratórias são factores predisponentes de colonização e infecção por meningococos. Considerou-se ser a gripe a representativa de infecção respiratória, com a vantagem sobre os outros agentes de infecção respiratória pelo facto da sua incidência anual ser monitorizada em Portugal no âmbito do Sistema Nacional de vigilância da Gripe (INSA e DGS).

Para a análise de incidências, das formas de apresentação clínica e da evolução clínica da DM, usaram-se os dados validados que constituem as bases de dados nacionais, enviadas anualmente pela Direcção Geral da Saúde e à rede EU-IBIS (até 2009) e ao ECDC. Nessas bases incluem-se dados demográficos, clínicos e laboratoriais. O INSA, através da rede VigLab- Doença Meningocócica e do LNR, contribuiu para assegurar a fidelidade dos dados, nomeadamente pela confirmação de casos e caracterização de estirpes de *Neisseria meningitidis*.

A definição de caso de DM adoptada neste trabalho é o da Comissão Europeia de 19 de Março de 2002 (Decisão 2002/253/CE), publicada pelo Jornal Oficial das Comunidades Europeias em 3 de Abril de 2002. De acordo com os critérios da Comissão Europeia, um *caso confirmado* de doença meningocócica é compatível com a clínica e tem confirmação laboratorial; um *caso provável* é compatível com a clínica sem confirmação laboratorial.

Neste documento da Comissão Europeia, a definição do quadro clínico refere “Quadro clínico compatível com doença meningocócica, por exemplo meningite e/ou meningococémia que pode degenerar rapidamente em púrpura fulminante, choque e morte. São possíveis outras manifestações”.

Os critérios laboratoriais para o diagnóstico compreendem:

- Isolamento de *Neisseria meningitidis* a partir de um local normalmente estéril, incluindo lesões purpúricas;
- Detecção de ácidos nucleicos de *Neisseria meningitidis* a partir de um local normalmente estéril, incluindo lesões purpúricas;
- Detecção do antigénio de *Neisseria meningitidis* no líquido céfalo-raquidiano (LCR);
- Detecção de diplococos gram-negativo no LCR.

A definição de caso de DM foi posteriormente alterada pela decisão da Comissão Europeia de 28 de Abril de 2008, estabelecendo critérios clínicos mais consistentes (sinais meníngeos, exantema petequial, choque séptico, artrite séptica) e acrescentando critérios epidemiológicos (relação epidemiológica por contágio de pessoa a pessoa). Caso possível - pessoa que preenche os critérios clínicos; caso provável - pessoa que preenche os critérios clínicos e apresenta uma relação epidemiológica; caso confirmado - pessoa que preenche os critérios laboratoriais) (Anexo III)

A dimensão da população portuguesa nos oito anos em análise e em cada grupo etário considerado, foi a publicada pelo do Instituto Nacional de Estatística, nos dados relativos às estimativas provisórias da população residente em Portugal, NUTS II, nos anos de 2002 a 2010.

Para a análise de incidências, consideraram-se os nove grupos etários também considerados pela rede EU-IBIS. Neles se distinguem os dois grupos mais vulneráveis à infecção devido a imaturidade do sistema imunitário (<1 ano e 1-4 anos), os adolescentes e adultos jovens que caracteristicamente têm práticas e actividade social próprias, os adultos e os idosos, estes últimos também frequentemente com deficits imunitários e co-morbilidades que são determinantes na incidência e evolução clínica da doença meningocócica.

O denominador utilizado para o cálculo de incidências corresponde ao número de indivíduos em cada grupo etário, no primeiro ano que define o ano epidemiológico.

2.2 Técnicas laboratoriais

O isolamento de *N. meningitidis* em cultura foi realizado em placas de Columbia agar adicionado de 5% de sangue de cavalo, incubadas durante 18 a 24 horas a 35°C ± 2°C em atmosfera com 5 a 10% de CO₂. A pesquisa de DNA de *N. meningitidis* a partir de amostras clínicas foi feita por PCR em tempo real com sondas FRET (Anexo IV).

O DNA utilizado em todas as técnicas de Biologia Molecular foi extraído, quer de estirpe quer de amostras clínicas, com coluna de sílica Qiamp DNA minikit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante.

Todas as reacções de PCR convencional foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA). Todas as reacções de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador Light Cycler 2000 (Roche, Alemanha).

Todas as reacções de sequenciação se processaram segundo a mesma metodologia. Cada mistura de reacção foi preparada com 0,6 μ M de *primer forward* ou *reverse*, 2 μ l da mistura de nucleótidos e terminadores BigDye 1.1 (Applied Biosystem, USA), 3 a 10 ng de DNA e água para completar um volume de 10 μ l. Os produtos foram purificados em colunas de sílica e sequenciados com o equipamento ABIPRISM 3130XL Genetic Analyzer Applied (California, USA).

O programa do termociclador manteve-se inalterado em todas as reacções de sequenciação cíclica (Figura 20).

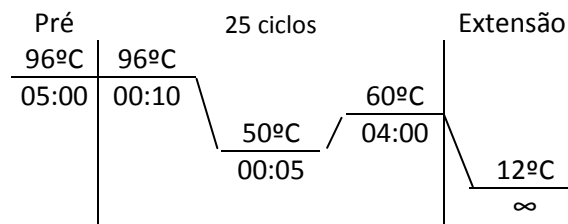


Figura 20 - Programa do termociclador para reacção de sequenciação

2.2.1 Caracterização do serogrupo

A caracterização do grupo foi feita por uma técnica de PCR utilizando DNA extraído de estirpe isolada ou, nos casos clinicamente suspeitos com cultura negativa, DNA extraído directamente da amostra clínica. No primeiro caso utilizou-se uma técnica de PCR convencional com visualização dos produtos de PCR em gel de agarose a 2%, utilizando *primers* descritos por Taha (Taha *et al.*, 2000), no segundo caso foi feito PCR em tempo real, utilizando os *primers* descritos por Molling (Molling *et al.*, 2002), (Anexo IV).

Os *primers* utilizados são dirigidos ao gene *siaD* (que codifica para polisialiltransferases) dos grupos B, C, W135 e Y e ao gene *sacC* do grupo A.

Na técnica de PCR convencional, cada mistura de reacção foi prepara com 0,5 μ M de cada *primer*, uma mistura de nucleótidos na concentração de 0,2 mM, tampão 10X (tampão da Taq com 15 mM de $MgCl_2$), e 1U de Taq plimerase (Taq-DNA-polimerase

Applied Biosystems, USA). Se realizado PCR multiplex, a mistura foi adicionada de 3 mM de MgCl₂.

A amplificação realizada em termociclador convencional iniciou-se com uma fase de desnaturação prévia a 95°C durante 3 minutos, 45 ciclos com desnaturação a 92°C durante um 40 segundos, *annealing* a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 20 segundos. A fase de extensão final fez-se a 72°C durante 10 minutos.

A mistura de reacção para PCR em tempo real foi preparada com Sybre Green. A concentração de MgCl₂ variou para cada par de *primers* (Anexo IV).

2.2.2 Caracterização do tipo

A caracterização do tipo foi realizada sistematicamente até 2005 por uma técnica ELISA, de acordo com o procedimento publicado Abdillahi em 1987. Os alvéolos das placas foram revestidos pelas células íntegras das estirpes de meningococos que se pretendiam caracterizar e os anticorpos monoclonais utilizados, dirigidos a proteínas de membrana externa de classe 2 e 3 (PorB), foram preparados pelo National Institute for Biologic Standards and Control (UK).

A técnica revelou-se inútil, dado o muito elevado número de estirpes não tipáveis face ao painel de anticorpos monoclonais disponível, pelo que foi abandonada.

2.2.3 Caracterização do subtipo

Foi feita a caracterização do subtipo por amplificação e sequenciação das duas regiões variáveis do gene *porA*, designadas VR1 e VR2 que, pelo seu grau de polimorfismo, são a base da subtipagem de meningococos (McGuinness *et al*, 1993).

Os *primers*, descritos por Paula Molling, são utilizados indistintamente na amplificação por PCR convencional ou em tempo real e na sequenciação (Anexo IV).

Cada mistura de reacção para PCR convencional foi prepara com 0,5 µM de cada um dos *primers*, tampão da Taq 10X com 15 mM de MgCl₂, uma mistura de nucleótidos na concentração de 0,2 mM e 1U de Taq plimerase (Taq-DNA-polimerase Applied Biosystems, USA).

A amplificação realizada em termociclador convencional iniciou-se com uma fase de desnaturação prévia a 95°C durante 7 minutos, 45 ciclos com desnaturação a 95°C durante um minuto, *annealing* a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A fase de extensão final fez-se a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, utilizando um marcador de peso molecular para confirmação do tamanho do fragmento amplificado (VR1 tem 144 pb e VR2 tem 327 pb).

A mistura de reacção para PCR em tempo real foi preparada com 0,7 µM de cada um dos *primers*, 2,5 mM de MgCl₂ e 2 µl de *master mix* com Sybre Green.

Os produtos de amplificação foram purificados pelo sistema de colunas Jetquick PCR Product Purification Spin kit (Genomed, Germany) ou com ExoSap, seguindo as indicações do fabricante e quantificados em gel de agarose a 2%.

As sequências nucleotídicas foram analisadas com recurso ao programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor (Isis Pharmaceuticals Inc). A sua identificação foi feita por comparação com as sequências alélicas contidas na base de dados Neisseria MLST em www.pubmlst.org/neisseria.

2.2.4 Caracterização genotípica por MLST

A técnica de *multilocus sequence typing* (MLST) para caracterização de *Neisseria meningitidis* inclui a amplificação de sete alelos de sete genes *housekeeping*, e a sua sequenciação, empregando *primers* internos de sequenciação (Anexo IV). Com o uso destes *primers* internos os produtos inespecíficos não são sequenciados, mesmo quando a amplificação se dá em condições de menor estringência, permitindo aumentar a sensibilidade.

Os sete alelos de genes *housekeeping* amplificados são dos seguintes:

abcZ – codifica para um transportador ABC, uma proteína de ligação ao ATP

adk – codifica para uma adenilato cinase

aroE – codifica para uma xiquimato desidrogenase

fumC – codifica para uma fumarase

gdh – codifica para uma glucose -6-fosfato-desidrogenase

pdhC – codifica para uma subunidade de uma piruvato desidrogenase

pgm – codifica para uma fosfoglutamase

A técnica realizada foi adaptada da técnica descrita por Maiden em 1998. Cada mistura de PCR foi prepara com 0,5 µM de cada *primer* para amplificação de cada um dos sete alelos referidos, uma mistura de nucleótidos na concentração de 0,2 mM, tampão S 10X

(tampão da Taq com 15 mM de MgCl₂), e 1U de *proof reading* Taq plimerase (peqGold hot Taq-DNA-polimerase).

A amplificação foi realizada com uma fase de desnaturação prévia a 95°C durante 8 minutos, 40 ciclos com desnaturação a 95°C durante um minuto, *annealing* a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 50 segundos. A fase de extensão final fez-se a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 2%, empregando um marcador de peso molecular para confirmação do tamanho do fragmento amplificado. Os produtos de amplificação foram purificados pelo sistema de colunas Jetquick PCR Product Purification Spin kit (Genomed, Germany) seguindo as indicações do fabricante e quantificados em gel de agarose a 2%.

As sequências nucleotídicas foram analisadas com recurso ao programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor (Isis Pharmaceuticals Inc). A sua identificação foi feita por comparação com as sequências alélicas contidas na base de dados Neisseria MLST em www.pubmlst.org/neisseria, na opção “Allele Sequence queries – Single locus query”.

Nesta aplicação informática, cada sequência submetida é alinhada com as sequências pré existentes e é identificada com um número, que será igual à de outro alelo se já existente na base de dados, ou com um número novo, se for uma sequência nova.

O perfil alélico que resulta da identificação dos sete alelos, na ordem alfabética porque foram enumerados, foi de seguida submetido à mesma base de MLST em www.pubmlst.org/neisseria, na opção “Allelic profile/sequence type queries – Allelic profile query”, para identificação do ST e do complexo clonal, tendo em conta que estirpes que partilham pelo menos quatro alelos iguais pertencem ao mesmo complexo clonal.

2.2.5 Fenómeno de alteração capsular

A dinâmica da DM por estirpes do serogrupo C é fundamentalmente determinada pela utilização da vacina. A possibilidade de alteração capsular como consequência da vacinação em massa implica a sua monitorização permanente no sentido de se detectarem falências vacinais. A confirmar-se este fenómeno, ele é uma variável a considerar no desenvolvimento do modelo. Os serotipos 2a e 2b são os mais frequentes entre estirpes do serogrupo C. Em oito anos de vigilância epidemiológica de base laboratorial realizada em Portugal, os fenótipos C:2b:P1.5,2 e C:2a:P1.5-1,10-8 foram os mais frequentes entre as estirpes C, representando 62% e 14% respectivamente do total das estirpes deste serogrupo. Estes serotipos são muito pouco frequentes entre

meningococos do serogrupo B, mas foram, ocasionalmente, isolados em Portugal, noutros países europeus, Canadá e Estados Unidos (Alcalá *et al.*, 2002; Stefanelli *et al.*, 2003; Kirz *et al.*, 1999 e Kertesz *et al.*, 1998).

Foram incluídas neste estudo todas as estirpes invasivas do serogrupo B, caracterizadas como 2a ou 2b isoladas no período em análise (12 estirpes) e 56 estirpes C, seleccionadas aleatoriamente de entre o total de meningococos do serogrupo C com o mesmo tipo. Para reconhecer as relações genéticas possíveis entre as estirpes B e C que expressam o subtipo 2a e 2b, bem como para detectar fenómenos de alteração capsular que possam ter ocorrido em Portugal, usou-se a técnica de electroforese em campo pulsado (PFGE) e, a partir de 2006, a de MLST implementada no laboratório nesse ano.

A técnica de PFGE foi inicialmente descrita por Schwartz e Cantor para análise do genoma completo de fungos (Schwartz *et al.*, 1984). A técnica baseia-se na mobilidade electroforética dos fragmentos de DNA que resultam da digestão do DNA cromossómico por enzimas de restrição (endonucleases que reconhecem zonas específicas de quatro a seis pares de bases repetidas no genoma). O resultado dessa digestão é um conjunto de fragmentos cujo número e tamanho depende da localização e frequência de corte da enzima. Para *Neisseria meningitidis*, uma espécie com um conteúdo médio de GC de 52%, a enzima a utilizar deve reconhecer uma sequência rica em adeninas e timinas para que a restrição dê origem a um número de fragmentos reduzido e a um perfil interpretável.

A técnica de PFGE utiliza uma electroforese com sucessivos campos eléctricos alternados, que forçam os fragmentos de DNA a mudar continuamente de direcção durante a migração, sendo possível separar fragmentos que tenham entre 30 kb e 5Mb (Schwartz *et al.*, 1984; Achtman *et al.*, 2001). Os fragmentos são visualizados após coloração do DNA e o perfil electroforético é analisado com recurso a programas informáticos que permitem também a construção de dendrogramas.

A enzima de restrição utilizada foi Bgl II, que tem a sua origem na bactéria *Bacillus globigii*. Reconhece sequências ricas em timinas e adeninas e tem o local de corte na sequência: 5'...A^vGATCT...3'



Da restrição do genoma de *Neisseria meningitidis* com Bgl II resultam perfis com 10 a 15 fragmentos. O sistema de electroforese em campo pulsado utilizado foi o da BIO-RAD (Chef Mapper XA).

Os padrões de restrição foram fotografados com uma câmara Gel Doc 2000 (BIO-RAD, California, USA) e analisadas empregando o *software* BioNumerics v 3.5 (Applied Maths). Os diferentes padrões de restrição foram designados com o prefixo Bg numa numeração

sequencial e gerado um dendrograma empregando o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA), com 5% de tolerância.

A interpretação dos perfis electroforéticos teve por base os critérios de Tenover, que se fundamentam no número e peso das bandas originadas pela restrição enzimática, tendo em conta que as variações genéticas observadas entre estirpes resultam de fenómenos de inserção, deleção ou de mutação pontual. Pela análise dos perfis de restrição inferiu-se se as estirpes comparadas eram idênticas, próximas, possivelmente relacionadas ou diferentes (Tenover *et al.*, 1995) (Tabela 5).

Tabela 5 - Interpretação dos perfis de restrição de acordo com os critérios de Tenover

Nº de diferenças genéticas relativamente à estirpe tomada como referência	Nº de bandas diferentes relativamente ao perfil da estirpe tomada como referência	Relação entre estirpes
0	0	Estirpes idênticas
1	2 a 3	Estirpes próximas
2	4 a 6	Estirpes possivelmente relacionadas
3 ou mais	7 ou mais	Estirpes diferentes

2.2.6 *Estudo de susceptibilidade aos antibióticos*

Seguindo as recomendações do EMGM, foi utilizado o método de diluição em agar para determinação da concentração mínima inibitória, de acordo com o protocolo M7-A7 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Anexo IV).

Numa primeira fase do estudo foi apenas feita a diferenciação entre estirpes susceptíveis não susceptíveis, incorporando no agar a respectiva concentração do antibiótico para que, de acordo com os critérios do CLSI, a estirpe seja considerada susceptível (Tabela 6).

Na segunda fase do estudo foram estudadas as estirpes que apresentaram CMI superiores ao limite de susceptibilidade. Dado que apenas em relação à penicilina se encontraram estirpes com susceptibilidade diminuída, apenas deste antibiótico se prepararam soluções com sucessivas concentrações duplas (Tabela 7).

Tabela 6 – Interpretação da CMI de *Neisseria meningitidis* (critério do CLSI)

Antibiótico	CMI de estirpes susceptíveis	CMI de estirpes intermédias	CMI de estirpes resistentes
Penicilina	≤ 0,06 mg/L	0,12-0,25 mg/L	≥0,5 mg/L
Ciprofloxacina	≤ 0,03 mg/L	0,06 mg/L	≥0,12 mg/L
Rifampicina	≤0,5 mg/L	1 mg/L	≥2 mg/L

Tabela 7 - Concentrações de Penicilina utilizada para a determinação de CMI

Antibiótico	Concentração de antibiótico (mg/L)				
Penicilina	0,06	0,12	0,24	0,48	0,9

A partir da substância pura prepararam-se soluções primárias de Penicilina, Ciprofloxacina e Rifampicina e diluições necessárias para obter a concentração desejada. A Penicilina utilizada foi na forma de sulfato de penicilina 1200 Unidades. Uma unidade de penicilina corresponde a 0,000625 mg da substância pura, de acordo com a Farmacopeia Portuguesa.

Prepararam-se placas com 3 mm de profundidade com agar de Mueller Hinton (BioMérieux) com de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, adicionadas de soluções de Penicilina, Ciprofloxacina e Rifampicina, de modo a obter as concentrações consideradas no limite de susceptibilidade, referidas na tabela 6.

Inoculou-se 1 µl de suspensão bacteriana com uma turvação aferida no Densimat a um valor de 0,5 McFarland em cada uma das placas de agar com antibiótico. Como controlo de crescimento inoculou-se 1 µl das mesmas suspensões numa placa de agar de Mueller Hinton com 5% de sangue sem antibiótico.

Após 18 horas de incubação a 35 ± 2°C em estufa com 5 a10% de CO₂ as culturas foram observadas e registada a presença ou ausência de crescimento ou, na segunda fase do estudo, a concentração de Penicilina a partir da qual foi inibido completamente o crescimento bacteriano.

As soluções de antibiótico foram controladas empregando estirpes de referência de American Type Culture Collection (ATCC) – *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, de acordo com o procedimento M100-S17 do CLSI (Anexo IV).

3 Resultados

Entre 1 de Julho de 2002 e 30 de Junho de 2010 (período correspondente a oito anos epidemiológicos) registaram-se em Portugal 1139 casos de doença meningocócica, dos quais 905 (79%) tiveram confirmação laboratorial e 234 (21%) foram classificados como casos prováveis (Tabela 8).

Tabela 8 – Número de casos de doença meningocócica ocorrida em Portugal nos anos epidemiológicos de 2002-03 a 2009-10. Diferenciação entre casos classificados como confirmados e prováveis (percentagem relativamente ao total de casos)

Ano epidemiológico	Total casos	Total casos confirmados	Casos prováveis
2002-2003	254	183 (72%)	71 (28%)
2003-2004	209	150 (72%)	59 (28%)
2004-2005	179	145 (81%)	34 (19%)
2005-2006	139	125 (90%)	14 (10%)
2006-2007	119	90 (76%)	29 (24%)
2007-2008	85	74 (87%)	11 (13%)
2008-2009	79	67 (85%)	12 (15%)
2009-2010	75	71 (95%)	4 (5%)
TOTAL	1139	905 (79%)	234 (21%)

A confirmação laboratorial da DM foi, na maioria dos casos, feita nos laboratórios hospitalares por isolamento de *Neisseria meningitidis* em cultura (88%). Numa percentagem reduzida e variável ao longo do período em análise, a confirmação foi feita no LNR por identificação de DNA de *Neisseria meningitidis*, por uma técnica de PCR em tempo real (12%) (tabela 9).

A distribuição dos casos de DM ao longo do ano confirmou a sazonalidade esperada, com o pico de incidência nos meses de inverno (Figura 21). Esta sazonalidade observada é coincidente com a sazonalidade da gripe de acordo com os dados dos relatórios anuais do Sistema Nacional de Vigilância da Gripe (INSA em colaboração com a DGS) (Figura 22).

Tabela 9 – Número de casos confirmados por cultura e por PCR (percentagem relativamente ao total de casos confirmados)

Ano epidemiológico	Casos confirmados por cultura	Casos confirmados por PCR	Total de casos confirmados
2002-2003	154 (84%)	29 (16%)	183
2003-2004	132 (88%)	18 (12%)	150
2004-2005	123 (85%)	22 (15%)	145
2005-2006	111 (89%)	14 (11%)	125
2006-2007	84 (93%)	6 (7%)	90
2007-2008	67 (91%)	7 (9%)	74
2008-2009	64 (96%)	3 (4%)	67
2009-2010	64 (90%)	7 (10%)	71
Total	799 (88%)	106 (12%)	905

Nº de casos de DM

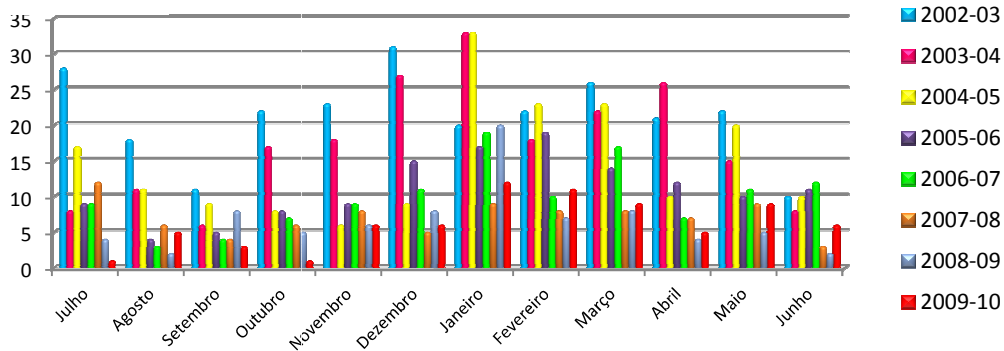


Figura 21 – Distribuição dos casos de doença meningocócica ao longo do ano epidemiológico

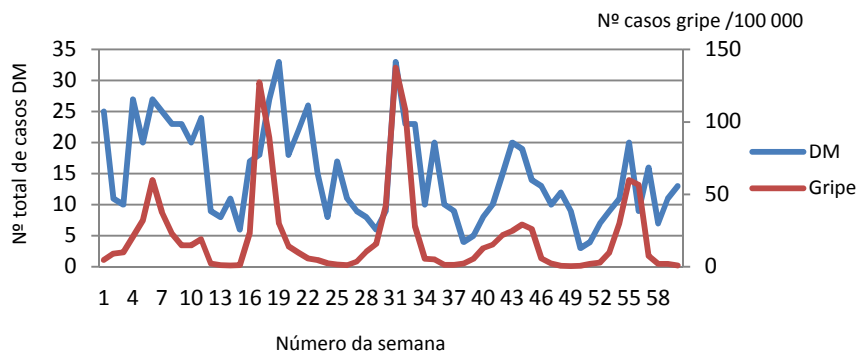


Figura 22 – Distribuição do número médio de casos semanais de DM e de gripe, entre Julho de 2002 (semana 1) e Junho de 2007 (semana 60)

3.1 Incidência por grupo etário

A incidência da DM variou entre 2,34 e 0,7 por 100 mil habitantes (Figura 23). Foi máxima no primeiro ano de vida, variando entre 10,7 e 50,5 casos por 100 mil crianças. Registou-se uma diminuição progressiva da incidência a partir do ano de idade (tabela 10).

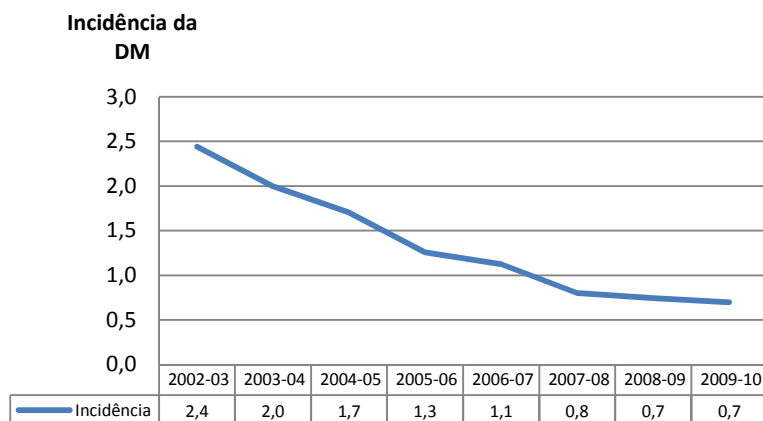


Figura 23 – Incidência da DM em Portugal ao longo dos oito anos epidemiológicos em análise (2002 a 2010)

Tabela 10 – Incidência da DM por grupo etário, entre Julho de 2002 e Junho de 2010

Ano epidemiológico	< 1 ano		1-4 anos		5-9 anos		10-14 anos		15-19 anos		20-24 anos		25-44 anos		45-64 anos		> 65 anos	
	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.	Nº casos	Inc.
2002-2003*	48	42,9	102	22,9	34	6,4	10	1,8	12	1,9	4	0,5	12	0,3	11	0,4	4	0,2
2003-2004**	55	50,6	87	19,6	24	4,5	9	1,6	7	1,2	3	0,4	8	0,2	4	0,2	8	0,4
2004-2005	50	45,9	53	11,9	31	5,7	16	2,9	8	1,4	4	0,6	8	0,2	4	0,2	5	0,3
2005-2006	43	40,9	42	9,5	13	2,4	7	1,3	8	1,4	5	0,7	8	0,2	10	0,4	3	0,2
2006-2007	33	32,3	48	10,8	11	2,0	10	1,9	2	0,3	1	0,2	4	0,1	6	0,2	4	0,2
2007-2008	22	21,2	33	7,6	11	2,0	3	0,6	2	0,3	2	0,2	5	0,1	3	0,1	4	0,2
2008-2009	22	21,9	32	7,1	8	1,4	0	0	5	0,9	1	0,2	4	0,1	6	0,2	1	0,1
2009-2010	11	10,7	26	6,0	13	2,3	1	0,2	5	0,9	1	0,2	5	0,1	5	0,2	7	0,4

Inc. = incidência

*Idade desconhecida de 18 doentes

**Idade desconhecida em 4 doentes

3.2 Incidência por serogrupos

Das 897 estirpes invasivas de *Neisseria meningitidis* responsáveis por casos confirmados de DM em Portugal durante os oito anos em análise, foi caracterizado o serogrupo de 824 (91,6%) no LNR.

Com exceção do primeiro ano deste período, o serogrupo B foi o mais frequente em todos os anos, com uma tendência crescente até 2004-2005. O serogrupo C evidenciou uma marcada diminuição a partir de 2003-2004. Em 2006 verificou-se uma nova diminuição do número de casos por serogrupo C (Tabela 11). Assinale-se que se registou uma vacinação em massa, por iniciativa dos pais e pediatras no inverno de 2002-2003, e que a vacina foi introduzida no PNV em Outubro de 2006. Os restantes serogrupos foram residuais, contudo, notou-se uma tendência decrescente no número de casos por W135.

Tabela 11 – Número de casos de DM (confirmados e estimados) por serogrupo, registados entre Julho de 2002 e Junho de 2010

Ano epidemiológico	B	C	W135	Y	A	NG	Desconhecido
2002-2003	62	67	8	1	2	6	108
2003-2004	104	27	2	3	2	2	69
2004-2005	108	18	4	2	1	2	44
2005-2006	97	18	1	5	0	0	18
2006-2007	75	5	2	3	0	1	33
2007-2008	68	0	2	2	1	1	11
2008-2009	63	1	1	3	2	0	9
2009-2010	46	4	0	1	0	1	23
Total	623	140	20	20	8	13	315

A proporção dos serogrupos em cada grupo etário revelou uma acentuada diferença entre o início e o fim do período em análise, naturalmente devido à diminuição do número de estirpes C. No conjunto da população portuguesa, a incidência de DM por estirpes do grupo C reduziu drasticamente, de forma mais marcada em crianças até nove anos (Figura 24 e Figura 25).

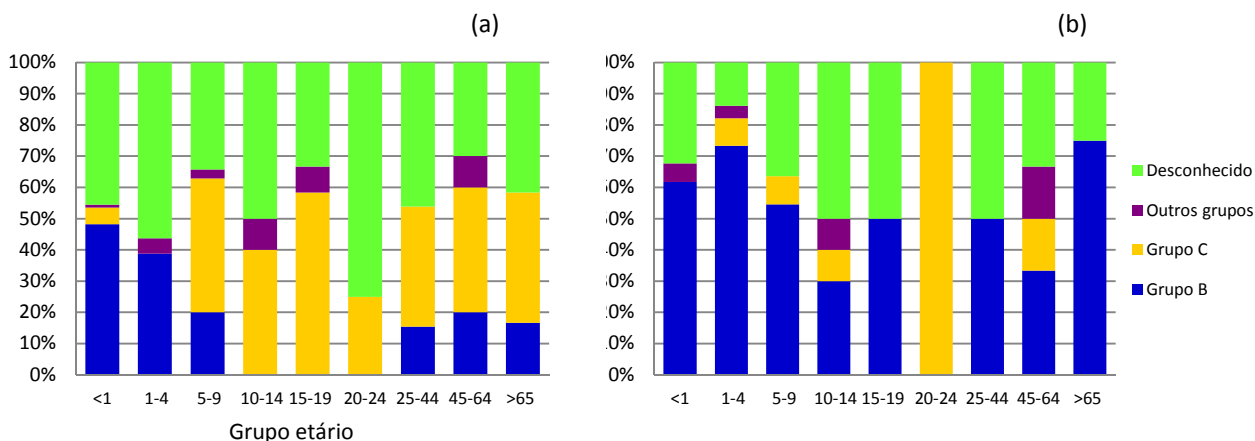


Figura 24 – Proporção das incidências dos serogrupos por grupo etário nos anos epidemiológicos 2002-2003 (a) e 2006-2007 (b)

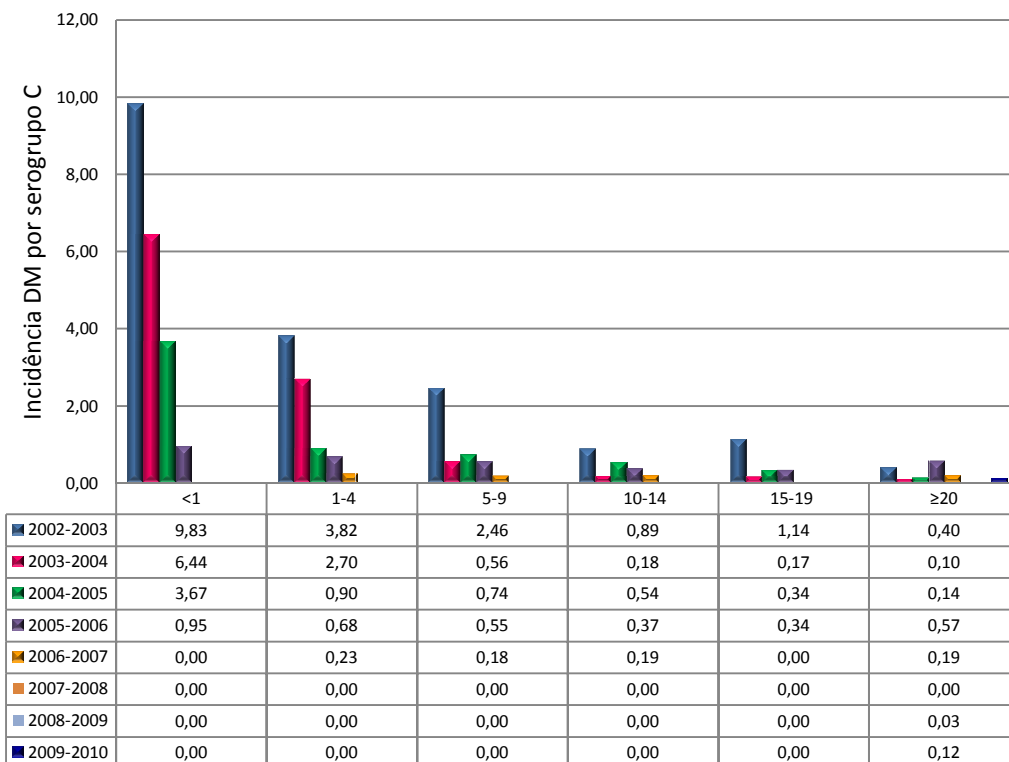


Figura 25 – Taxas de incidência de DM por serogrupo C, por grupo etário, ocorrida em Portugal no período 2002-03 a 2009-10

Observou-se uma tendência decrescente na incidência da DM por serogrupos não C em crianças até quatro anos. Nos restantes grupos etários a incidência manteve-se constante (Figura 26).

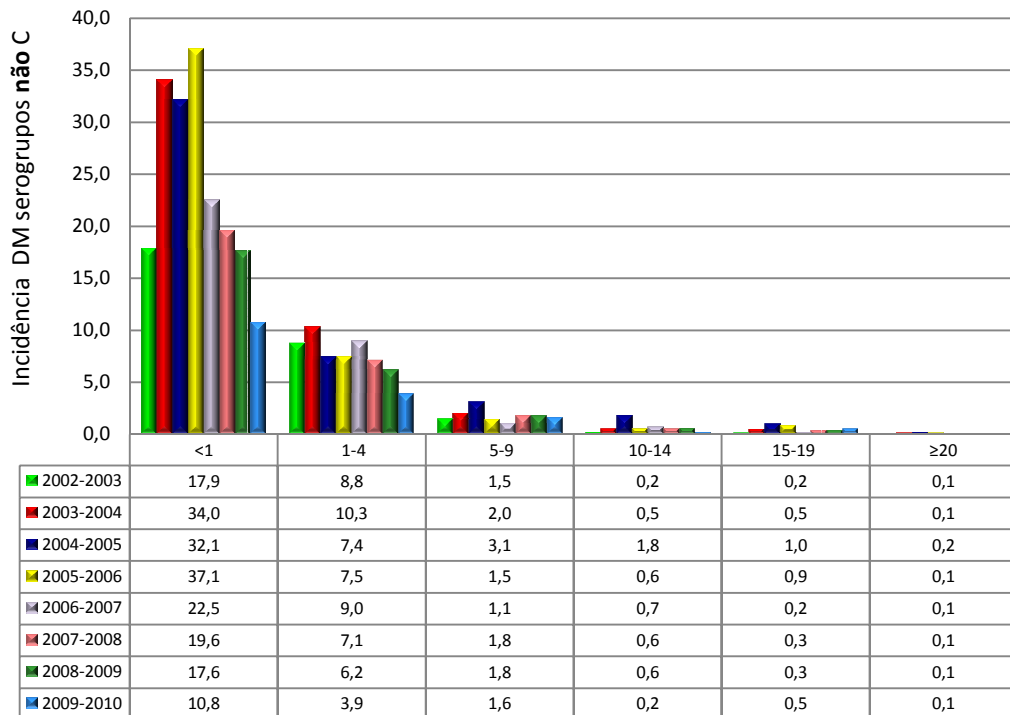


Figura 26 – Taxas de incidência de DM por serogrupos **não C**, por grupo etário, ocorrida no período 2002-03 a 2009-10

3.3 Caracterização genotípica

3.3.1 Identificação do sequence type (ST) e de complexos clonais hiper virulentos e não hiper virulentos

Das 905 estirpes de *Neisseria meningitidis* responsáveis por doença invasiva confirmada, ocorrida em Portugal entre Julho de 2002 e Junho de 2010, foram recebidas 487 no LNR (54%). Destas, 262 foram caracterizadas por MLST (29% do total das estirpes invasivas) (Tabela 12). Foi caracterizado o ST de 82 estirpes C e de 180 estirpes não C, representando todos os serogrupos isolados em todos os grupos etários considerados (Tabela 13 e Tabela 14).

Tabela 12 – Número de estirpes invasivas e número de estirpes caracterizadas por MLST, com referência ao ano do seu isolamento (período entre 2002 e 2010)

Ano epidemiológico	Nº total de estirpes invasivas (isoladas ou identificadas por PCR)	Nº total de estirpes caracterizadas por MLST	% de estirpes caracterizadas (relativamente ao total de estirpes identificadas)
2002-2003	183	42	23,0 %
2003-2004	150	26	17,3 %
2004-2005	145	72	49,7 %
2005-2006	125	25	22,1 %
2006-2007	90	18	20,0 %
2007-2008	74	6	8,1%
2008-2009	67	26	38,8%
2009-2010	71	47	67,1%
Total	905	262	

Tabela 13 – Número de estirpes de cada serogrupo caracterizadas por MLST, com referência ao ano do seu isolamento (percentagem relativamente ao total de estirpes do mesmo serogrupo, isoladas ou identificadas por PCR no mesmo ano)

Ano epidemiológico	Estirpes serogrupo B	Estirpes serogrupo C	Estirpes serogrupo W135	Estirpes serogrupo Y
2002-2003	11 (17,7%)	29 (43,3%)	1 (16,7%)	0 (-)
2003-2004	6 (5,8%)	19 (70,4%)	1 (50%)	0 (-)
2004-2005	55 (51,9%)	15 (83,3%)	2 (100 %)	0 (-)
2005-2006	9 (10,1%)	14 (72,2%)	1 (100%)	1 (20%)
2006-2007	18 (24%)	1 (20%)	0 (-)	0 (-)
2007-2008	6 (8,2%)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
2008-2009	26 (41,3%)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
2009-2010	41 (89%)	4 (100%)	0 (-)	1 (100%)
Total*	172 (27,6%)	82 (59,1%)	5 (25%)	2 (10%)

* + 1 estirpe não grupável caracterizada por MLST

Tabela 14 – Distribuição por grupo etário das estirpes invasivas de meningococos responsáveis por DM confirmada, ocorrida entre Julho de 2002 e Junho de 2010, e número de estirpes caracterizadas por MLST no mesmo período

Grupo etário*	Total de estirpes identificadas (cultura ou PCR)	Total de estirpes caracterizadas por MLST	% de estirpes caracterizadas (relativamente ao total de estirpes identificadas)
< 1 ano	232	61	26,3
1-4 anos	328	81	24,7
5-9 anos	110	43	39,1
10-14 anos	44	16	36,4
15-19 anos	37	15	40,5
20-24 anos	16	10	62,5
25-44 anos	47	19	40,4
45-64 anos	43	8	18,6
>65 anos	26	9	34,6
Total	883*	182	20,1%

* Idade desconhecida em 22 doentes

Os resultados de caracterização indicam que a proporção de estirpes invasivas de complexos clonais hiper virulentos em cada grupo etário é diferente no conjunto de estirpes C e não C. As estirpes do serogrupo C são maioritariamente HV e distribuem-se uniformemente através dos grupos etários. Contrariamente, a distribuição das estirpes invasivas de meningococos de outros serogrupos caracterizou-se por uma percentagem baixa de estirpes HV nas idades extremas da vida (Tabela 15, Tabela 16 e Figura 27).

Tabela 15 – Número total de estirpes do serogrupo C caracterizadas. Número de estirpes de cc hiper virulentos e não hiper virulentos e respectiva proporção por grupo etário

Grupo etário	Meningococos do serogrupo C								
	Nº total estirpes caracterizadas	Estirpes hiper virulentas						Estirpes não hiper virulentas	
		Nº	%	ST-8	ST-11	ST-41/44	ST-269	Nº	%
< 1 ano	11	9	82%	6	3	0	0	2	18%
1-4 anos	23	22	96%	16	4	2	0	1	4%
5-9 anos	15	14	93%	11	2	0	1	1	7%
10-14 anos	9	9	100%	6	3	0	0	0	0%
15-19 anos	8	7	88%	3	4	0	0	1	12%
20-24 anos	6	6	100%	4	2	0	0	0	0%
25-44 anos	5	4	80%	2	2	0	0	1	20%
45-64 anos	3	3	100%	2	1	0	0	0	0%
>65 anos	2	1	50%	0	1	0	0	1	50%

Tabela 16– Número total de estirpes de serogrupos não C caracterizadas. Número de estirpes de cc hiper virulentos e não hiper virulentos e respectiva proporção por grupo etário

Grupo etário	Meningococos de serogrupos não C									
	Nº total estirpes caracterizadas	Estirpes hiper virulentas							Estirpes não hiper virulentas	
		Nº	%	ST-8	ST-11	ST-41/44	ST-269	ST-32	Nº	%
< 1 ano	50	19	38%	3*	2	10	3	1	31	62%
1-4 anos	58	36	62%	1*	2*	17	5	11	24	38%
5-9 anos	28	14	50%	0	0	4	5	5	14	50%
10-14 anos	7	5	71%	0	0	2	1	2	2	29%
15-19 anos	7	5	71%	0	0	2	1	2	2	29%
20-24 anos	4	4	100%	0	0	2	1	1	0	0%
25-44 anos	14	12	86%	0	6*	4	1	1	2	14%
45-64 anos	5	1	20%	0	0	1	0	0	4	80%
>65 anos	7	2	29%	0	0	2	0	0	5	71%

* Estirpes com alterações capsulares

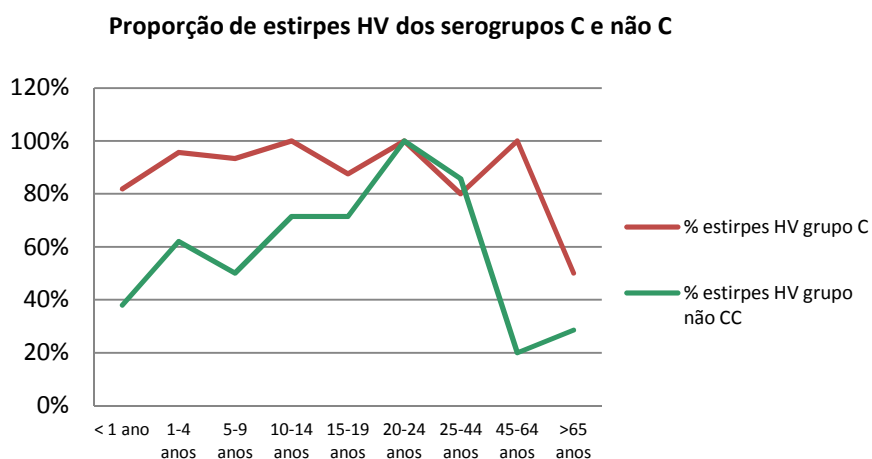


Figura 27 – Proporção de estirpes hiper virulentas de meningococos de serogrupos C e não C por grupo etário

As estirpes de serogrupos não C evidenciaram uma maior variabilidade genética. Os complexos clonais hiper virulentos mais frequentes foram ST-41/44, ST-32 e ST-269 (Figura 28). As estirpes não C dos complexos clonais ST-11 e ST-8 evidenciaram terem tido origem em estirpes do serogrupo C com alterações capsulares.

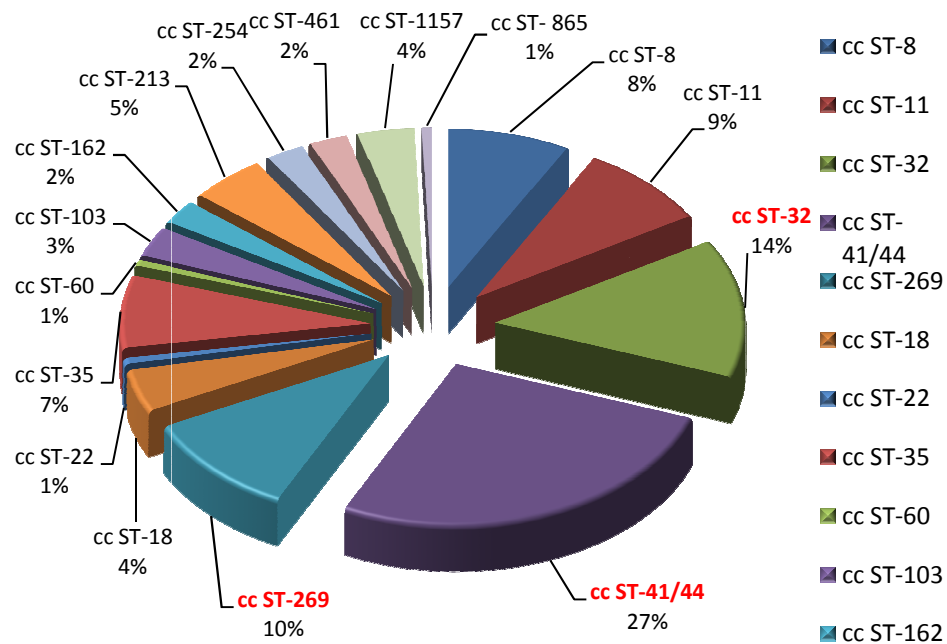


Figura 28 – Proporção de complexos clonais de meningococos de serogrupos não C isolados em Portugal entre Outubro de 2002 e Junho de 2010

As estirpes ST-1157 representam 4% das estirpes invasivas isoladas em Portugal e apenas 0,1% dos meningococos que causam doença invasiva no conjunto dos 14 países europeus analisados. Curiosamente, esta parece ser uma estirpe característica da região do Montijo/Barreiro uma vez que cinco das seis estirpes caracterizadas com este ST infectaram crianças residentes na zona do Barreiro e Montijo.

3.3.2 Caracterização do tipo, subtipo e identificação do genótipo

Foi caracterizado o subtipo de 82 (82/138) estirpes invasivas do serogrupo C e de 315 (315/684) estirpes não C, isoladas entre Outubro de 2002 e Junho de 2010.

As estirpes do serogrupo C revelaram uma baixa variabilidade genética relativamente à proteína PorA, com predomínio de VR1 da família 5 (90%) e de VR2 da família 2 (71%).

A caracterização do tipo, por identificação antigénica da proteína PorB (método de ELISA), foi feita em todas as estirpes do serogrupo C. Apenas se identificaram proteínas do tipo 2 (2a e 2b). Apesar de ser esperado que alterações acumuladas no genoma conduzissem a proteínas de membrana antigenicamente modificadas e, conseqüentemente, não reconhecidas pelo painel de anticorpos monoclonais disponível

no mercado, verificou-se que apenas 9,7% das estirpes deste serogrupo se revelaram não tipáveis.

Observou-se uma prevalência de estirpes de cc hiper virulentos entre meningococos do serogrupo C (91,4%), quase que exclusivamente de dois únicos complexos clonais, ST-8 e ST-11 (Tabela 17).

Tabela 17 – Genótipos de meningococos do serogrupo C isolados entre Outubro de 2002 e Junho de 2010

Genótipo	ST (cc)	Frequência	
		Número	%
C:2b:P1.5,2	cc ST-8/Cluster A4	49	59,7%
C:2a:P1.5-1,10-8	cc ST-11/ET-37	11	13,4%
C:2a:P1.5,2	cc ST-11/ET-37	4	4,8%
C:2b:P1.5,15	cc ST-8/Cluster A4	1	1,2%
C:2b:P1.5,2-1	cc ST-11 (cc ST-11)	1	1,2
C:NT:P1.5,2	cc ST-11/ET-37	2	2,4%
	cc ST-8/Cluster A4	1	1,2%
C:NT:P1.5-1,2-2	ST-6076 (ccST-103)	1	1,2
	ST-6080 (cc-)	1	1,2%
C:NT:P1.5	ST-2818 (cc ST-254)	1	1,2%
	cc ST-11/ET-37	1	1,2%
	ST-60 (cc-)	1	1,2%
	ST-269 (1 estirpe)		
Outros com VR1 ≠ de 5	ST-41/44 (2 estirpes)	8	9,7%
	ST-11 (2 estirpes)		
Total		82	

Os meningococos não C evidenciaram uma grande diversidade de subtipos, principalmente relacionada com a região variável 2. As estirpes predominantes são das famílias 5, 7 e 22 (VR1) e das famílias 4, 9, 14 e 15 (VR2). Os subtipos mais frequentemente observados foram P1.22,14 e P1.7-2,4 (Figura 29).

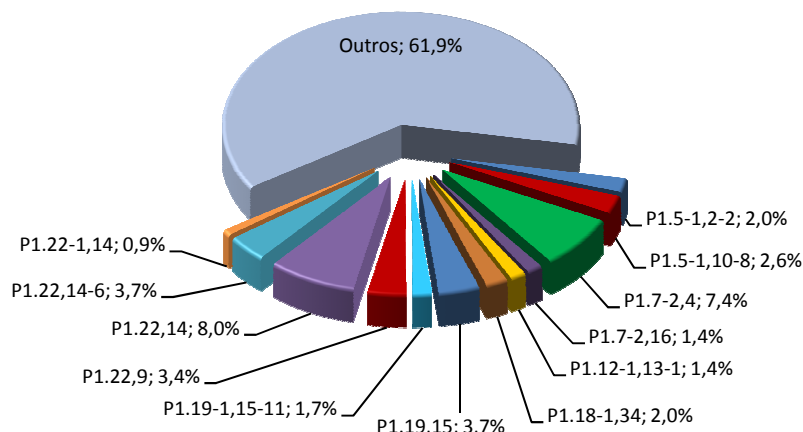


Figura 29 – Subtipos mais frequentes em estirpes de serogrupos não C, isoladas em Portugal entre Outubro de 2002 e Julho de 2010

3.4 Estudo de susceptibilidade aos antibióticos

Foram estudadas 326 estirpes de meningococos, isoladas em Portugal entre Outubro de 2002 e Junho de 2010, o que corresponde a 36% das estirpes invasivas isoladas de casos de DM com confirmação laboratorial durante os oito anos epidemiológicos em análise.

Em nenhuma das estirpes estudadas se observou diminuição da susceptibilidade nem à Ciprofloxacina nem à Rifampicina, com as mais elevadas CMI respectivamente 0,004 mg/L e 0,19 mg/L. Relativamente à Penicilina, embora a percentagem de estirpes com susceptibilidade diminuída seja baixa (13,5%), observou-se ao longo dos oito anos um aumento da CMI (Tabela 18).

Tabela 18– Concentração mínima inibitória de Penicilina para *Neisseria meningitidis* responsável por doença invasiva em Portugal, entre Julho de 2002 e Junho de 2010

Ano epidemiológico	Nº estirpes estudadas	CMI (mg/L)				
		≤0,064	>0,064 <0,24	≥0,24 <0,5	≥0,5 <0,75	≥0,75
2002-2003	63	98,4%	1,6%	-	-	-
2003-2004	81	92,6%	6,2%	1,2%	-	-
2004-2005	99	98,0%	2,0%	-	-	-
2005-2006	17	70,6%	29,4%	-	-	-
2006-2007	21	52,4%	47,6%	-	-	-
2007-2008	-	-	-	-	-	-
2008-2009	16	43,8%	18,8%	31,3%	6,3%	-
2009-2010	29	62,1%	20,7%	13,8%	-	3,4%

3.5 O fenómeno de alteração capsular

Noventa estirpes de meningococos isoladas entre Outubro de 2002 a Junho de 2010 foram caracterizadas com o tipo 2a ou 2b, das quais 66 eram do serogrupo C (66/82 do total de estirpes C caracterizadas) e 24 de serogrupos não C (24/180 do total de estirpes não C caracterizadas).

O genótipo **2b:P1.5,2:ST-8** foi o mais frequente entre as estirpes do serogrupo C e foi também identificado em seis estirpes B. Das estirpes com o genótipo **2a:P1.5-1,10-8:ST-11**, o segundo mais frequente entre as estirpes C, sete eram do serogrupo B (Tabela 19 e Tabelas 20).

Tabela 19 – Estirpes invasivas de meningococos isoladas em Portugal entre Outubro de 2002 e Junho de 2010, caracterizadas com tipo 2a ou 2b

Fenótipo	Nº de estirpes por serogrupo		
	C	B	W135
2b:P1.5,2:ccST-8	49	6	
2a:P1.5-1,10-8:ccST-11	12	7	
2a:P1.5,2:ccSt-11	2		2
2b:P1.5			2
Outros	3	7	
Total	66	20	4

O complexo clonal ST-8/cluster A4 ocorreu principalmente como ST-8 e ST-2289 e do complexo clonal ST-11/ET-37 distinguiram-se apenas dois perfis alélicos diferentes, ST-11 e ST-5368.

Os perfis de restrição que resultaram da electroforese em campo pulsado foram agrupados nos três grandes grupos: Bg2, Bg3 e Bg11 (Figura 30). Quatro das seis estirpes com o fenótipo B:2b:P1.5,2, ST-8 tiveram um perfil electroforético Bg3, tal como a maior parte das estirpes do serogrupo C com o mesmo genótipo. Cinco estirpes caracterizadas como B:2a:P1.5-1,10-8,ST-11 apresentaram ligeiras diferenças no padrão de *pulsedfield* quando comparadas com as correspondentes estirpes C (duas estirpes não foram estudadas por PFGE).

Tabela 20 – Resultados da análise por PFGE das estirpes de meningococos dos serogrupos C e B com o tipo 2a e 2b, isolados em Portugal entre Outubro de 2002 e Junho de 2010

ST	Complexo ST	Genótipo	Frequência do genótipo	PFGE	Frequência do perfil de PFGE
8	ST-8 complex/Cluster A4	B:2b:P1.5,2	4	Bg3	2*
8	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	29	Bg3	7
				Bg3.1	2
				Bg3.2	2
				NR	18
66	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	1	NR	1
760	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	2	NR	2
2711	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	1	Bg3	1
5712	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	1	Bg2.1	1
5714	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	1	Bg3.1	1
5716	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	2	Bg3	2
2289	ST-8 complex/Cluster A4	C:2b:P1.5,2	8	Bg2	3
				Bg2.1	1
				NR	4
11	ST-11/ET-37 complex	C:2a:P1.5-1,10-8	6	Bg 11	5
				NR	1
11	ST-11/ET-37 complex	B:2a:P1.5-1,10-8	7	Bg 11.1	5*
				NR	2
5368	ST-11/ET-37 complex	C:2a:P1.5-1,10-8	5	Bg 11	5
32	ST-32/ET-5 complex	B:2b:P1.5,2	2	Bg 17	2

NR = Não Realizado

*PFGE não realizada em 2 estirpes

Das 11 estirpes recombinantes encontradas, quatro foram isoladas de crianças com idade inferior a um ano, duas foram isoladas de crianças com quatro e cinco anos e as restantes cinco infectaram adultos com idade entre 30 e 41 anos. Nenhum doente era vacinado com MenC.

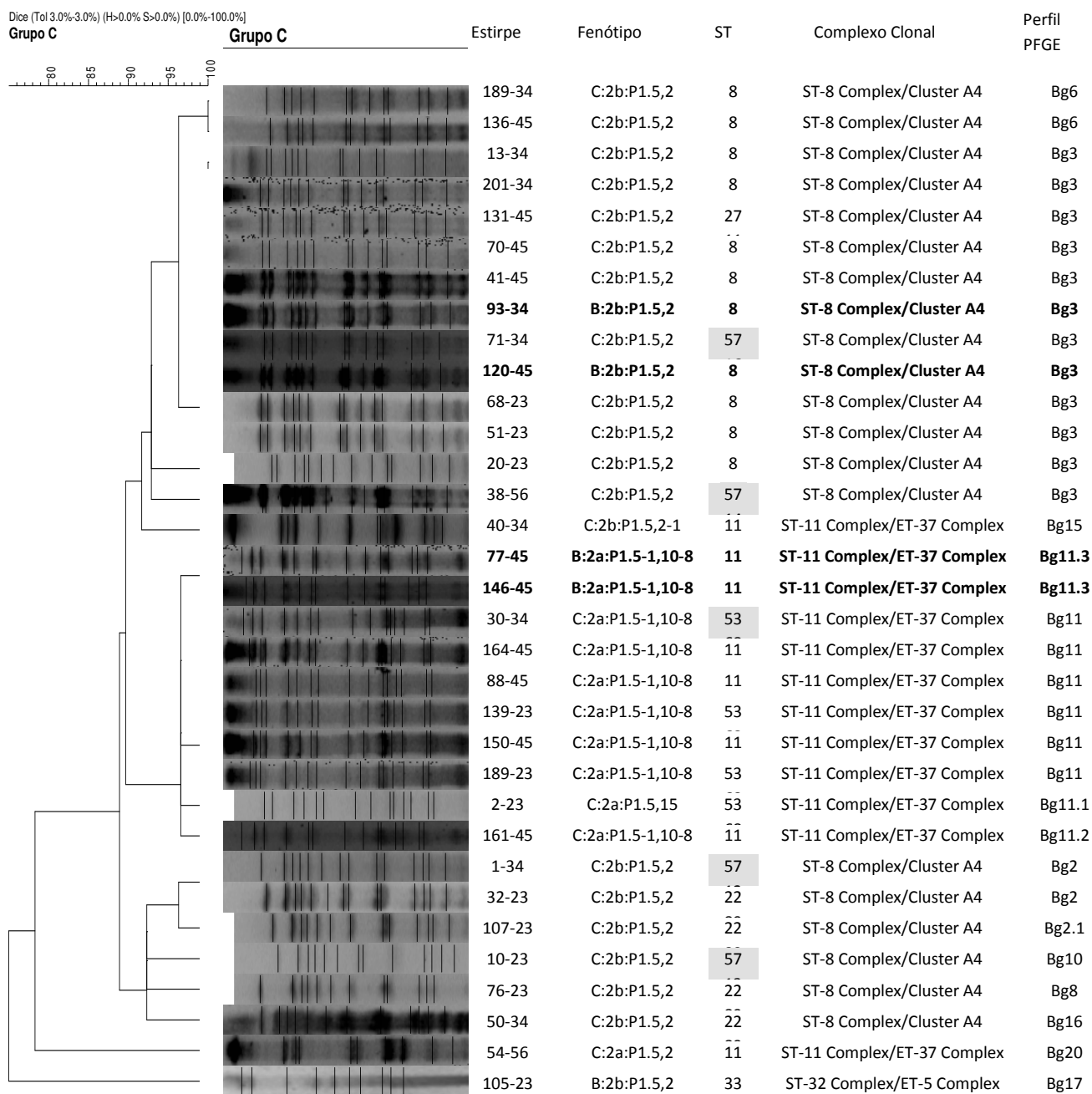


Figura 30 - Dendrograma construído com os perfis electroforéticos de 33 estirpes incluídas no estudo de alterações capsulares. O programa utilizado foi o Bionumerics v2.0 (*Applied Maths*) com o algoritmo *single linkage* com um erro associado de 3%.

4 Discussão

A implementação do Sistema de Vigilância Integrada da Doença Meningocócica em Portugal contribuiu para um melhor conhecimento e controlo da doença, por ter aumentado o número de casos confirmados e de estirpes caracterizadas (Figura 31), o que gerou informação que permitiu a tomada de decisões em políticas de saúde, nomeadamente a introdução da vacina conjugada para meningococos do serogrupo C no plano nacional de vacinação.

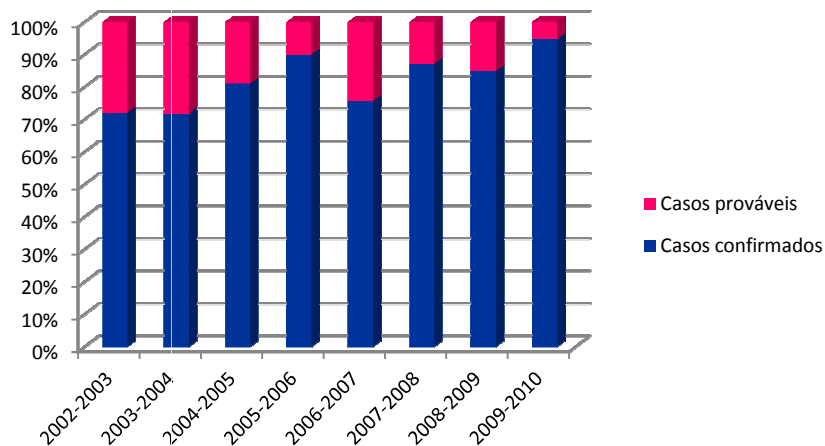


Figura 31– Percentagem de casos de DM com e sem confirmação laboratorial, registados entre 2002-2003 e 2009-2010

Os dados obtidos através deste sistema de vigilância, nomeadamente os de caracterização de estirpes invasivas, contribuem, mas não são suficientes, para a quantificação das variáveis que afectam a dinâmica da doença meningocócica, já identificadas anteriormente e já representadas as suas inter-relações nos diagramas de ciclo causal (capítulo II). Com os resultados do estudo experimental pretende-se avaliar se a situação epidemiológica em Portugal é semelhante à que se observa na maioria dos restantes países europeus para que, na ausência de dados nacionais, as variáveis do sistema dinâmico da DM possam ser quantificadas a partir dos dados europeus.

4.1 Incidências

A incidência da DM variou entre 2,33 por 100 mil, no ano epidemiológico 2002-2003 e 0,7 por 100 mil em 2009-2010, valor abaixo da média em 20 países europeus, notificadores para a rede EU-IBIS e para o sistema de notificação europeu (Tessy) (Tabela 21) (EU-IBIS, 2007; ECDC, 2010).

Em Portugal, a diminuição da incidência da DM deve-se à diminuição do número de estirpes invasivas do serogrupo C. A mesma redução foi observada em países europeus onde a vacina MenC foi introduzida no calendário de vacinação (Figura 32).

Tabela 21 - Incidência da DM em 20 países Europeus no período entre 2002 e 2008

País	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Áustria	1.06	1.00	1.08	1.30	0.93	0,74	1,0
Bélgica	2.54	2.20	1.51	1.63	1.32	1,5	1,04
República Checa	1.20	0.98	1.03	0.95	0.77	0,73	0,79
Dinamarca	1.86	1.95	1.85	1.64	1.45	1,4	1,2
Estónia	0.73	0.74	0.81	0.96	0.82	0,82	0,45
Filândia	0.94	0.81	0.86	0.77	0.86	0,81	0,55
França	1.11	1.31	1.13	1.19	1.13	1,10	1,10
Grécia	2.12	1.19	0.65	0.88	1.02	0,95	0,70
Islândia	5.22	2.77	3.42	1.69	1.31	1,30	0,63
Irlanda	6.43	5.96	4.92	4.91	4.96	3,80	3,50
Itália	0.39	0.48	0.55	0.56	0.30	0,3	0,29
Latvia	-	1.03	1.03	0.78	0.52	0,66	0,26
Lituânia	1.90	1.27	2.67	2.36	2.26	1,50	2,00
Malta	3.52	4.25	3.33	2.47	8.90	1,50	0,73
Holanda	3.82	2.19	1.75	1.51	1.09	1,20	0,98
Noruega	1.13	1.12	0.74	0.85	0.75	0,64	0,76
Espanha	2.71	2.45	2.11	2.15	1.84	1,40	1,30
Suécia	0.53	0.63	0.65	0.63	0.57	0,54	0,53
Suiça	1.56	1.19	1.16	1.02	0.95	-	-
Reino Unido	3.38	3.10	2.59	2,78	2.33	2,50	2,10

Fonte: EU-IBIS 2007 e ECDC 2010

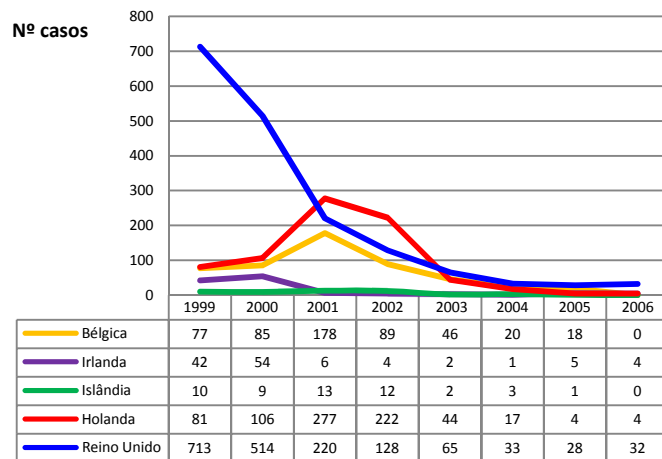


Figura 32– Distribuição de estirpes invasivas do serogrupo C por ano, em países onde a vacina MenC foi introduzida até 2002. Fonte: EU-IBIS 2007

A vacina conjugada MenC foi licenciada em 1999 no Reino Unido, o primeiro país que iniciou a vacinação por rotina de crianças (Novembro de 1999). Entre 2000 e 2002 vários países europeus incluíram a vacina nos seus calendários de vacinação (Bélgica, Republica Checa, etc.), com esquemas de vacinação diferentes e campanhas de *catch-up* dirigidos a grupos etários diferentes.

O decréscimo na proporção de casos de DM por estirpes do serogrupo C nos anos subsequentes à introdução da vacina MenC, não observado no mesmo intervalo de tempo em países em que a vacinação não foi realizada, permite concluir da eficácia da vacina no controlo da infecção por estirpes deste serogrupo (Figura 33).

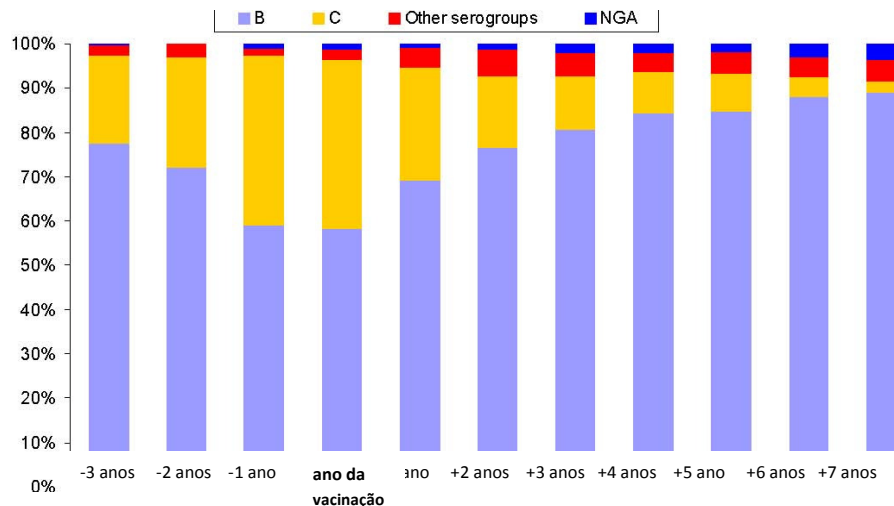


Figura 33 – Proporção de serogrupos confirmados e estimados nos anos ante e pós a introdução da vacina MenC em países que a introduziram regularmente nos esquemas de vacinação*

*Países (ano de introdução da vacina): Bélgica (2002), Islândia (2002), Irlanda (2000), Holanda (2002), Espanha (2000), Reino Unido (1999). Fonte: EU-IBIS network 2007

Em Portugal, as reduções mais marcadas no número de estirpes invasivas do serogrupo C observaram-se no final do primeiro ano do período em análise e em 2006-2007, coincidentes com a vacinação em massa efectuada em 2002-2003 por iniciativa de pais e pediatras e com a introdução da vacina no PNV em Janeiro de 2006 (Figura 34). Esta tendência descendente manteve-se nos anos seguintes. Não sendo objectivo deste trabalho avaliar a eficácia da vacina, não pode deixar de ser referido que há uma clara relação entre vacina e redução marcada do número de casos de DM por serogrupo C em Portugal.

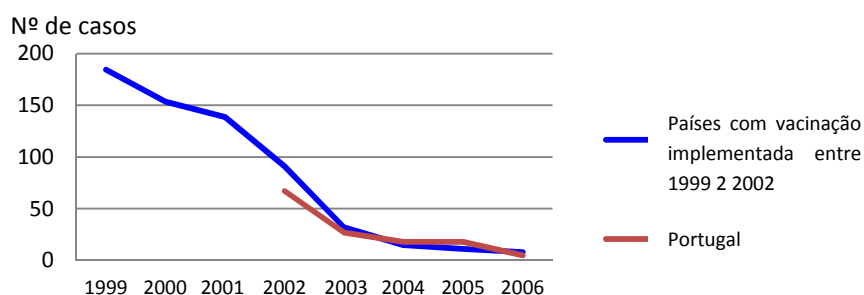


Figura 34 – Número médio de casos de DM por serogrupo C em países com vacinação implementada entre 1999 e 2002 (dados por ano civil) e em Portugal (dados por ano epidemiológico)

Da análise dos dados europeus observa-se uma clara relação entre serogrupo e grupo etário, concordante também com os dados nacionais. A mais alta proporção de infecção por serogrupo B ocorre nas crianças (Figura 35). A proporção de casos por serogrupo C é mais elevada nos adolescentes e adultos jovens (Figura 36).

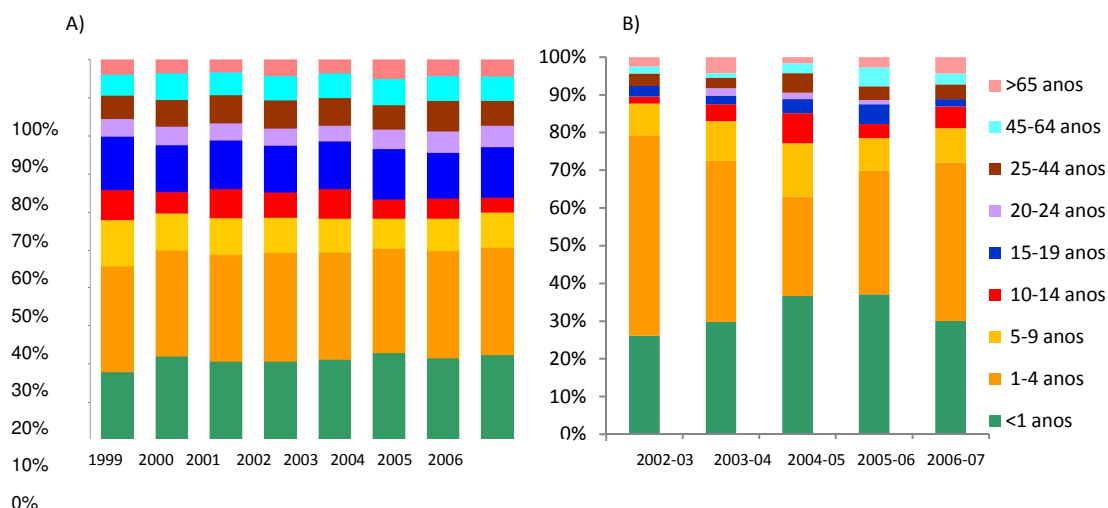


Figura 35 - Proporção de casos de DM (confirmados e estimados) causados por estirpes B por grupo etário, registados entre 1999 e 2006. A) em países europeus*; B) em Portugal

*Austria, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Estónia, Filândia, França, Alemanha, Grécia, Islândia, Irlanda, Itália, Malta, Holanda, Noruega, Polónia, Eslováquia, Espanha e Reino Unido. Fonte: EU-IBIS network 2007

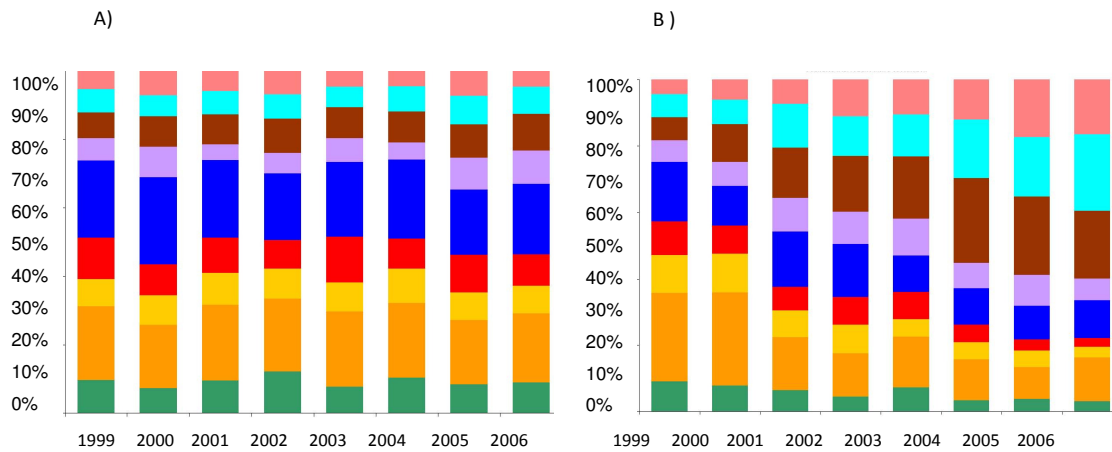


Figura 36 - Proporção de casos de DM (confirmados e estimados) causados por estirpes C por grupo etário, registados entre 1999 e 2006. A) Em países europeus sem vacinação. B) Em países europeus com vacinação. Fonte: EU-IBIS network 2007(código de cores igual ao da figura 37)

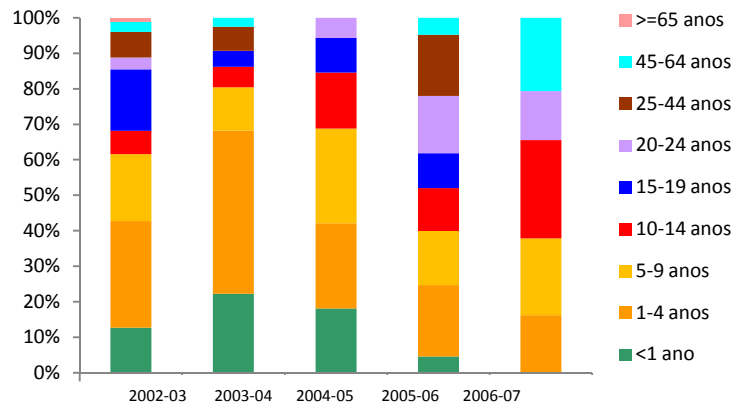


Figura 37 - Proporção de casos de DM em Portugal (confirmados e estimados) causados por estirpes C por grupo etário, registados entre 2002-2003 e 2006-2007, antes e após a introdução da vacina MenC no PNV.

É interessante observar o aumento do número de casos verificado em Portugal no inverno do ano epidemiológico 2004-2005 (Figura 38). Este foi um ano com intensa actividade gripal (Dados não publicados gentilmente cedidos pela Dr.ª Raquel Guiomar, responsável do Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe). Note-se ainda que, entre 12 de Junho e 4 de Julho de 2004, realizou-se em oito cidades do país um evento que criou condições singulares para a transmissão de meningococos e aumento do número de portadores assintomáticos entre residentes, o Campeonato Europeu de Futebol.

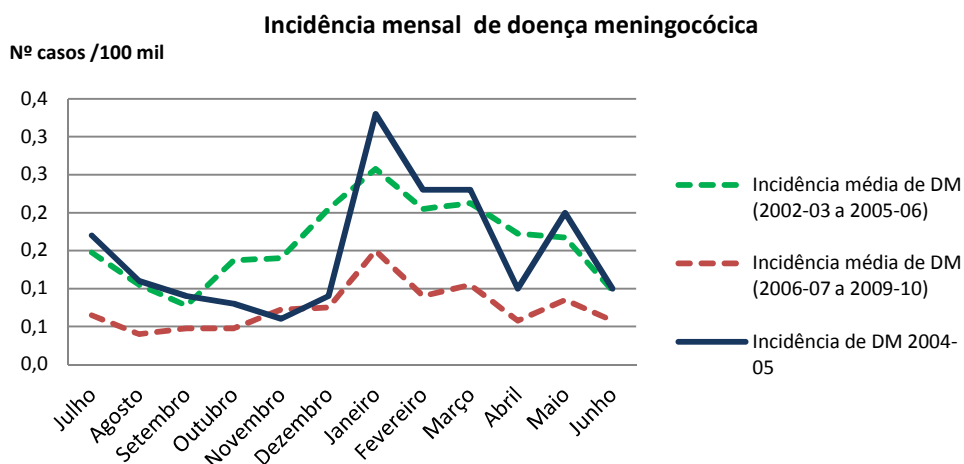


Figura 38 - Incidência mensal de DM registada em Portugal no período em que se registou grande incidência de estirpes C (2002-03 a 2005-06), no período pós endémico de estirpes C (após 2006-07) e em 2004-2005, ano de intensa actividade gripal e em que se realizou no país o Campeonato Europeu de Futebol, entre 12 de Junho e 4 de Julho de 2004.

4.2 Genótipo e estirpes hiper virulentas

Os dados europeus mais consistentes de caracterização de estirpes de *Neisseria meningitidis* isoladas na Europa são os da base de dados *European Meningococcal Epidemiology in Real Time (EMERT)*, referentes a 18 países europeus* que, voluntariamente e em tempo real, desde 2007 submetem os dados de caracterização de estirpes invasivas de meningococos, com o objectivo de partilha e comparação de dados entre os países notificadores (<http://emgm.eu/emert/>). Os valores acumulados nesta base, indicam que existe uma grande semelhança entre os subtipos das estirpes invasivas isoladas em Portugal e na Europa (Figura 39 e Figura 40).

Os dados de caracterização do subtipo de *Neisseria meningitidis* isoladas em Portugal contribui não só para observar a dispersão geográfica de genótipos, mas também para avaliar o grau de imunização da população portuguesa relativamente à população de meningococos que circula no país. Efectivamente, depois da infecção, os anticorpos bactericidas anti proteína PorA circulantes imunizam o indivíduo e protegem-no de novo contágio e infecção por estirpes do mesmo subtipo. O mesmo se passa durante a fase de portador assintomático. Este facto tem efeito sobre a dimensão da população susceptível de ser contagiada, efeito que será considerado no desenvolvimento do modelo.

* Alemanha, Áustria, Bélgica, Bielorrússia, Croácia, Filândia, França, Grécia, Irlanda, Itália, Noruega, Polónia, Portugal, Holanda, Reino Unido, República Checa, Espanha e Suécia

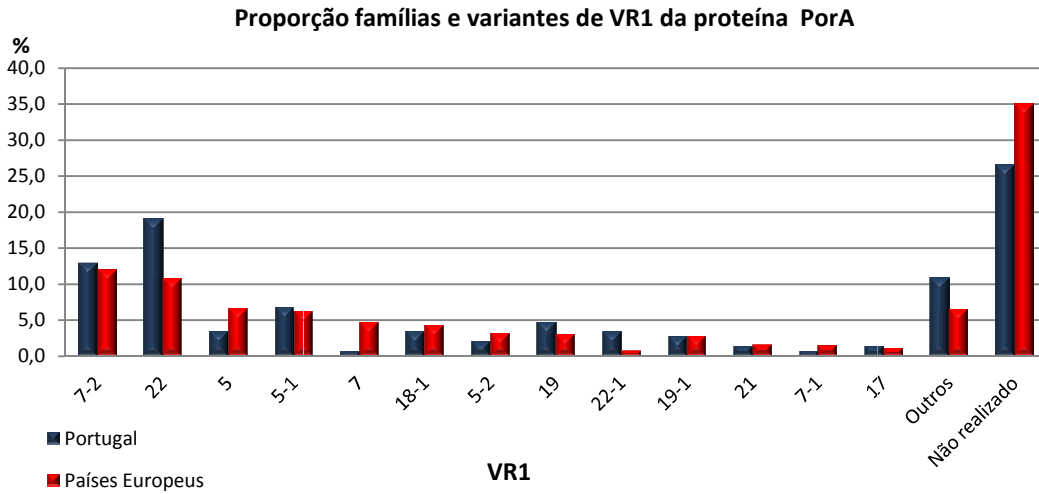


Figura 39 - Proporção de **PorA_VR1** de estirpes de *Neisseria meningitidis* responsáveis por doença invasiva em 18 países europeus e em Portugal, desde Janeiro de 2007 a Junho 2010 (Fonte: <http://emgm.eu/emert/>, data de acesso 04-12-2010).

■ Portugal
 ■ Países Europeus

Figura 40 - Proporção de **PorA_VR2** de estirpes de *Neisseria meningitidis* responsável por doença invasiva em 18 países europeus e em Portugal, desde Janeiro de 2007 a Junho 20010 (Fonte: <http://emgm.eu/emert/>, data de acesso 04-12-2010).

A caracterização do subtipo de estirpes invasivas contribui também para avaliar a potencial cobertura de vacinas que tenham como alvo a proteína PorA. Presentemente, encontra-se em fase III de ensaios clínicos a vacina *Multicomponent Meningococcal Serogroup B Vaccine* (4CMenB, Novartis) dirigida a meningococos do serogrupo B, que contem três proteínas recombinantes: NHBA (*Neisseria* Heparin Binding Antigene), NadA

(Neisserial adesin A) e fHbp (factor H binding protein), construídas a partir de proteínas de membrana externa de uma estirpe com o subtipo P1.7-2,4, nas quais a proteína PorA é imunodominante. Embora o subtipo P1.7-2,4 seja um dos mais frequentes em Portugal, a proporção de estirpes com este genótipo nunca foi superior a 13%. Contudo, a avaliação da eficácia desta vacina tem que ter em conta não só a resposta imunológica a cada um dos componentes vacinais como também ao seu potencial sinérgico.

A análise comparativa de dados europeus referentes ao período 2002-2010, registados na base de dados publicada em <http://pubmlst.org/neisseria/>, permite observar a semelhança que existe entre a proporção de complexos clonais de estirpes invasivas não C isoladas em Portugal e noutros países europeus neste período (Figura 41).

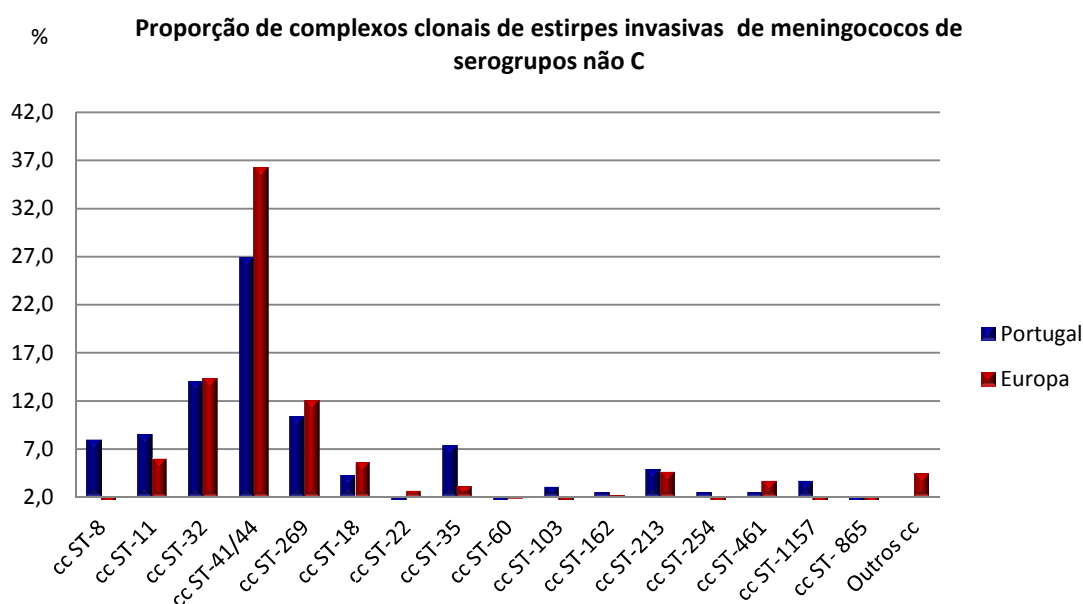


Figura 41 - Proporção de complexos clonais de estirpes de meningococos de serogrupos não C isoladas em Portugal e em 14 países europeus* entre 2002 e 2010 (Fonte: base de dados no *site* <http://pubmlst.org/neisseria/>, consultada em 30 de Maio de 2011)

ga, Polónia,

Neste universo de estirpes invasivas, a percentagem de estirpes de complexos clonais HV que foram isoladas ao longo deste período de oito anos, foi semelhante em Portugal e na Europa (análise de 1715 dados publicados no *site* (<http://pubmlst.org/neisseria/>) (Figura 42).

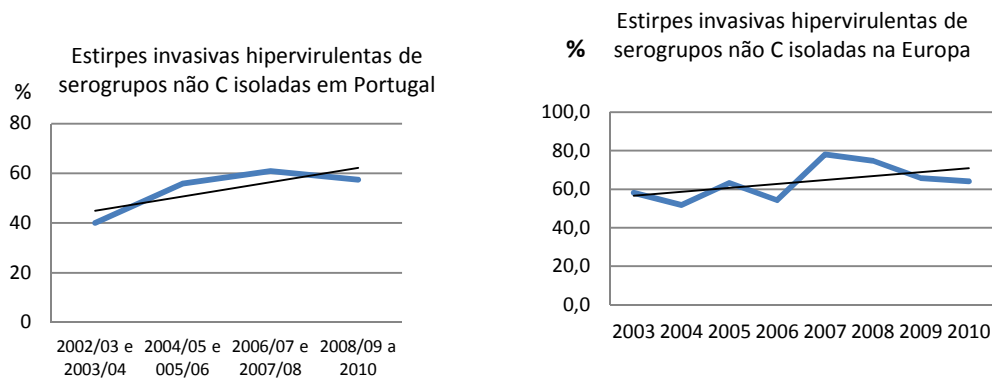


Figura 42 – Proporção de estirpes invasivas de meningococos de serogrupos não C de complexos clonais hiper virulentos, isoladas em Portugal e em 14 países europeus* entre 2002 e 2010 (Fonte: <http://pubmlst.org/neisseria/>, data de acesso 10-03-2011).

*Alemanha, Áustria, Bélgica, Eslovénia, Espanha, França, Grécia, Holanda, Irlanda, Itália, Noruega, Polónia, Reino Unido e Suécia.

Neste período observou-se, em Portugal e na Europa, uma tendência negativa discreta na proporção de estirpes dos complexos clonais ST-41/44 e ST-32 e uma tendência positiva discreta na proporção de estirpes do complexo clonal ST-269, (Figura 43 e Figura 44).

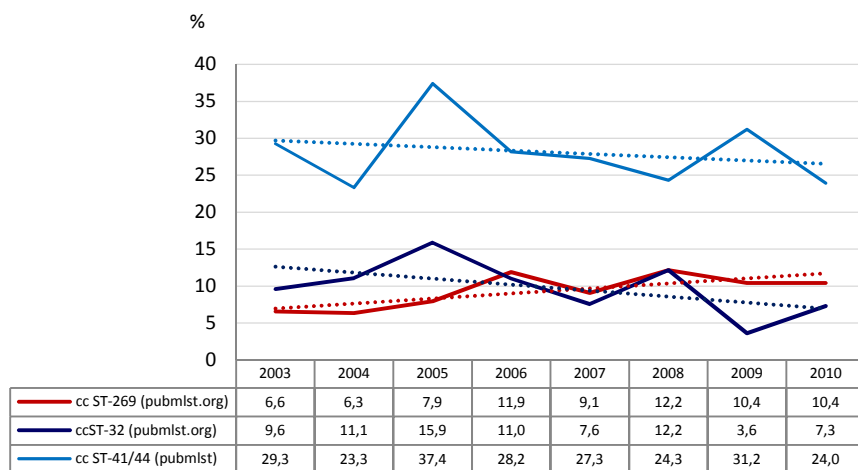


Figura 43 - Proporção complexos clonais hiper virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em 14 países europeus*, entre 2003 e 2010 (Fonte: <http://pubmlst.org/neisseria/>, data de acesso 10-03-2011).

*Alemanha, Áustria, Bélgica, Eslovénia, Espanha, França, Grécia, Holanda, Irlanda, Itália, Noruega, Polónia, Reino Unido e Suécia.

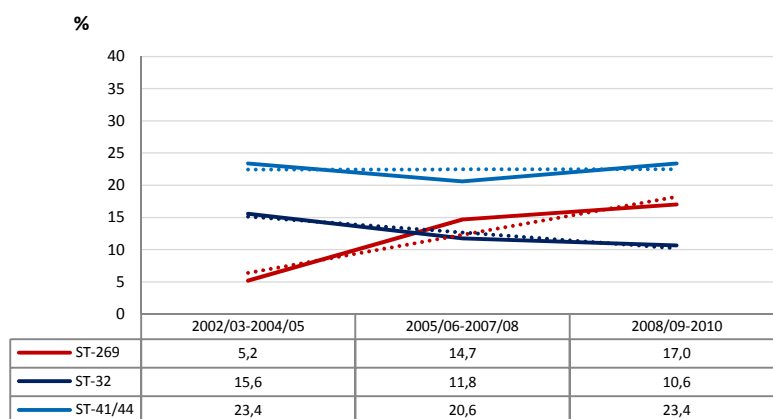


Figura 44 - Proporção complexos clonais hiper virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em Portugal, entre 2002/03 e 2010

Em Portugal, as estirpes invasivas do serogrupo C revelaram uma franca clonalidade, pertencendo maioritariamente a dois génotipos hiper virulentos (C:2a:P1.5-1,10-8:ST-5368(cc11) e C:2b:P1.5,2:ST-2289(cc8)). Esta clonalidade foi também observada entre 2002 e 2010 no conjunto de 14 países europeus, de acordo com os dados publicados na base de dados no site <http://pubmlst.org/neisseria/> (Tabela 22).

Tabela 22 – Proporção de estirpes invasivas do serogrupo C, isoladas em 14 países europeus* entre 2002 e 2010 (Fonte: pubmlst.org, consultado em 10-03-2011)

Ano (total de estirpes caracterizadas)	Complexos clonais de meningococos do serogrupo C											
	ST-8		ST-11		ST-32		ST-41/44		ST-269		cc não HV	
2003 (69)	31	44,9%	31	44,9%	0	0%	1	1,4%	0	0%	6	8,8%
2004 (84)	25	29,8%	39	46,4%	0	0%	3	3,6%	0	0%	17	20,2%
2005 (99)	25	25,3%	50	50,5%	0	0%	10	10,1%	0	0%	14	14,1%
2006 (54)	14	25,9%	34	63%	0	0%	2	3,7%	0	0%	4	7,4%
2007 (11)	2	7,7%	5	54%	1	8%	0	0%	0	0%	3	27%
2008 (43)	0	0,0%	22	51,2%	1	2,3%	1	2,3%	0	0%	19	44,2%
2009 (35)	0	0,0%	17	48,6%	1	2,8%	1	2,8%	4	11,4%	12	34,3%
2010 (16)	0	0,0%	4	25%	0	0,0%	5	31,3%	1	6,3%	6	37,5%

Contrariamente ao que foi observado entre meningococos de outros serogrupos, as estirpes C de cc não hiper virulentos isoladas em Portugal representaram apenas 6% do total das estirpes invasivas deste serogrupo. Presumivelmente, as estirpes do serogrupo C não serão comensais frequentes pelo facto de estas serem maioritariamente hiper virulentas.

No conjunto das estirpes caracterizadas (todos os serogrupos) observou-se um declínio na proporção de complexos clonais HV, particularmente ST-8, ST-11 e ST-32, este último reconhecidamente associado a uma elevada letalidade por sepsis (Caugant, 1998). Simultaneamente, observou-se em Portugal um declínio na taxa de letalidade (Figura 45).

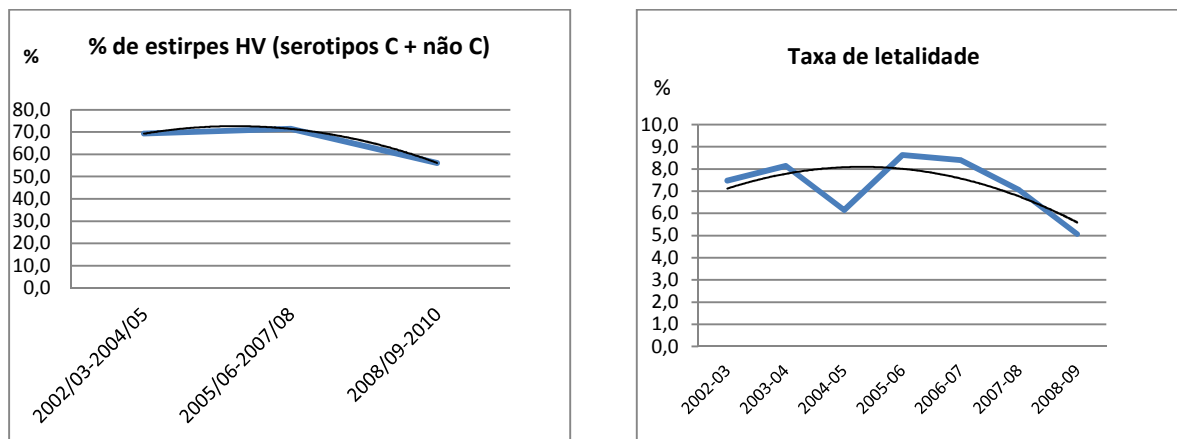


Figura 45 - Evolução da taxa de estirpes de cc hiper virulentos isolados em Portugal entre Julho de 2002 e Junho de 2010 e da taxa de letalidade observada no mesmo período. Pela observação das linhas de tendência das duas curvas pode inferir-se que, também em Portugal, há relação entre os dois eventos.

A forma de apresentação da doença resume-se na Tabela 23 e Figura 46.

Tabela 23 – Número de casos de doença meningocócica em cada forma de apresentação clínica

Ano	Meningite	Sepsis	Meningite + sepsis	Desconhecido	Total /ano
2002-2003	88	74	53	38	254
2003-2004	111	52	45	1	209
2004-2005	80	55	27	17	179
2005-2006	65	41	13	20	139
2006-2007	52	50	11	6	119
2007-2008	35	36	10	4	85
2008-2009	29	27	6	17	79
2009-2010	7	4	1	63	75
TOTAL	468	339	166	166	1139

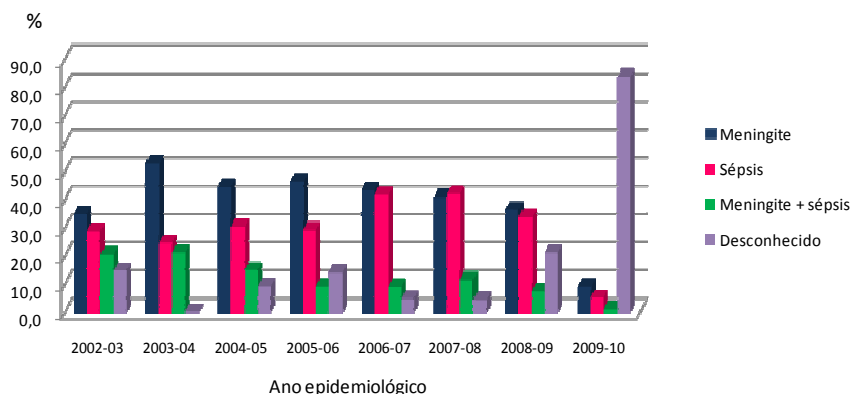


Figura 46 - Apresentação clínica da doença meningocócica e respectivas percentagens anuais

Dos 79 óbitos (6,9%) registados no período em análise, 3,8% registaram-se em doentes com meningite, 15,6% em doentes com sépsis e 4,8% em doentes com meningite e sépsis (Figura 47). Sendo as causas de morte obrigatoriamente investigadas e notificadas, considera-se que o número elevado de casos dos quais se desconhece a evolução clínica (166/1139) não compromete o conhecimento do número real de óbitos.

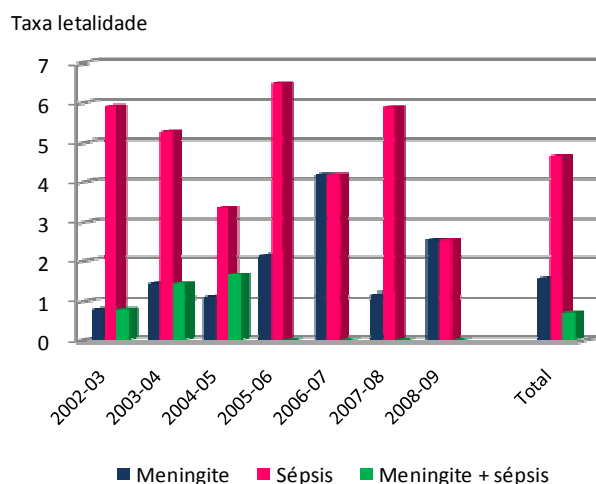
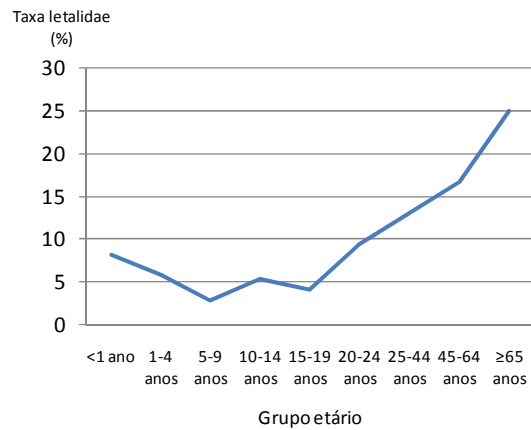


Figura 47 - Evolução da taxa de letalidade por tipo de apresentação clínica da DM

O maior número de óbitos registou-se durante os primeiros quatro anos de vida mas a taxa de letalidade aumentou a partir da adolescência, tendo sido máxima (25%) em indivíduos com idade superior a 65 anos (Tabela 24).

Tabel 24 - Número de óbitos por grupo etário e respectiva taxa de letalidade registada entre Julho de 2002 e Junho de 2010

Idade*	Total de casos	Nº total de óbitos	Taxa letalidade (%)
<1 ano	284	23	8,1
1-4 anos	432	25	5,8
5-9 anos	145	4	2,8
10-14 anos	56	3	5,4
15-19 anos	49	2	4,1
20-24 anos	21	2	9,5
25-44 anos	54	7	13
45-64 anos	24	4	16,6
≥65 anos	36	9	25



*Idade desconhecida em 22 casos

A letalidade associada a serogrupos de meningococos variou nos diferentes grupos etários. As estirpes do serogrupo C foram responsáveis por uma mais alta taxa de letalidade em adolescentes e adultos jovens (Figura 48).

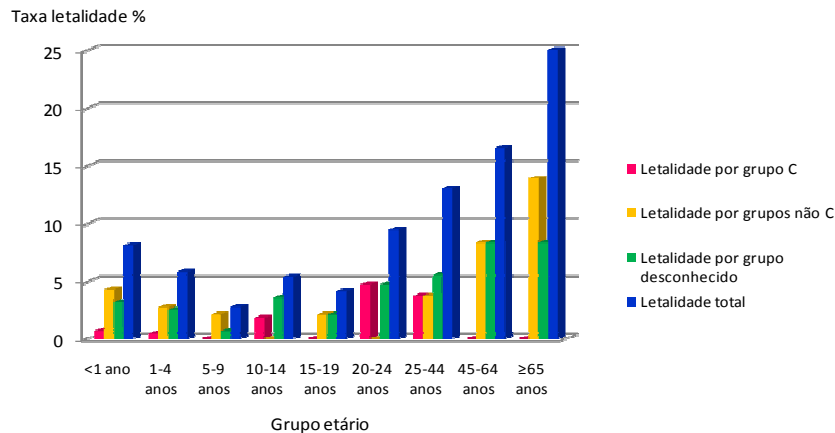


Figura 48 - Taxa de letalidade registada em Portugal entre 2002 e 2010, por grupo etário e por serogrupo de *N. meningitidis*

4.3 Alterações capsulares

A substituição da cápsula de *Neisseria meningitidis* como resultado de recombinação genética foi relatada em Portugal (Simões *et al.*, 2009) e tem sido também referida em vários países, com e sem história prévia de vacinação em massa (Alcalá *et al.*, 2002; Stefanelli *et al.*, 2003; Kriz *et al.*, 1999 e Kertesz *et al.*, 1998). A pressão selectiva devido à imunidade induzida pela vacina pode ser razão para o fenómeno de *switching*

capsular, mas não a única. É de considerar também a possibilidade de transferência de material genético durante o período de colonização da nasofaringe de portadores com estirpes de diferentes serogrupos (Swartley *et al.*, 1994).

A capacidade que os meningococos têm de alterar os polissacáridos capsulares e as suas características antigénicas permite-lhes escapar à imunidade induzida pela vacina (Swartley *et al.*). A vacina conjugada anti meningococos do serogrupo C foi introduzida no Plano Nacional de Vacinação em Janeiro de 2006 e a vigilância laboratorial activa do fenómeno de alteração capsular tornou-se então numa das prioridades do VigLab-DM. Pretende-se detectar o incremento no número de estirpes recombinantes para as quais não existe vacina e a sua dispersão, potencialmente facilitada pela proximidade de Espanha, onde têm sido identificadas numerosas estirpes recombinantes B:2b:P1.5 depois da onda epidémica de 1996-1997 (Alcalá *et al.*). A análise da distribuição das estirpes com alteração da cápsula, isoladas em Portugal em cada ano epidemiológico, indica um número estável de estirpes recombinantes (Tabela 25). No pressuposto de que o número de estirpes do serogrupo C diminuiu entre portadores, não só devido à vacinação mas também como resultado da protecção de grupo, o número mantido de estirpes B recombinantes sugere que a alteração da cápsula terá ocorrido no passado, como resultado da co-colonização da nasofaringe, e que as estirpes se mantêm como parte da população bacteriana endémica.

Tabela 25 - Distribuição das estirpes recombinantes por ano epidemiológico

Ano epidemiológico	Total de estirpes identificadas	Nº de estirpes recombinantes
2002-2003	244	0 (0%)
2003-2004	209	1 (0,5%)
2004-2005	179	3 (1,7%)
2005-2006	139	2 (1,4%)
2006-2007	119	3 (2,5%)
2007-2008	85	0 (0%)
2008-2009	79	0 (0%)
2009-2010	75	2 (2,6%)

4.4 Resistência aos antibióticos

Embora 13,5% das estirpes estudadas revelasse susceptibilidade diminuída à Penicilina, em todas as estirpes a CMI à Penicilina foi inferior a 1 mg/L, valor limite para a penetração nas meninges. De acordo com os dados publicados na base de dados em <http://neisseria.org>, no período entre 2002 e 2010, a proporção de estirpes isoladas em

Portugal com susceptibilidade diminuída à Penicilina foi inferior à que se observou noutros países da Europa, nomeadamente França, Itália e Espanha (Tabela 26).

Tabela 26 – CMI de Penicilina para *Neisseria meningitidis* observadas em quatro países europeus entre 2002 e 2010

CMI de Penicilina (mg/L)	França		Espanha		Itália		Portugal	
	Nº estirpes	%	Nº estirpes	%	Nº estirpes	%	Nº estirpes	%
≤0,064	286	30,1	93	32,4	10	7,2	282	86,5
>0,064<0,24	444	46,7	44	15,3	106	76,3	32	9,8
≥0,24<0,5	138	14,5	26	9,1	18	12,9	10	3,1
≥0,5<0,75	34	3,6	48	16,7	2	1,4	1	0,3
≥0,75	47	4,9	11	3,8	3	2,2	1	0,3
Total estirpes estudadas	951		222		139		326	

A realização dos testes de susceptibilidade aos antibióticos deve ser feita por rotina para monitorizar a progressão de estirpes resistentes ou o aparecimento de novas resistências sendo este um dos objectivos dos programa de vigilância da Doença meningocócica.

A falta de informação na literatura de referência sobre incidência de infecções respiratórias, nomeadamente por *Mycoplasma*, por Vírus Sincicial Respiratório ou por Adenovirus, implicou que se considerasse apenas a gripe, única infecção respiratória da qual se conhece a incidência anual através dos programas de vigilância, com influência no número de infectados por meningococos. A relação que se observou em Portugal entre gripe e DM, com base na sobreposição que se observa das respectivas curvas de incidência, é também observada noutros países europeus (Paul *et al.*, 2008). Contudo, no ano epidemiológico 2009-2010, ano em que se verificou a pandemia da gripe AH1N1, registou-se em Portugal uma incidência invulgarmente baixa de DM. Possivelmente, este facto deve-se às fortes medidas que foram tomadas neste ano para prevenção da disseminação do vírus da gripe e, conseqüentemente, de todos os outros agentes de transmissão aérea.

Com os dados disponíveis sobre gripe não é possível estabelecer uma relação consistente entre os dois tipos de infecção. É desconhecida a incidência de gripe por grupo etário e as incidências anuais dos vários tipos de vírus *Influenza* que circulam no país e que têm níveis de virulência diferentes. Fica por compreender em que medida as infecções respiratórias facilitam a colonização e a doença invasiva e quais as características dos agentes virais e bacterianos de infecção respiratória que são determinantes nas infecções subsequentes.

5 Conclusões


As características epidemiológicas da doença meningocócica, nomeadamente no que se refere à incidência global, incidência por grupo etário, distribuição proporcional de serogrupos por grupo etário e genótipos hiper virulentos na população bacteriana responsável por doença invasiva, são bastante semelhantes em Portugal e nos restantes países europeus notificadores para a rede europeia do projecto EU-IBIS (até 2007) e ECDC (dados publicados no *site* <http://pubmlst.org/neisseria/>). Para fazer a quantificação das variáveis do modelo a desenvolver, sempre que forem desconhecidos os dados epidemiológicos e/ou outras variáveis do sistema dinâmico da DM, poderá então inferir-se que os dados nacionais são sobreponíveis aos dados europeus.

Embora fortemente imunogénica, a proteína PorA não é um alvo adequado para a produção de vacinas, devido a grande diversidade genética reconhecida nas duas zonas variáveis caracterizadas. O tipo de vacinas baseadas unicamente nesta proteína poderá ser utilizado pontualmente, no controlo de surtos localizados, mas não é um meio universal de controlo da DM.


Alterações capsulares de C para B foram observadas num número diminuto de estirpes de *Neisseria meningitidis*. Este fenómeno não será considerado no desenvolvimento do modelo, como variável que afecte o controlo da DM após vacinação.

Não foi observada resistência a antibióticos utilizados na terapia ou na profilaxia da DM. A diminuição de susceptibilidade de meningococos à Penicilina mantém ainda valores que não conduzem ao insucesso terapêutico. A possível resistência a antibióticos não será considerada no desenvolvimento do modelo, como variável que afecte o controlo da DM.

Por não ser compreensível a relação entre gripe e DM, na sua incidência total ou por grupo etário, esta variável não será considerada no desenvolvimento do modelo. Esta relação implica um estudo muito mais aprofundado.



**Capítulo V - Modelação da doença
meningocócica como um sistema
dinâmico**



1. Introdução

Muitos filósofos, cientistas e “gurus” da gestão acreditam que as mudanças radicais na sociedade, induzidas pelo rápido desenvolvimento em todas as áreas, requerem uma nova maneira de pensar e de actuar. Muitos advogam a necessidade de **Pensamento Sistémico**, isto é, a habilidade de ver o mundo como um sistema complexo, no qual compreendemos que um só acto afecta todo o restante sistema.

O Pensamento Sistémico permite estimar ou inferir as influências exercidas num universo, que resultam de políticas, acções ou mudanças locais. Pode também ser definido como a resolução de um problema, vendo “os problemas” que são parte de um sistema completo. Esta linha de pensamento preocupa-se em compreender um sistema analisando as ligações e interacções entre os elementos que constituem o sistema. Tenta demonstrar que os eventos estão separados no tempo e no espaço e que pequenos eventos, que tenham uma acção catalítica, podem causar grandes alterações em sistemas complexos.

As técnicas de Pensamento Sistémico podem ser usadas no estudo de qualquer tipo de sistema – biológico, de engenharia, de gestão, etc.

O desafio que enfrentamos agora consiste em saber como passamos de generalidades sobre Pensamento Sistémico para ferramentas e processos que nos permitam compreender a complexidade dos sistemas e desenhar políticas operacionais que possam conduzir a mudanças, nomeadamente na epidemiologia de doenças infecciosas ou, em particular, da doença meningocócica.

A **Dinâmica de Sistemas** é o método para melhor compreender o comportamento de sistemas complexos ao longo do tempo. O que torna esta metodologia diferente de qualquer outra no estudo de sistemas complexos é o recurso a *feedback loops* (mecanismo regulador) e a níveis e fluxos. Estes elementos ajudam a descrever como sistemas aparentemente simples mostram uma inesperada não linearidade. Tal como na aviação os pilotos usam simuladores de voo para seleccionar manobras de navegação, outros domínios podem usar a Dinâmica de Sistemas para desenvolver os seus próprios simuladores de voo (Sterman, 2000).

A Dinâmica de Sistemas teve as suas origens no trabalho desenvolvido por Jay Forrester na década de 1960, no Massachusetts Institute of Technology. Os seus estudos sobre não linearidades em sistemas complexos, levaram-no a encontrar melhores formas de descrever o comportamento industrial (Forrester, 1961). Desde então, Jay Forrester tem tido muitos seguidores no estudo e desenvolvimento de Dinâmica de Sistemas, dirigidos

a diversas áreas incluindo epidemiologia e doenças infecciosas (Hannon *et al* Ruth, 1997).

É interessante compreender qual é a importância prática do pensamento sistémico e modelação, particularmente quando aplicados a questões de saúde pública. Segundo Leischow *et al.* (2008), os progressos em Saúde Pública implicam uma melhor compreensão dos sistemas adaptativos complexos que constituem quer as causas quer as soluções dos problemas de saúde. A título de exemplo dir-se-á que a prevenção e a elaboração de planos de contingência para a gripe pandémica exige a participação de diferentes disciplinas, como a vigilância epidemiológica para identificação de focos de gripe, rápida identificação laboratorial de novas estirpes para que seja possível o desenvolvimento de medicamentos novos e eficazes, desenvolvimento e implementação de infra-estruturas de informação e informáticas que possibilitem a comunicação entre comunidades e respostas eficazes perante as informações disponíveis. Individualmente, cada uma destas actividades é necessária, mas insuficiente. No entanto, no seu conjunto representam um sistema complexo em permanente mudança (sistema adaptativo), cujo comportamento dificilmente pode ser inferido por análise das partes (Leischow *et al.*, 2006 e 2008).

A metodologia de Dinâmica de Sistemas foi utilizada por investigadores do ministério da Saúde do México para estudo da epidemiologia do Dengue hemorrágico. Com o objectivo de proporcionar políticas eficazes no combate à epidemia de Dengue (com uma elevada taxa de letalidade), os autores desenvolveram um modelo causal e um simulador que reproduz as condições em que a infecção progride. Este é verdadeiramente um sistema complexo, no qual interagem variáveis da população humana e da população de mosquitos vectores do vírus Dengue (*Aedes aegyptus*) (Ritchie-Dunham e Galván, 1999).

Espanha conheceu ondas epidémicas de DM desde o final da década de 1970. Em 1979 registou-se um pico na incidência da DM, com valores de 17,9 casos por 100 000 habitantes. Uma nova onda epidémica em 1996, causada principalmente por estirpes do serogrupo C, proporcionou a oferta de vacinação em várias regiões do país e deu origem a reuniões plenárias para avaliar e emitir orientações para controlo da situação. Neste contexto, Yolanda Álvarez e colaboradores desenvolveram um modelo, utilizando a metodologia de Dinâmica de Sistemas para análise do risco em populações vacinadas e não vacinadas, no caso de ser implementado um programa de vacinação voluntária contra a infecção meningocócica (Álvarez *et al.*, 1998).

2. Representação do processo numa linguagem de níveis e fluxos

2.1. Conceitos e variáveis chave

Um modelo para análise do comportamento de um sistema dinâmico é desenvolvido recorrendo a *softwares* que permitem descrever as interdependências entre variáveis. Nesta tese usou-se o *software* Vensim (Ventana Systems UK Ltd), cuja notação particular é usada para descrever os modelos que se seguem.

As variáveis que descrevem o contexto da doença meningocócica estão referidas na Tabela 27, identificadas como endógenas, exógenas ou excluídas do modelo. Estas últimas estabelecem e delimitam as fronteiras para análise do comportamento que é descrito pelo modelo.

Tabela 27 - Variáveis que descrevem o comportamento do sistema

Endógenas	Exógenas	Excluídas
População por grupo etário	População INE nos vários grupos etários	Alterações capsulares
Doentes não C por grupo etário	Eventos que promovam grandes aglomerados humanos	Entrada de imigrantes no país
Imunizados por grupo etário	Novos contactos	Factores comportamentais
Portadores por grupo etário	Taxa de estirpes invasivas hiper virulentas com factor de invasão x	Incidência de gripe
Nascendo	Taxa de estirpes invasivas não hiper virulentas	Medidas de controlo (vacinas, tratamento antibiótico e profilaxia dos contactos)
Crescendo em cada grupo etário	Taxa de fumadores por grupo etário	Novos genótipos
	Taxa de imunização de doentes	Taxa de letalidade
Adoecendo em cada grupo etário	Taxa de imunização de portadores	
Ficando portador por grupo etário	Taxa de mães fumadoras	
Imunizando portadores por grupo etário	Taxa mortalidade por grupo etário	
Imunizando doentes por grupo etário	Total de portadores não C	

A linguagem de Dinâmica de Sistemas utiliza dois conceitos centrais, **nível** e **fluxo**. Os níveis, que descrevem quantidades que podem ser acumuladas e medidas em cada altura tempo, são representados por rectângulos (sugerindo recipientes). As acções dos decisores de políticas de saúde fundamentam-se nos valores que estes níveis assumem. Os fluxos, que descrevem variações medidas num intervalo de tempo (por dia, por ano), são representados por válvulas em setas de duplo traço (\rightleftarrows) (sugerindo uma canalização). As válvulas (\bowtie) controlam os fluxos de entrada (que "enchem"), representados por setas que apontam para os níveis e os fluxos de saída (que "esvaziam"), representados por setas que saem dos níveis. As nuvens (☁) representam a origem ou o destino dos fluxos, quando estes nascem ou drenam para fora das fronteiras do modelo.

2.2. Definição e quantificação das variáveis

2.2.1 População por grupo etário (INE)

Pela observação da incidência anual de DM nos nove grupos etários considerados no capítulo IV, verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa da incidência da DM nos grupos etários entre 10 e 20 anos e nos superiores a 20 anos (Tabela 28), pelo que, no desenvolvimento do modelo, consideram-se apenas os cinco grupos etários referidos na Tabela 29.

Tabela 28 - Incidências (por 100 mil) da DM em nove grupos etários

Ano epidemiológico	<1 ano	≥1 < 5	≥5 <10	≥10 <15	≥15 <20	≥20 <25	≥25 <45	≥45 <65	≥65 anos
2002-2003	42,9	22,4	6,6	1,8	1,9	0,5	0,4	0,4	0,2
2003-2004	49,7	19,6	4,5	1,6	1,2	0,4	0,2	0,2	0,4
2004-2005	45,9	11,7	5,7	2,9	1,4	0,6	0,2	0,2	0,3
2005-2006	40,9	9,5	2,4	1,3	1,4	0,7	0,2	0,4	0,2
2006-2007	32,3	10,8	2,0	1,9	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2
2007-2008	21,5	7,6	2,0	0,6	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2
2008-2009	23,5	7,1	1,8	0	0,9	0,2	0,1	0,2	0,1
2009-2010	11,7	5,5	2,2	0,2	0,9	0,2	0,1	0,2	0,4

Tabela 29 - Incidências (por 100 mil) da DM nos cinco grupos etários considerados no desenvolvimento do modelo

Ano epidemiológico	<1 ano	≥1 <5 anos	≥5 <10 anos	≥10 <20 anos	≥20 anos
2002-2003	42,9	22,4	6,6	1,9	0,4
2003-2004	49,7	19,6	4,5	1,4	0,3
2004-2005	45,9	11,7	5,7	2,1	0,3
2005-2006	40,9	9,5	2,4	1,3	0,4
2006-2007	32,3	10,8	2,0	1,1	0,2
2007-2008	21,5	7,6	2,0	0,4	0,2
2008-2009	23,5	7,1	1,8	0,4	0,2
2009-2010	11,7	5,5	2,2	0,5	0,2

De entre esses cinco grupos etários distinguem-se dois grupos de indivíduos:

1. Crianças entre zero e cinco anos, que não são portadores assintomáticos e que adoecem por terem tido contacto directo com portadores;
2. Indivíduos com idade superior ou igual a cinco anos, nos quais os meningococos podem existir como comensais após contágio e que adoecem esporadicamente pelas razões já abordadas nos capítulos anteriores.

A população INE por grupo etário representa a dimensão da população portuguesa em cada grupo etário, de acordo com as estimativas provisórias da população residente calculada anualmente pelo Instituto Nacional de Estatística (INE, 2002 a 2010).

Para que se possa observar de forma contínua a influência que exercem no modelo as oscilações da dimensão da população, optou-se por uma representação gráfica destas variáveis, na qual se faz variar continuamente a dimensão da população ao longo do tempo. Estas variáveis passam a ser designadas por “Evolução da população” em cada grupo etário (Figura 49).

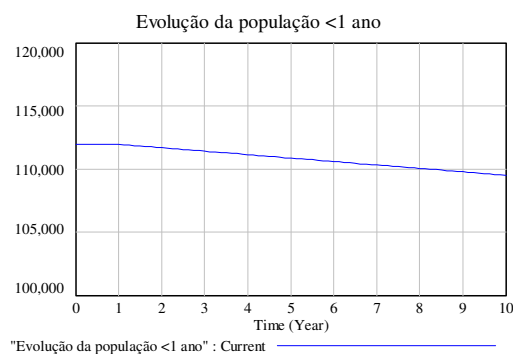


Figura 49 - Evolução da dimensão da população portuguesa num período de dez anos (2002-2011), aqui exemplificada no grupo etário menor de um ano

2.2.2 Taxa de mortalidade por grupo etário

São também dados do INE as taxas de mortalidade em cada grupo etário, representando esta variável a proporção de indivíduos em cada grupo etário que morre, qualquer que seja a causa.

2.2.3 População (em cada grupo etário)

O conjunto dos indivíduos que podem ser contagiados por portadores assintomáticos constitui o nível “População” nos diferentes grupos etários.

Ao nível “População <1 ano” chegam todos os indivíduos que nascem e saem os que morrem por qualquer causa, o número destes é dado por “População <1 ano” x “Taxa mortalidade <1 ano”. Saem também os que crescem para o grupo etário seguinte, cujo número é dado por “População <1 ano” x (1-“Taxa mortalidade <1 ano”) (Figura 50).

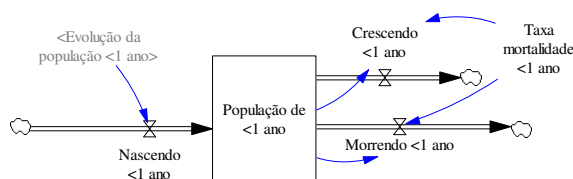


Figura 50 – O nível “População <1 ano” contem o número de indivíduos que nascem menos os que morrem ou crescem

No sistema da doença meningocócica os doentes “acumulam-se” em níveis cujo valor, em cada altura no tempo, depende da velocidade de infecção dos indivíduos susceptíveis de adoecer e disseminação das estirpes bacterianas na corrente sanguínea (fluxo de entrada “Adoecendo”). O nível de doentes em cada altura no tempo depende ainda da velocidade da sua recuperação (com ou sem imunização) ou morte (fluxos de saída) (Figura 51). Trata-se de um artifício de modelação, “retirar” à população os indivíduos que adoecem, fazendo entrar de novo os que, tendo adoecido, não ficaram imunizados, uma vez que dada a diversidade de genótipos o indivíduo fica parcialmente imunizado à doença. Na realidade, os “doentes” nunca deixaram de fazer parte da população.

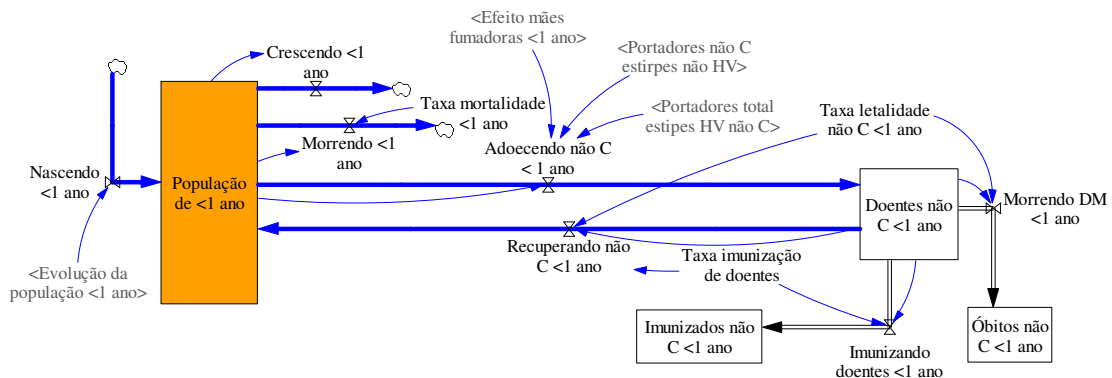


Figura 51- Representação das inter-relações entre variáveis que afectam a dimensão da população onde não existem portadores assintomáticos, aqui exemplificada no grupo etário inferior a um ano

Não foi considerada no desenvolvimento do modelo a imunização de crianças menores de um ano adquirida pelos anticorpos maternos.

No grupo etário <1 ano, a equação que traduz a dinâmica entre as variáveis que afectam o nível “População <1 ano” é a seguinte:

$$\text{"População de <1 ano"} = \text{INTEG} (\text{"Nascendo <1 ano"} + \text{"Recuperando não C <1 ano"} - \text{"Adoecendo <1 ano"} - \text{"Crescendo <1 ano"} - \text{"Morrendo <1 ano"}, 113701)$$

Nesta equação, INTEG significa a acumulação ao longo do tempo da soma dos fluxos de entrada menos a dos fluxos de saída, a partir do valor de 113701, dimensão da população <1 ano no momento inicial.

De modo análogo, ao nível “População >=1<5 anos” chegam todos os indivíduos que evoluem do grupo etário precedente e saem os que morrem por qualquer causa bem como os que crescem para o grupo etário seguinte. Também saem os que adoecem e entram de novo os que não ficaram imunizados.

A equação que traduz a dinâmica entre variáveis que afectam a dimensão da população no grupo etário >=1<5 anos e que é a seguinte:

$$\text{"População de >=1<5 anos"} = \text{INTEG} ((\text{"Evoluindo >=1<5 anos"} + \text{"Recuperando não C >=1<5 anos"} - \text{"Adoecendo >=1<5 anos"} - \text{"Crescendo >=1<5 anos"} - \text{"Morrendo >=1<5 anos"}), 437385)$$

Sendo que 437385 é a dimensão da população >=1 <5 anos no momento inicial.

A partir dos cinco anos, a dimensão da população é afectada também pela capacidade de haver portadores assintomáticos e pela dinâmica de imunização após o estado de portador (Figura 52).

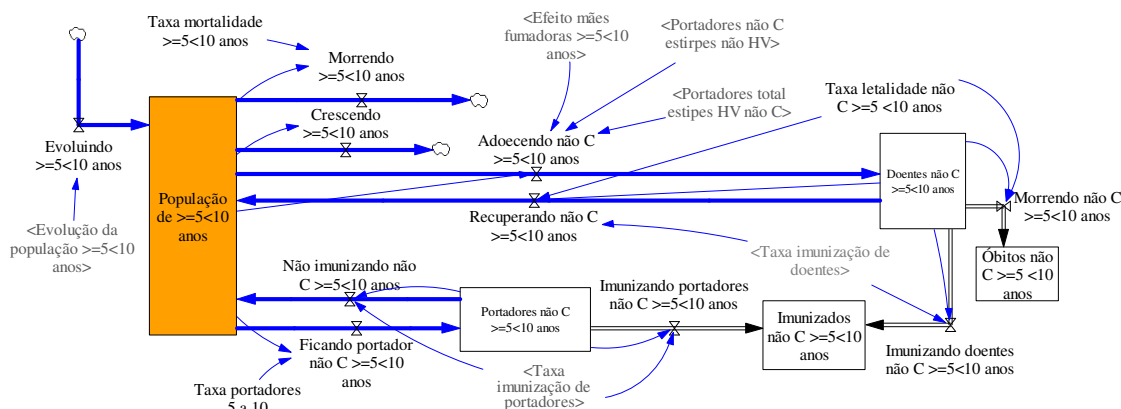


Figura 52 - Inter-relações entre as variáveis que afectam a dimensão da população onde podem existir portadores assintomáticos, aqui exemplificada no grupo etário com idade >= 5 < 10 anos

No grupo etário >=5 < 10 anos, a equação que traduz o nível “População >=5 < 10 anos” é a seguinte:

$$\text{"População de } \geq 5 < 10 \text{ anos"} = \text{INTEG}(\text{"Evoluindo } \geq 5 < 10 \text{ anos"} + \text{"Não imunizando não C } \geq 5 < 10 \text{ anos"} + \text{"Recuperando não C } \geq 5 < 10 \text{ anos"} - \text{"Adoecendo não C } \geq 5 < 10 \text{ anos"} - \text{"Crescendo } \geq 5 < 10 \text{ anos"} - \text{"Ficando portador não C } \geq 5 < 10 \text{ anos"} - \text{"Morrendo } \geq 5 < 10 \text{ anos"}), 527667)$$

Sendo que 527667 é a dimensão da população >=5 < 10 anos no momento inicial.

A partir daqui, a dinâmica que se estabelece entre as variáveis que afectam a dimensão da população neste grupo etário é igual à que estabelece nos grupos etários >=10 < 20 anos e >=20 anos.

2.2.4 Hábitos tabágicos, taxa de fumadores e efeito de fumo por grupo etário

Os hábitos tabágicos são, a seguir à idade, o segundo factor mais importante que influencia a taxa de portadores assintomáticos (Cougant *et al.*, 1994). Estes dados estão de acordo com outros estudos que demonstram que a exposição passiva ao fumo constitui um factor de risco para doença meningocócica em crianças e adolescentes (Haneberg *et al.*, 1983; Stuart *et al.*, 1988; Stanwell-Smith *et al.*, 1994; Yusuf *et al.*, 1999). Efectivamente, se existir um maior número de portadores assintomáticos na população fumadora, as crianças que vivem entre fumadores terão maior contacto com estirpes de meningococos e, conseqüentemente, serão sujeitas a uma maior taxa de ataque (Figura 53).

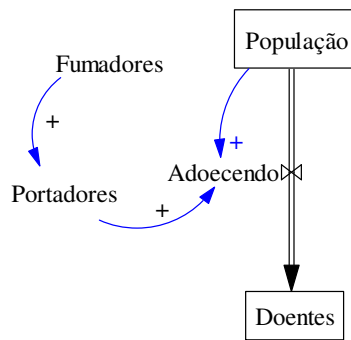


Figura 53 - Representação gráfica da influência dos fumadores na dinâmica da DM

A quantificação do risco associado à exposição passiva ao fumo de tabaco, embora se revista de alguma subjectividade, tem sido objecto de estudo de alguns autores. O risco de DM em crianças e adolescentes com idade inferior a 15 anos, com pais fumadores, é 8,2 vezes superior ao de crianças não expostas ao fumo de tabaco no meio familiar (Kriz *et al.*, 2000). Se apenas a mãe for fumadora o risco é de 3,5 e se apenas o pai for fumador é de 3,2. Estes resultados são concordantes com os de Fischer *et al.* (1997), num estudo desenvolvido no estado de Washigton (EUA) durante o ano de 1994, que refere que 37% dos casos de doença meningocócica em crianças menores de 18 anos podem ser atribuídos aos hábitos tabágicos das mães. De acordo com o mesmo estudo, o risco de DM é 8,4 vezes maior em crianças com menos de cinco anos com mães fumadoras, quando comparado com um grupo controlo. O risco é 3,7 vezes maior em crianças com idade entre cinco e 17 anos com mães fumadoras. Não foi identificada a associação entre DM e pai fumador o que é consistente com o facto de filhos com mãe fumadora terem um nível de cotinina salivar (a medida quantitativa de exposição à nicotina) mais elevado do que as crianças com pai fumador (Fischer *et al.*, 1997).

O relatório do INFOTABAC 2009 revela que em Portugal, mesmo após a entrada em vigor da lei de protecção do tabagismo, em Janeiro de 2008, não houve alteração dos hábitos tabágicos em casa, na presença de crianças e de não fumadores (Figura 54).

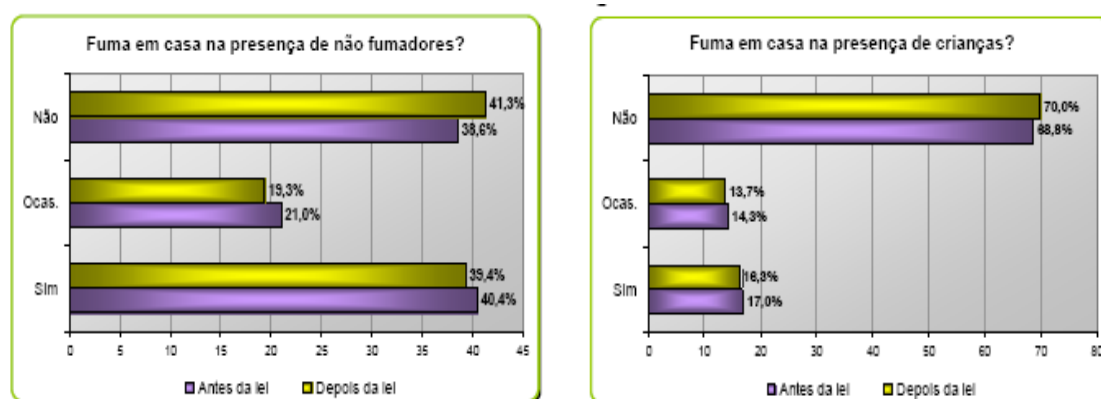


Figura 54 - Alteração da exposição passiva ao fumo de tabaco em ambiente familiar Fonte: INFOTABAC-DGS, 2009

A quantificação do risco para infecção invasiva meningocócica em crianças e adolescentes com idade inferior a 20 anos, relacionada com a exposição passiva ao fumo de tabaco, depende directamente da percentagem de mães fumadoras, dado que estas não alteram o seu comportamento dentro e fora de casa.

Em Portugal, a prevalência de fumadores tem sido avaliada desde 1987 através dos quatro Inquéritos Nacionais de Saúde (INS) (1987; 1995/96; 1998/99 e 2005/06).

Consideram-se fumadores, todos os indivíduos com idade superior a 15 anos que fumavam regularmente à data dos inquéritos.

Trabalhos sobre a prevalência de fumadores em Portugal têm sido realizados com base nos dados dos terceiro e quarto INS dos quais se destacam tês:

1. “Consumo de tabaco na população portuguesa: análise dos dados do Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006” (Instituto Nacional de Saúde, 2009);
2. “Acompanhamento estatístico e epidemiológico do consumo de tabaco em Portugal - Estudo do impacto da Lei n.º 37/2007, de 14 de Agosto” (DGS, 2008).
3. “Avaliação Intercalar do Impacte da Nova Legislação de Prevenção do Tabagismo (Lei 37/2007, de 14 de Agosto)”, relatório 2009 de INFOTABAC (DGS, 2009).

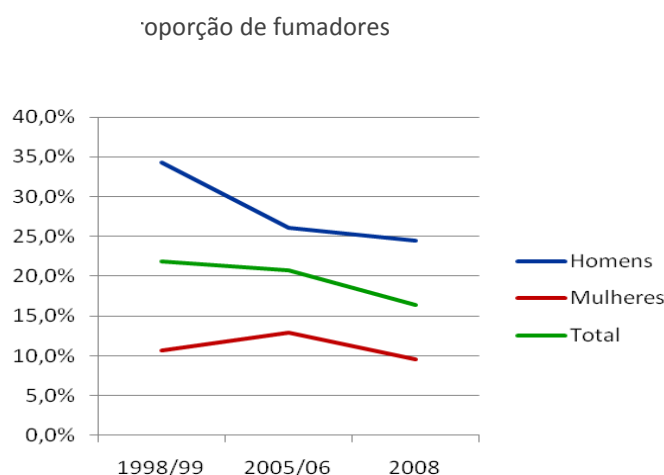
O estudo “Consumo de tabaco na população portuguesa: análise dos dados do Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006” analisa os dados sobre consumo de tabaco, obtidos através do quarto INS e foi realizado pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge em parceria com o Instituto Nacional de Estatística, no período 2005 e 2006, com a colaboração da Direcção Geral da Saúde. A população inquirida, 35 229 indivíduos, incluiu residentes em alojamentos familiares com mais de 15 anos de idade, consumidora diária ou ocasional de tabaco. A prevalência de fumadores regulares

estimada na população foi de 20,9%, sendo que mais de 99% dos fumadores regulares de ambos os sexos fumavam diariamente. A prevalência no sexo masculino foi de 32,1% e no sexo feminino foi de 10,1% (INSA, 2009).

O estudo “Acompanhamento estatístico e epidemiológico do consumo de tabaco em Portugal - Estudo do impacte da Lei n.º 37/2007, de 14 de Agosto” teve como objectivo primordial avaliar o impacto da lei de prevenção do tabagismo na população portuguesa, que entrou em vigor a partir do dia um de Janeiro de 2008. A sondagem foi da responsabilidade da Base Geográfica de Referenciação de Informação. Foram inquiridos 6 308 indivíduos com idade superior ou igual a 15 anos, residentes em Portugal continental, entre Maio e Novembro de 2008. De acordo com este estudo, a prevalência de fumadores em Portugal continental foi de 16,4%, sendo a prevalência de 24,5% para o sexo masculino e de 9,5% para o sexo feminino (DGS, 2008).

O relatório de 2009 “Avaliação Intercalar do Impacte da Nova Legislação de Prevenção do Tabagismo (Lei 37/2007, de 14 de Agosto)” foi elaborado pela INFOTABAC*, com o apoio de outros especialistas em áreas específicas (Administrações Regionais de Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, Instituto da Droga e Toxicodependência, Ministério da Educação, Direcção-Geral das Alfândegas e dos Impostos Especiais sobre o Consumo, Gabinete Coordenador de Segurança, Direcção Nacional da Polícia Judiciária, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Direcção Geral do Consumidor, Câmaras Municipais e Associação de Grossistas do Tabaco). De acordo com este relatório, entre 1998/99 e 2005/06 observou-se uma tendência decrescente na proporção de fumadores diários com idade igual ou superior a 15 anos (Figura 55), também já observada desde 1987. Contudo, a evolução desta tendência foi crescente na população feminina e decrescente na população masculina, à semelhança do que se observa na grande maioria dos países (DGS, 2009).

*Comissão multidisciplinar de especialistas da Direcção Geral de Saúde e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge nas áreas de epidemiologia, protecção da saúde, estatística e jurídica, criada para assegurar o acompanhamento estatístico e epidemiológico do consumo de tabaco em Portugal, bem como para avaliar o impacto resultante da aplicação da Nova Legislação de Prevenção do Tabagismo (Lei 37/2007, de 14 de Agosto)



	1998/99	2005/06	2008
Homens	34,3%	26,1%	24,5%
Mulheres	10,7%	12,9%	9,5%
Total	21,9%	20,7%	16,4%

Figura 55 - Prevalência em Portugal de fumadores diários e ocasionais com idade superior ou igual a 15 anos, registada entre 1998 e 2008

Após a entrada em vigor da lei de prevenção do tabaco, em Janeiro de 2008, a prevalência de fumadores diminuiu em ambos os sexos. Esta parece ser uma tendência decrescente sustentada, uma vez que o número de cigarros que entrou em Portugal diminuiu (11% entre 2007 e 2009) e aumentou o número de consultas de apoio a fumadores que pretendem abandonar o hábito (INFOTABAC, 2009).

A quantificação da variável “taxa de fumadores” nos diferentes grupos etários considerados no modelo considerou os resultados dos INS ou foi estimada com base nos resultados desses inquéritos e nos seguintes pressupostos (Tabela 30):

- A taxa de fumadores com 10 a 20 anos em 1998/99 foi de 11,8% (dados do 3º INS)
- A taxa de fumadores com 10 a 20 anos em 2005/06 foi de 12,3 (dados do 4º INS)
- A taxa de fumadores com 20 ou mais anos em 1998/99 foi de 25,8% (dados do 3º INS)
- A taxa de fumadores com 20 ou mais anos em 2005/06 foi de 20,7% (dados do 4º INS)
- A taxa de fumadores na população total em 1998/99 foi de 21,9% (dados do 3º INS)
- A taxa de fumadores na população total foi em 2005/06 de 20,7% (dados do 4º INS)

- A taxa de fumadores na população total em 2008 foi de 16,4% (DGS, 2009).
- A tendência crescente na prevalência de fumadores com 10 a 20 anos foi contínua entre 1998/1999 e 2006-2007. A taxa de fumadores aumentou 0,08% em cada ano.
- A tendência decrescente da prevalência de fumadores com idade superior a 20 anos foi contínua entre 1998/1999 e 2006-2007. A taxa de fumadores decresceu 0,73% em cada ano.
- Em 2007/08 manteve-se a mesma proporcionalidade entre a taxa de fumadores na população em geral e em cada grupo etário do que a observada em 2005/06.
- A partir de 2007 registou-se uma quebra de 10% ao ano no consumo de tabaco (declaração da Associação dos Grossistas de Tabacos ao Diário Económico em 31-5-2011).

Tabela 30 - Taxa total de fumadores na população portuguesa e nos dois grupos etários considerados no desenvolvimento do modelo da DM, com influência na dimensão da população de portadores assintomáticos (os valores assinalados a vermelho correspondem a valores dos INS, os restantes são valores estimados)

Ano Epidemiológico	Taxa de fumadores na população total (%)	Taxa de fumadores na população $\geq 10 < 20$ anos (%)	Taxa de fumadores na população ≥ 20 anos (%)
1998-1999	21,9	11,8	25,8
1999-2000	21,7	11,88	25,07
2000-2001	21,5	11,96	24,34
2001-2002	21,4	12,04	23,61
2002-2003	21,2	12,12	22,88
2003-2004	21,0	12,20	22,15
2004-2005	20,9	12,28	21,42
2005-2006	20,7	12,3	20,7
2006-2007	20,5	12,44	19,96
2007-2008	16,4	9,75	16,4
2008-2009	14,76	8,78	14,76
2009-2010	13,29	7,91	13,29

Para que se possa observar de forma contínua a influência que exercem no modelo as oscilações do número de fumadores, optou-se por uma representação gráfica desta variável, na qual se faz variar a taxa de fumadores em cada grupo etário ao longo do tempo. Estas variáveis passam a ser designadas por “Efeito de fumo” em cada grupo etário (Figura 56).

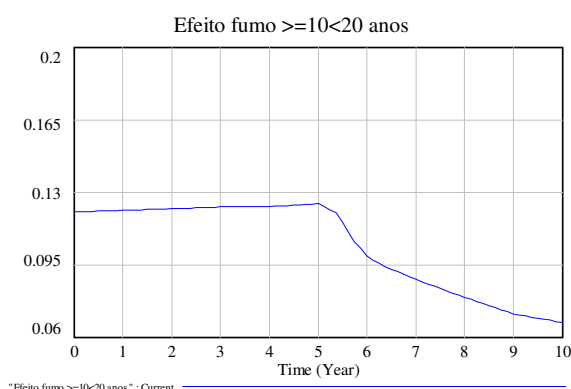


Figura 56 - Evolução da taxa de fumadores aqui exemplificada na população $\geq 10 < 20$ anos, estimada para o período de dez anos (2002-2011)

2.2.5 Portadores não C em cada grupo etário

Os níveis “Portadores não C” em cada grupo etário representam a população que é contagiada, fica portadora mas não adoece. Dada a diversidade de genótipos na população bacteriana (principalmente a diversidade de proteínas da membrana externa que são imunogénicas), apenas parte do indivíduo fica imunizada à doença após o estado de portador assintomático. A esta proporção de indivíduos chama-se “Taxa de imunização de portadores”.

Dada a inexistência de estudos de portadores realizados em Portugal, as características da população de portadores assintomáticos e as variáveis que influenciam a sua dimensão foram definidas tendo em conta a literatura de referência, com origem em estudos realizados em diversas regiões Europeias e por diferentes autores.

- Um estudo de Dominique Caugant, realizado em 1991 numa população aleatoriamente seleccionada e representativa da população norueguesa, revelou que 10,9 % da população estudada era portadora assintomática de estirpes de *N. meningitidis*. De acordo com o mesmo estudo, a taxa de portadores em crianças com menos de cinco anos é quase nula. A taxa máxima de portadores (cerca de 30%) regista-se entre os indivíduos com idade compreendida entre 20 a 24 anos. Esse valor decresce a partir de então, mantendo-se próximo de 10% na população adulta até aos 75 anos (Figura 57) (Caugant *et al.*, 1994).
- Em 2007, num artigo de revisão e citando estudos de diferentes autores, Stephens refere que *Neisseria meningitidis* é um comensal frequente na nasofaringe, isolado em 8-20% de indivíduos saudáveis (Stephens, 2007).
- Num estudo realizado por Claus e colaboradores, entre Novembro de 1999 e Março de 2000 (período anterior à introdução da vacina conjugada para o

serogrupo C), incidindo numa população infantil e jovem com idade entre três e 25 anos, conclui-se que 10,4% desta população era portadora assintomática. Dos dados referidos nesse estudo pode estimar-se que 5% da população estudada é portadora de estirpes do serogrupo B, 0,85% da população é portadora de estirpes do serogrupo C e o segundo serogrupo mais frequente é o Y com uma taxa de colonização de 1,8% (Claus *et al.*, 2005).

- Numa meta-análise que revê 89 artigos científicos sobre portadores assintomáticos com o objectivo de estimar a prevalência de portadores em diferentes grupos etários, os autores concluem que a taxa de portadores aumenta de 4,5% na infância para 7,7% em crianças com dez anos, sobe abruptamente para 23,7% em indivíduos com 19 anos e decresce na idade adulta para 13,1% em indivíduos com 30 anos e para 7,8% em adultos com 50 anos (Christensen *et al.*, 2010).

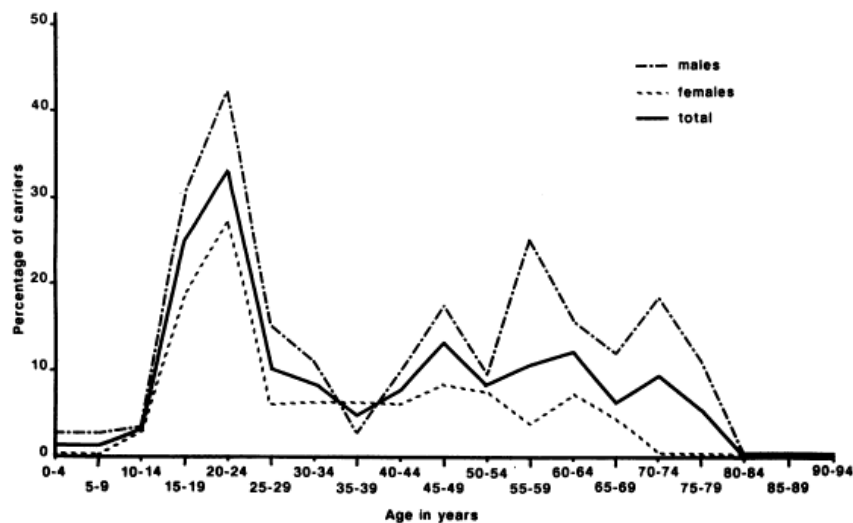


Figura 57 - Percentagem de portadores de *N. meningitidis* por grupo etário e género na população norueguesa em 1991 (Fonte: Caugant *et al.*, 1994)

De acordo com a literatura, considerou-se que os portadores assintomáticos são indivíduos com idade superior ou igual a cinco anos (Caugant *et al.*, 1994; Claus *et al.*, 2005) e que, na ausência de quaisquer variáveis que influenciassem o número de portadores, existe uma taxa de referência de portadores em cada grupo etário, estimada com base nos dados da literatura e que é a referida na tabela 35 (Tabela 31) (Caugant *et al.*, 1994). Considerou-se também que a relação entre fumadores e portadores assintomáticos em Portugal é a mesma do que a que foi observada por Caugant, isto é, existem três vezes mais portadores na população fumadora do que na não fumadora (Caugant *et al.*, 1994).

Tabela 31 - Taxas de referência de portadores assintomáticos de meningococos não C por grupo etário

Grupo etário	Taxa de portadores não C
≥5 <10 anos	2%
≥10 <20 anos	15,3%
≥20 anos	11,7%

No modelo, o **fluxo** “ficando portador não C” em cada grupo etário representa o número de indivíduos que é contagiado e fica portador, não vindo nunca a adoecer enquanto mantiver o estado de portador assintomático. É afectado pela dimensão da população, pelas taxas de fumadores e de portadores no respectivo grupo etário (Figura 58 e Figura 59).

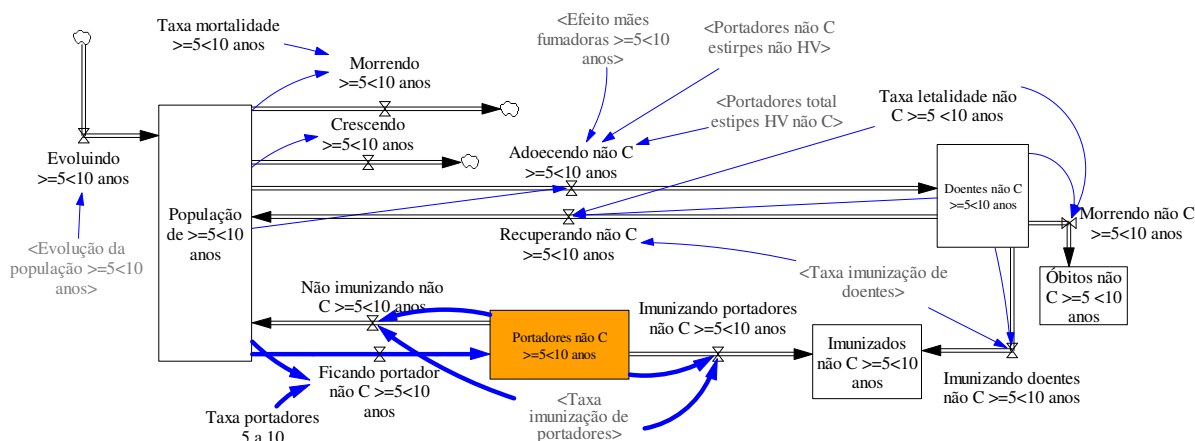


Figura 58 - Inter-relações entre as variáveis que afectam a dimensão de portadores não C, aqui exemplificado no grupo etário ≥5 e <10 anos, grupo etário onde não existem fumadores

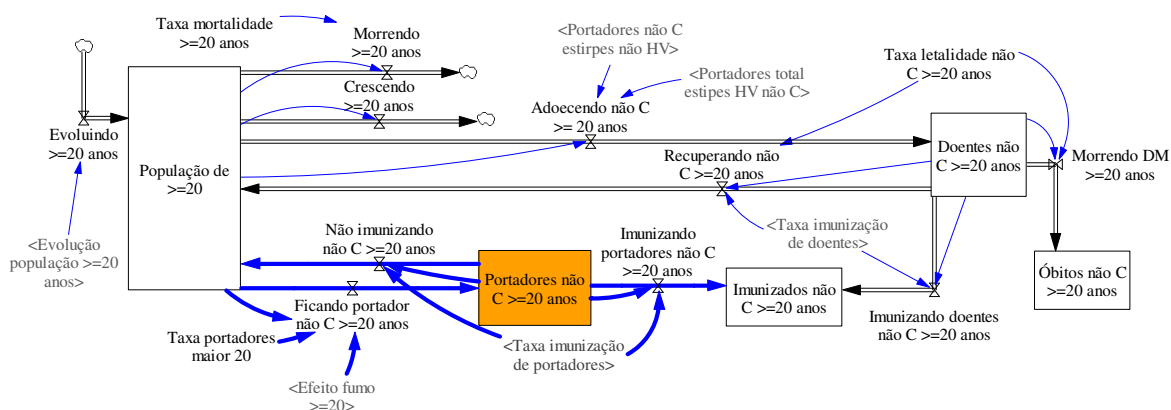


Figura 59 - Inter-relações entre as variáveis que afectam a dimensão de portadores não C, aqui exemplificado no grupo etário ≥ 20 anos

A equação que traduz o **fluxo** “Ficando portador não C” em crianças com idade entre cinco e dez anos, no qual não há fumadores, é a seguinte:

$$"Ficando portador não C \geq 5 < 10 \text{ anos}" = "População de \geq 5 < 10 \text{ anos}" * "Taxa portadores não C \geq 5 < 10 \text{ anos}"$$

Na restante população, o número de portadores é afectado pelos hábitos tabágicos e, como já foi referido, existem três vezes mais portadores na população fumadora do que na não fumadora. A equação que traduz o **fluxo** “Ficando portador não C”, aqui exemplificada no grupo etário $\geq 10 < 20$ anos, é a seguinte:

$$"Ficando portador não C \geq 10 < 20 \text{ anos}" = ("População de \geq 10 < 20 \text{ anos}" * (1 - "Efeito fumo \geq 10 < 20 \text{ anos}")) + "População de \geq 10 < 20 \text{ anos}" * "Efeito fumo \geq 10 < 20 \text{ anos}" * 3 * "Taxa de portadores não C \geq 10 < 20 \text{ anos}"$$

O **nível** “Portadores não C” em cada grupo etário é afectado pelo fluxo de entrada “Ficando portador não C” e pelos fluxos de saída “Não imunizando não C” e “Imunizando portadores não C” nos respectivos grupos etários. A equação que traduz este nível, exemplificado no grupo etário $\geq 10 < 20$ anos é a seguinte:

$$"Portadores não C \geq 10 < 20 \text{ anos}" = \text{INTEG} ("Ficando portador não C \geq 10 < 20 \text{ anos}" - "Imunizando portadores não C \geq 10 < 20 \text{ anos}" - "Não imunizando não C \geq 10 < 20 \text{ anos}", 228314)$$

sendo que 228314 é o número de portadores no momento inicial.

2.2.6 Total de portadores não C

Esta variável representa a dimensão da população contagiada que, em cada momento, é portadora assintomática de estirpes de meningococos. Não se diferenciam os portadores de longo termo e os indivíduos contagiados nos quais, a muito curto prazo,

se irá declarar a infecção invasiva. A dinâmica da transmissão e infecção é fortemente afectada pelo número de portadores mas é também afectada pelas características das estirpes que circulam na população humana, nomeadamente a sua capacidade de transmissão e infecção do hospedeiro.

No pressuposto de que as estirpes mais virulentas são as que têm maior capacidade de invadir a corrente sanguínea após o contágio, é de esperar que essas mesmas estirpes sejam pouco frequentes em portadores assintomáticos. Este é o caso, por exemplo, de estirpes do serogrupo C do cc ST-8, praticamente não encontradas em estudos de portadores (Yazdankhah *et al.*, 2004) e reconhecidamente hiper virulentas, com um elevado potencial epidémico. Assim, é de esperar que a razão entre a proporção de estirpes isoladas em doentes e a proporção das mesmas estirpes isoladas em portadores assintomáticos seja mais elevada no caso de estirpes de cc hiper-virulentos do que no caso de estirpes não HV.

Foi então útil criar o conceito quantificável de transmissibilidade *versus* infecciosidade, aqui designado como “factor de invasão”. Este é definido pela razão entre a percentagem de doentes e a percentagem de portadores de estirpes do mesmo cc, observada na mesma área geográfica e no mesmo período de tempo, tomando como referência os dados observados num estudo de portadores realizado na Grécia, Noruega e Polónia, entre 1991 e 2000 (Yazdankhah *et al.*, 2004). O “factor de invasão” é definido para cada complexo clonal numa escala ordinal, na qual as estirpes não HV assumem o valor um e as HV são ordenadas de forma crescente de acordo com a sua capacidade de invasão (Tabela 32). No modelo consideram-se apenas 4 níveis de “Factor de invasão” que correspondem a estirpes hiper-virulentas conhecidas (Tabela 33).

Tabela 32- Associação entre complexo clonal, doença e estado de portador (Adaptado de Yazdankhah *et al.*, 2004). Cálculo do “factor de invasão”, sendo este a razão normalizada entre a percentagem de estirpes invasivas e a percentagem de estirpes do mesmo cc encontradas em portadores assintomáticos

Complexos clonais (cc)	Doentes (D)		Portadores (P)		Razão D/P	Razão normalizada (0,4=1)
	Nº	%	Nº	%		
8	10	3,2	1	0,3	11,2	28
11	93	29,6	10	2,8	10,5	26
32	54	17,2	18	5,1	3,4	8
269	15	4,8	7	2,0	2,4	6
41	44	14,0	42	11,9	1,2	3
cc não HV ou estirpes sem cc	98	31,2	275	77,9	0,4	1
Total	314		353			

Tabela 33 - Relação entre complexo clonal de estirpes HV e quantificação do “factor de invasão” considerado no desenvolvimento do modelo

CC Hiper-virulentos	Factor de invasão
ST-8	28
ST-11	26
ST-32 e ST-269	7
ST-41/44	3

A proximidade encontrada entre as estirpes ST-32 e ST-269 e ST-8 e ST-11, no que se refere a capacidade de transmissão e invasão, coincide com a proximidade genética evidenciada num estudo comparativo do genoma completo de 20 estirpes de *N. meningitidis*, no qual se identificaram relações filogenéticas entre estirpes de diferentes complexos clonais (Budroni *et al.*, 2011). De acordo com este estudo, a população de *N. meningitidis* está estruturada em grupos mais amplos do que os complexos clonais definidos com base em MLST, a que os autores designaram por *clades* filogenéticos. Os cc ST-32 e ST-269, bem como os cc ST-8 e ST-11, considerados como entidades epidemiológicas distintas, mostraram ser parte dos *clade* filogenéticos PC32/269 e PC8/11 respectivamente (Figura 60).

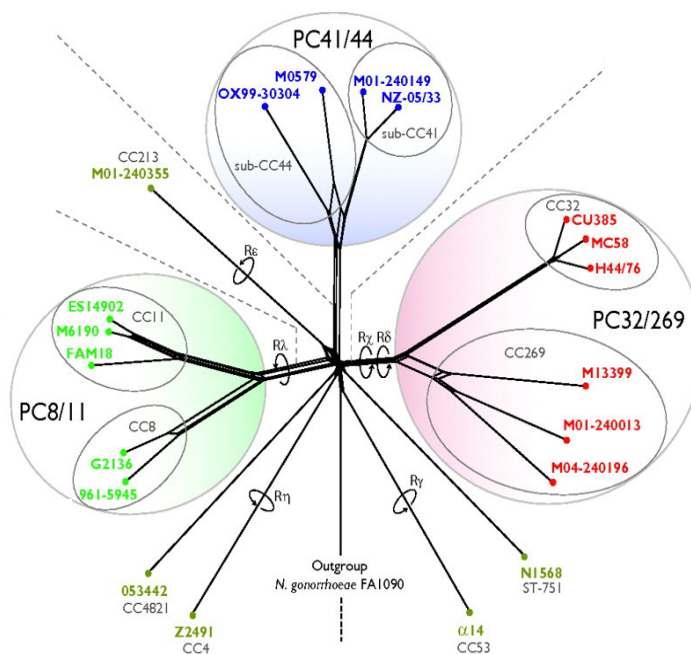


Figura 60 – Árvore filogenética estabelecida com base na análise do genoma completo de 20 estirpes de *N. meningitidis*. Observam-se três *clades* filogenéticos (PC32/269, PC8/11 e PC 41/44) e estirpes sem proximidade genética entre si. Adaptado de Budroni *et al.*, 2011

Na ausência de estudos de portadores em Portugal, considerou-se que a proporção estirpes de colonização de cada um dos cc HV é na população portuguesa a mesma que foi observada em outros países europeus*, de acordo com os dados registados na base de dados no *site* <http://pubmlst.org/neisseria/> (Figura 61).

*Alemanha, Austria, Bélgica, Filândia, Holanda, Irlanda, França, Grécia, Itália, Noruega, Polónia, Espanha, Suécia, Reino Unido e República checa

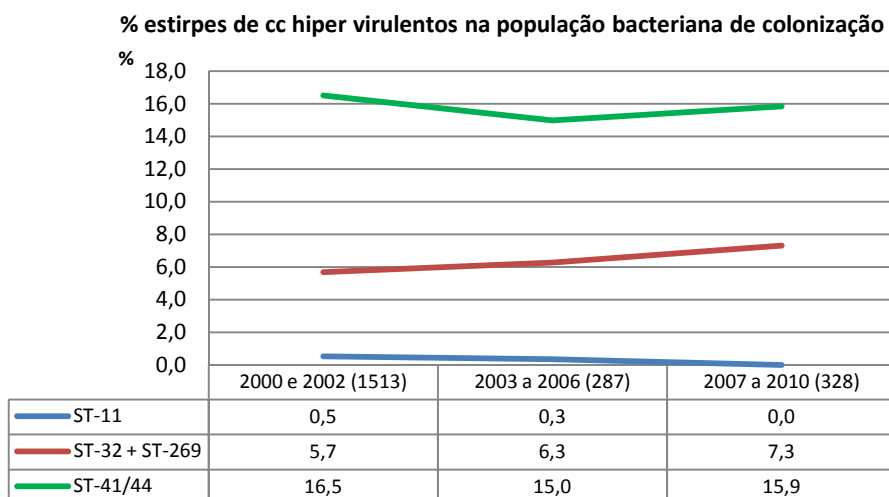


Figura 61 - Proporção de estirpes de colonização dos complexos clonais ST-11, ST-32+ST-269 e ST-41/44, observada em 15 países europeus entre 2000 e 2010 (com indicação do número de estirpes comensais caracterizadas no respectivo intervalo de tempo). Não se observam estirpes de colonização ST-8 (Fonte: <http://pubmlst.org/neisseria/>, data de acesso 04-12-2010)

Para que possa ser observado de forma contínua o efeito que têm no modelo as variações nessas proporções ao longo do tempo, fez-se a representação gráfica destas variáveis, na qual se fez variar a taxa de colonização por cada um dos cc ao longo do tempo, no período entre 2002 e 2011 (Figura 62).

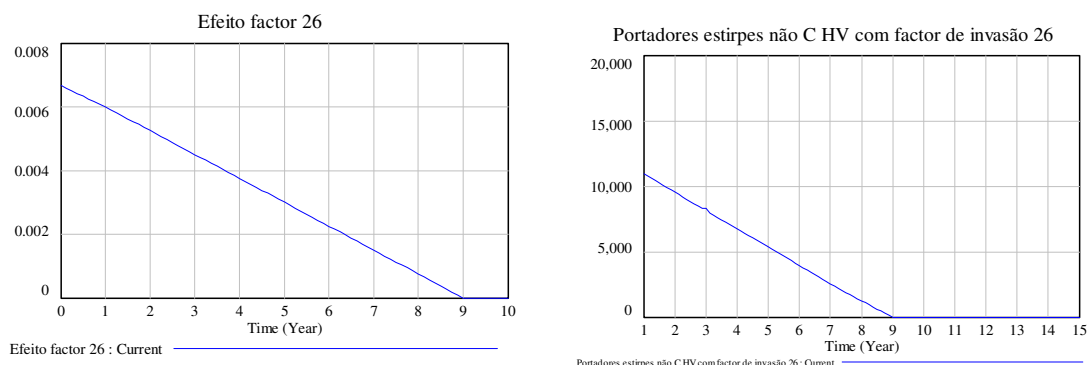


Figura 22 - Exemplo de representação gráfica da percentagem de estirpes de colonização com factor de invasão 26 e do seu efeito contínuo ao longo do tempo no número de portadores destas estirpes

O número total de portadores é o somatório de todos os portadores residentes, em cada grupo etário e em grupos populacionais que casualmente entram no país, aqui designados como “Portadores de novos contactos”.

Durante o período em estudo, apenas se registou um evento excepcional na sequência do qual muitos visitantes entraram em Portugal e tiveram um contacto próximo com a população residente. Por esta razão, a variável “Novos contactos” apenas assumiu o valor diferente de zero no ano epidemiológico 2004-2005, devido à realização do Campeonato Europeu de Futebol 2004 que decorreu entre 12 de Junho e 4 de Julho de 2004 em dez estádios distribuídos de norte a sul do país. Cerca de um milhão de turistas visitaram Portugal neste período, aos quais se juntam mais de 2 000 voluntários e 10 000 jornalistas de todo o mundo (Wikipédia, 5 de Agosto de 2010). Esta variável assumiu nesse ano epidemiológico o valor 1 012 000. No pressuposto que os visitantes eram na sua maioria jovens, assumiu-se que a taxa de portadores era de 30% e a de fumadores igual às da população nacional no grupo etário $\geq 15 < 35$ anos (26,5%).

A equação que traduz o número de “portadores nos novos contactos” é a seguinte:

*portadores de novos contactos = ((Efeito novos contactos * (1 - Taxa fumadores novos contactos) + Efeito novos contactos * Taxa fumadores novos contactos) * Taxa portadores novos contactos)*

O número total de portadores é traduzido pela seguinte equação:

Total de portadores não C = "Portadores não C $\geq 5 < 10$ anos" + "Portadores não C $\geq 10 < 20$ anos" + "Portadores não C ≥ 20 anos" + portadores de novos contactos

Parte dos portadores está colonizada com estirpes não HV e a restante com estirpes HV com os factores de invasão considerados

O número de portadores de estirpes com os factores de invasão considerados (definidos no ponto 2.2.5 deste capítulo) é função da “% de estirpes HV com factor de invasão x” e da “% de estirpes não HV” na população bacteriana comensal (Figura 63).

As equações que traduzem o número de portadores de cada um dos tipos de meningococos são as seguintes:

Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 26 = Total de portadores não C * Efeito factor 26

Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 28 = Total de portadores não C * Efeito factor 28

Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 7 = Total de portadores não C * Efeito factor 7

Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 3 = Total de portadores não C * Efeito factor 3

Portadores não C estirpes não HV = Total de portadores não C * Efeito factor 1

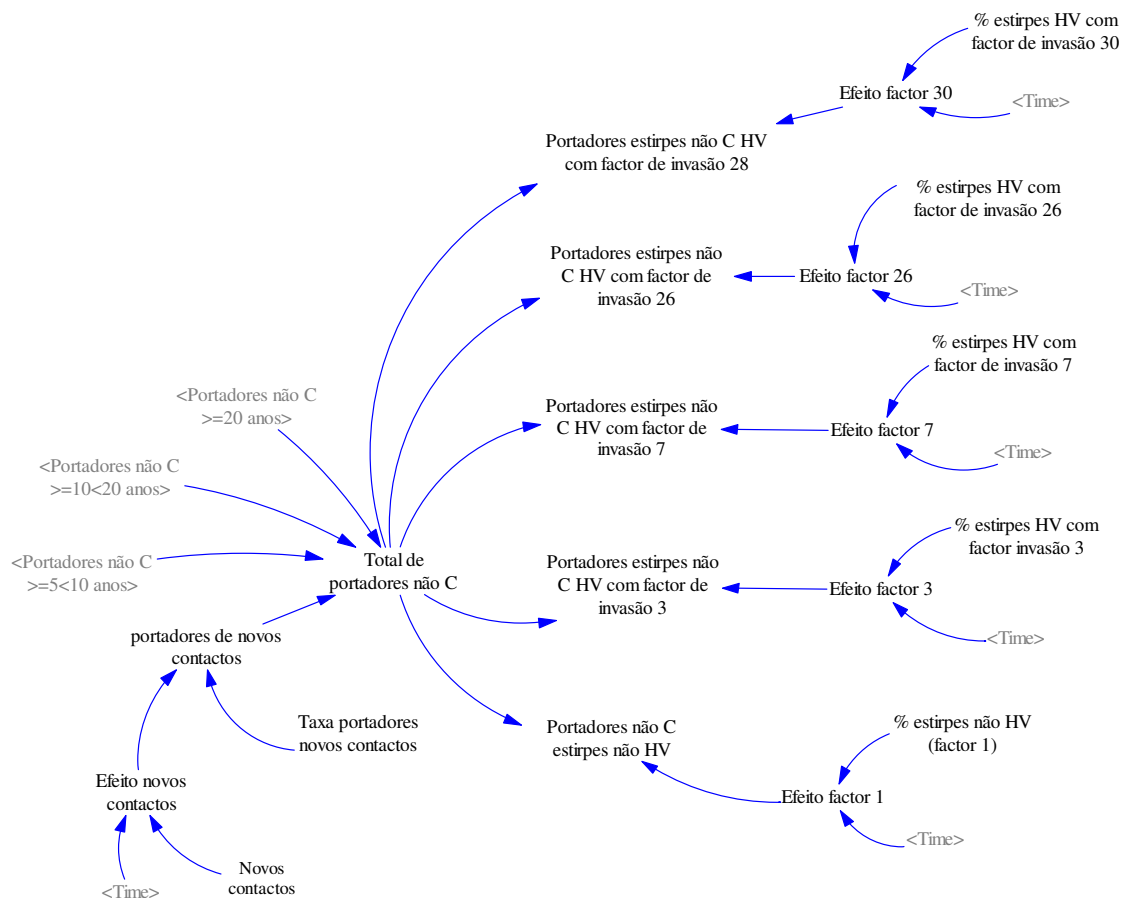


Figura 63 - Representação das inter-relações entre as variáveis que afectam o número total de portadores não C com a diferenciação dos portadores de estirpes com diferente “factor de invasão”

2.2.7 Novos contactos e novos genótipos

Os grandes eventos desportivos, artísticos, empresariais ou outros, que acontecem em Portugal e trazem ao país um elevado número de visitantes, são designados no modelo por “Novos contactos”. Com estes visitantes “entram” também no país as suas estirpes de colonização que, dada a proximidade que se estabelece nas grandes concentrações de indivíduos, se transmitem à população residente. Esses eventos constituem também uma oportunidade de entrada de “Novos genótipos” no país. O seu impacto na dinâmica da DM é tanto maior quanto menor for o grau de semelhança com as estirpes residentes, isto é, quanto menor for o grau de reconhecimento dos novos epítomos pelos anticorpos da população (Figura 64) (Jones *et al.*, 1998).

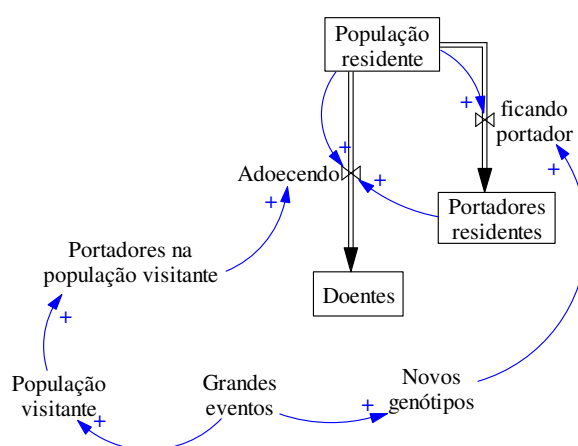


Figura 64 – Representação gráfica da influência dos grandes eventos na dinâmica da DM. Na presença de portadores visitantes e de novos genótipos, para os quais a população residente não está naturalmente imunizada, o número de portadores aumenta e, conseqüentemente, aumenta o número de indivíduos que adoecem

2.2.8 Taxa de estirpes invasivas hiper virulentas em cada grupo etário

Em jovens e adultos saudáveis, é esperado que a doença meningocócica invasiva seja maioritariamente causada por estirpes hiper virulentas, capazes de ultrapassar os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. Nas idades extremas da vida, devido à imaturidade do sistema imunitário ou a co-morbilidades debilitantes, a proporção de estirpes não HV que causa doença invasiva é mais alta. A variável “Taxa de estirpes invasivas hiper virulentas” em cada grupo etário representa a percentagem de estirpes dos cc ST-8, ST-11, ST-32, ST-269 ou ST-41/44 que causam DM em cada grupo etário. O seu valor foi determinado a partir dos dados de caracterização genotípica das estirpes invasivas isoladas em Portugal entre 2002 e 2010. A comparação com os dados europeus recolhido do [site http://pubmlst.org/neisseria/](http://pubmlst.org/neisseria/) indica que esta proporção é semelhante em Portugal e nos restantes países europeus (Tabela 34 e Figura 65).

Tabela 34 – Proporção de cc hiper-virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em Portugal e em nove países europeus, entre 2002 e 2010

Grupo etário	% estirpes HV	
	Em Portugal	Na Europa
<1 ano	38 (19/38)	38 (72/188)
≥1<5 anos	62 (36/58)	58 (73/127)
≥5<10 anos	50 (14/28)	61 (22/36)
≥10<20 anos	71 (10/14)	58 (47/81)
≥20 anos	48 (19/40)	42 (106/251)

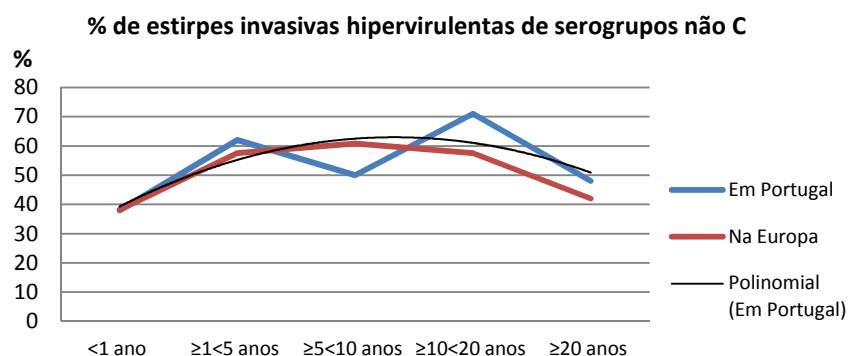


Figura 65 -Proporção de cc hiper-virulentos de estirpes invasivas não C isoladas em Portugal e em nove países europeus*, entre 2002 e 2011. Note-se que a percentagem de estirpes HV em crianças com 5 a 10 anos (ponto fora da curva) corresponde a um número baixo de observações (Fonte: <http://pubmlst.org/neisseria/>, data de acesso 04-12-2010)

*Alemanha, França, Holanda, Irlanda, Noruega, Polónia, Reino Unido, República Checa e Suécia

2.2.9 Taxa de imunização de portadores e taxa de imunização de doentes

Durante a fase de portador assintomático há a produção de anticorpos específicos para as estirpes de colonização, sendo a taxa de imunização de portadores a proporção de indivíduos que ficam imunizados para as estirpes de colonização. No desenvolvimento do modelo assume-se que cada indivíduo não voltará a ser colonizado pela mesma estirpe de colonização.

Assumindo que durante a doença invasiva há produção de anticorpos (bactericidas) protectores específicos para a estirpe invasiva, a taxa de imunização de doentes representa a proporção de doentes que fica imunizado depois da infecção. Cada indivíduo não voltará a ser infectado pela mesma estirpe ou por outra para a qual exista reactividade cruzada.

No pressuposto de que as estirpes de colonização imunizam o hospedeiro (Goldschneider *et al* (a) e (b), 1969; Robinson *et al.*, 2002) e que estas apresentem uma enorme variabilidade genética, foi necessário estimar a frequência dos seus génotipos com o objectivo de quantificar a variável “Taxa de imunização de portadores”. Pela mesma razão, foi necessário estimar a frequência dos génotipos de estirpes invasivas a fim de quantificar a variável “Taxa de imunização de doentes”. Dado que a grande maioria das estirpes não C são do serogrupo B, e nestas os polissacáridos capsulares não são imunogénicos, de entre as outras estruturas celulares antigénicas consideraram-se apenas as proteínas de classe 1 (base da subtipagem) como representativas dos constituintes bacterianos passíveis de induzir imunidade específica.

A “Taxa de imunização de portadores” foi estimada em função da diversidade de subtipos observados entre portadores, em nove países europeus, de acordo com a base de dados publicada em <http://pubmlst.org/neisseria/>. Estima-se a probabilidade de um indivíduo ser portador assintomático de estirpes com subtipo determinado (frequência relativa de cada um dos subtipos/número total de estirpes de colonização) e a probabilidade de voltar a ser portador de estirpes com um subtipo diferente. A taxa de imunização de portadores corresponde ao complementar para 1 da probabilidade de se voltar a ser portador de estirpes diferentes (tabela 1 do anexo V). Dos dados da referida tabela estima-se que o valor esperado para a taxa de imunização de portadores é de 8%.

A “Taxa de imunização de doentes” foi estimada em função da diversidade de subtipos observados na população de estirpes invasivas isoladas em Portugal. Trata-se de um artificialismo para representar a imunização parcial do indivíduo à DM. Estima-se a probabilidade da doença ser causada por cada um dos subtipos das estirpes invasivas isoladas em Portugal no período em análise (frequência relativa de cada um dos subtipos/total de estirpes invasivas) e a probabilidade de voltar a ser infectado por estirpes com um subtipo diferente. A taxa de imunização de doentes após doença invasiva corresponde ao complementar para 1 da probabilidade de se voltar a ser infectado por estirpes diferentes (tabela 2 do anexo V). Dos dados da referida tabela estima-se que o valor esperado para a taxa de imunização de doentes é de 41% .

2.2.10 Imunizados não C em cada grupo etário

O **fluxo** “Imunizando doentes não C” em cada grupo etário representa os indivíduos que, em cada grupo etário, não morrem e ficam imunizados para a estirpe responsável pela doença invasiva.

A equação que o traduz o **fluxo** “Imunizando doentes não C” em cada grupo etário, aqui exemplificada em crianças menores de um ano, é a seguinte:

$$\text{"Imunizando doentes <1 ano"} = \text{"Doentes não C <1 ano"} * \text{Taxa imunização de doentes} * (1 - \text{"Taxa letalidade não C <1 ano"})$$

O **fluxo** “Imunizando portadores não C” em cada grupo etário representa os indivíduos com idade superior ou igual a cinco anos que ficam imunizados após o estado de portador assintomático. Este fluxo, aqui exemplificado em crianças com idade ≥ 5 e <10 anos, é traduzido pela equação:

$$\text{"Imunizando portadores não C } \geq 5 < 10 \text{ anos"} = \text{"Portadores não C } \geq 5 < 10 \text{ anos"} * \text{Taxa imunização de portadores}$$

O **nível** “Imunizados não C “ em cada grupo etário acumula os indivíduos que, em cada grupo etário, ficam imunizados, quer após o estado de portador assintomático quer após doença invasiva.

A equação que traduz o nível “Imunizados não C “ em crianças menores de cinco anos, nas quais não existem portadores assintomáticos, aqui exemplificada no grupo etário <1 ano, é a seguinte:

$$\text{"Imunizados não C <1 ano"} = \text{INTEG ("Imunizando doentes <1 ano", 0)}$$

Sendo que 0 é o número de imunizados não C no momento inicial.

A equação que traduz o nível “Imunizados não C “ em indivíduos maiores de cinco anos, de entre os quais existem portadores assintomáticos, aqui exemplificada no grupo etário >=10<20 anos, é a seguinte:

$$\text{"Imunizados não C >=10<20 anos"} = \text{INTEG ("Imunizando doentes não C >=10<20 anos" + "Imunizando portadores não C >=10<20 anos", 0)}$$

Sendo que 0 é o número de imunizados não C no momento inicial.

Recuperando não C

$$\text{Recuperando não C <1 ano} = \text{"Doentes não C <1 ano"} * (1 - \text{Taxa imunização de doentes}) * (1 - \text{Taxa letalidade não C <1 ano})$$

2.2.11 Taxa de letalidade

Esta variável representa a proporção de indivíduos que morre na sequência de doença invasiva meningocócica.

3. Modelação da doença meningocócica por estirpes não C

O número de indivíduos contagiados é função do número de portadores assintomáticos e dos genótipos bacterianos que entre eles circulam. A dimensão da população portadora assintomática traduz a dispersão de estirpes hiper virulentas (prevalência e facilidade de transmissão). O número de indivíduos que adoece em qualquer grupo etário depende da dimensão da população susceptível, da hiper virulência das estirpes adquiridas e da fragilidade dos seus mecanismos naturais de defesa. Esta última condição é fortemente afectada pela exposição passiva ao fumo de tabaco. Deste modo, a percentagem de crianças com mães fumadoras é determinante da taxa de ataque.

Não sendo recomendado o uso da vacina tetravalente em Portugal (apenas para viajantes e militares) e não existindo presentemente uma vacina para o serogrupo B, a população adquire imunidade natural durante o período de portador assintomático ou no decurso da infecção invasiva. Contudo, tendo as estirpes de meningococos de serogrupos não C uma elevada diversidade antigénica relativamente às proteínas de membrana externa de classe 1 (imunogénicas), a taxa de imunização de portadores é baixa. A dimensão da população imunizada vai afectar a dimensão da população susceptível de ser contagiada e/ou adoecer, na medida em que indivíduos imunizados não voltarão a ser portadores de estirpes com as mesmas características antigénicas, estabelecendo-se assim um ciclo vicioso. O número de portadores é também afectado positivamente pelos hábitos tabágicos.

Considerou-se que as estirpes de colonização promovem imunização dos portadores e impedem nova colonização, uma vez que os anticorpos circulantes são protectores e apresentam, para algumas proteínas, algum grau de reactividade cruzada (Goldschneider *et al* (a) e (b), 1969; Robinson *et al.*, 2002). Assim, a taxa de imunização alcançada durante o estado de portador afecta o número de portadores assintomáticos. No limite, na ausência de novos genótipos o número de portadores assintomáticos tende para zero.

O “Total de portadores não C” observado ao longo do tempo contou em 2004 com o contributo da população visitante, ou “Novos contactos”, não negligenciando a influência da prevalência de fumadores nessa população, representada pela variável “Taxa de fumadores nos novos contactos”.

A doença pode evoluir para a cura, ficando o indivíduo imunizado para a estirpe infectante, ou para a morte. A letalidade associada a doença meningocócica depende de numerosos factores já referidos no capítulo II desta tese. A quantificação desta variável implicaria, entre outros, um estudo aprofundado das co-morbilidades e das deficiências

do sistema do complemento dos indivíduos que morrem e de indivíduos de um grupo controlo. Implicaria também a pesquisa de factores de patogenicidade em estirpes de colonização e em estirpes invasivas. Em suma, a avaliação da mortalidade associada a doença meningocócica requer um estudo extenso que sai do âmbito desta tese e por esta razão não foi considerada a influência desta variável no modelo.

Pretende-se que o modelo reproduza um número de doentes que se observa em cada ano concordante com o número de doentes registado na base de dados nacional. O número de doentes constitui a informação que potencialmente condiciona quaisquer intervenções de iniciativa dos decisores de políticas de saúde.

Para o desenvolvimento do modelo da doença meningocócica por estirpes não C considerou-se o ano 2007-2008 como referência, uma vez que foi neste ano que se verificou uma das mais altas percentagens de casos com confirmação laboratorial e a mais alta percentagem de casos com caracterização do serogrupo (a menor percentagem de valores estimados), o que garante a qualidade dos dados (Tabela 35). Isto é, conhecidos os valores das variáveis que ao longo do tempo afectam o sistema dinâmico da DM, o número de doentes devolvido pelo modelo no ano referência foi igual ao observado na base de dados nacional.

Tabela 35 - Proporção de casos de DM registados entre 2002 e 2010 com confirmação laboratorial e serogrupo conhecido

Ano Epidemiológico	% Casos confirmados	% de grupos caracterizados
2002-2003	72%	57,5
2003-2004	72%	67,0
2004-2005	81%	75,4
2005-2006	90%	81,3
2006-2007	76%	72,3
2007-2008	87%	85,9
2008-2009	85%	81,0
2009-2010	95%	62,7

No modelo, as variáveis assumem valores observados ou estimados com base nos dados nacionais do sistema de vigilância da DM, nos dados do INE e na bibliografia de referência. Cada passo de simulação corresponde a um ano.

3.1 Doentes não C em cada grupo etário

O nível “Doentes não C” em cada grupo etário contem os indivíduos que foram contagiados, adoecem e ainda não recuperaram, não ficaram imunizados ou não morreram. São afectados pelos fluxos de entrada “Adoecendo não C” e pelos fluxos de

saída “Recuperando não C”, “Imunizando doentes não C” e “Morrendo não C” (Figura 65).

O **fluxo** “Adoecendo não C” representa os indivíduos dos respectivos grupos etários que, em cada unidade de tempo (um ano), ficam contagiados após o contacto com portadores de estirpes não C e adoecem. Este fluxo é função da dimensão da população, do número de portadores de cada tipo de estirpe, da taxa de estirpes HV que infecta cada grupo etário e de factores de risco já mencionados no capítulo II dos quais, no desenvolvimento do modelo, apenas considerámos a exposição passiva ao fumo de tabaco aqui representada pelo efeito de mães fumadoras. Na população com idade superior a 20 anos esse efeito não se faz notar. O fluxo de saída “Recuperando não C” é função do número de doentes e da taxa de letalidade (Figura 66).

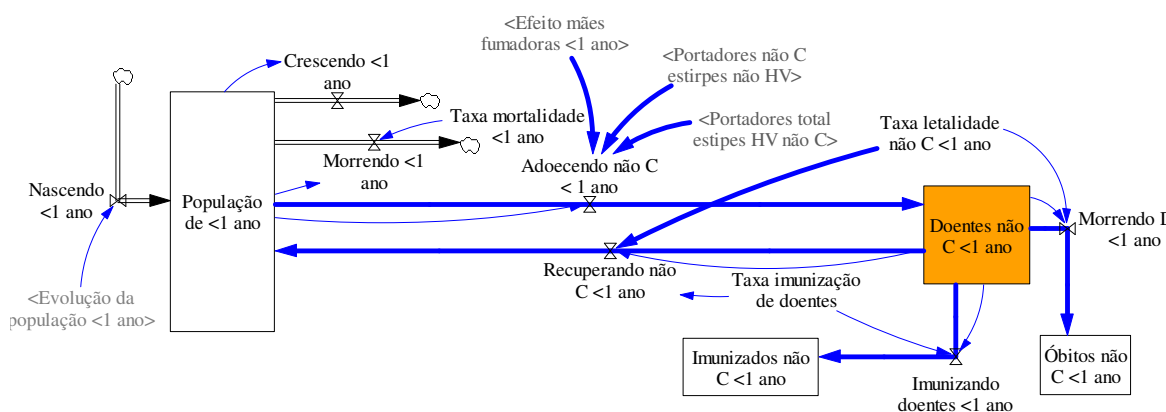


Figura 66- Fluxos que afectam o nível “Doentes não C” aqui exemplificado no grupo etário <1 ano

Uma vez que a taxa de fumadoras varia com a idade, foi necessário estimar a idade das mães de crianças nos diferentes grupos etários considerados no desenvolvimento do modelo e a respectiva taxa de fumadoras. No período em análise verificou-se uma queda do índice sintético de fecundidade, indicador que traduz o número médio de nados vivos por mulher em idade fecunda e que, em 2009, se situou em 1,32 crianças por mulher, face a 1,56 em 2000. No mesmo período verificou-se um aumento da idade média das mulheres residentes em Portugal ao nascimento do primeiro filho e ao nascimento de um filho, situando-se os valores para 2009 em 28,6 anos (26,5 anos em 2000) e 30,3 anos (28,6 anos em 2000) respectivamente (INE, 2009). A estimativa da taxa de mães fumadoras teve por base os dados dos terceiro e quarto INS relativos a taxas de fumadores e respectivas idades (Tabelas 36 e 37). (“Estatísticas demográficas – 2006”, Instituto Nacional de Estatística, Fevereiro 2008).

Tabela 36 - Idade estimada das mães de crianças e jovens nos quais a incidência da DM sofre influência dos hábitos tabágicos da mãe

		Grupo etário da população susceptível a infecção meningocócica invasiva			
		<1 ano	≥1 <5 anos	≥5 <10 anos	≥10 <20 anos
Idade média da mãe		30 anos	>30 <35 anos	≥35 <40 anos	≥40 <50 anos

Tabela 37 - Prevalência de mulheres fumadora nos grupos etários correspondentes a mães de crianças e jovens com idade inferior a vinte anos, no período entre 1998 e 2008 (os valores assinalados a vermelho correspondem a valores dos INS, os restantes são valores estimados)

Idade de mães fumadoras	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008
25 a 34 anos	22,30%	21,60%	20,90%	20,20%	19,60%	18,90%	18,20%	17,50%	16,80%	8,48%	3,70%
35 a 44 anos	17,30%	17,80%	18,40%	18,90%	19,40%	20,00%	20,50%	21,10%	21,60%	16%	4,20%
45 a 54 anos	0,78%	0,69%	0,60%	0,51%	0,42%	0,33%	0,24%	0,12%	0,03	9,90%	-

Para definir a equação que traduz o fluxo “adoecendo não C” nos vários grupos etários procedeu-se do seguinte modo:

1. Definiu-se a população susceptível de adoecer em cada grupo etário no ano referência (2007-2008), considerando como verdadeira para Portugal a relação encontrada por Fischer entre mães fumadoras e doentes (Fischer *et al.*, 1997). Assim, as crianças menores de cinco anos com mães fumadoras são 8,4 vezes mais susceptíveis à infecção invasiva do que as restantes do mesmo grupo etário e a população com idade compreendida entre cinco e 20 anos com mães fumadoras é 3,7 vezes mais susceptível à infecção invasiva do que a restante do mesmo grupo etário. As equações que definem a população susceptível nos diferentes grupos etários são as seguintes:

$$\text{População susceptível } < 1 \text{ ano} = P_0 \times (1 - MF_0) + P_0 \times MF_0 \times 8,4$$

$$\text{População susceptível } \geq 1 < 5 \text{ anos} = P_1 \times (1 - MF_1) + P_1 \times MF_1 \times 8,4$$

$$\text{População susceptível } \geq 5 < 10 \text{ anos} = P_5 \times (1 - MF_5) + P_5 \times MF_5 \times 3,7$$

$$\text{População susceptível } \geq 10 < 20 \text{ anos} = P_{10} \times (1 - MF_{10}) + P_{10} \times MF_{10} \times 3,7$$

$$\text{População susceptível } \geq 20 \text{ anos} = P_{20}$$

Sendo que:

P_0 = População com idade inferior a 1 ano

P_1 = População com idade $\geq 1 < 5$ anos

P_5 = População com idade $\geq 5 < 10$ anos

P_{10} = População com idade $\geq 10 < 20$ anos

P_{20} = População com idade ≥ 20 anos

MF_0 = Taxa de mães fumadoras de crianças com idade inferior a 1 ano

MF_1 = Taxa de mães fumadoras de crianças com idade $\geq 1 < 5$ anos

MF_5 = Taxa de mães fumadoras de crianças com idade $\geq 5 < 10$ anos

MF_{10} = Taxa de mães fumadoras de jovens com idade $\geq 10 < 20$ anos

2. Calculou-se, para cada grupo etário e para o ano de referência, a probabilidade de adoecer, diferenciando a probabilidade de adoecer com estirpes de complexos clonais HV e não HV (a taxa de estirpes de complexos clonais HV que, num contexto não epidémico, infectam cada grupo etário em Portugal e em países europeus, foi discutida no ponto 2.2.7 deste capítulo):

$$r_{p_{HV}} = \frac{\text{doentes com estirpes HV}}{\text{população susceptível}} \quad \text{e} \quad r_{p_{nHV}} = \frac{\text{doentes com estirpes não HV}}{\text{população susceptível}}$$

sendo que:

$r_{p_{HV}}$ = Probabilidade de adoecer com estirpes HV no ano referência

$r_{p_{nHV}}$ = Probabilidade de adoecer com estirpes não HV no ano referência

3. Considerou-se que a proporcionalidade observada no ano referência entre a probabilidade de adoecer e o número total de portadores assintomáticos se mantém. Assim, para outros anos epidemiológicos, a probabilidade de adoecer é a seguinte:

$$p_{HV} = \frac{r_{PHV}}{N^{\circ} \text{ portadores assintomáticos no ano referência}} \times N^{\circ} \text{ portadores assintomáticos}$$

e

$$p_{nHV} = \frac{r_{PnHV}}{N^{\circ} \text{ portadores assintomático no ano referência}} \times N^{\circ} \text{ portadores assintomáticos}$$

Sendo constante o valor das fracções, calculou-se o valor dessas constantes (C_{HV} e C_{nHV}) em cada grupo etário (Tabela 38):

$$C_{HV} = \frac{rPHV}{N^{\circ} \text{ portadores assintomáticos no ano referência}}$$

$$C_{nHV} = \frac{rPnHV}{N^{\circ} \text{ portadores assintomático no ano referência}}$$

4. Considerou-se que as estirpes comensais com factor de invasão 3, 7, 26 e 28 afectam três, sete, 26 e 28 vezes a probabilidade de adoecer.

5. Por facilidade de representação, considerou-se a variável “Portadores total de estirpes HV não C” (P_{tHV}) que é traduzida pela seguinte equação:

*Portadores total estirpes HV não C = Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 26*26 + Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 28*28 + Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 3*3 + Portadores estirpes não C HV com factor de invasão 7*7*

Tabela 38 - Valor das variáveis que afectam o fluxo “Adoecendo não C” nos cinco grupos etários, no ano referência 2007-2008 e valor das constantes C_{HV} e C_{nHV}

Grupo etário (anos)	População INE	% mães fumadoras	População susceptível	% estirpes invasivas HV (no grupo etário)	Nº total doentes	Constante C_{HV}	Constante C_{nHV}
<1	102153	0,085	166256	0,38	22	3,7E-11	7,6E-10
≥1<5	434468	0,085	707105	0,6	33	2,1E-11	1,7E-11
≥5<10	553451	0,16	792542	0,62	11	5,8E-12	4,9E-12
≥10<20	1121422	0,099	1421178	0,6	5	1,4E-12	1,3E-12
≥20	8406081	-	8406081	0,5	5,5	6,3E-13	7,0E-13

Para qualquer grupo etário a equação que traduz o fluxo “Adoecendo não C” é a seguinte:

$$\text{Adoecendo não C} = \text{População susceptível} \times PnHV \times CnHV + \text{População susceptível} \times PtHV \times CHV$$

Sendo que:

C_{HV} = Constante para infecção com estirpes hiper virulentas

C_{nHV} = Constante para infecção com estirpes não hiper virulentas

P_{nHV} = Portadores não C de estirpes não HV

P_{HV} = Portadores não C de estirpes HV

Ou, exemplificando para o grupo etário <1 ano:

"Adoecendo <1 ano"=("População de <1 ano"*(1-"Efeito mães fumadoras <1 ano")+"População de <1 ano"*"Efeito mães fumadoras <1 ano"*8.4)*Portadores estirpes não HV não C*7.6e-011+"População de <1 ano"*(1-"Efeito mães fumadoras <1 ano")+"População de <1 ano"*"Efeito mães fumadoras <1 ano"*8.4)*Portadores total estirpes HV não C*3.7e-011

Consequentemente, a equação que traduz o fluxo "Recuperando não C", aqui exemplificada no grupo etário <1 ano é a seguinte:

"Recuperando não C<1 ano"="Doentes não C <1 ano"*(1-Taxa imunização de doentes)*
*(1-"Taxa letalidade não C <1 ano")

Os modelos completos que traduzem a dinâmica das variáveis que afectam a epidemiologia da doença meningocócica em cada grupo etário são os seguintes (Figuras 67 a 71):

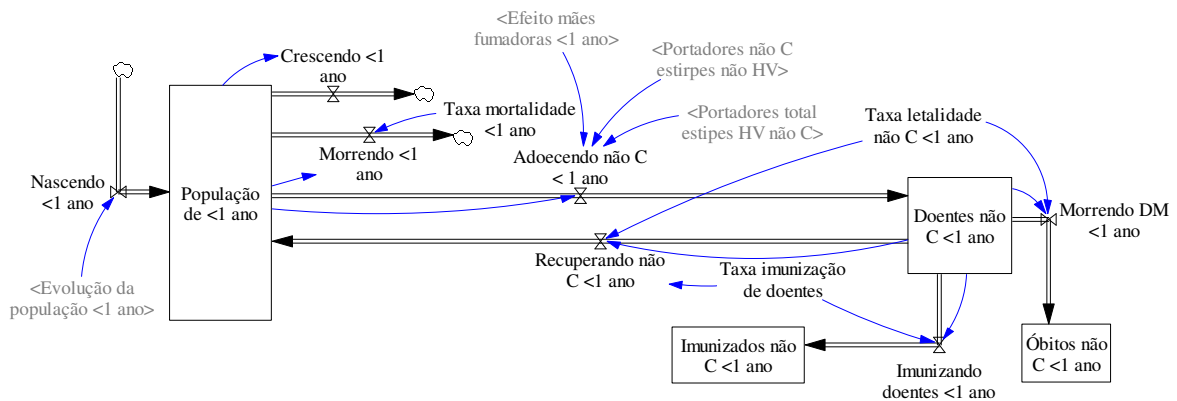


Figura 67 – Modelo completo que traduz a dinâmica das variáveis que afectam a epidemiologia da doença meningocócica em crianças menores de um ano

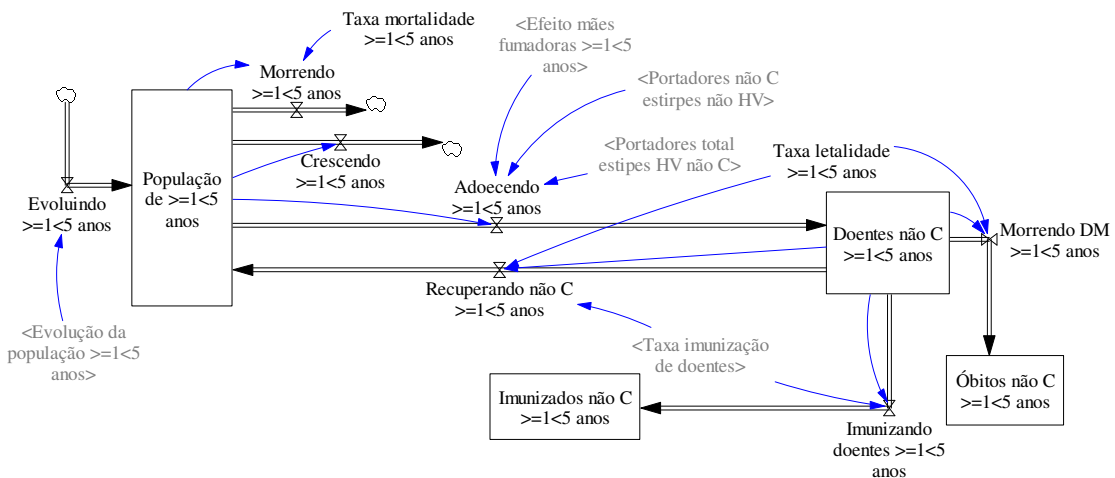


Figura 68 - Modelo completo que traduz a dinâmica das variáveis que afectam a epidemiologia da doença meningocócica crianças com idade superior ou igual a um ano e inferior a cinco anos

Maria João Mendes Simões Pedro

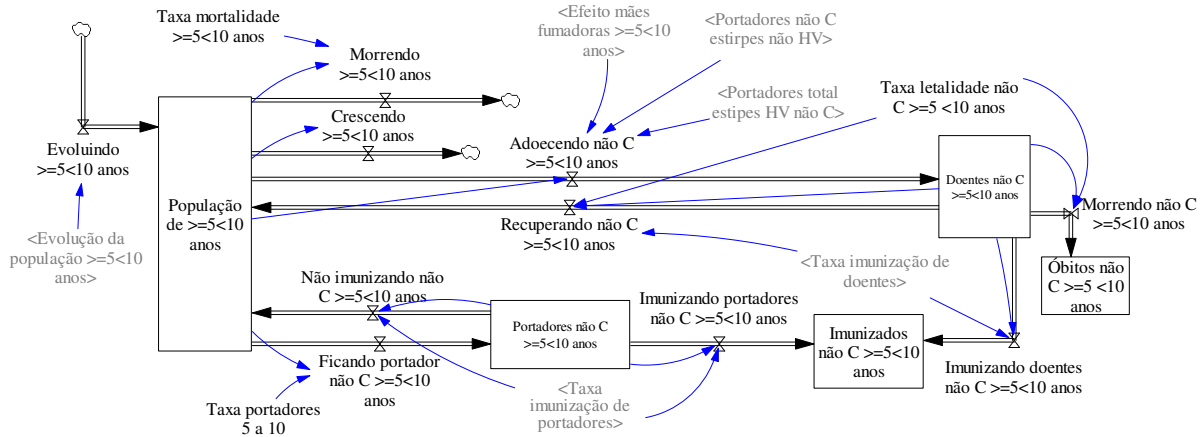


Figura 69 - Modelo completo que traduz a dinâmica das variáveis que afectam a epidemiologia da doença meningocócica em crianças com idade superior ou igual a cinco anos e inferior a dez anos

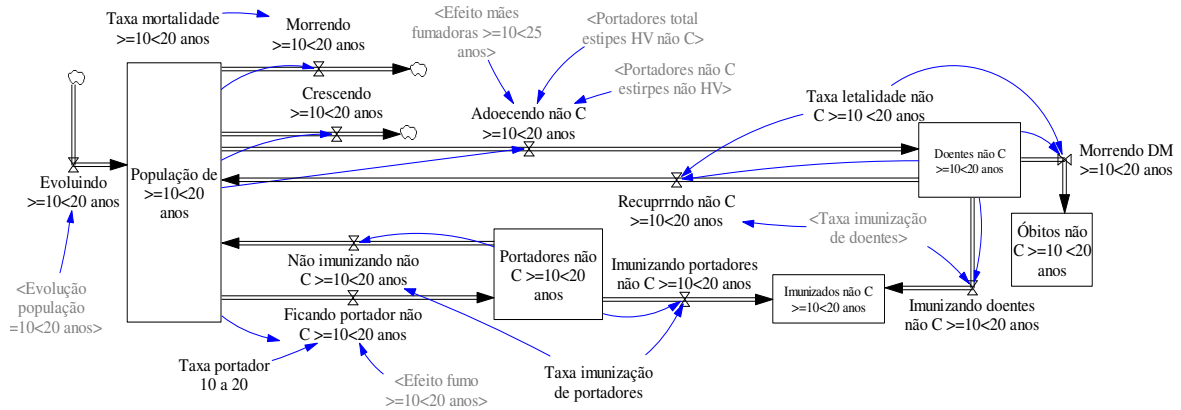


Figura 70 - Modelo completo que traduz a dinâmica das variáveis que afectam a epidemiologia da doença meningocócica em crianças com idade superior ou igual a dez anos e inferior a vinte anos

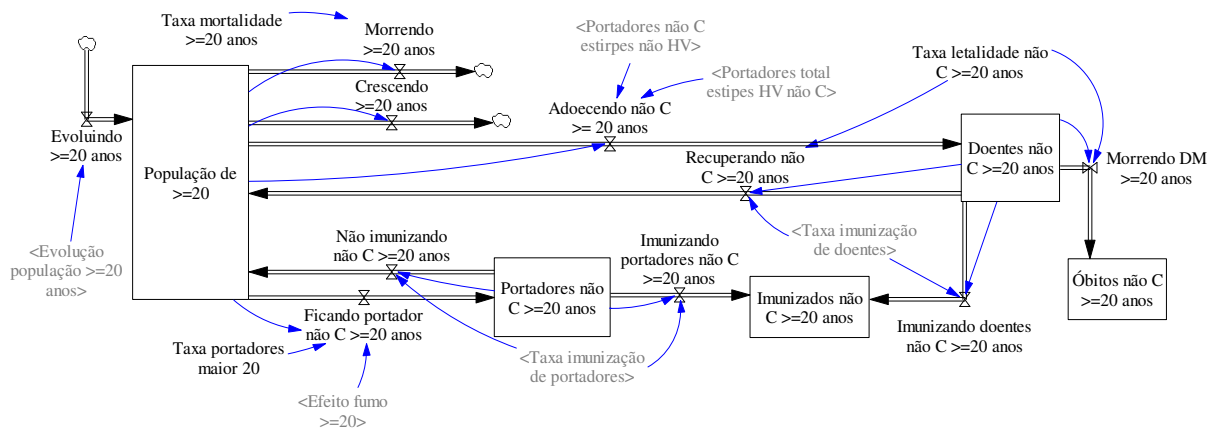


Figura 71 - Modelo completo que traduz a dinâmica das variáveis que afectam a epidemiologia da doença meningocócica em crianças com idade superior ou igual a vinte anos

4. Testes de validação do modelo

4.1 Grau de concordância entre os valores do modelo e os dados históricos

Avaliou-se o grau de concordância entre os valores observados no modelo para o nível “Doentes” nos diferentes grupos etários e os correspondentes valores registados na base de dados nacional. O período sujeito a comparação foi não só o respeitante aos oito anos epidemiológicos que foram analisados (2002 a 2010), mas ainda o ano epidemiológico 2010-2011.

O grau de concordância entre o número de doentes (total de doentes e em cada grupo etário) observado no modelo e os dados históricos observa-se nas tabelas e gráficos seguintes (Figura 72 e Figura 73):

Ano Epidemiológico	Total de casos	
	Nº casos não C notificados	Nº casos não C no modelo
2002-2003	135,2	126,7
2003-2004	160,1	122,8
2004-2005	153,9	119,4
2005-2006	110,8	116,3
2006-2007	111,2	107,2
2007-2008	85,0	85
2008-2009	76,7	73,9
2009-2010	70,0	69,1
2010-2011	82,0	67,2

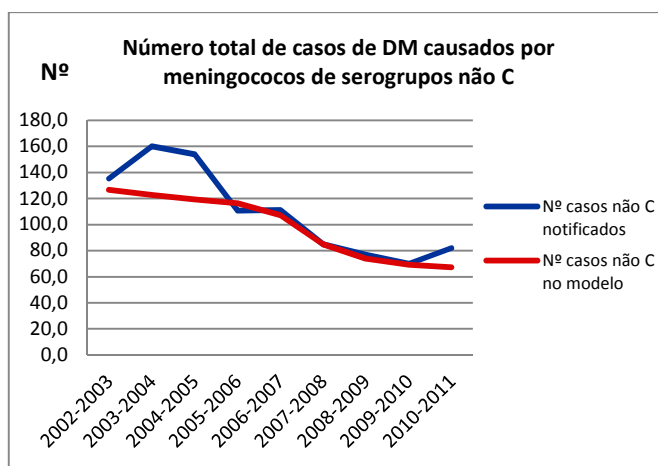
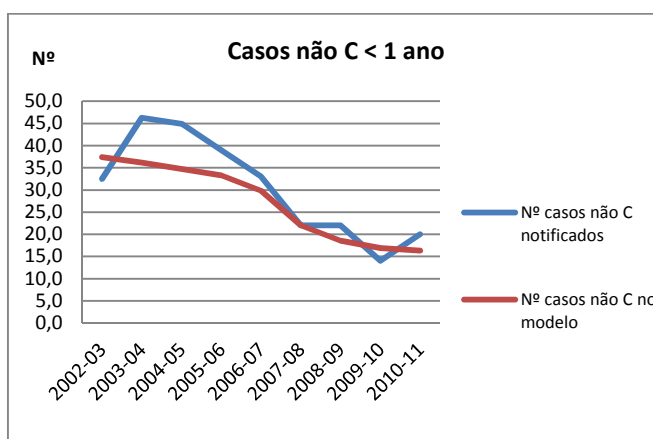
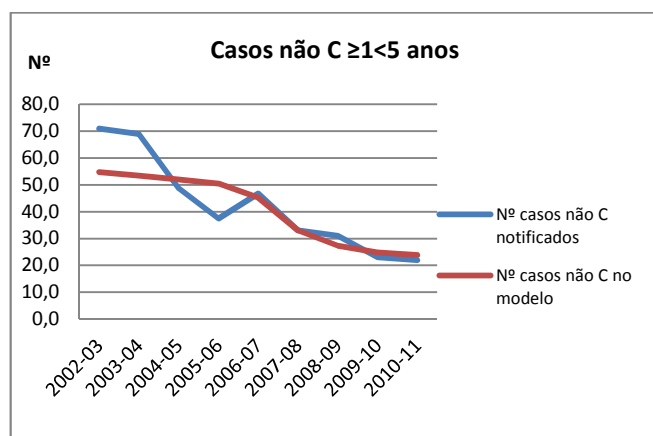


Figura 72 - Grau de concordância entre o número total de casos de DM devolvido pelo modelo e o número de casos notificado na base de dados nacional

Ano Epidemiológico	<1 ano	
	Nº casos não C notificados	Nº casos não C no modelo
2002-03	32,5	37,4
2003-04	46,3	36,2
2004-05	44,9	34,7
2005-06	38,9	33,7
2006-07	33,0	29,8
2007-08	22,0	22
2008-09	22,0	18,6
2009-10	14,0	16,9
2010-11	20	16,3



Ano Epidemiológico	≥1<5 anos	
	Nº casos não C notificados	Nº casos não C no modelo
2002-2003	71,0	54,8
2003-2004	69,0	53,5
2004-2005	48,8	52,0
2005-2006	37,5	50,5
2006-2007	46,8	45,2
2007-2008	33,0	33
2008-2009	31,0	27,3
2009-2010	23,0	24,8
2010-11	22	23,9



Ano Epidemiológico	≥5<10 anos	
	Nº casos não C notificados	Nº casos não C no modelo
2002-2003	12,7	12,9
2003-2004	18,9	12,7
2004-2005	24,5	12,5
2005-2006	10,0	12,3
2006-2007	9,4	12,2
2007-2008	11,0	11
2008-2009	8,0	9,7
2009-2010	13,0	9,2
2010-11	9	9,1

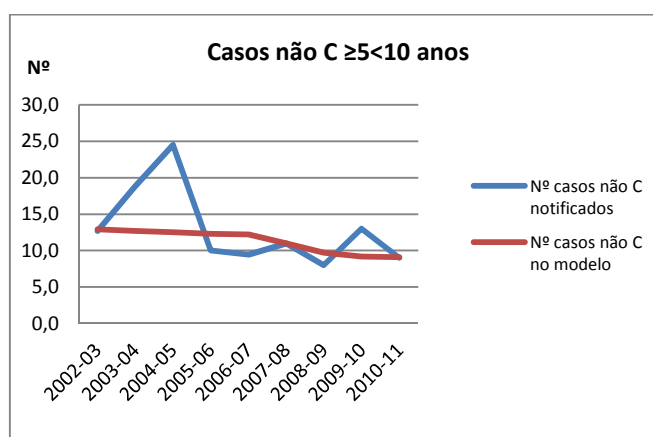
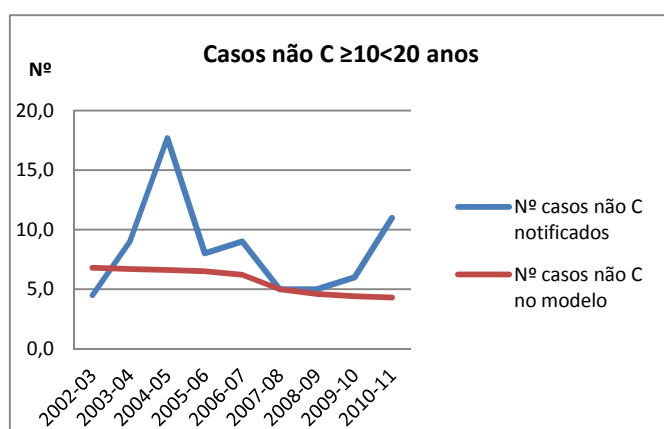


Figura 73 - Grau de concordância entre o número de casos de DM devolvido pelo modelo nos diferentes grupos etários e o número de casos notificado na base de dados nacional

Ano Epidemiológico	≥10<20 anos	
	Nº casos não C notificados	Nº casos não C no modelo
2002-2003	4,5	6,8
2003-2004	9,0	6,7
2004-2005	17,7	6,6
2005-2006	8,0	6,5
2006-2007	9,0	6,2
2007-2008	5,0	5
2008-2009	5,0	4,6
2009-2010	6,0	4,4
2010-2011	11	4,3



Ano Epidemiológico	≥20 anos	
	Nº casos não C notificados	Nº casos não C no modelo
2002-2003	14,5	14,4
2003-2004	17,0	14,3
2004-2005	18,0	14,2
2005-2006	16,4	14,1
2006-2007	13,0	14,1
2007-2008	14,0	14
2008-2009	10,7	13,9
2009-2010	14,0	13,8
2010-2011	20	13,9

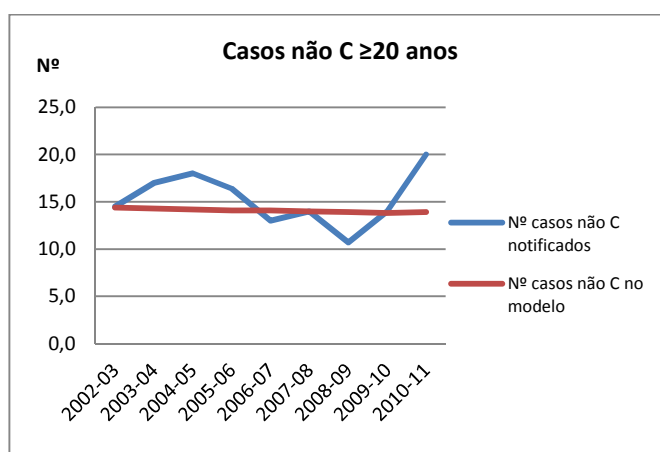


Figura 73 (cont.) – Grau de concordância entre o número de casos de DM devolvido pelo modelo nos diferentes grupos etários e o número de casos notificado na base de dados nacional

4.2 *Análise de sensibilidade do modelo*

Nos testes de sensibilidade observam-se os valores devolvidos pelo modelo para o valor dos níveis quando se faz variar o valor de uma variável ou, simultaneamente, o valor de várias variáveis (Sterman, 2000). Nesta tese utilizou-se a simulação de Monte Carlo (ou simulação multivariada de sensibilidade) que permite que este processo seja automático, com recurso ao *software* Vensim (Ventana Systems UK Ltd).

A análise de sensibilidade permite avaliar se existem grandes oscilações no número de doentes (sensibilidade numérica) ou no padrão de comportamento gerado pelo modelo (sensibilidade de comportamento) quando as variáveis assumem um intervalo de valores plausível. O modelo será tanto mais sensível quanto maior forem essas oscilações.

Sensibilidade do número de doentes com idade inferior a um ano ao número de nascimentos: como o número de nascimentos é uma curva no tempo (Evolução da população <1 ano), a análise de sensibilidade fez-se multiplicando a curva por um desvio que tem uma função distribuição uniforme entre 0,95 e 1,05, isto é, fez-se variar o número de nascimentos entre -5% e +5% do valor desta variável no modelo (Figura 74).

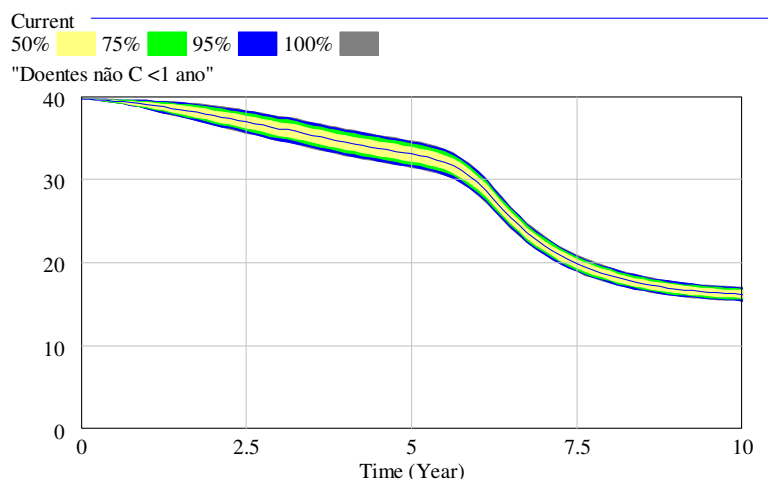


Figura 74 – Análise de sensibilidade do número de doentes com idade inferior a um ano ao número de nascimentos, numa simulação de um período de dez anos

Verifica-se que a sensibilidade do número de doentes com idade inferior a um ano ao número de nascimentos aumenta ao longo do tempo até que o modelo deixa de ser sensível à variável quando o número de doentes é baixo.

Sensibilidade do total de doentes à taxa de fumadores (total de fumadores): como a taxa de fumadores é uma curva no tempo ("Efeito fumo"), a análise de sensibilidade fez-

se multiplicando cada ponto das curvas relativas aos vários grupos de fumadores por um desvio que tem uma função distribuição uniforme entre 0,9 e 1,1, isto é, fez-se variar a taxa de fumadores em -10% a +10% (Figura 75).

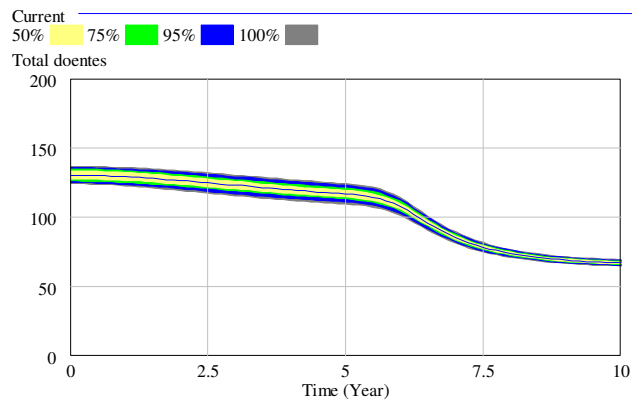


Figura 75 - Análise de sensibilidade do total de doentes à variável “taxa de fumadores “ do conjunto da população fumadora, numa simulação de um período de dez anos

Verifica-se que a sensibilidade do número de doentes ao total de fumadores aumenta ao longo do tempo até que o modelo deixa de ser sensível quando o número de doentes é baixo.

Sensibilidade dos doentes dos diferentes grupos etários à taxa de mães fumadoras: como a taxa de mães fumadoras nos diferentes grupos etários é uma curva no tempo (Efeito de mães fumadoras), a análise de sensibilidade fez-se multiplicando cada ponto das respectivas curvas por um desvio que tem, para todos os grupos etários, uma função distribuição uniforme entre 0,9 e 1,1, isto é, fez-se variar a taxa de mães fumadoras em -10% a +10% do valor desta variável no modelo. A sensibilidade a esta variável diminui no tempo à medida que o número de doentes diminui (Figura 76). Note-se que a taxa de mães fumadoras também baixou consideravelmente a partir do sexto ano da simulação.

Maria João Mendes Simões Pedro

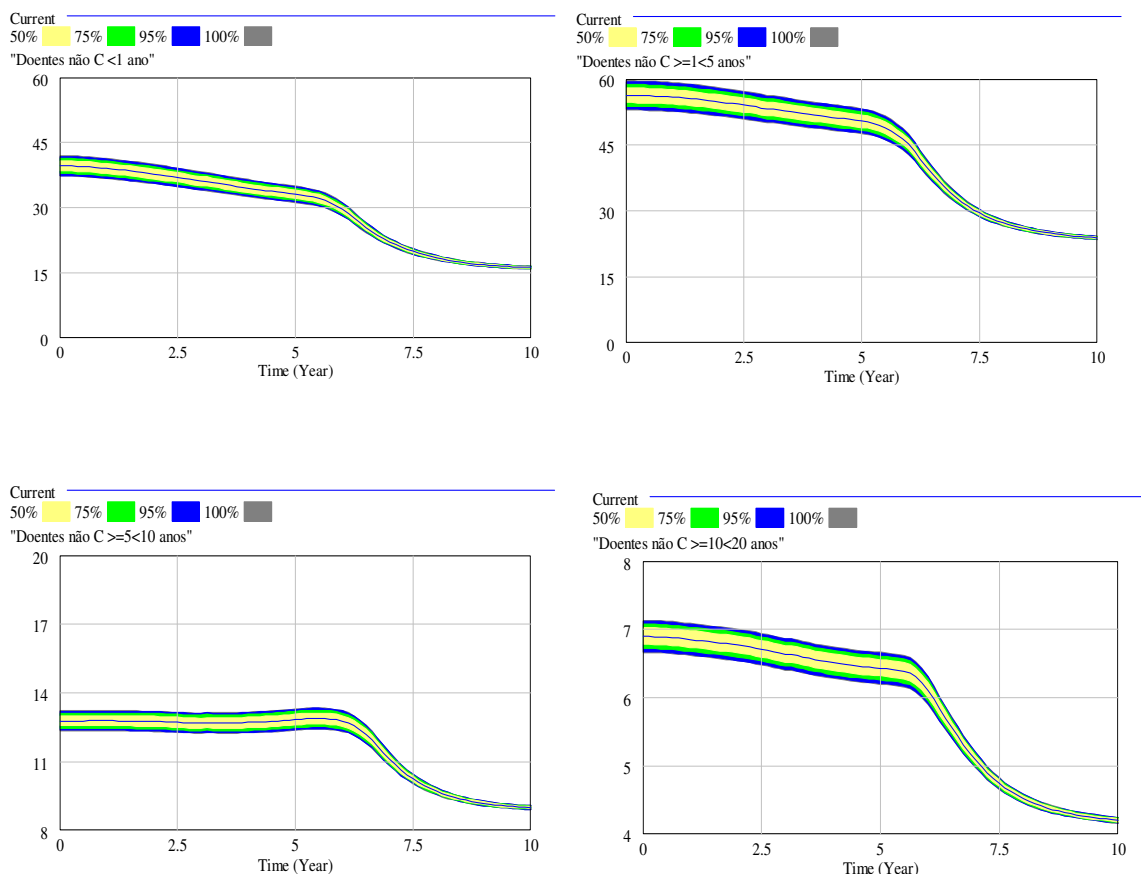


Figura 76 – Sensibilidade do número de doentes nos grupos etários sensíveis à exposição passiva ao fumo do tabaco das mães fumadoras, numa simulação de um período de dez anos

Sensibilidade do total de doentes à taxa de imunização de portadores: a análise de sensibilidade fez-se variando a taxa de imunização de portadores entre 5 e 15%, isto é, -3% e +7% do valor da variável considerado no desenvolvimento do modelo. A dinâmica do modelo não é sensível à variável (Figura 77), consequentemente, se o valor atribuído a esta variável se afastar do seu valor real, o comportamento do modelo não é significativamente afectado.

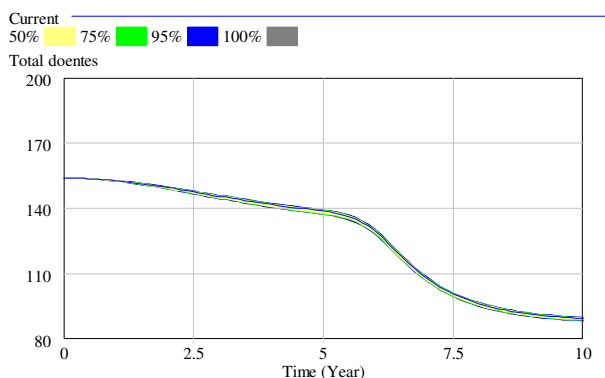


Figura 77 - Sensibilidade do total de doentes à taxa de imunização de portadores

Sensibilidade do total de doentes à taxa de imunização de doentes: a análise de sensibilidade fez-se variando a taxa de imunização de doentes entre 31 e 51%, isto é, entre menos 10 e mais 10% do valor da variável considerado no desenvolvimento do modelo. A dinâmica do modelo não é sensível à variável (Figura78), conseqüentemente, se o valor atribuído a esta variável se afastar do seu valor real, o comportamento do modelo não é significativamente afectado.

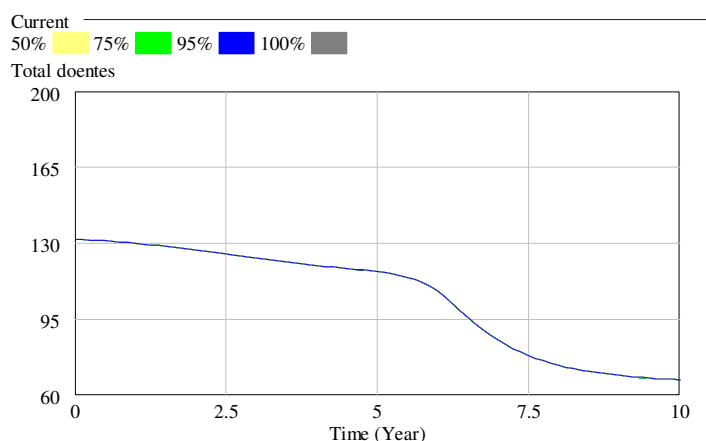


Figura 78 - O teste de sensibilidade do modelo, numa simulação num período de dez anos, mostra que não existe sensibilidade do número total de doentes à taxa de imunização de doentes

Sensibilidade do número total de doentes à taxa de portadores em cada grupo etário: a taxa de portadores mostrou ser a variável à qual o número de doentes é mais sensível (Figura 79).

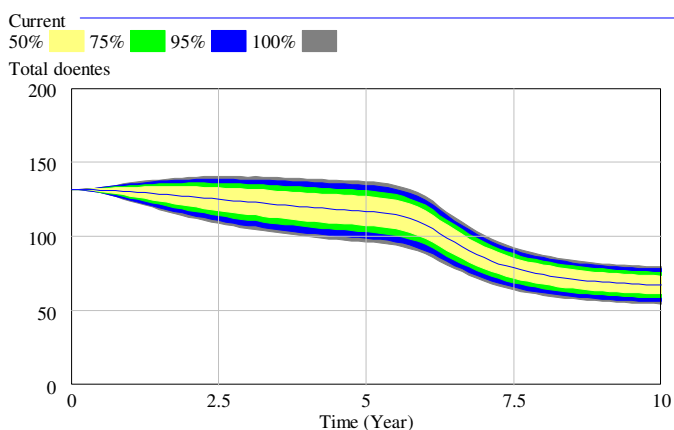


Figura 79 - Sensibilidade do número de doentes à taxa de portadores, numa simulação de um período de dez anos, quando se fez variar a taxa de portadores em crianças de cinco a nove anos entre 0 e 4% (foi considerada de 2% no desenvolvimento do modelo), a taxa de portadores em indivíduos com idade de 10 a 19 anos entre 13 e 17% (foi considerada de 15,3% no desenvolvimento do modelo) e a taxa de portadores em indivíduos com idade superior ou igual a 20 anos entre 8 e 12% (foi considerada de 10% no desenvolvimento do modelo)

4.3 Testes em condições extremas

O modelo deve ser robusto em condições extremas, isto é, o modelo deve mostrar um comportamento realista quando as variáveis assumem valores extremos (Sterman, 2000).

Redução de 75% no total de fumadores na população portuguesa – sem alteração de nenhuma outra variável, o modelo indica uma redução que varia entre 44 e 26% no número total de casos de DM (Figura 80). Esta é uma situação irreal, contudo o modelo apresenta um comportamento realista.

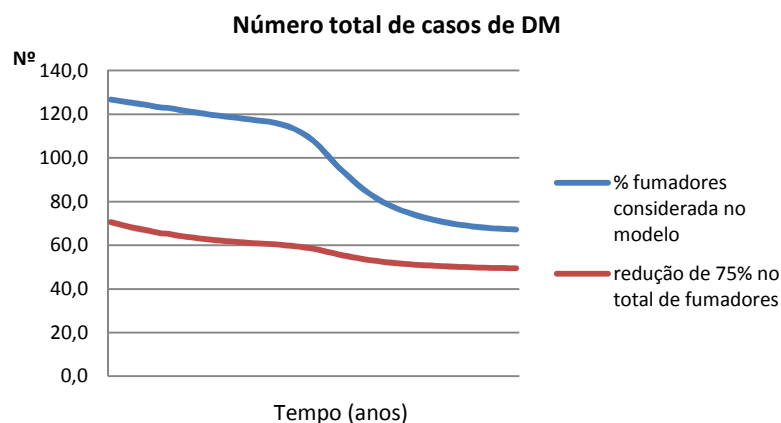


Figura 80 - Comparação entre o número total de casos de DM na situação extrema de se registar uma redução uniforme de 75% na taxa de fumadores do país e o número de doentes devolvido pelo modelo quando a taxa de fumadores é a estimada com base nos dados dos INS, num período de dez anos

Ausência de mães fumadoras: O modelo indica um comportamento realista em todos os grupos etários nos quais o número de doentes é afectado pela taxa de mães fumadoras, na situação improvável de não existirem mães fumadoras (Figura 81).

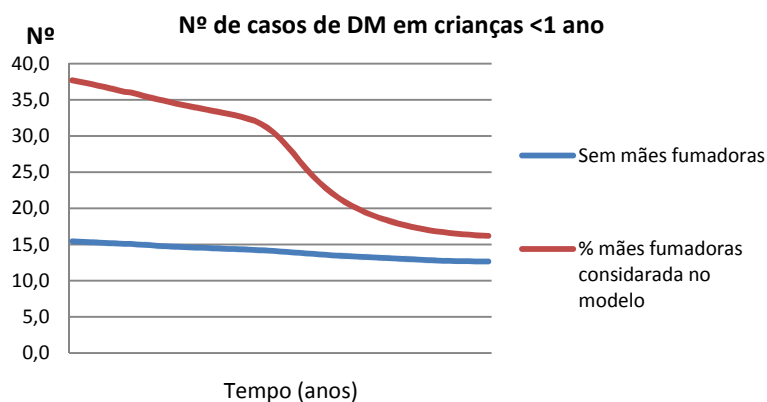


Figura 81 - Comparação entre o número de casos de DM na situação extrema de não existirem mães fumadoras e o número de doentes devolvido pelo modelo quando a taxa de fumadoras é a estimada com base nos dados dos INS, aqui exemplificada no grupo etário inferior a um ano, num período de dez anos

Varição de 50% na taxa de portadores no total da população portuguesa: Numa situação não epidémica não é provável que o número de portadores duplique quando todas as restantes variáveis mantêm o mesmo valor. Também não é provável que o número de portadores seja metade do que foi considerado no desenvolvimento do modelo quando todas as restantes variáveis se mantêm. A simulação nestas condições improváveis indica um comportamento realista do modelo (Figura 82).

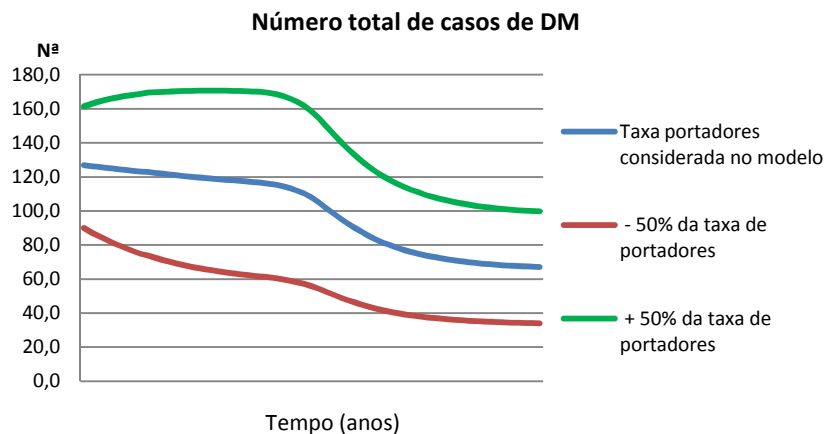


Figura 82 - Comparação entre o número de casos de DM observado no modelo e o que se iria observar se a taxa de portadores duplicasse ou fosse reduzida a metade, num período de dez anos

5. Simulação de cenários

O modelo constitui uma ferramenta que permite responder a questões pertinentes em saúde pública, com recurso a simulação de cenários. Nestas simulações avalia-se o impacto que alterações nas variáveis do modelo têm na dinâmica de transmissão de meningococos e, conseqüentemente, no número de doentes.

Fez-se a simulação de cenários considerando alterações em variáveis, únicas ou combinadas, que afectam fortemente o modelo, isto é, idade da população, não subestimando o envelhecimento da população a que se assiste presentemente, taxa de estirpes HV com diferentes “factores de invasão” presentes em portadores assintomáticos e hábitos tabágicos (Tabela 40). Em todas as simulações, o número de doentes refere-se sempre a indivíduos infectados com meningococos de serogrupos não C.

Cenário 1 – Mantendo-se a mesma tendência decrescente no número de nascimentos e não havendo alterações em nenhuma das restantes variáveis que afectam o modelo (o que é improvável), o número de crianças com idade inferior a um ano que virá a adoecer em 2015-16 seria 13% inferior ao número de doentes observado no modelo em 2010-11. Esta redução será apenas de 3% nas condições precedentes, quando a taxa de mães fumadoras das crianças deste grupo etário aumenta de 3,5% em 2010-11 para 5% em 2015-16.

Cenário 2 – A simulação de um cenário mais provável do que o anterior, no qual a tendência decrescente no número nascimento se mantém mas se mantém também a tendência crescente de estirpes com factor de invasão 7 em portadores assintomáticos, indica que, em 2015-16 o número doentes com idade inferior a um ano decresce 10,6% mas, no total da população, o número total de doentes decresce apenas 0,7%.

Cenário 3 – A simulação de um cenário em que se verifica o aumento contínuo, a partir de 2010-11, da taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 7 de 7,4% para 12%, sem alteração de outras variáveis, conduz ao aumento de 12,5% do número de doentes não C, no ano epidemiológico 2015-16 (Figura 83).

Cenário 4 – O envelhecimento da população terá impacto no número total de doentes que se registam anualmente. Sem alteração de outras variáveis, considerando apenas a tendência crescente que se observa presentemente na curva de indivíduos com idade superior a 20 anos, em 2020-21 verifica-se neste grupo etário um aumento de 8,7% no número de doentes, relativamente a 2010-11.

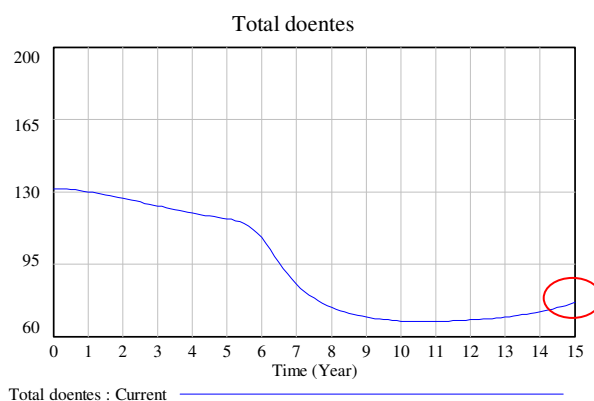


Figura 83 - Evolução no número total de doentes não C, simulando um aumento crescente e contínuo (de 7% a 12%) na taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 7, de 2010-11 a 2015-16

Cenário 5 – As estirpes com factor de invasão 28 caracterizam-se, como se viu no capítulo no capítulo V (Tabela 33), maioritariamente como serogrupo C. Sem alteração de quaisquer outras variáveis, a simulação de um aumento da taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 28 a partir de 2010-11, passando progressivamente de vestigial para 1% em 2015-16, conduz possivelmente a um cenário semelhante ao que se verificou no início dos anos 2000, quando o país registou um número anormalmente elevado de casos de DM.

Cenário 6 – No mesmo tipo de simulação, quando se faz aumentar continuamente, a partir de 2010-11, a taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 26 de 0,05% para 1%, verifica-se que em 2015-16 há um aumento de 22% no número de doentes não C, relativamente a 2010-11 (Figura 84).

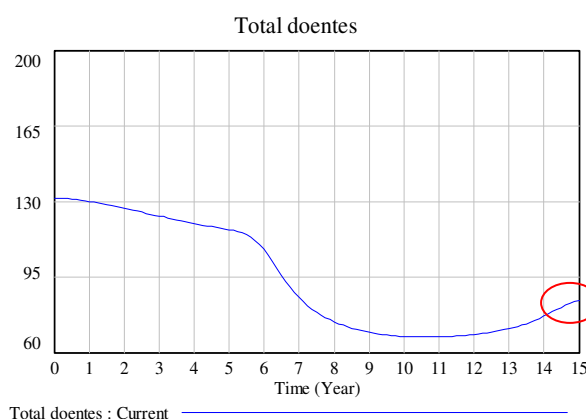


Figura 84 - Evolução no número total de doentes não C, simulando um aumento crescente e contínuo (de 0,05% a 1%) na taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 26, de 2010-11 a 2015-16

Cenário 7 – A simulação do aumento da taxa de portadores no grupo etário ≥ 10 e < 20 anos, de 15,3% para 18%, independentemente do tipo de estirpe de colonização, indica que há o aumento anual médio de 2,5% no número total de doentes.

Cenário 8 – Alterações na taxa de fumadores na população portuguesa traz alteração ao número de portadores e, conseqüentemente, ao número de doentes. A simulação de um aumento contínuo a partir de 2010-11 da taxa de fumadores, atingindo-se em 2020-21 mais 4% de fumadores do que em 2010-11, conduz a um aumento de 2,6% no número total de doentes no final deste período.

Cenário 9 - Mantendo-se a tendência decrescente no número de nascimentos, num cenário de redução progressiva até 0% em 2015-16 na taxa de mães fumadoras de crianças menores de um ano, e sem alteração de outras variáveis, o modelo indica que em 2015-16 se verifica uma redução de 27% no número de doentes deste grupo etário, comparativamente a 2010-11.

Cenário 10 – Nas condições precedentes, adicionadas de uma redução progressiva até 0% também na taxa de mães fumadoras de crianças com idade ≥ 1 ano e < 5 anos, em 2015-16 verifica-se uma redução de 19% no número de doentes deste grupo etário, comparativamente a 2010-11. No conjunto da população, verifica-se uma redução de 13% no número total de doentes.

Tabela 39 – Cenários para simulação de transmissão de meningococos

Cenários	Resultado Variação (%) no número de casos de DM por meningococos não C
1- <i>Decréscimo mantido no número de nascimentos ocorridos em Portugal, sem alteração de quaisquer outras variáveis que afectam o modelo.</i>	1 – No ano epidemiológico 2015-16 o número de doentes com idade inferior a 1 ano decresce 13%. Este decréscimo será apenas de 3% se, às condições precedentes se juntar o aumento da taxa de mães fumadoras de 3,5% para 5%.
2 - <i>Decréscimo mantido no número de nascimentos ocorridos em Portugal, aumento mantido do número de portadores assintomáticos de estirpes com factor de invasão 7, sem alteração de quaisquer outras variáveis que afectam o modelo</i>	2 - No ano epidemiológico 2015-16 o número de doentes com idade inferior a 1 ano decresce 10,6% e o número total de doentes decresce apenas 0,7%
3 - <i>Aumento contínuo, a partir de 2010-11, da taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 7, de 7% para 12%, sem alteração de outras variáveis</i>	3- Em 2015-16 observa-se um aumento de 12,5% no número de doentes não C relativamente a 2010-11 (Figura 83)
4 - <i>Consequência do envelhecimento da população</i>	4 - Em 2020-21 verifica-se, em indivíduo com idade \geq a 20 anos, um aumento de 8,7% no número de doentes relativamente a 2010-11
5 - <i>Aumento da taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 28 a partir de 2010-11, passando progressivamente de vestigial para 1% em 2015-16</i>	5 - No ano epidemiológico 2015-16 verifica-se um aumento de 26% no número total de doentes relativamente a 2010-11

Tabela 39 (cont.) – Cenários para simulação de transmissão de Meningococos

Cenários	Resultado Varição (%) no número de casos de DM por meningococos não C
<i>6 - Aumento contínuo, a partir de 2010-11, da taxa de portadores de estirpes com factor de invasão 26 de 0,05% para 1%, sem alteração de outras variáveis</i>	6 - Em 2015-16 observa-se um aumento de 22% no número de doentes não C relativamente a 2010 (Figura 84)
<i>7- Aumento da taxa de portadores no grupo etário ≥ 10 e < 20 anos de 15,3% para 18%</i>	7- Aumento anual médio de 2,5% no número total de doentes
<i>8- Aumento contínuo, a partir de 2010-11, da taxa de fumadores, existindo em 2020-21 mais 4% de fumadores do que em 2010-11</i>	8- Em 2020-21 verifica-se, no conjunto da população, um aumento de 2,6% no número de doentes relativamente a 2010-11
<i>9 - Ausência de mães fumadoras de crianças menores de um ano em 2015-16</i>	9 – Em 2015-16 verifica-se uma redução de 27% no número de doentes deste grupo etário, comparativamente a 2010-11
<i>10 - Ausência de mães fumadoras de crianças menores com idade ≥ 1 ano e < 5 anos em 2015-16</i>	10 – Em 2015-16 verifica-se uma redução de 19% no número de doentes deste grupo etário, comparativamente a 2010-11
<i>11 - Ausência de mães fumadoras de crianças menores 5 anos em 2015-16</i>	11- Em 2015-16 verifica-se uma redução de 13% no número total de doentes, comparativamente a 2010-11

6. Discussão

O modelo reproduz como esperado o número total de doentes em cada ano (figura 83), havendo contudo desvios nos grupos etários com idade compreendida entre cinco e dez anos e entre dez e vinte anos, possivelmente devido ao número pequeno de observações. Também se verificam alguns desvios no número de casos de DM nos anos epidemiológicos entre 2002 e 2005 quando comparado com os dados históricos. Este facto pode justificar-se pela fraca qualidade dos dados correspondentes aos três primeiros anos de vigilância epidemiológica integrada de doença meningocócica em Portugal, durante os quais a percentagem de casos confirmados variou entre 72% e 81 e a percentagem de estirpes, das quais se fez caracterização do serogrupo, variou entre 58% e 75%. Acresce ainda o facto de se não ter considerado no desenvolvimento do modelo o efeito da gripe.

A comparação entre a evolução que supostamente ocorreu em Portugal na taxa de infecção por estirpes C após a introdução no mercado da vacina MenC em 2002 e a que ocorreu em países europeus com vacinação por rotina (vacina introduzida no PNV), sugere que os números portugueses estão sobreavaliados em 2002 e 2003. No final de 2005, a cobertura vacinal nacional de crianças de um a oito anos de idade à data, diminuía com a idade, progressivamente de 69% para 39% (DGS-INSA, 2007). A taxa de vacinação em Portugal entre 2002 e 2005 foi baixa e, presumivelmente, mais baixa do que a registada em países com a vacina implementada no PNV mas observou-se a mesma redução na percentagem de doença por serogrupo C do que a observada nesses países, isto é, a evolução da taxa de doença invasiva por serogrupo C em Portugal acompanhou a que foi observada em países europeus com a vacina introduzida no PNV (Tabela 40) (Eu-Ibis 2007). Em 2003, um ano depois da vacinação voluntária de crianças e adolescentes por iniciativa de pais e pediatras, Portugal registou uma redução de 38% na taxa de estirpes invasivas C, o que se aproxima da redução observada na Bélgica no mesmo período, um ano após a vacina ter sido introduzida no PNV naquele país.

No pressuposto de que é excessiva a redução de estirpes do serogrupo C registada em Portugal em 2002 e 2003, pode especular-se que o número total de casos de DM está sobreavaliado nesse período e que o número de estirpes não C foi também incorrectamente estimado para o mesmo período.

Tabela 40 – Percentagem de estirpes invasivas do serogrupo C identificadas em três países europeus com vacinação por rotina e em Portugal, com indicação do ano de implementação da vacina nos respectivos PNV e taxa de redução de estirpes um ano e dois anos após o início da vacinação por rotina.

País	Percentagem de estirpes invasivas do serogrupo C identificadas por ano de isolamento										Catch-up	% redução de estirpes C 1 ano e 2 anos após início da vacinação por rotina	
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	1 ano após		2 anos após	
Bélgica	26	31,8	46,8	34	20,2	12,7	10,5	7,9			1 - 6 anos e 14-17 anos*	40,5	62,6
Holanda	14,1	19,6	38,4	36	12,4	6	1,6	-			1 - 18 anos	65	83,3
Reino Unido	22,6**	16,8	8,3	6,4	3,5	2,2	1				< 18 anos	25,7	90,3
Portugal	>40	56,5	52,3	62,7	38,9	12,1	13,5	15,1	4,9		2002 - crianças e adolescentes voluntário 2006 - <10 anos 2007 - 10-18 anos	67,5	-

■ Ano de introdução da vacina no PNV
 □ Ano de comercialização da vacina em Portugal

*Só na Flandres

**Vacina introduzida no PNV em Novembro

No pressuposto de que as estirpes de colonização conferem imunização protectora e que na ausência de novos genótipos o número de indivíduos susceptíveis de serem colonizados vai progressivamente diminuindo, foi necessário quantificar o nível de imunização após o estado de portador assintomático e após doença invasiva. Esta quantificação, porventura controversa e nunca anteriormente realizada por outros autores, contribuiu para que o modelo mostrasse, no período de oito anos em análise, um declínio no número de doentes, sobreponível ao observado nos dados reportados na base de dados nacional (Figura 85).

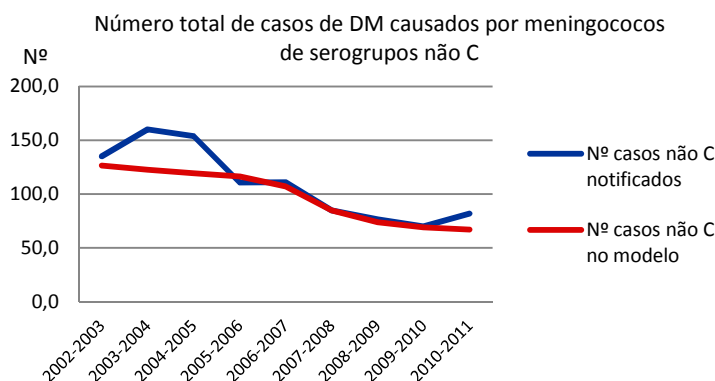


Figura 85 - Número total de casos de doença meningocócica causada por estirpes de serogrupos não C, registados na base de dados nacional e observados no modelo dinâmico

A tendência decrescente no número de casos de DM observada na base de dados nacional e no modelo, entre 2002 e 2010, acompanhou a curva decrescente de nascimentos e da dimensão da população com idade ≥ 1 ano e <5 anos (Figura 86).

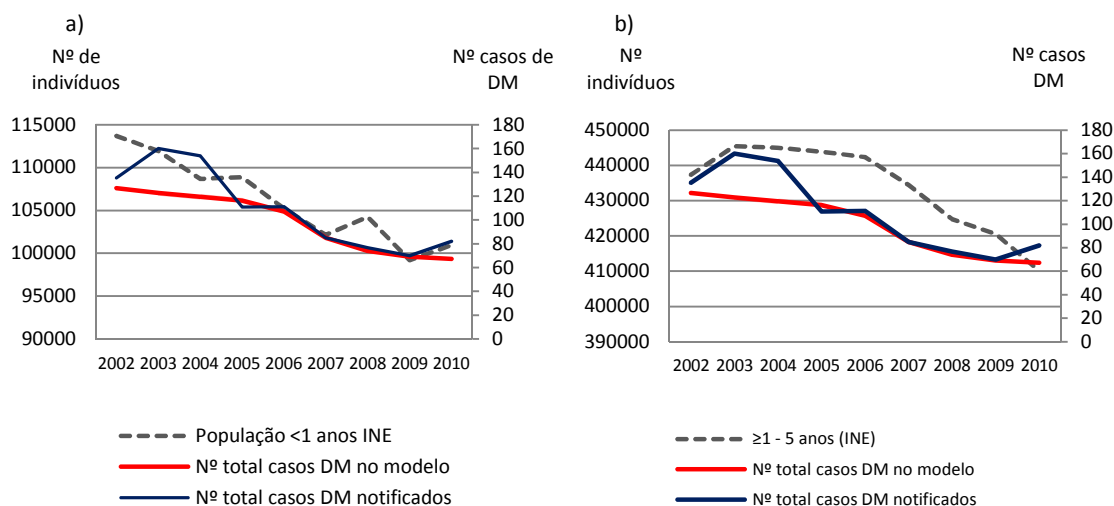


Figura 86 - Evolução do número anual de casos de DM (registado na base de dados nacional e no modelo) e número estimado de indivíduos em 31 de Dezembro de cada ano (INE) com idade inferior a um ano (a) e com idade superior ou igual a um e inferior a cinco anos (b), relativo ao período entre 2002 e 2010

Nos restantes grupos etários, ou no total da população, não se observa esta mesma tendência.

A tendência decrescente no número de casos de DM observada na base de dados nacional e no modelo, entre 2002 e 2010, acompanhou também a curva decrescente do número total de fumadores (Figura 87).

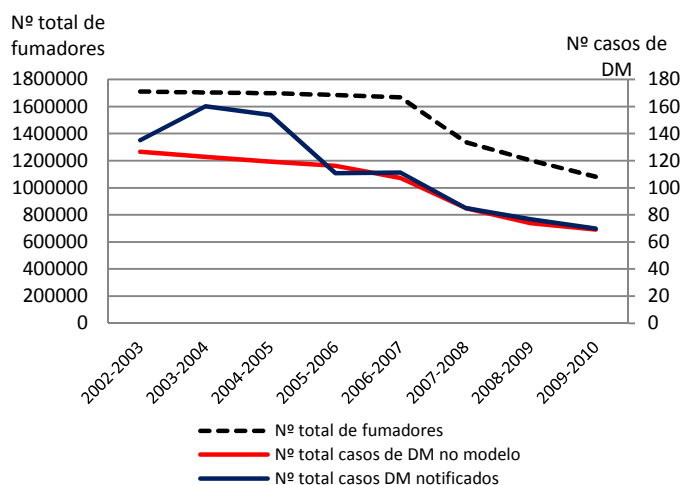


Figura 87 - Número anual de casos de DM registados na base de dados nacional e no modelo entre 2002 e 2010 e número estimado de fumadores para o mesmo período

Em que medida o aparecimento de novos genótipos vai influenciar a dinâmica da DM é difícil, se não impossível, de prever, uma vez que essa variável depende fundamentalmente de características intrínsecas de bactérias ainda não emergentes. Ao considerarmos quatro níveis de infecciosidade/capacidade de invasão de meningococos, dotámos o modelo da capacidade de simular a emergência de estirpes com diferentes níveis de virulência e potencial epidémico.

Fez-se a simulação de cenários considerando variações na taxa de estirpes HV com diferentes “factores de invasão” presentes em portadores assintomáticos, nos hábitos tabágicos e no envelhecimento da população (Tabela 42).

A partir do início de 2011, observou-se em Portugal um aumento de estirpes invasivas do serogrupo Y (de 6,3% no período 2002 a 2010 para 17% em 2011 e ainda uma estirpe B com alteração capsular de Y para B isolada em 2011). Este é um fenómeno esperado uma vez que a incidência de doença invasiva por este serogrupo aumentou significativamente, inicialmente no continente americano e mais recentemente na Europa (Hedberg *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos da América a incidência de doença invasiva por serogrupo Y aumentou a partir da década de 1990. No período entre 1989 e 1991, o serogrupo Y representava 2% das estirpes invasivas e em 2007 representou 37% das estirpes invasivas identificadas neste país (Harrison, 2010). No Canadá, em 1999, os meningococos do serogrupo Y representavam 10,1% das estirpes invasivas e em 2003 eram já 25,3% destas estirpes (Tsang *et al.*, 2007). Na Suécia, a incidência de DM por serogrupo Y mais do que quintuplicou entre 2005 e 2010 (Hedberg *et al.*, 2011). À semelhança do que se passa nos países referidos, em Portugal os meningococos do serogrupo Y são também maioritariamente do cc ST-23. Parece então que está a emergir um novo clone bem adaptado, do qual não é ainda possível quantificar o seu “factor de invasão” mas que poderá vir a justificar uma inflexão na curva de número de casos/ano (*vide* figura 83).

No desenvolvimento do modelo não foi possível estabelecer a relação entre doença invasiva e gripe (ou outra infecção respiratória) uma vez que não estão disponíveis dados de incidência de gripe ou outra infecção respiratória por grupo etário. Embora a sazonalidade destes dois tipos de infecção seja sobreponível (*vide* Capítulo IV, figura 22), sabe-se que a epidemia de gripe AH₁N₁, supostamente registada no ano epidemiológico 2009/2010, não fez aumentar a incidência da DM em nenhum dos grupos etários considerados no desenvolvimento do modelo. Contudo, uma análise mais cuidada dos dados referentes ao Programa Nacional de Vigilância da Gripe revela que a situação epidemiológica em 2009-2010 não foi significativamente diferente da registada na época gripal precedente (Guiomar *et al.*, 2010). Em 2008/2009, as taxas de incidência semanais do síndrome gripal^{a)} mantiveram-se acima da área de actividade basal^{b)} durante 6 semanas consecutivas (entre as semanas 50/2008 e 3/2009), com um valor máximo de

199,5 casos por 100 000 habitantes na semana 1/2009. Na época 2009/2010, a taxa de incidência manteve-se acima da área da actividade basal durante 7 semanas consecutivas (entre a semana 44/2009 e a semana 50/2009), com um valor máximo de 133,7 casos por 100 000 habitantes na semana 47/2009 (Figura 88), (Guiomar *et al.*, 2010).

- a) O caso de síndrome gripal é definido de acordo com os critérios do Conselho Europeu, Decisão 2008/426/EC: Início súbito de sintomas e pelo menos 1 de 4 sintomas sistémicos (febre ou febrícula; mal-estar, debilidade ou prostração; cefaleias; mialgias ou dores generalizadas) e pelo menos 1 de 3 sintomas respiratórios (tosse; dor de garganta ou inflamação da mucosa nasofaríngea sem outros sinais respiratórios relevantes; dificuldade respiratória). No período de 2009/2010 foi também considerada a presença dos seguintes sintomas/sinais: calafrios/arrepios e contacto com doente com Gripe.
 - b) A área de actividade basal é definida pela linha de base e pelo respectivo limite superior do intervalo de confiança a 95%. A linha de base foi obtida por suavização da distribuição das médias semanais (semana 40 à 13) das taxas de incidência inferiores a 50 casos por 100 000 habitantes. Este valor limite (50/105) foi estabelecido pela relação entre a frequência da distribuição semanal das taxas de incidência durante 10 anos e a análise da média dos vírus detectados no mesmo intervalo de tempo.
- Neste contexto, a epidemia de Gripe ocorre no período em que as taxas de incidência se encontram acima da área de actividade basal, correspondendo a uma circulação não esporádica de vírus Influenza.

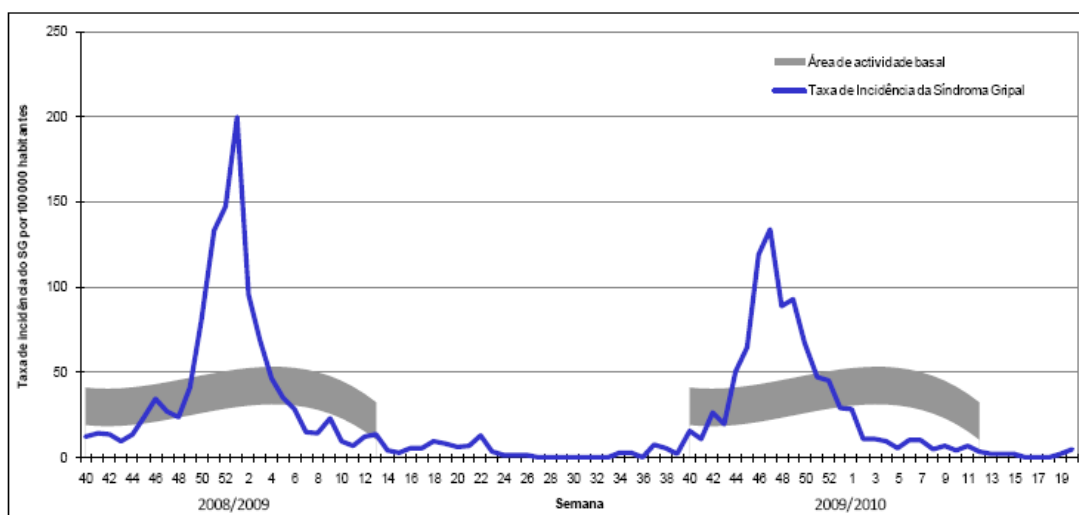


Figura 88 - Taxas de incidência semanais de síndrome gripal por 100 000 habitantes, nas épocas gripais 2008/2009 e 2009/2010, com indicação da área de actividade basal

A caracterização dos casos de síndrome gripal por grupo etário, revela uma maior proporção de casos nos grupos etários acima dos 45 anos na época de 2008/2009 enquanto que, na época de 2009/2010, a maior proporção de casos verifica-se nos grupos etários mais novos, dos zero aos 14 anos (Figura 89).

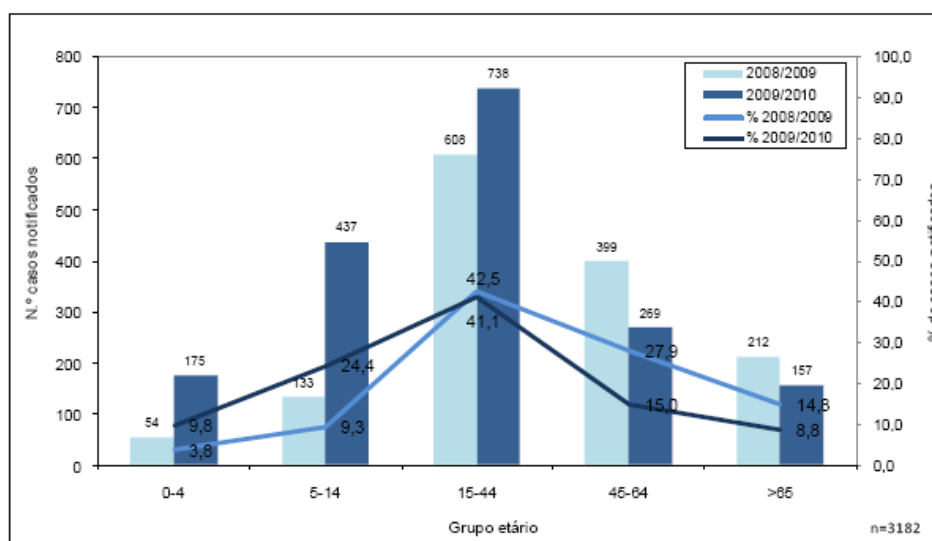


Figura 89 - Distribuição dos casos de síndrome gripal, por grupo etário, nas épocas gripais de 2008/2009 e 2009/2010

Embora fique por compreender em que medida as infecções respiratórias facilitam a colonização e a doença invasiva e quais as características dos agentes virais e bacterianos de infecção respiratória que são determinantes nas infecções subsequentes, assinala-se que houve uma *actividade gripal elevada** na época de 2003/2004 (Figura 90) (Andrade *et al*, 2004) e 2004-2005 (Figura 91) (dados não publicados, gentilmente cedidos pela Dr.^a Raquel Guiomar, responsável pelo LNR para o vírus da Gripe), coincidente com uma incidência aumentada de DM nos referidos anos.

*Actividade gripal elevada é definida por valores de taxa de incidência de síndrome gripal acima de 120/casos por 100 mil habitantes.

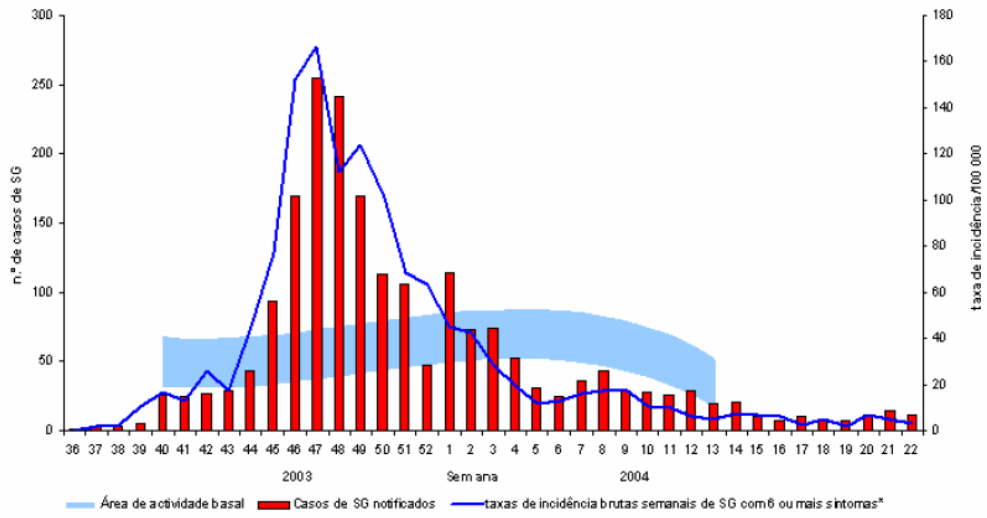


Figura 90 - Número total de casos de SG e respectivas taxas de incidência semanais de síndrome gripal na época 2003/2004

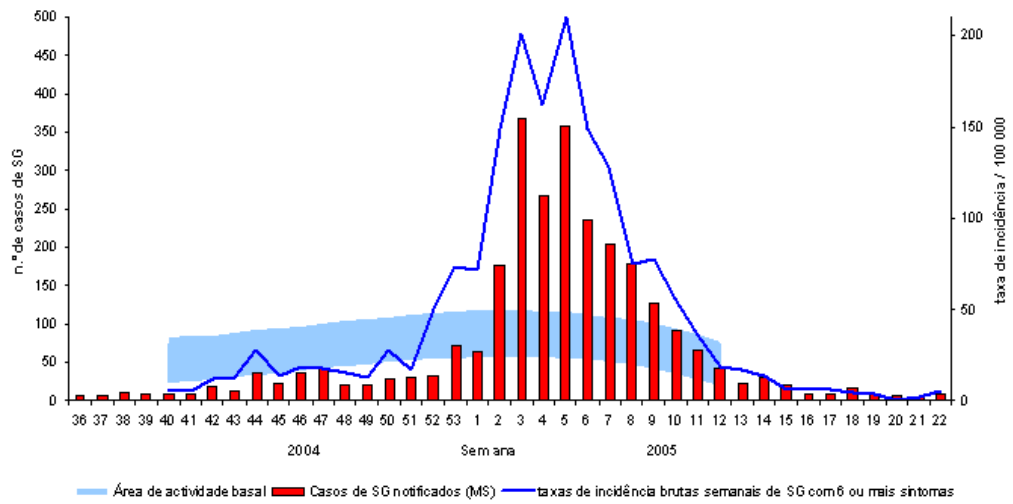




Figura 91 - Número total de casos de SG e respectivas taxas de incidência semanais de síndrome gripal na época 2004/2005



Capítulo VI – Conclusões



1. Conclusões

No período entre 2002 e 2010, registou-se em Portugal uma tendência decrescente na incidência da DM, com um acentuado decréscimo na incidência da doença causada por estirpes C após a introdução da vacina meningocócica conjugada para o serogrupo C.

Contrariando a suspeição de que os serogrupos não incluídos na vacina iriam ocupar o nicho deixado por meningococos C depois da introdução da vacina e, conseqüentemente, aumentar a incidência da DM causada por estirpes não C, verificou-se que, oito anos pós vacinação, o número de casos de doença meningocócica não aumentou.

Em resposta à questão fundamental desta tese, pode afirmar-se que as estirpes de *Neisseria meningitidis* de serogrupos não C não ocuparam o nicho deixado pelas estirpes C depois da vacinação em massa de crianças a adolescentes com a vacina meningocócica conjugada, que decorreu a partir de 2002. Este cenário é contrário ao que se observou na incidência da doença invasiva pneumocócica, em países com políticas de vacinação implementadas, cinco anos depois da introdução da vacina pneumocócica conjugada. Tal facto pode justificar-se pela muito maior diversidade de polissacáridos capsulares pneumocócicos que são já 90 (Henrichsen, 1995). Possivelmente, o aparecimento de estirpes de pneumococos resistentes aos antibióticos, particularmente à Penicilina (antibiótico de eleição no tratamento de infecções pneumocócicas), tem contribuído para a selecção de estirpes e para a substituição de serótipos que se tem observado em pneumococos. As diferenças entre meningococos e pneumococos, no que respeita a prevalência de portadores por grupo etário, dinâmica de transmissão/ infecção e no padrão de resistência aos antibióticos, são possivelmente variáveis determinantes nas diferenças na epidemiologia dos dois tipos de doença invasiva. Em Portugal, também não se verificou o aparecimento de estirpes invasivas de meningococos não capsulados, tal como aconteceu com *Haemophilus influenzae* nos países que incluíram a vacina Hib nos seus programas de vacinação, nos quais a incidência de doença invasiva por estirpes não capsuladas é agora mais alta do que por estirpes tipo b, ocorrendo, no entanto, principalmente em recém-nascidos e idosos (Rubach *et al.*, 2011). No que respeita à incidência da doença meningocócica em idosos, é ainda prematuro avaliar tendências em Portugal mas ela deve constituir objecto de monitorização.

O modelo desenvolvido mostrou traduzir correctamente a dinâmica de transmissão de meningococos invasivos. Ele poderá ser uma ferramenta útil na simulação de cenários que possam interessar aos decisores de políticas de saúde.

O modelo demonstrou que, dos factores associados ao hospedeiro, a idade e a redução do número de fumadores foram as variáveis que mais contribuíram para a redução do número de casos de DM em todos os grupos etários. Este facto justifica, só por si, o esforço que deve ser investido em campanhas antitabágicas.

O modelo sustenta a hipótese da imunização natural induzida por genótipos endémicos na população portuguesa contribuir para a redução progressiva da incidência da DM que se observou no país. Esta é uma questão determinante na evolução da epidemiologia da DM, cuja dinâmica é afectada pela diversidade genética da bactéria *Neisseria meningitidis*. Essa grande diversidade resulta da frequência de recombinação genética, particularmente por transformação, para a qual a bactéria tem grande capacidade. Factores ecológicos, como a co-existência de diferentes estirpes no mesmo nicho, propiciam a recombinação genética, cuja eficácia é, contudo, difícil de quantificar. Sendo aleatória a inserção de novas sequências no genoma, a evolução não será sempre no sentido de uma melhor adaptação, ou não será compreensível que uma bactéria, que tem como reservatório único a nasofaringe humana, evolua no sentido de aumentar a sua virulência. Será a infecção fágica verdadeiramente responsável pela virulência da espécie?

A tendência decrescente da incidência da DM que se observou em Portugal entre 2002 e 2010 não é necessariamente definitiva. Atente-se o seguinte: de acordo com a literatura de referência, a maioria das estirpes invasivas pertencem a um número limitado de complexos clonais (tipos de MLST ou ST), o que sugere uma forte clonalidade da população bacteriana associada a doença invasiva (Feil *et al.*, 2001). Maynard Smith sugere que a população de meningococos é composta por duas partes: Uma população base livremente recombinante constituída por inúmeros e diferentes genótipos; e uma população clonal recentemente emergida e bem sucedida sob o ponto de vista ecológico (Figura 92) (Smith *et al.*, 1993). A capacidade de colonizar e invadir a corrente sanguínea deste último tipo de estirpes é o factor bacteriano determinante da epidemiologia da doença meningocócica.

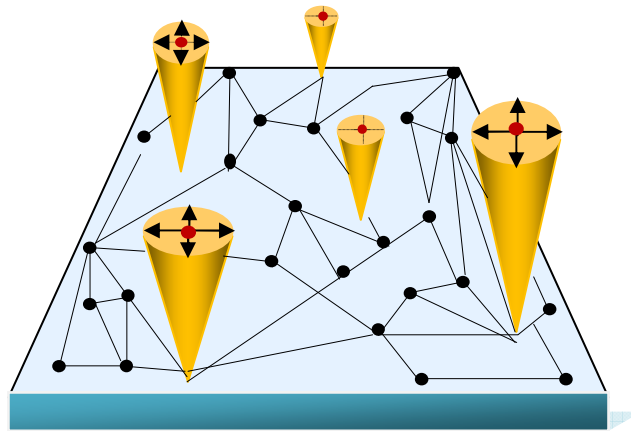


Figura 92 - Representação esquemática das duas subpopulações de *Neisseria meningitidis*: a população base, constituída por muitos e diferentes genótipos (círculos negros) e a população clonal (cones invertidos) que se sobrepõe à população base, com origem em alguns genótipos bem adaptados (círculos vermelhos) e que se diversificam dando origem a complexos clonais (assinalados por setas). Adaptado de Smith *et al.*, 1993

A história da DM e a sua epidemiologia mostra que, em cada década, se tem observado o aparecimento de, pelo menos, um conjunto clonal de estirpes com capacidade para se dispersar entre indivíduos e para invadir a corrente sanguínea. Na ausência de medidas de controlo, essas estirpes têm sido responsáveis por graves epidemias que, ao longo do tempo, se dispersaram por várias regiões do globo. É, portanto, previsível a emergência de novos genótipos com origem clonal que venham a causar ondas epidémicas em populações não imunizadas. A manterem-se altos os títulos de anticorpos na população vacinada com MenC (Blanchard-Rohner *et al.*, 2008) e a protecção de grupo observada em países onde tem sido feita a monitorização do efeito da vacina conjugada Men C (Maiden *et al.*, 2002 b); Ramsay *et al.*, 2003), as estirpes emergentes com polissacáridos capsulares do grupo C não virão a tornar-se endémicas ou epidémicas em Portugal. Estirpes emergentes com polissacáridos não C irão tornar-se endémicas e infectar a população infantil mais vulnerável ou, à semelhança do que aconteceu com meningococos do grupo C dos complexos clonais ST-8 e ST-11, se as estirpes emergentes possuírem factores de virulência particulares, irão ser responsáveis por epidemias.

2. Estudos futuros

1 - A influência da gripe e de outras infecções respiratórias de etiologia viral na incidência da DM não foi considerada no desenvolvimento do modelo, por não estar disponível informação que permitisse quantificar esta variável.

A introdução no mercado de kit de diagnóstico baseado na metodologia de PCR multiplex, com a possibilidade de detecção simultânea de 15 vírus respiratórios (nos quais se incluem os vírus da gripe), vem possibilitar estudos alargados de infecção respiratória. Decorrem já no Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge alguns estudos complementares da infecção gripal e perspectivam-se outros dirigidos particularmente à população pediátrica, na comunidade e em ambiente hospitalar. Será então possível estudar a influência que as infecções respiratórias virais têm na dinâmica da infecção invasiva meningocócica.

2 - Tendo ficado demonstrado que o modelo é sensível ao número de portadores (ponto 5.1 do capítulo V) e à capacidade de transmissão/infecção das estirpes de colonização, uma mais precisa quantificação das variáveis “Portadores de estirpes não C HV com factor de invasão x ” e “Portadores de estirpes não C não HV” irá melhorar a capacidade preditiva do modelo. É portanto vantajoso que seja realizado a curto prazo um estudo de portadores assintomáticos na população portuguesa, que possibilite saber não só a taxa de portadores em cada grupo etário, mas também o genótipo das estirpes de colonização. O conhecimento sobre a população bacteriana de colonização e a dinâmica da sua transmissão constitui informação de referência indispensável para correctamente se poder monitorizar ao longo do tempo os efeitos de uma vacina conjugada MenB que se pensa vir a ser introduzida no mercado proximamente. Face à evolução da incidência de doença meningocócica por serogrupos não C e não B, um estudo de portadores poderá também fundamentar políticas de controlo, nomeadamente a utilização de vacinas monovalentes ou tetravalentes em grupos etários específicos.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

Abdillahi H, Poolman JT. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. FEMS Microbiology Letters. 1987 Dec; 48(3): 367-371.

Agudelo IC, Sanabria OM, Ovalle MV. Serogroup Y meningococcal disease, Colombia. Emerg Infect Dis. 2008 Jun;14(6):990-991.

Aguilera, J. F., A. Perrocheau, C. Meffre, and S. Hahne. Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. Emerg Infect Dis. 2002 Aug;8(8):761-767.

Alcalá B, Arreaza L, Salcedo C, Uria MJ, De la Fuente L, Vazquez LA. Capsule switching among C:2b:P1.2,5 meningococcal epidemic strains after mass immunization campaign, Spain. Emerg Infect Dis. 2002 Dec;8(12):1512-1514.

Alonso, JN. La vacunacion frente a la enfermedad meningocócica. Situación actual. Rev Esp Salud Pública. 2001:25-33.

Álvarez Y, Caicoya M, Garcia R, González-Busto B. A system Dynamics model for analysing population risk in case of a voluntary vaccination program against meningococcal meningitis. Proceedings of the 16th International Conference of the System Dynamics Society; 1998 Jul 20-23; Quebec, Canadá.

Andrade HR. Gripe em Portugal 2003/2004 - Relatório Anual. Centro Nacional da Gripe; 2004. Disponível em: http://www.onsa.pt/conteu/est_gripe-pt_onsa.pdf.

Anónimo. Control of epidemic meningococcal disease. In: WHO practical guidelines. 2nd edition World Health Organization; 1998. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/meningitis/whoemcbac983.pdf>.

Antignac A, Ducos-Galand M, Guiyoule A, Pirès R, Alonso JM, Taha MK. *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive infections in France (1999-2002): phenotypes and antibiotic susceptibility patterns. Clin Infect Dis. 2003 Oct; 37(7):912-920.

Atchman M, Morelli G. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Pollard AJ & Maiden MCJ, editors. Meningococcal disease methods and protocols. Totowa, New Jersey: Human Press; 2001. p.147-154.

Baethgen LF, Weidlich L, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Cafrune PI, Lemos AP, Rios SS, Abreu MF, Kmetzsch C, Sperb AF, Riley LW, Rossetti ML, Zaha A. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. Trop Med Int Health. 2008 Jan;13(1):31-40.

Barlas Y. Model Validation in System Dynamics. International System Dynamics Conference; 1994. Stirling, Scotland. Disponível em: http://www.systemdynamics.org/conferences/1994/proceed/papers_vol_1/barla002.pdf

Bennett JS, Callaghan MJ, Derrick JP, Maiden MCJ. Variation in the *Neisseria lactamica* porin, and its relationship to meningococcal PorB. Microbiology. 2008 May;154(Pt 5):1525-34.

Bhattacharjee AK, Jennings HJ, Kenny CP, Martin A, Smith IC. Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. J Biol Chem. 1975 Mar 10;250(5):1926-1932.

Bille E, Ure R, Gray SJ, Kaczmarek EB, McCarthy ND, Nassif X, Maiden MC, Tinsley CR. Association of a bacteriophage with meningococcal disease in young adults. PLoS One. 2008;3(12):e3885. Publicado *online* em 2008 Dec 9.

Bille E, Zahar JR, Perrin A, Morelle S, Kriz P, Jolley KA, Maiden MCJ, Dervin C, Nassif X, Tinsley CR. A chromosomally integrated bacteriophage in invasive meningococci. J Exp Med. 2005 Jun 20;201(12):1905-1913.

Billker O, Godert S, Meyer TF. Interactions of *Neisseria meningitidis* with the immune system. In: Ferreirós C, Criado MT, Vázquez J, editors. Emerging strategies in the Fight against meningitis molecular and cellular aspects. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press; 2002. p. 39-54.

Blanchard-Rohner G, Pollard A. Sustaining immunity after immunization against encapsulated bacteria. Hum Vaccin. 2008 Jul-Aug;4(4):309-312.

Block C, Davidson Y, Keller N. Unreliability of disc diffusion test for screening for reduced penicillin susceptibility in *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol. 1998 Oct;36(10):3103-3104.

Brandtzaeg, P; Bryn, K; Kierulf, P; Øvstebø, R; Namork, E; Aase, B; Jantzen, E. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. J Clin Investig. 1992;89:816–823.

Branham SE. Serologic relationships among meningococci. Bacteriol Rev. 1953 Sep; 17(3): 175–188.

Brehony C, Jolley KA, Maiden MCJ. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. FEMS Microbiol Rev. 2007;31:15–26.

Budroni S, Siena E, Dunning Hotopp JC, Seib KL, Serruto D, Nofroni C, Comanducci M, Riley DR, Daugherty SC, Angiuoli SV, Covacci A, Pizza M, Rappuoli R, Moxon ER, Tettelin H, Medini D. *Neisseria meningitidis* is structured in clades associated with restriction modification systems that modulate homologous recombination. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Mar 15;108(11):4494-9. Publicado *online* em 2011 Feb 28.

Campos J, Mendelman PM, Sako MU, Chaffin DO, Smith AL, Sáez-Nieto JA. Detection of relatively penicillin G-resistant *Neisseria meningitidis* by disk susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 1987 Oct;31(10):1478-1482.

Campos J, Trujillo G, Seuba T, Rodriguez A. Discriminative criteria for *Neisseria meningitidis* isolates that are moderately susceptible to penicillin and ampicillin. Antimicrob Agents Chemother. 1992 May;36(5):1028-1031.

Cartwright K. Microbiology and laboratory diagnosis. In: Ferreirós C, Criado MT, Vázquez J, editors. Emerging strategies in the Fight against meningitis molecular and cellular aspects. Wyomndham, UK: Horizon Scientific Press; 2002. p. 1-21.

Cartwright Keith. Historical Aspects. In Frosch M, Maiden M, editors. Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 1-11.

Caugant DA. Global trends in meningococcal disease. In: Pollard AJ & Maiden MCJ, editors. Meningococcal disease methods and protocols. Totowa, New Jersey: Human Press; 2001. p.273-292.

Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. APMIS. 1998 May;106(5):505-525.

Caugant DA, Høiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, Wedege E, Eng J, Frøholm LO. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. J Clin Microbiol. 1994 Feb;32(2):323-330.

Caugant DA (a), Bøvre K, Gaustad P, Bryn K, Holten E, Høiby EA, Frøholm LO. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. J Gen Microbiol. 1986 Mar;132(3):641-652.

Caugant DA (b), Frøholm LO, Bøvre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander RK (1986) Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. Proc Natl Acad Sci USA. 1986 Jul;83(13):4927-4931.

Chen A, Seifert HS. Interactions with Host Cells Causes *Neisseria meningitidis* Pili to Become Unglued. Front Microbiol. 2011;2:66. Publicado *online* em 2011 Apr 4.

Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter C. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases, 2010 Dec (10); 853-861.

Claus, H., Vogel, U., Muhlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R. & Frosch, M. (1997). Molecular divergence of the sia locus in different serogroups of *Neisseria meningitidis* expressing polysialic acid capsules. Mol Gen Genet. 1997 Dec;257(1):28-34.

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 Apr 15;191(8):1263-1271.

Coen PG, Tully J, Stuart JM, Ashby D, Viner RM, Booy R. Is it exposure to cigarette smoke or to smokers which increases the risk of meningococcal disease in teenagers? Int J Epidemiol. 2006 Apr;35(2):330-336.

Cope GF, Heatley RV. Cigarette smoking and intestinal defences. *Gut* 1992;33:721–723.

Cornelis GR. Contact with eukaryotic cells: a new signal triggering bacterial gene expression. *Trends Microbiol.* 1997 Feb;5(2):43-44.

Devoe IW, Gilchrist JE. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med.* 1973 Oct;138(5): 1156–1167.

Deghmane AE, Stéphanie Petit S, Andrzej Topilko A, Pereira Y, Giorgini D, Larribe M and Taha MK. Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J.* 2000 Mar;19(5):1068-1078.

Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden M. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2406-2413.

DGS e INSA. Doença meningocócica em Portugal 2000-2006. Relatório. Direcção Geral de Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Ministério da Saúde; 2007.

DGS. Campanha de vacinação contra a doença invasiva por *Neisseria meningitidis* do serogrupo C. Circular Normativa 09/DT de 22/12/05, Direcção Geral de Saúde, Ministério da Saúde; 2005a.

DGS. Programa Nacional de Vacinação 2006. Circular Normativa 08/DT de 21/12/2005, Direcção Geral de Saúde, Ministério da Saúde; 2005b.

DGS. Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença Meningocócica. Circular Normativa 13/DEP de 05-09-02. Direcção Geral da Saúde, Ministério da Saúde; 2002.

DGS. Meningites – Normas de procedimento. Direcção Geral da Saúde, Ministério da Saúde; 1995. Disponível em: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i005630.pdf>

Deuren M, Brandtzaeg P, and Meer JWM. Update on Meningococcal Disease with Emphasis on Pathogenesis and Clinical Management *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jan; 13(1): 144–166.

Dye JA and Adler K B. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax*. 1994 Aug; 49(8): 825–834.

ECDC. Annual epidemiological report on communicable disease in Europe. European Center for Disease Prevention and Control; 2010.

Edwards, U., Muller, A., Hammerschmidt, S., Gerardy-Schahn, R. & Frosch, M. Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol*. 1994 Oct;14(1):141-9.

EU-IBIS. Invasive *Neisseria meningitidis* in Europe 2006. European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network; 2007. Disponível em: http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/euibis/documents/2006_meningo.pdf.

EU-IBIS. Invasive *Neisseria meningitidis* and invasive Haemophilus influenza in Europe 2005. European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network; 2007. Disponível em: http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/euibis/documents/2005_meningo_hib.pdf

EU-IBIS. Invasive *Neisseria meningitidis* in Europe 2003-2004. European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network; 2006. Disponível em: http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/euibis/documents/20032004_meningo.pdf

EU-IBIS. Invasive *Neisseria meningitidis* in Europe 2002. European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network; 2003. Disponível em: http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/euibis/documents/2002_meningo.pdf

Euro Surveill. 2011 Jun 9;16(23). Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19885>

Evans JR, Artenstein MS, Hunter DH. Prevalence of meningococcal serogroups and description of three new groups. *Am J Epidemiol*. 1968 May;87(3):643-646.

Feavers IM, Pizza M. Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine*. 2009 Jun 24;27 Suppl 2:B42-50. Publicado *online* em 2009 May 28.

Feil EJ, Spratt BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:561-90.

Finne J, Leinonen M, Mäkelä PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*. 1983 Aug 13;2(8346):355-7.

Fischer M, Hedberg K, Cardosi P, Plikaytis BD, Hoesly FC, Steingart KR, Bell TA, Fleming DW, Wenger JD, Perkins BA. Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J*. 1997 Oct;16(10):979-83.

Flasche S, Van Hoek AJ, Sheasby E, Waight P, Andrews N, Sheppard C, George R, Miller E. 2011. Effect of pneumococcal conjugate vaccination on serotype-specific carriage and invasive disease in England: a cross-sectional study. *PLoS Med*. 2011 Apr;8(4). Publicado *online* em 2011 Abril 5.

Forrester J. *Industrial Dynamics*. Cambridge, Massachusetts: MIT Press; 1961.

Frasch C E, Zollinger W D, Poolman J T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis*. 1985;7:504–510.

Gagneux S, Wirth T, Hodgson A, Ehrhard I, Morelli G, Kriz P. Clonal groupings in serogroup X *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:462–466.

Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Aricò B, Savino S, Santini L, Brunelli B, Bambini S, Biolchi A, Capecchi B, Cartocci E, Ciucchi L, Marcello F, Ferlicca F, Galli B, Luzzi E, Masignani V, Serruto D, Veggi D, Contorni M, Morandi M, Bartalesi A,* Cinotti V, Mannucci D, Titta F, Ovidi E, Welsch JA, Granoff D, Rappuoli R, e Pizza M. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jul 18; 103(29): 10834–10839.

Goldschneider I (a), Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*. 1969; 129(6):1307-1326.

Goldschneider I (b), Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus II. Development of natural immunity. *J Exp Med*. 1969; 129(6):1327-1348.

Gorry AR, Oakhill J. *Neisseria meningitidis*: multiple mechanisms to acquire iron. In: Ferreirós C, Criado MT, Vázquez J, editors. *Emerging strategies in the Fight against meningitis molecular and cellular aspects*. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press; 2002. p. 119-134.

Gotschlich EC; Goldschneider I; Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med.* 1969;129(6):1367–1384.

Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis.* 1980 Dec;142(6):923-933.

Guiomar R, Nunes B. A gripe em Portugal nas épocas 2008/2009 e 2009/2010. Relatório do Programa Nacional de Vigilância da Gripe. Direcção Geral da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Ministério da Saúde; 2010.

Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Dec;26(3-4):189-195.

Hannon B, Ruth M. Modeling dynamic biological systems. New York: Springer; 1997.

Harrison LH. The Epidemiology of Meningococcal Disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 2010 March 1; 50(S2): S37-44.

Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine.* 2009 Jun 24;27 (2):B51-63.

Hedberg ST, Törös B, Fredlund H, Olcén P, Mölling P. Genetic characterization of the emerging invasive *Neisseria meningitidis* serogroup Y in Sweden, 2000 to 2010.

Henrichsen, J. 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1995 Oct;33(10):2759-2762.

Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, Jackson D, Thomas A, Beall B, Lynfield R, Reingold A, Farley MM, Whitney CG. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1346-1354.

Hitchcock PJ. Unified nomenclature for pathogenic *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev.* 1989 April; 2: S64–S65.

Hoare S, El-Shazali O, Clark JE, Fay A, Cant AJ. Investigation for complement deficiency following meningococcal disease. *Arch Dis Child*. 2002 Mar;86(3):215–217.

Horton RE, 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 Oct;133(5):883-889.

Huang SS, Hinrichsen VL, Stevenson AE, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Pelton SI, Lipsitch M, Hanage WP, Lee GM, Finkelstein JA. Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics*. 2009 Jul;124(1):e1-11.

Johan Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J and Rosenqvist E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2009 Jun 24;27 Suppl 2:B3-12. Publicado *online* em 2009 May 28.

Jolley KA, Brehony C, Maiden MCJ. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev*. 2007 Jan; 31(1):89-96.

Jones GR, Christodoulides M, Brooks JL, Miller AR, Cartwright KA, Heckels JE. Dynamics of carriage of *Neisseria meningitidis* in a group of military recruits: subtype stability and specificity of the immune response following colonization. *J Infect Dis*. 1998 Aug;178(2):451-9.

Jordens JZ, Williams JN, Jones GR, Christodoulides M, Heckels JE. Development of immunity to serogroup B meningococci during carriage of *Neisseria meningitidis* in a cohort of university students. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6503-10.

Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, Farley MM, Jorgensen JH, Lexau CA, Petit S, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Whitney CG, Harrison LH. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med*. 2009 Jan 15;360(3):244-56.

Infotabac, 2009. Avaliação Intercalar do Impacte da Nova Legislação de Prevenção do Tabagismo (Lei 37/2007, de 14 de Agosto). Avaliação Intercalar do Impacte da Nova Legislação de Prevenção do Tabagismo (Lei 37/2007, de 14 de Agosto).

INE. Destaque. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2009. Instituto Nacional de Estatística; 2010.

INE. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2008. Instituto Nacional de Estatística; 2009.

INE. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2007. Instituto Nacional de Estatística; 2008.

INE. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2006. Instituto Nacional de Estatística; 2007.

INE. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2005. Instituto Nacional de Estatística; 2006.

INE. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2004. Instituto Nacional de Estatística; 2005.

INE. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2003. Instituto Nacional de Estatística; 2004.

INE. Estimativas provisórias da população portuguesa, Portugal, NUTS II, NUTS II e municípios 2001-2002. Instituto Nacional de Estatística; 2003.

Källström H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol.* 1997 Aug;25(4):639-647.

Kasper, D. L., J. L. Winkelhake, W. D. Zollinger, B. L. Brandt, and M. S. Artenstein. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7:K1(L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol.* 1973 Jan;110(1):262-268.

Kertesz DA, Coulthart MB, Ryan JA, Johnson WM, Ashton FE. Serogroup B, electrophoretic type 15 *Neisseria meningitidis* in Canada. *J Infect Dis.* 1998 Jun;177(6):1754-1757.

Kriz P, Bobak M, Kriz B. Parental smoking, socioeconomic factors, and risk of invasive meningococcal disease in children: a population based case-control study. *Arch Dis Child.* 2000 Aug;83(2):117-121.

Kriz P, Giorgini D, Musilek M, Larribe M, Taha MK. Microevolution through DNA exchange among strains of *Neisseria meningitidis* isolated during an outbreak in the Czech Republic. *Res Microbiol.* 1999 May;150(4):273-280.

Krizova P, Musilek M. Changing epidemiology of meningococcal invasive disease in the Czech republic caused by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2(P1.5), ET-15/37. Cent Eur J Public Health. 1995 Nov;3(4):189-194.

Lapeyssonnie L. La meningite cérébro-spinale en Afrique. Bull. W.H.O. 1963; 28(suppl.1):3-114.

Law DK, Lorange M, Ringuette L, Dion R, Giguère M, Henderson AM, Stoltz J, Zollinger WD, De Wals P, Tsang RS. Invasive meningococcal disease in Quebec, Canada, due to an emerging clone of ST-269 serogroup B meningococci with serotype antigen 17 and serosubtype antigen P1.19 (B:17:P1.19). J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):2743-2749.

Leischow SJ e Milstein B. Systems Thinking and Modeling for Public Health Practice. Am J Public Health. 2006 Mar;96(3):403-5. Publicado on line em 2006 Jan 31.

Leischow SJ, Best A, William M, Trochim WM, Clark PI, Gallagher RS, Marcus SE, Matthews E. Systems Thinking to Improve the Public's Health. Am J Prev Med 2008;35(2S) 196-203.

Linz B, Schenker M, Zhu P, Achtman M. Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol. 2000 Jun;36(5):1049-1058.

Lipsitch M. Bacterial Vaccines and Serotype Replacement: Lessons from *Haemophilus influenzae* and Prospects for *Streptococcus pneumoniae*. Emerg Infect Dis. 1999 May-Jun;5(3):336-345.

Lystad, A. e Aasen S. The epidemiology of meningococcal disease in Norway 1975-91. NIPH Ann. 1991 Dec;14(2):57-66.

Maiden MCJ (a). Population structure of *Neisseria meningitidis*. In: Ferreirós C, Criado MT, Vázquez J, editors. Emerging strategies in the Fight against meningitis molecular and cellular aspects. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press; 2002. p. 151-169.

Maiden MCJ (b), Stuart JM, on behalf of the UK Meningococcal Carriage Group. Carriage of serogroup C meningococci one year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. Lancet 2002;359:1829-1830.

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(6):3140-3145.

Maiden MCJ, Suker J, McKenna AJ, Bygraves JA, Feavers IM. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 1991 Mar; 5(3): 727-736.

Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2006 Jan;24 (1):7-19.

Materu S, Cox HS, Isaakidis P, Baruani B, Ogaro T, Caugant DA. Serogroup X in meningococcal disease, Western Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jun;13(6):944-945.

Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, Schmink SE, Noble CA, Tondella ML, Whitney AM, Al-Mazrou Y, Al-Jefri M, Mishkhis A, Sabban S, Caugant DA, Lingappa J, Rosenstein NE, Popovic T. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis*. 2002 Jun 1;185(11):1596-1605.

Merz AJ, So M, Sheetz MP. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*. 2000 Sep 7;407(6800):98-102.

Molling P, Jacobsson S, Backman A and Olcén P. Direct and Rapid Identification and Genogrouping of Meningococci and porA Amplification by LightCycler PCR. *J. Clin. Microb.* 2002 40.12:p 4531-4535.

Moxon ER, Jansen VA. Phage variation: understanding the behavior of an accidental pathogen. *Trends Microbiol.* 2005 Dec;13(12):563-565.

Nassif X, So M. Interaction of pathogenic neisseriae with nonphagocytic cells. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Jul;8(3):376–388.

Nelson JD. Jails, microbes, and the three-foot barrier. *N. Engl. J. Med.* N Engl J Med. 1996 Sep 19;335(12):885-886.

Nicolas P, Cavallo JD, Fabre R, Martet G. Standardization of the *Neisseria meningitidis* antibiogram. Detection of strains relatively resistant to penicillin. Bull World Health Organ. 1998;76(4):393-400.

Paul M. Held L, Toschke AM. Multivariable modeling of infectious disease surveillance data. 2008. Stat Med. 2008 Dec 20;27(29):6250-6267.

Plaut AG, Gilbert JV, Artenstein MS, Capra JD. *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* : extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. Science. 1975 Dec 12;190(4219):1103-1105.

Poolman JT, Feron C, Dequesne G, Denoel PA, Dessoy S, Goraj KK, Janssens DE, Kummert S, Lobet Y, Mertens E, Monnom DY, Momin P, Pépin N, Ruelle JL, Thonnard JJ, Verlant VG, Voet P e Berthet FX. Outer membrane vesicles and other options for a meningococcal B vaccine. In: Ferreirós C, Criado MT, Vázquez J, editors. Emerging strategies in the Fight against meningitis molecular and cellular aspects. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press; 2002. p. 135-149.

Public Health Agency of Canada. Enhanced surveillance of invasive meningococcal disease in Canada: 1 January, 2002 - 31 December, 2003. Can Commun Dis Rep. 2006 Apr 15;32(8):97-107.

Peltola H. Meningococcal disease: still with us. Rev Infect Dis. 1983 Jan-Feb;5(1):71-91.

Queirós L, Castro L, Ferreira M A, Gonçalves G. Adesão às Novas Vacinas Conjugadas. Vacina antimeningocócica e antipneumocócica. Acta Médica Portuguesa. 2004;17:49-53.

Queiroz L, Vieira M, Feutoso A. Cobertura pela vacina pneumocócica conjugada heptavalente nas coortes de nascimento de 2001 a 2005 na região Norte. Relatório da avaliação realizada em Junho 2007. ARSN, I.P.- Departamento de Saúde Pública; 2007. Disponível em:

http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Conte%C3%BAdos/Sa%C3%BAde%20P%C3%BAblica%20Conteudos/Relatorio_2008_Vacina_Prevenir.pdf

Rouaud P, Perrocheau A, Taha MK, Sesboué C, Forgues AM, Parent du Châtelet I, Levy-Bruhl D. Prolonged outbreak of B meningococcal disease in the Seine-Maritime department, France, January 2003 to June 2005. Euro Surveill. 2006 Jul;11(7):178-181.

Ramsay ME, Andrews NJ, Trotter CL, Kaczmarski EB, Miller E. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. *BMJ*. 2003 Feb 15;326(7385):365-366.

Ramsay ME, N. Andrews, E.B. Kaczmarski and E. Miller. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet*. 2001 Jan 20;357(9251):195-196.

Riordan FA e Pollard AJ. Clinical studies. In: Pollard AJ & Maiden MCJ, editors. *Meningococcal disease methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Human Press; 2001. p.375-410.

Ritchie-Dunham JL, Galván JFM. Evaluating epidemic intervention policies with systems thinking: A case study of dengue fever in Mexico. *Syst. Dyn. Rev.* 1999 Aug;15(2):119-138.

Robinson K, Neal KR, Howard C, Stockton J, Atkinson K, Scarth E, Moran J, Robins A, Todd I, Kaczmarski E, Gray S, Muscat I, Slack R, Ala'Aldeen DA. Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by meningococcal carriage. *Infect Immun.* 2002 Mar;70(3):1301-1309.

Rodrigues F, Nunes S, Sá-Leão R, Gonçalves G, Lemos L, de Lencastre H. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in children attending day-care centers in the central region of Portugal, in the era of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Microb Drug Resist.* 2009 Dec;15(4):269-277.

Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML, Danila R, Cieslak P, Shutt KA, Popovic T, Schuchat A, Harrison LH, Reingold AL. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):1894-901.

Rouaud P, Perrocheau A, Taha MK, Sesboué S, Forgues A, Parent du Châtelet I, Levy-Bruhl D. Prolonged outbreak of B meningococcal disease in the Seine-Maritime department, France, January 2003 to June 2005. *Euro Surveill.* 2006 Jul;11(7):178-181.

Rubach MP, Bender JM, Mottice S, Hanson K, Weng HYC, Korgenski K, Daly JA, Pavia AT. Increasing Incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, Utah, USA. *Emerg. Inf. Dis.* 2011 Sep;9(17):1645-1650.

Russell JE, Jolley KA, Feavers IM, Maiden MCJ e Suker J. PorA Variable Regions of *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis*. 2004 Apr;10(4):674-8.

Schwartz B, Moore PS, Broome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev*. 1989 April;2: S118–S124.

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 1984 May;37(1):67-75.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 1986 May;51(5):873-884.

Simões MJ, Cunha M, Almeida F, Furtado C, Brum L. Molecular surveillance of *Neisseria meningitidis* capsular switching in Portugal, 2002-2006. *Epidemiol Infect*. 2009 Feb;137(2):161-5. Epub 2008 Jul 31.

Smith MJ, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 May 15;90(10):4384-4388.

Sørensen HT, Møller-Petersen J, Krarup HB, Pedersen H, Hansen H, Hamburger H. Diagnostic problems with meningococcal disease in general practice. *J Clin Epidemiol*. 1992 Nov;45(11):1289-1293.

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

Stanwell-Smith RE, Stuart JM, Hughes AO, Robinson P, Griffin MB, Cartwright K.. 1994. Smoking, the environment and meningococcal disease: a case control study. *Epidemiol Infect*. Apr;112(2):315-28.

Stefanelli P, Fazio C, Neri A, Sofia T, Mastrantonio P. First report of capsule replacement among electrophoretic type 37 *Neisseria meningitidis* strains in Italy. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5783-5786.

Stefanelli P, Fazio C, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M, Mastrantonio P. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease: detection of point mutations in the *rpoB* gene and molecular characterization of the strains. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Feb;47(2):219-222.

Stephen J. Gray, Caroline L. Trotter, Mary E. Ramsay, Malcolm Guiver, Andrew J. Fox, Raymond Borrow, Richard H. Mallard and Edward B. Kaczmarski. Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit. *J Med Microbiol.* 2006 Jul;55(Pt 7):887-896.

Stephens DS. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Jan;31(1):3-14.

Stephens DS, Whitney AM, Melly MA, Hoffman LH, Farley MM, Frasch CE. Analysis of damage to human ciliated nasopharyngeal epithelium by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 1986 Feb;51(2):579-585.

Sterman JD. *Business Dynamics: Systems Thinking and Modeling for a Complex World.* McGraw-Hill Higher Education; 2000.

Stuart JM, Cartwright KA, Dawson JA, Rickard J, Noah ND. Risk factors for meningococcal disease: a case control study in south west England. *Community Med.* 1988 May;10(2):139-146.

Sultan B, Labadi K, Guégan JF, Janicot S. Climate drives the meningitis epidemics onset in West Africa. *PLoS Med.* 2005 Jan;2(1):43-49. Publicado *online* em 2005 Jan 25.

Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Jan 7;94(1):271-276.

Taha MK, Zarantonelli ML, Neri A, Enriquez R, Vázquez JA, Stefanelli P. Interlaboratory comparison of PCR-based methods for detection of penicillin G susceptibility in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Mar;50(3):887-92.

Taha MK, Deghmane AE. Informative talk between *Neisseria meningitidis* and Host Cells. In: Ferreirós C, Criado MT, Vázquez J, editors. *Emerging strategies in the Fight against meningitis molecular and cellular aspects.* Wymondham, UK: Horizon Scientific Press; 2002. p. 39-54.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Murray BE. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by bacterial strains typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-2239.

Tinsley C, Nassif X. Meningococcal pathogenesis: at the boundary between the pre- and post-genomic eras. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Feb;4(1):47-52.

Tinsley CR, Bille E, Nassif X. Bacteriophages and pathogenicity: more than just providing a toxin? *Microbes Infect.* 2006 Apr;8(5):1365-71.

Tofte RW, Peterson PK, Kim Y, Quie PG. Opsonic Activity of Normal Human Cerebrospinal Fluid for Selected Bacterial Species. *Infect Immun.* 1979 Dec;26(3): 1093-1098.

Trotter C, Maiden M. Meningococcal vaccines and herd immunity: lessons learned from serogroup C conjugate vaccination programs. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(7):851-861.

Trotter C, Ramsay M. Vaccination against meningococcal disease in Europe: review and recommendations for the use of conjugate vaccines. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Jan; 31(1):101-107.

Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 1981 Apr;146(1):69-78.

Tsang R. Capsule switching and capsule replacement in vaccine-preventable bacterial diseases. *Lancet Infect Dis.* 2007 Sep;7(9):569–570.

Tsang RS, Henderson AM, Cameron ML, Tyler SD, Tyson S, Law DK, Stoltz J, Zollinger WD. 2007. Genetic and antigenic analysis of invasive serogroup Y *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1999 to 2003 in Canada. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):1753-1758.

Tzanakaki G, Urwin R, Musilek M, Kriz P, Kremastinou J, Pangalis A, Blackwell CC, Maiden MCJ. Phenotypic and Genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. *J Clin Microbiol* 2001 Apr; 39(4):1235-1240.

Van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect Immun.* 1991 Sep;59(9):2963-71.

Van Looveren M, Vandamme P, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Carion F, Caugant DA, Goossens H. Molecular epidemiology of recent Belgian isolates of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Clin Microbiol.* 1998 Oct;36(10):2828-2834.

Vestrheim DF, Gaustad P, Aaberge IS, Caugant DA. Pherotypes of pneumococcal strains co-existing in healthy children. *Infect Genet Evol.* 2011 Oct;11(7):1703-1708.

Vidarsson G, Overbeeke N, Stemerding AM, van den Dobbelen G, van Ulsen P, van der Ley P, Kilian M, van de Winkel JG. Working mechanism of immunoglobulin A1 (IgA1) protease: cleavage of IgA1 antibody to *Neisseria meningitidis* PorA requires de novo synthesis of IgA1 Protease. *Infect Immun.* 2005 Oct;73(10):6721-6726.

Vitovski S, Read RC, Sayers JR. Invasive isolates of *Neisseria meningitidis* possess enhanced immunoglobulin A1 protease activity compared to colonizing strains. *FASEB J.* 1999 Feb;13(2):331-337

Wang JF, Caugant DA, Morelli G, Koumaré B, Achtman M. Antigenic and epidemiologic properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis.* 1993 Jun;167(6):1320-1329.

Welsch JA, Moe GR, Rossi R, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Granoff DM. Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity. *J Infect Dis.* 2003 Dec 1;188(11):1730-1740.

Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, Kremastinou J, Kalmusova J, Musilek M, Alvestad T, Jolley KA, Wilson DJ, McCarthy ND, Caugant DA, Maiden MCJ. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):5146-5153.

Yusuf HR, Rochat RW, Baughman WS, Gargiullo PM, Perkins BA, Brantley MD, Stephens DS. Maternal cigarette smoking and invasive meningococcal disease: a cohort study among young children in metropolitan Atlanta, 1989-1996. *Am J Public Health.* 1999 May;89(5):712-717.

Zollinger WD, Mandrell RE. Outer-membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of a solid-phase radioimmunoassay. *Infect Immun.* 1997 Nov;18(2):424-433.

Anexos

