

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE**  
**IMUNOBIOLOGICOS**

**Avaliação da participação de cada antígeno vacinal na resposta bactericida induzida pela vacina meningocócica B em camundongos.**

**CAMILA LORDELLO XAVIER**

Rio de Janeiro  
2015

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE**  
**IMUNOBIOLOGICOS**

**CAMILA LORDELLO XAVIER**

**Avaliação da participação de cada antígeno vacinal na resposta  
bactericida induzida pela vacina meningocócica B em  
camundongos.**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Tecnologia em Imunobiológicos como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Tecnologia de  
Imunobiológicos.

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Seção de Gestão de Documentos e Arquivos / SIGDA  
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ

X3

Xavier, Camila Lordello.

Avaliação da participação de cada antígeno vacinal na resposta bactericida induzida pela vacina meningocócica B em camundongos. / Camila Lordello Xavier. – Rio de Janeiro, 2015.  
xiv, 62 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2015.

Bibliografia: f. 52-60

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Vacina meningocócica sorogrupo B. 3. Ensaio bactericida do soro. 4. Vesícula de membrana externa. 5. Lipooligossacarídeo. I. Título.

CDD 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologia Bacteriana, sob a orientação da Dra. Ellen Jessouroun.



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**CAMILA LORDELLO XAVIER**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CADA ANTÍGENO VACINAL  
NA RESPOSTA BACTERICIDA INDUZIDA PELA VACINA  
MENINGOCÓCICA B EM CAMUNDONGOS.**

Orientadora: Dra. Ellen Jessouroun

Dissertação aprovada em 27/07/2015

Examinadores:

Dra. Ivna Alana FB da Silveira  
Fiocruz/ Presidente

Dra. Lucia Martins Teixeira  
UFRJ

Dr. José Mauro Peralta  
UFRJ

**RIO DE JANEIRO**  
**2015**  
**MPTI**

*À minha família: Felipe, Davi,  
Elizabeth e Wilson, minha  
eterna gratidão. Obrigada por  
estarem sempre ao meu lado.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, alfa e ômega, princípio e fim, por ter me ensinado que não há limites que sejam impossíveis de serem superados.

À Fiocruz e ao Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos Bio-Manguinhos, por toda a estrutura fornecida para realização deste trabalho e pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional através do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos.

À Dra. Ellen Jessouroun, pela cuidadosa orientação, pelos ricos momentos de discussão científica e pelo exemplo de dedicação que contribuíram para o meu aprimoramento pessoal e para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Bacteriana (LATEB), que tornaram possível a realização de toda a parte experimental. Em especial aos amigos Deborah Macedo, Fernanda Otaviano, Iaralice Medeiros, Jorge Augusto da Costa.

À Verônica Nascimento Oliveira, amiga que aprendi a admirar e que foi o meu braço direito durante esta dissertação. “Velônica”, obrigada por tudo!

À equipe do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), que além de ter cedido o espaço físico para realização deste trabalho, estava sempre disponível para ajudar no que fosse necessário.

À equipe do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN), pela execução dos experimentos com animais.

Ao Professor Dr. Sérgio Alves da Silva, do INCQS, pela colaboração com as análises estatísticas.

Aos colegas do mestrado por me ensinarem, no convívio com as diferenças de cada um, a importância da colaboração na vida acadêmica e do trabalho em equipe. Em especial Alexandre Murad, André Vinicius Ribeiro, Christina Cerqueira, Jéssica Yukie, Mayra Moura, Monique Collaço, Natalia Pedra, Priscila Martins, Robson Cruz e Vivian Pereira.

Ao meu esposo Felipe Maia, que sempre me incentivou a prosseguir durante os meus momentos de incertezas, medos e inseguranças.

Ao meu amado filho Davi Maia, que, com sua inocência, esteve sempre interessado neste trabalho e serviu como inspiração primordial em muitos momentos.

À minha mãe, Elizabeth Lordello, exemplo de mulher e de profissional, cujo esforço contínuo me ajudou a chegar até aqui.

À minha família e a todos os meus amigos, por compreenderem os meus momentos de ausência e colaborarem, mesmo que indiretamente, para a concretização deste trabalho.

*“O essencial é invisível aos olhos”*

Antoine de Saint-Exupéry



## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS E QUADROS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MENINGITE .....	1
1.2. DOENÇA MENINGOCÓCICA .....	2
1.3. <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> .....	4
1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA .....	6
1.5. RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	9
1.6. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA .....	11
1.6.1. No Mundo.....	11
1.6.2. No Brasil.....	13
1.7. VACINAS MENINGOCÓCICAS .....	14
1.7.1. Vacinas polissacarídicas .....	15
1.7.2. Vacinas conjugadas .....	15
1.8. VACINAS MENINGOCÓCICAS PARA O SOROGRUPO B .....	16
1.8.1. Vacinas de VME.....	17
1.8.2. Vacinas recombinantes .....	18
1.9. ANTICORPOS BACTERICIDAS E ANTÍGENOS ALVOS .....	18
1.10. DESENVOLVIMENTO DA VACINA MENINGOCÓCICA B EM BIO-MANGUINHOS .....	20
2. OBJETIVOS .....	22
2.1. OBJETIVO GERAL .....	22
2.1.1. Objetivos específicos .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. MICRORGANISMO .....	23
3.2. SOLUÇÕES.....	23
3.2.1. Solução de Greaves .....	23
3.2.2. Solução de Hanks .....	23
3.3. PREPARO DAS CULTURAS ESTOQUES .....	24
3.3.1. Lote semente-mãe.....	24
3.3.2. Lote trabalho.....	25
3.4. PREPARO DAS VACINAS EXPERIMENTAIS .....	25
3.4.1. Obtenção das Vesículas de Membrana Externa .....	25
3.4.2. Obtenção do dLOS .....	26
3.4.3. Formulação das vacinas experimentais .....	27

3.5.	IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS .....	27
3.6.	ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA .....	28
3.6.1.	Inativação da bactéria .....	28
3.6.2.	Fonte de complemento .....	28
3.6.3.	Ensaio bactericida do soro .....	29
3.7.	ENSAIO BACTERICIDA COMPETITIVO COM OS ANTÍGENOS VACINAIS .....	29
3.7.1.	Padronização do ensaio para VME N603/95.....	30
3.7.2.	Padronização do ensaio para VME N44/89.....	30
3.7.3.	Padronização do ensaio para dLOS .....	30
3.7.4.	Combinação de antígenos.....	31
3.7.5.	Ensaio Bactericida Competitivo .....	31
3.8.	TESTE DE PIROGÊNIOS .....	31
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1.	RESULTADOS DE ATIVIDADE BACTERICIDA EM SOROS DE ANIMAIS QUE RECEBERAM AS DIFERENTES FORMULAÇÕES TESTE.....	34
4.1.1.	Obtenção da fonte de complemento .....	34
4.1.2.	Avaliação do ensaio bactericida do soro .....	36
4.2.	RESULTADOS DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO SORO DOS ANIMMAIS IMUNIZADOS APÓS INIBIÇÃO COMPETITIVA COM DIFERENTES COMPONENTES VACINAIS.....	41
4.2.1.	Padronização do ensaio de soroneutralização .....	41
4.2.2.	Avaliação do ensaio bactericida competitivo .....	44
4.3.	AVALIAÇÃO DO TESTE DE PIROGÊNIOS EM COELHOS.....	48
5.	CONCLUSÃO.....	50
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
7.	ANEXOS.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - por cento

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

°C – Grau Celsius

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{m}$  – Micrometro

$\mu\text{M}$  – Micromolar

**ABS** – Anticorpos bactericidas do soro

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico, do inglês, “Deoxyribonucleic acid”

**AMH** – ágar Müeller Hilton

**BHE** - Barreira Hematoencefálica

**CDC** - Instituto americano responsável pelo controle de doenças, do inglês “Centers for Disease Control and Prevention”

**CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais

**dLOS** – LOS detoxificado

**DM** – Doença Meningocócica

**D.O.** – Densidade Óptica

**EBS** – Ensaio Bactericida do Soro

**EDDHA** - Ácido etileno-di-amino-di-hidroxi fenil

**fHbp** – Proteína ligante do fator H

**g** - grama

**GSK** – Glaxo SmithKline

**HA** – Hidróxido de alumínio

**Hib** – *Haemophilus influenzae* tipo b

**kDa** – Kilodalton

**KDO** – Ácido 2-ceto-3deoxi-D-mano-octulosônico

**L** - Litro

**LOS** - Lipooligolissacarídeo

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**M** – Molar

**MAC** – Complexo de Ataque a Membrana, do inglês “Membrane Attack Complex”

**mL** – Mililitro

**mM** – Milimolar

**N**- Normal

**nm** – Nanômetro

**NIPH** - Instituto Norueguês de Saúde Pública, do inglês “Norwegian Institute of Public Health”

**PME** – Proteínas de Membrana Externa

**rpm** – Rotações por minuto

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TLR** – Receptor do tipo Toll, do inglês “Toll Like Receptor”

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$ , do inglês “Tumor Necrosis Factor”

**UI** – Unidade Internacional

**VME** – Vesícula de membrana externa

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1: Membrana celular do meningococos, adaptada de Sadarangani & Pollard (2010).....	5
Figura 1-2: LOS de <i>N. meningitidis</i> , adaptado de Raetz & Whitfield (2002). .....	9
Figura 1-3: Distribuição dos principais sorogrupos meningocócicos por região. Em destaque encontra-se a região conhecida como cinturão da meningite, adaptado de Harrison et al. (2009) e Hedari et al. (2014).....	12
Figura 1-4: Número de casos confirmados de doença meningocócica, no período de 1990 a 2014, no Brasil (Sinan 2015a).....	14
Figura 1-5: Incidência de doença meningocócica por ano segundo o sorogrupo, no período de 2009 a 2014, no Brasil (Sinan 2015b).....	14
Figura 4-1: Mediana dos títulos bactericidas para a cepa N603/95, obtidos a partir de camundongos imunizados com as seis vacinas experimentais, nos tempos T0 (pré-imunização), T15 (antes da segunda dose), T30 (antes da terceira dose) e T45 (15 dias após a terceira dose). .....	37
Figura 4-2: Mediana dos títulos bactericidas para a cepa N44/89, obtidos a partir de camundongos imunizados com as seis vacinas experimentais, nos tempos T0 (pré-imunização), T15 (antes da segunda dose), T30 (antes da terceira dose) e T45 (15 dias após a terceira dose). .....	38
Figura 4-3: Relação entre a redução no título obtido no ensaio bactericida e a concentração de antígeno VME de N603/95 utilizado para a soroneutralização. A seta indica a concentração de VME de N603/95 escolhida para uso no ensaio bactericida competitivo. A soroneutralização com a bactéria inativada, com $D.O_{600nm} = 1,0$ , foi capaz de levar a uma redução total dos títulos bactericidas.....	42
Figura 4-4: Relação entre a redução no título obtido no ensaio bactericida e a concentração de antígeno VME de N44/89 utilizado para a soroneutralização. A seta indica a concentração de VME de N44/89 escolhida para uso no ensaio bactericida competitivo. A soroneutralização com a bactéria inativada, com $D.O_{600nm} = 1,0$ , foi capaz de levar a uma redução total dos títulos bactericidas.....	43
Figura 4-5: Relação entre a redução no título obtido no ensaio bactericida e a concentração de antígeno dLOS. Em laranja, observa-se a variação do título bactericida com diferentes concentrações de dLOS, frente à cepa alvo N603/95. Em azul, observa-se esta variação frente à cepa alvo N44/89. A soroneutralização com a bactéria inativada, com $D.O_{600nm} = 1,0$ , foi capaz de levar a uma redução total dos títulos bactericidas. ....	43

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1-1: Principais agentes etiológicos das meningites (Ministério da Saúde 2009). .....	1
Quadro 3-1: Reagentes que compõem a solução de Hanks.....	24
Quadro 3-2: Vacinas formuladas para o estudo. ....	27
Quadro 3-3: Vacinas meningocócicas B e as variações nas concentrações de seus componentes.....	32
Tabela 4-1: Comparação, frente as cepas vacinais N44/89 e N603/95, dos títulos bactericidas obtidos, para duas amostras controle, utilizando as fontes de complemento com e sem a etapa de soroneutralização.....	35
Tabela 4-2: Mediana dos títulos bactericidas obtidos para os grupos do estudo, nos tempos T0, T15, T30 e T45, para as duas cepas vacinais, N44/89 e N603/95. ....	40
Tabela 4-3: Mediana dos títulos bactericidas para a cepa N44/89, obtida a partir do soro dos camundongos imunizados com as seis diferentes formulações testadas, antes e após soroneutralização com os antígenos vacinais. ....	45
Tabela 4-4: Mediana do título bactericida para a cepa N603/89, obtida a partir do soro dos camundongos imunizados com as seis diferentes formulações testadas, antes e após soroneutralização com os antígenos vacinais.....	47
Tabela 4-5: Temperatura individual de cada coelho, submetido ao teste de pirogênios, a fim de avaliar a pirogenicidade dos componentes presentes nas três formulações de vacina testadas. ....	49

## RESUMO

O principal agente causador da meningite bacteriana é a *Neisseria meningitidis*. Seis sorogrupos (A, B, C, W-135, X e Y) são responsáveis por 95% dos casos de doença meningocócica invasiva, uma doença que apresenta grande variação epidemiológica de acordo com a área geográfica e ao longo do tempo. Os anticorpos desempenham papel central na proteção desta doença, devido a capacidade lítica dos mesmos através da fixação do complemento. Bio-Manguinhos está envolvido no desenvolvimento da vacina brasileira contra o meningococo B, composta de vesículas de membrana externa (VME) das duas cepas de maior prevalência e LOS detoxificado (dLOS). Neste momento, é importante compreender melhor a participação de cada um dos antígenos vacinais na resposta induzida pela vacina meningocócica B brasileira. Portanto, o presente trabalho tem o objetivo de determinar o papel de cada antígeno vacinal na indução da resposta bactericida em camundongos, a fim de discutir uma potencial otimização da vacina teste. Para isso, camundongos suíços foram divididos em seis grupos, onde cada grupo recebeu uma das seguintes formulações em hidróxido de alumínio: vacina meningocócica B, vacina meningocócica B combinada à vacina meningocócica C conjugada produzida em Bio-Manguinhos, vacina de VME de N44/89, vacina de VME de N603/95, vacina de VME de N603/95 combinada a VME de N44/89 e vacina de dLOS. Os anticorpos obtidos a partir do soro dos camundongos foram submetidos a um ensaio bactericida convencional e a um ensaio bactericida competitivo. Além disso, novas formulações com diferentes proporções e concentrações de antígenos foram submetidas ao teste de pirogênios. No ensaio bactericida convencional, realizado para as duas cepas vacinais, N44/89 e N603/95, todas as preparações testadas induziram soroconversão em título bactericida  $\geq 4$  vezes em relação aos valores dos soros pré-ímmunes, exceto no grupo que recebeu o dLOS separadamente, que não apresentou resposta protetora. A combinação da vacina meningocócica B à vacina meningocócica C conjugada não interferiu na resposta imunológica induzida para a vacina B, o que possibilita o uso futuro das duas vacinas combinadas. Foi observada reatividade cruzada entre as cepas vacinais, induzida por algum componente presente nas VMEs. Os dados obtidos no ensaio bactericida competitivo sugerem que o LOS residual, presente nas VMEs, parece desempenhar um papel na reatividade cruzada. Este ensaio ainda permitiu verificar que as VMEs e o LOS contribuem para a indução de anticorpos bactericidas protetores, e essa atuação parece ocorrer de forma sinérgica. Em geral, os títulos bactericidas obtidos para N44/89 foram maiores que os obtidos para N603/95. Essa indução preferencial de anticorpos para a N44/89 foi confirmada no ensaio de soroneutralização, onde foi necessária a utilização de pelo menos três vezes a concentração de proteínas de VME dessa cepa em relação à concentração usada para N603/95. Esses resultados indicam a importância de avaliar diferentes concentrações e proporções dos antígenos na vacina. Como qualquer mudança nas suas concentrações precisa ser avaliada antes de um possível uso em humanos, formulações com diferentes proporções e concentrações de antígenos foram submetidas ao teste de pirogênios. Os resultados deste teste indicam que existe a perspectiva de avaliar a imunogenicidade das novas vacinas testes, contendo diferentes proporções dos antígenos.

## ABSTRACT

*Neisseria meningitidis* is the main causative agent of bacterial meningitis. Six serogroups (A, B, C, W-135, X e Y) are responsible by 95% of invasive meningococcal disease cases, that has a large epidemiologic variation according to the geographic area and along time. Antibodies plays a central role in protection of this disease, due to their lytic capacity through the complement fixation. Bio-Manguinhos is involved in the development of Brazilian vaccine against meningococcus B, formulated with outer membrane vesicles (OMV) of the two most prevalent strains and detoxified LOS (dLOS). At this point, better understand the participation of each vaccine antigen in induced response by Brazilian meningococcal B vaccine is important. Therefore, this study aims to determine the role of each vaccine antigen in inducing of a bactericidal response in mice, in order to discuss a potential optimization of test vaccine. For this, Swiss mice were divided into six groups and each one received one of the following formulations in aluminum hydroxide: meningococcal B vaccine, meningococcal B vaccine combined with meningococcal C conjugate vaccine, produced in Bio-Manguinhos, VME N44/89 vaccine, VME N603/95 vaccine, VME N603/95 combined with VME N44/89 vaccine and dLOS vaccine. Antibodies obtained from the serum of mice were submitted to a conventional bactericidal assay and a competitive bactericidal assay. Additionally, new formulations with different proportions and concentrations of antigens were submitted to pyrogen test. In the conventional bactericidal assay, conducted for the two vaccine strains, N44/89 and N603/95, all formulations tested induced seroconversion in bactericidal title  $\geq 4$  times compared to the values of pre-immune sera, except in the group that received only dLOS, that not had protective response. The combination of meningococcal B vaccine with meningococcal C conjugate vaccine didn't change the immune response induced by B vaccine, allowing the future use of this combined vaccines. Cross-reactivity was observed between vaccine strains, induced by some VME component. Data obtained in competitive bactericidal assay suggests that VME residual LOS seems to play a role in cross-reactivity. This assay has shown that VMEs and LOS contribute for the induction of protective bactericidal antibodies, and this interaction seems to be synergic. In general, bactericidal titles obtained for N44/89 were higher than that obtained for N603/95. This preferential induction of antibodies for N44/89 was confirmed for seroneutralization assay, in which the concentration of N44/89 VME proteins was three times higher when compared to the concentration used to N603/95. These results indicate the importance of evaluating different concentrations and ratios of the antigens vaccine. Since any change in its concentration needs to be evaluated before a possible use in humans, formulations with different proportions and concentration antigens were tested for pyrogenic content. The results of this test indicate that there is a prospect to evaluate the immunogenicity of new test vaccines, containing different proportions of antigens.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. MENINGITE

A meningite é uma doença provocada pela inflamação das meninges, que são as membranas protetoras que envolvem o encéfalo e a medula espinhal (Secretaria de Saúde de São Paulo 2012). A inflamação pode se desenvolver devido a inúmeras causas, estando geralmente associada a bactérias ou vírus, mas podendo ser causada por uma lesão física, câncer ou até por certas drogas (Quadro 1.1). De acordo com o tempo de apresentação da doença, a mesma pode ser classificada em aguda, subaguda ou crônica. A meningite aguda geralmente se apresenta dentro de horas ou dias sendo frequentemente infecciosa, enquanto a meningite crônica tem, por definição, a duração de mais de quatro semanas. O CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA), que é o instituto americano responsável pelo controle de doenças, classifica as meningites em cinco tipos, de acordo com o agente causal: viral, bacteriana, fúngica, parasitária e não infecciosa (CDC 2013).

**Quadro 1-1:** Principais agentes etiológicos das meningites infecciosas (Ministério da Saúde 2009).

Bactérias	Vírus	Outros
<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp</i> <i>Enterobacter sp</i> <i>Salmonella sp</i> <i>Proteus sp</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Leptospira sp</i>	<b>Vírus RNA</b> Enterovírus Vírus do Sarampo Vírus da Caxumba Arenavírus – Coriomeningite linfocitária HIV 1  <b>Vírus DNA</b> Adenovírus Vírus do grupo Herpes Varicela Zoster Epstein Barr Citomegalovírus	<b>Fungos</b> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>  <b>Protozoários</b> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Plasmodium sp</i>  <b>Helmintos</b> Infecção larvária da <i>Taenia solium</i> <i>Cysticercus cellulosae</i> (Cisticercose)

Embora a meningite possa se originar a partir de agentes etiológicos diversos, a maioria dos casos é provocada por vírus ou bactérias. A meningite bacteriana é a principal causa de infecção do sistema nervoso central (SNC) com altas taxas de mortalidade e morbidade, que varia de acordo com a idade, localização geográfica e o organismo causador. A mortalidade da

meningite bacteriana, não tratada, se aproxima de 100%. A meningite clássica de crianças e adultos geralmente se inicia com febre, calafrios, vômitos, fotofobia e dor de cabeça severa. Em alguns casos, convulsão é o primeiro sinal da doença e pode ocorrer durante toda a progressão da mesma. Irritabilidade, delírio, sonolência, letargia e coma são sintomas também observados. A constatação física mais consistente em crianças e adultos é a presença de rigidez da nuca, associada aos sinais de Kernig e de Brudzinski (Sáez-Llorens & McCracken 2003). Sequelas físicas e neurológicas, incluindo amputação de membros, surdez e deficiência na fala, são relativamente comuns nos pacientes que sobrevivem à meningite (Borg et al. 2009). As características clínicas da meningite bacteriana em bebês e crianças podem ser sutis, variáveis, não específicas ou até ausentes.

Para que a meningite bacteriana se desenvolva, os agentes patogênicos precisam atravessar a mucosa do trato respiratório, serem capazes de se multiplicar e sobreviver na corrente sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Esta barreira protege o SNC da maioria das bactérias que chegam à corrente sanguínea, o que restringe a etiologia da meningite bacteriana a poucos patógenos (Van De Beek *et al.* 2006). Dentre estes, o principal agente causador de meningite bacteriana em bebês, crianças, adolescentes e adultos jovens é a *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*).

## 1.2. DOENÇA MENINGOCÓCICA

A doença causada pela bactéria *N. meningitidis* recebe o nome de doença meningocócica (DM) e foi primeiramente descrita em 1805 por Vieusseux, após um surto ocorrido na Suíça (Vieusseux M. (1805) *apud* Pollard 2004; CDC 2013). A colonização da mucosa das vias respiratórias superiores por *N. meningitidis* é o primeiro passo para que um indivíduo se torne portador ou desenvolva a DM invasiva (Stephens et al. 2007). Embora a DM tenha manifestações clínicas variáveis, as principais são a meningite e a septicemia.

Com a espécie humana como única hospedeira, a transmissão do meningococo ocorre geralmente através de aerossol e secreções respiratórias de portadores assintomáticos ou indivíduos doentes apresentando sintomas do trato respiratório superior (Chang et al. 2012). Após o contágio com *N. meningitidis*, a probabilidade de uma pessoa desenvolver DM diminui muito rapidamente com o tempo, de modo que se torna improvável sua manifestação, de 10 a 14 dias após a aquisição (Stephens 2009). A taxa de letalidade é de aproximadamente 5-10% e entre os sobreviventes, 12-20% sofrem sequelas clínicas significativas (Abio et al. 2013). O tratamento de escolha para a DM é a administração parenteral de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas (Chaudhuri et al. 2008).

A capacidade de adesão às superfícies mucosas é essencial para a sobrevivência do meningococo (Merz & So 2000). Os meningococos aderem à mucosa da nasofaringe, nas microvilosidades presentes na superfície das células colunares não ciliadas, onde se multiplicam e colonizam o epitélio (Rosenstein et al. 2001). Este contato inicial com células epiteliais da nasofaringe é mediado pelo pili de tipo IV. Outras adesinas também terão papel fundamental durante o processo de adesão, como por exemplo, Opa e Opc que atuam facilitando a adesão e invasão de células epiteliais e endoteliais (Hill et al. 2010).

Após a adesão à célula epitelial do hospedeiro, ocorre a formação de placas corticais e a extensão de pseudópodos, que vão englobar o microrganismo (Doulet et al. 2006). Os meningococos são capazes de se replicar intracelularmente e isso é possível, em parte, devido à sua capacidade de aquisição de ferro por meio de um sistema de transporte especializado. Este patógeno, no meio intracelular, reside no interior de um vacúolo e dentro de 18 a 40 horas é capaz de se translocar através de camadas epiteliais (Stephens 2009). Na corrente sanguínea, o meningococo produz uma forte resposta inflamatória e ativa as cascatas do complemento e de coagulação (Hill et al. 2010). Quando alcança a corrente sanguínea, pode ser responsável por choque séptico mortal, levando a púrpura fulminante, ou ainda atravessar a BHE e invadir as meninges (Coureuil et al. 2012).

Acredita-se que a bacteremia favoreça a invasão das meninges, já que aumenta a possibilidade de interação entre as bactérias e os componentes da BHE. Quando um número de bactérias circulantes na corrente sanguínea é baixo ou moderado, a meningite é a manifestação clínica proeminente da doença. Neste caso, as bactérias interagem com os vasos sanguíneos das extremidades do corpo causando apenas poucas lesões purpúricas localizadas, enquanto que a interação com células endoteliais do cérebro é suficiente para levar a invasão das meninges (Coureuil et al. 2013). O meningococo pode penetrar nas meninges através de transcitose, da ruptura das junções intercelulares entre as células endoteliais induzidas pelo Pili ou ainda por uma via alternativa que envolve lesão endotelial por efeitos citopáticos mediados pela endotoxina (Hill et al. 2010).

Quando há uma alta bacteremia, entretanto, as células endoteliais periféricas são extremamente colonizadas pelos meningococos, levando a um aumento significativo da permeabilidade vascular, geralmente associada com trombose e petéquias. Neste caso, as bactérias também invadem as meninges, mas a apresentação clínica da doença é um choque séptico associado com lesões purpúricas, ou seja, púrpura intensa. Esta infecção é fulminante, já que o óbito em alguns casos ocorre em menos de 24 horas, com sintomas iniciais inespecíficos (febre e dores musculares) e de difícil diagnóstico antes do início de uma erupção maculopopular, petequiral ou purpúrica (Coureuil et al. 2013).

Devido ao potencial de contágio e disseminação da epidemia, início rápido, alta letalidade e sequelas neurológicas da DM, um único caso deve levar a uma resposta de saúde pública imediata, sendo a doença de notificação compulsória.

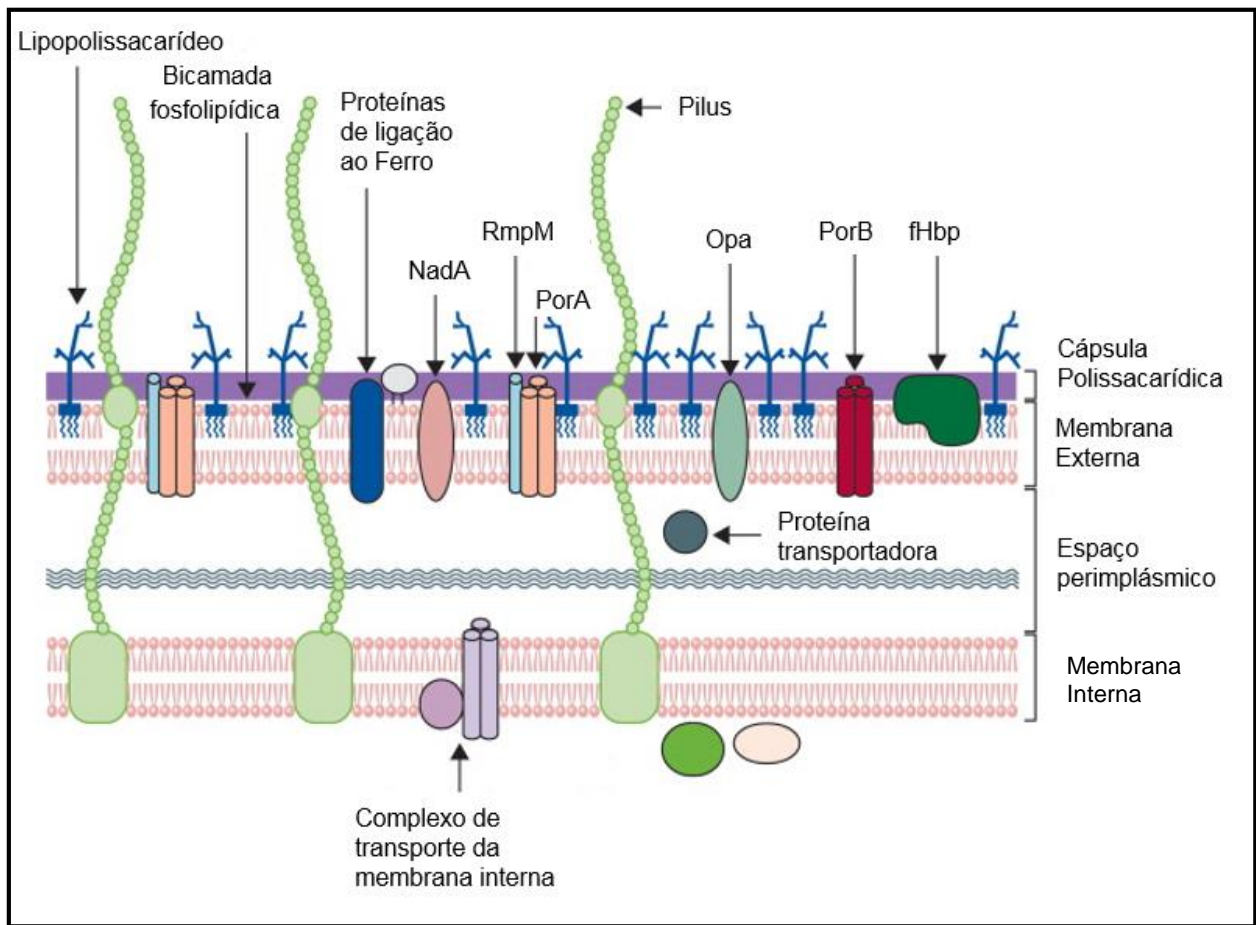
As crianças têm um risco maior de desenvolver a DM, embora já tenha sido demonstrado que crianças com menos de seis meses de idade possuem uma proteção contra a doença, provavelmente devido à persistência de anticorpos maternos. A maior incidência, portanto, é em crianças de seis a 24 meses de idade, com um declínio constante na incidência com a idade até a adolescência, quando pode ocorrer um pequeno pico secundário (Morley & Pollard 2001).

### 1.3. *NEISSERIA MENINGITIDIS*

A bactéria *N. meningitidis*, também conhecida como meningococo, é um  $\beta$ -Proteobacterium, pertence à família Neisseriaceae. Ela é um diplococo Gram negativo, aeróbio, sem motilidade, catalase e oxidase positivas, com capacidade de fermentar glicose e maltose (Lewis & Ram 2014). O meningococo foi descrito em 1884, por Marchiafava e Celli, como um micrococo intracelular oval e isolado em 1887 no líquido céfalo-raquidiano por Anton Weichselbaum (Marchiafava E. (1884) *apud* Stephens 2009; Weichselbaum A. (1887) *apud* Stephens 2009).

O meningococo possui as membranas celular externa e interna, separadas por uma parede de peptidoglicano. Como se pode observar na figura 1.1, a membrana externa é rodeada por uma cápsula polissacarídica, que é ou um homopolímero ou um heteropolímero constituído de monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo como unidades de repetição (Rosenstein et al. 2001). A bactéria pode ser estruturalmente encapsulada ou não encapsulada. A cápsula confere proteção contra agressões ambientais e geralmente bactérias encapsuladas estão envolvidas em situações epidêmicas (Hill et al. 2010). A membrana externa contém numerosas proteínas que atuam como estruturas de transporte, adesão e também permitem o equilíbrio do ambiente intracelular. Embora apresentem diferentes funções, elas são conhecidas como proteínas de membrana externa (PME). Dentre as PME, destacam-se as principais porinas (PorA e Por B), que servem como um canal através do qual pequenos nutrientes são difundidos para o interior da célula (Pollard & Frasch 2001). As proteínas de membrana externa em conjunto com o polissacarídeo capsular formam os principais antígenos de superfície do microrganismo. Esta membrana contém ainda lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina que está envolvida na patogênese da DM. No Gênero *Neisseria* o LPS é descrito como lipooligossacarídeo (LOS) devido à falta do antígeno O. Observam-se também algumas lipoproteínas, funcionalmente

importantes, frouxamente presas à superfície externa da membrana externa (Morley & Pollard 2001).



**Figura 1-1:** Membrana celular do meningococo, adaptada de Sadarangani & Pollard (2010).

Os meningococos são classificados por grupagem sorológica, com base na composição química do polissacarídeo capsular. Já foram relatados 12 sorogrupos de *N. meningitidis*, dentre os quais cinco sorogrupos (A, B, C, W-135 e Y) são os principais responsáveis pelos casos de DM invasiva (Harrison et al. 2013; Lewis & Ram 2014). Recentemente, um novo sorogrupo, denominado X, foi identificado como uma ameaça epidêmica emergente, principalmente na África (Chang et al. 2012). A classificação em sorotipo, sorosubtipo e imunotipo é baseada no fenótipo de PorB, PorA e na estrutura do LOS, respectivamente. Esta classificação é importante, pois auxilia a nomenclatura de *N. meningitidis*, que é composta por sorogrupo, seguida do sorotipo, sorosubtipo e imunotipo, separados entre si por dois pontos (:), como por exemplo, B:15:P1.7,16:L3,7,9 (Harrison et al. 2009).

Embora o habitat natural mais comum da *N. meningitidis* seja o epitélio posterior da nasofaringe, existem relatos de sua presença na mucosa bucal, reto, uretra, trato urogenital e na placa dentária (Stephens 2009). Esta bactéria é transmitida de pessoa para pessoa através de

contato direto. Estima-se que, globalmente, de 10-35% dos adultos saudáveis sejam portadores de *N. meningitidis* na nasofaringe e apenas uma proporção muito pequena de infecções resultem em bacteremia (Cartwright et al. 1987; Orr et al. 2003). Vários fatores contribuem para que a DM ocorra. Dentre estes, fatores ambientais, fatores de virulência e a falta de uma resposta imunológica protetora são os principais.

#### 1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA

Os principais constituintes bacterianos que contribuem para a DM são: polissacarídeo capsular, o aparato genômico envolvido na mudança da cápsula, proteínas de membrana externa (Pili, porinas, moléculas de adesão Opc, mecanismo de sequestro de ferro) e LOS.

O polissacarídeo capsular desempenha um papel crucial na DM invasiva. A cápsula confere propriedades antifagocíticas, pois permite que o meningococo escape da morte mediada pelo complemento, contribuindo para a sobrevivência deste na corrente sanguínea ou no SNC, além de atuar como uma barreira protetora contra a dessecação durante a disseminação aérea entre diferentes hospedeiros (Rosenstein et al. 2001; Lewis & Stephens 2009; Ram 2014). Os sorogrupos B e C tem a cápsula composta por homopolímeros de ácido siálico, em ligação  $\alpha$  2 $\rightarrow$ 8 e  $\alpha$  2 $\rightarrow$ 9, respectivamente, enquanto nos sorogrupos Y e W-135 há a alternância entre dissacarídeos de ácido siálico e D-glicose ou D-galactose, respectivamente (Claus et al. 2004; Liu et al. 1971a). A cápsula do sorogrupo A é constituída por N-acetil-manosamina-1-fosfato em ligação  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 6 enquanto o sorogrupo X expressa N-acetil-D-glicosamina-1-fosfato em ligação  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4 (Bundle et al. 1974; Liu et al. 1971b). Além disso, os polissacarídeos A, C, W e Y podem ou não serem O-acetilados (Lewis e Ram 2014). Portanto, com exceção das cápsulas dos sorogrupos A e X, os polissacarídeos capsulares possuem ácido siálico, também conhecido como ácido N-acetilneuramínico, na sua composição. Este composto inibe a ativação do complemento nas células hospedeiras, o que previne a ocorrência da lise mediada pelo complemento. Além disso, resíduos deste ácido, estruturalmente idêntico à cápsula do sorogrupo B, também compõem uma molécula de adesão neural, um componente humano crucial para o funcionamento do SNC e do sistema nervoso periférico (Hill et al. 2010). Esta característica torna a cápsula do sorogrupo B não imunogênica e com potencial de geração de anticorpos autoimunes.

A *N. meningitidis* é conhecida pelas altas taxas de transformação do DNA e consequentemente pela capacidade de sofrer recombinação, levando a geração de uma diversidade antigênica considerável. Um mecanismo importante que permite que o meningococo escape da resposta imunológica do hospedeiro, direcionada para uma cepa específica, é a mudança de estruturas antigênicas, realizada através de transferência gênica

horizontal e transformação (Swartley et al. 1997). Essa mudança pode envolver o polissacarídeo capsular ou algumas proteínas de membrana externa, entretanto é descrita com maior frequência para a cápsula e para as proteínas PorA e PorB (Beddek et al. 2009).

A proteína ligante do fator H (fHbp), uma lipoproteína de 28kDa exposta na superfície da célula, é expressa por todas as cepas de meningococos e é capaz de induzir anticorpos com atividade bactericida. O fator H é recrutado pela fHbp e isso permite que a *N. meningitidis* escape de forma eficaz às respostas imunológicas do hospedeiro, impedindo a lise mediada pelo complemento (Coureuil et al. 2013).

As porinas de *Neisseria*, embora não sejam consideradas adesinas, interagem com várias células e proteínas humanas. O meningococo expressa duas porinas distintas: PorA (proteína de classe 1) e PorB (proteína de classe 2/3). PorA é expressa em todas as cepas de meningococos enquanto a PorB é expressa como uma das duas formas exclusivas: PorB2 ou PorB3 (Hill et al. 2010). PorA e PorB atuam no processo de polimerização de actina, por isso, durante a infecção, podem estar envolvidas na reorganização do citoesqueleto celular do hospedeiro, necessária para a captação de bactérias (Nassif et al. 1999). As porinas podem atuar através do Receptor do tipo Toll 2 (TLR-2) como um adjuvante que leva a estimulação de células B. PorB parece também ter um efeito anti-apoptótico em células epiteliais (Massari et al. 2002). As porinas, portanto, parecem desempenhar vários papéis, entre eles o de auxiliar os meningococos na colonização e na sobrevivência no sangue.

Os pili são considerados fatores de adesão primários utilizados pela maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Eles desempenham um papel importante mantendo a aderência às células endoteliais em condições de fluxo elevadas, como sob a tensão de cisalhamento na qual as células são submetidas na corrente sanguínea. O pilus meningocócico possui aproximadamente 6 nm de diâmetro e pertence à família de pili tipo IV, cujos membros passam por rápida extensão e retração e, desta forma, contribuem para uma motilidade das bactérias (Hill et al. 2010). Em bactérias encapsuladas, pili tipo IV são os principais fatores bacterianos capazes de promover a adesão. Eles promovem a interação inicial do diplococo com as células endoteliais e, em seguida, promovem interações bactéria-bactéria que levam à sua proliferação na superfície apical das células. A formação da placa apical é acompanhada do estímulo à polimerização de actina, formando estruturas semelhantes à microvilosidades na superfície apical das células endoteliais que protegem o meningococo da tensão de cisalhamento e causam a retração da junção entre as células endoteliais, comprometendo assim a integridade local (Coureuil et al. 2013). Além destas funções, eles também desempenham um importante papel em facilitar a absorção de DNA (ácido desoxirribonucleico) exógeno pelas células bacterianas (Proft e Baker 2009).

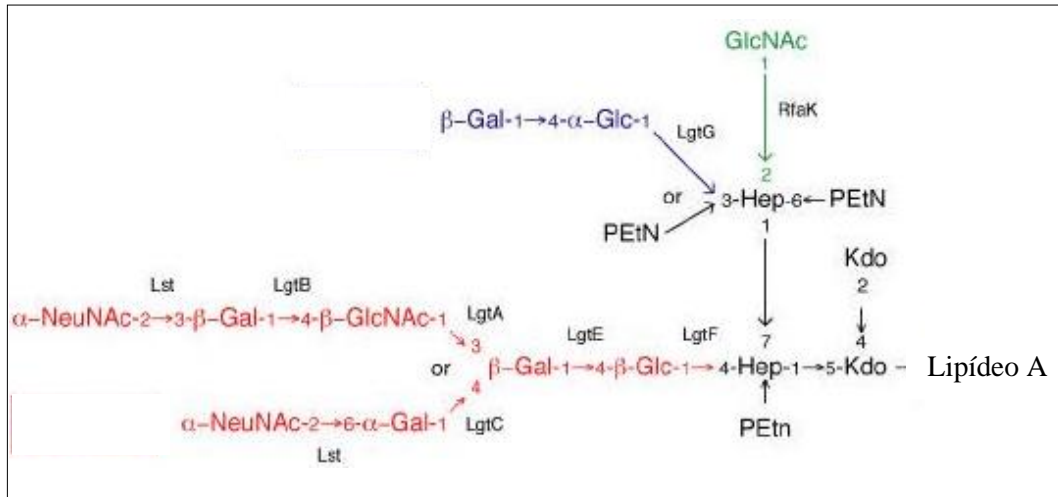
Entre as proteínas de membrana externa, *N. meningitidis* expressa as proteínas Opa e Opc, com peso molecular aproximado de 27 e 31 kDa, respectivamente, também conhecidas como proteínas de classe 5. Estas proteínas parecem estar relacionadas aos fenômenos de adesão e invasão de células endoteliais humanas. Outra proteína, que recebe o nome de NadA, interage com células epiteliais humanas através de interações proteína-proteína. Ela parece contribuir para a virulência bacteriana, uma vez que é expressa por aproximadamente 50% dos isolados de doença e em apenas 5% das cepas isoladas de indivíduos saudáveis (Hill et al. 2010). Cepas virulentas de *N. meningitidis* expressam ainda duas outras proteínas, App e NhhA. App atua na etapa de adesão da bactéria às células epiteliais enquanto NhhA auxilia na etapa de colonização e propagação bacteriana (Serruto et al. 2003; Sjölander et al. 2008).

O ferro é um fator essencial à multiplicação bacteriana no hospedeiro e ao fenômeno de colonização. Os meningococos possuem sistemas de captação de ferro, semelhantes ao de queilação de ferro, que são fundamentais para obtenção do ferro férrico (3+) necessário *in vivo* (Coureuil et al. 2013).

O componente bacteriano fundamental em causar sepse meningocócica é a endotoxina (figura 1.2), que é uma forte indutora de respostas inflamatórias celulares (Rosenstein et al. 2001). Além disso, o LOS desempenha um importante papel na estabilidade da membrana, sendo o principal componente na membrana externa de bactérias Gram negativas (Lewis e Ram 2014). De forma geral, a estrutura do LOS compreende um núcleo oligossacarídeo que consiste em uma diheptose e um N-acetil glucosamina ligados ao lipídio A, através de um ou dois KDOs (ácido 2-ceto-3deoxi-D-mano-octulosônico) (Stephens 2009). Durante a infecção, o LOS se liga a TLR-4 e induz a secreção de várias citocinas, incluindo interleucina 6 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), bem como quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, dentro dos vasos sanguíneos (He et al. 2009). A secreção destas substâncias induz danos endoteliais e derrame capilar, conduzindo a necrose de tecidos periféricos e falência múltipla de órgãos. A porção do lipídio A do LOS é o componente ativo responsável pela indução da resposta inflamatória associada à septicemia meningocócica e é, portanto, o responsável por grande parte da atividade biológica e da toxicidade da endotoxina meningocócica (Zughaier et al. 2004).

Outro importante fator de virulência do meningococo é a liberação de vesículas de membrana externa (VME) para o meio circulante, principalmente durante a fase exponencial de crescimento. Estas vesículas são evaginações de membrana externa que contêm LOS, PME, fosfolipídeo e fragmentos de cápsula polissacarídica (Morley e Pollard 2001). A endotoxina liberada em VMEs desempenha um importante papel nos eventos inflamatórios de meningococcemia (Rosenstein et al. 2001).





**Figura 1-2:** LOS de *N. meningitidis*, adaptado de Raetz & Whitfield (2002).

Dentre os fatores de risco ambientais conhecidos para a DM encontramos o tabagismo, local com aglomeração de pessoas, deficiência em vias do complemento, asplenia, viagem para locais endêmicos, deficiência na via das lectinas e infecções respiratórias prévias causadas por vírus e por micoplasma (Lewis e Ram 2014).

Embora vários fatores de virulência meningocócica tenham influência no curso da doença, a cápsula e o LOS são os principais responsáveis por driblar o sistema imunológico do hospedeiro, conferindo resistência à lise mediada pelo complemento e à fagocitose, e induzir resposta inflamatória desempenhando, portanto, papéis críticos na virulência.

### 1.5. RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Entre os principais mecanismos de defesa do hospedeiro necessários para a proteção contra a DM invasiva estão as células fagocitárias, o sistema complemento e os anticorpos.

Quando o meningococo entra na corrente sanguínea, ocorre a ativação do complemento e a liberação de citocinas, que desencadeiam uma resposta inflamatória. Existem três vias de ativação do complemento: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas. A via clássica é ativada pela interação antígeno-anticorpo, onde a proteína C1q se liga à porção Fc dos anticorpos e dá início à cascata proteolítica. A via alternativa é ativada por estruturas da superfície do microorganismo, como o LOS, que são reconhecidas por C3. Já a via das lectinas, é ativada quando a lectina ligante de manose ou de ficolina se liga a carboidratos na superfície do microorganismo. Todas essas vias resultam em clivagem do C3 em C3b pela C3 convertase e, conseqüentemente, a ativação de C5, que leva a formação de um complexo proteico, conhecido como complexo de ataque à membrana (MAC), na superfície bacteriana. Patógenos com C3b ligado à sua superfície são eliminados por fagocitose ou lise celular. A deficiência de

C3 está associada com uma maior suscetibilidade à DM. De forma análoga, indivíduos com deficiência nos componentes tardios do complemento (C5-C9) não conseguem formar o MAC e são mais suscetíveis a infecções meningocócicas (Lewis e Ram 2014).

Embora o sistema complemento seja considerado a primeira linha de defesa contra patógenos do sistema imunológico inato, outras funções têm sido atribuídas a ele, tais como a modulação da resposta imunológica adaptativa, a eliminação de complexos imunes e de células apoptóticas, a atuação no metabolismo de angiogênese, a regeneração de tecidos e a organogênese (Ricklin et al. 2010).

No início do século XX, Flexner e Jobling sugeriram que os anticorpos desempenhavam um papel na proteção contra a meningite meningocócica (Flexner e Jobling 1908). A importância da atividade lítica em sangue total como um mecanismo de resistência à infecção meningocócica foi observada em animais de laboratório e descrita em 1918 por Matsunami e Kolmer (Matsunami e Kolmer 1918a). Na mesma época esses autores descreveram que esta atividade lítica também ocorria em seres humanos, embora fosse menor em crianças do que em adultos (Matsunami e Kolmer 1918b). Alguns anos mais tarde Heist e colaboradores demonstraram que cepas de meningococo isolados da orofaringe também eram lisadas pelo sangue de alguns indivíduos adultos. Este foi um dos primeiros relatos que indicavam que características individuais presentes em alguns indivíduos levavam a uma proteção contra esta enfermidade (Solis-Cohen et al. 1922). Após isso, em 1969, Goldschneider e colaboradores publicaram o trabalho clássico sobre a importância da atividade bactericida de anticorpos e sua relação com a proteção contra a DM, que serviu como base para muitos estudos posteriores (Goldschneider et al. 1969a). Já foi demonstrado que a incidência de DM, durante os primeiros 12 anos de vida, é inversamente proporcional à prevalência de Anticorpos Bactericidas do Soro (ABS) (Goldschneider et al. 1969b). A importância da atividade bactericida do soro mediada pelo complemento é corroborada pela alta incidência de DM invasiva em pessoas com deficiência na via do complemento (Figuroa & Densen 1991; Figuroa et al. 1993). Embora a imunidade específica seja geralmente protetora, esta imunidade não é absoluta já que a meningococemia pode ocorrer em indivíduos que possuem previamente títulos de anticorpos considerados protetores (Stephens 2009).

Os fatores de risco ambientais associados à DM parecem aumentar a expressão de moléculas de adesão na nasofaringe e/ou alterar as citocinas locais, facilitando a entrada do microorganismo na corrente sanguínea. A opsonofagocitose também parece desempenhar um importante papel na proteção contra DM. Algumas cepas de *N. meningitidis* podem ser relativamente mais resistentes à opsonofagocitose que outras (Lewis e Ram 2014).

Como já citado, o LOS é o principal indutor da resposta pró-inflamatória, atuando através da ativação do TLR-4. Essa resposta em baixos níveis é considerada benéfica para o hospedeiro. No entanto, quando ocorre estimulação excessiva, a resposta pró-inflamatória pode ser prejudicial para o indivíduo, levando à sepse meningocócica (Coureuil et al. 2013). Os altos níveis de endotoxina em circulação durante a infecção meningocócica são resultado do grande número de bactérias no sangue e das VMEs que são eliminadas pelas bactérias. Apesar do LOS ser um sítio para ligação de C3b e C4b, a ativação do complemento parece ser independente da expressão de LOS. Já foi observada uma relação entre a gravidade da doença e a ativação do complemento, que pode estar associada à capacidade do complemento ativado liberar a endotoxina, que por sua vez exacerba a progressão da doença (Lewis e Ram 2014).

Apesar de vários fatores contribuírem para a suscetibilidade de um indivíduo à DM, a capacidade de um indivíduo montar uma resposta bactericida do soro contra a cepa infectante é, provavelmente, a variável mais importante em determinar o risco de infecção.

## **1.6. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA**

### **1.6.1. No Mundo**

A epidemiologia da DM é caracterizada pela sua natureza dinâmica e imprevisível, com taxas de incidência da doença e distribuição de sorogrupos sofrendo grande variabilidade regional (Yogev e Tan 2011). A DM tem ocorrência mundial e ocorre tanto de forma endêmica quanto epidêmica (CDC 2013). Ela pode afetar pessoas de todas as faixas etárias, mas as taxas mais elevadas de doença invasiva em países desenvolvidos são vistas em lactentes e crianças com menos de quatro anos de idade, adolescentes, recrutas militares e pessoas que convivem em locais de aglomeração, tais como estudantes universitários que vivem em dormitórios (Jafri et al. 2013). Estima-se que o meningococo infecte de 500.000 a 1,2 milhões de pessoas por ano no mundo, dentre as quais 50.000 a 135.000 terão o óbito como desfecho (Chang et al. 2012). Em geral, a mortalidade ocorre em até 10% dos pacientes com DM invasiva, mas chega até a 40% em casos de septicemia (Rosenstein et al. 2001; Stephens et al. 2007; Roupael e Stephens 2012).

A incidência global de infecção pelo sorogrupo B é estimada entre 20.000 e 80.000 casos por ano (Hedari et al. 2014). Dados epidemiológicos mostram que infecções meningocócicas provocadas pelo sorogrupo B continuam a representar um impacto significativo para a saúde humana (Abio et al. 2013). A faixa etária mais acometida pela DM B é a de crianças com menos de quatro anos de idade.

A DM na Europa é predominantemente causada pelo sorogrupo B (68%) e pelo sorogrupo C (12%). Na África são encontrados os sorogrupos A, C, W-135 e Y (European

Centre for Disease Prevention and Control 2015). Nas Américas há, em geral, o predomínio dos sorogrupos B e C. O sorogrupo W-135 provoca surtos em todo o mundo enquanto o sorogrupo Y é geralmente associado com doenças nos EUA e no Canadá, e aparece emergindo em muitos países da Europa (Figura 1.3) (Hill et al. 2010; Jafri et al. 2013; Bröker et al. 2014).



**Figura 1-3:** Distribuição dos principais sorogrupos meningocócicos por região. Em destaque encontra-se a região conhecida como cinturão da meningite, adaptado de Harrison et al. (2009) e Hedari et al. (2014).

Na Europa e nas Américas, a doença é principalmente endêmica, com taxas de incidência médias variando de menos de 0,5 a 8,9 casos por 100.000 da população total (Sáfadi e McIntosh 2011). Com a introdução de vacinas polissacarídicas conjugadas contra o meningococo sorogrupo C em boa parte da Europa, vem se observando um declínio substancial no número de casos de meningite causada pelo sorogrupo C (Garrido-Esteva et al. 2014; European Centre for Disease Prevention and Control 2015). Enquanto nos Estados Unidos, os sorogrupos B, C e Y causam aproximadamente um terço dos casos, na América Latina, a maior parte deles é causada pelos sorogrupos B e C, embora exista um aumento no registro de doença causada pelos sorogrupos W-135 e Y (Cohn et al. 2010; Racloz e Luiz 2010; Sáfadi e Cintra 2010).

Na África, o cinturão da meningite, região que se estende do Senegal até a Etiópia, registra as maiores taxas de incidência de doença no mundo, existindo uma sazonalidade da doença nesta região com epidemias recorrentes. No cinturão da meningite é possível observar a grande influência das condições climáticas no risco de doença, visto que, as epidemias começam durante a estação seca e terminam com o início da estação chuvosa (Greenwood

2006). O sorogrupo A era considerado o principal causador de doença epidêmica na África Subsaariana. Entretanto, com a introdução da vacina conjugada produzida na Índia, a MenAfriVac® em 2010, este cenário mudou e desde então, não ocorreram novas epidemias causadas por esse sorogrupo. A partir de 2000, sorogrupos como o W-135 e X têm emergido nesta região, causando epidemias frequentes (Koutangni et al. 2015). A incidência anual durante as epidemias com o sorogrupo A no cinturão da meningite chegava a exceder 1.000 casos por 100.000 habitantes (Harrison et al. 2009).

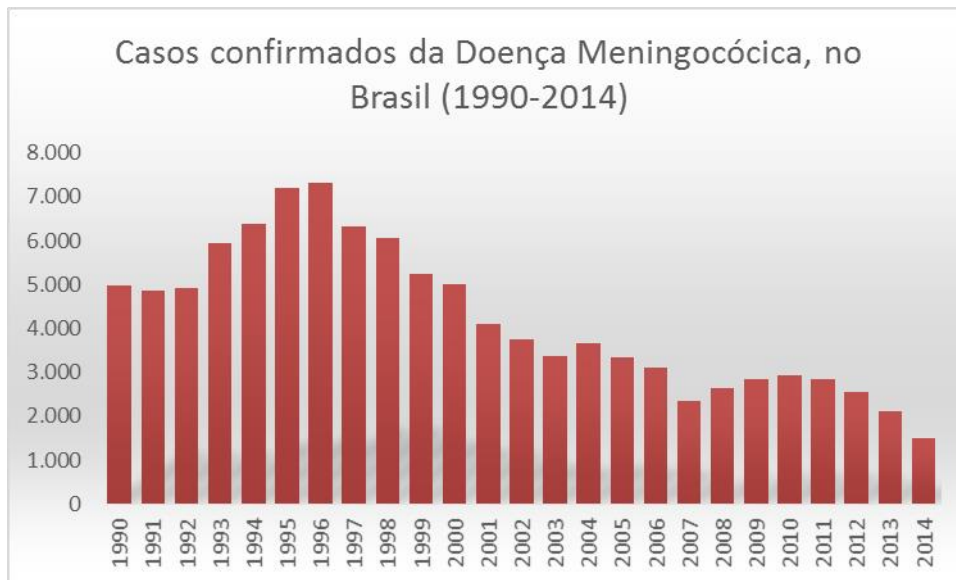
### 1.6.2. No Brasil

Em 1906 já haviam casos de DM sendo identificados no Brasil, com os primeiros relatos de surto ocorrendo em 1920, provocados pelo sorogrupo A (Godinho V. (1920) *apud* de Moraes e Barata 2005). Há relatos de epidemias de DM causada pelo sorogrupo A, com incidência relatada de 12 a 25 por 100.000 habitantes no período de 1920 a 1940 (Harrison et al. 2009).

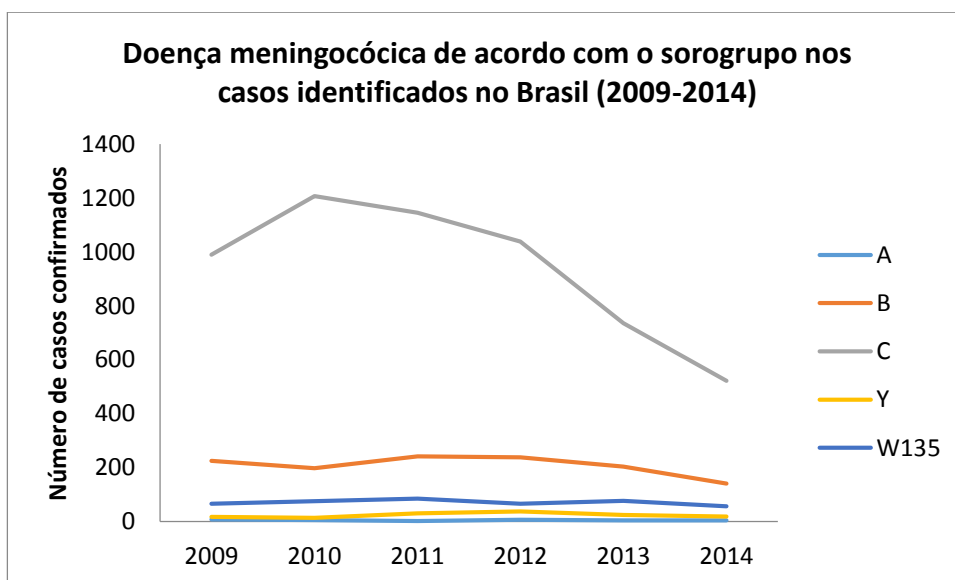
A maior epidemia de DM registrada no Brasil ocorreu durante a década de 1970. O epicentro foi em São Paulo e ocorreram duas grandes ondas epidêmicas, a primeira provocada pelo sorogrupo C, com início em abril de 1971, e a segunda provocada pelo sorogrupo A, começando em abril de 1974. A taxa de incidência atingiu um pico de 179 casos por 100.000 habitantes em 1974. A epidemia foi finalmente controlada em 1975 com o uso de vacinas polissacarídicas A e C (Sáfadi e McIntosh 2011).

Após um período de baixa incidência, uma nova epidemia, com prevalência do sorogrupo B, teve início em 1989. Com isso, uma campanha de vacinação contra o sorogrupo B foi iniciada utilizando uma vacina cubana (Harrison et al. 2009). A taxa de incidência aumentou a cada ano até atingir um pico em 1996, com 7.321 casos confirmados (de Moraes e Barata 2005). Na figura 1.4, tem-se um panorama da variação no número de casos da DM entre 1990 a 2014, onde a partir de 1996 é possível observar uma redução no número de casos confirmados no Brasil. Um levantamento realizado no período de 1990 a 2001 mostrou que o fenótipo B:4,7:P1.19,15 (N44/89) foi o mais encontrado (Lemos et al. 2006). A partir de 2002, observou-se um aumento do número de casos associados ao sorogrupo C.

Atualmente, entre os sorogrupos que causam DM, o sorogrupo C, é o mais frequente no Brasil, afetando diferentes cidades, seguido pelo sorogrupo B. O sorogrupo W-135 também é encontrado e já foi identificado nos estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (Sinan 2015b). Os sorogrupos prevalentes no Brasil, no período de 2009 a 2014, estão demonstrados na figura 1.5.



**Figura 1-4:** Número de casos confirmados de doença meningocócica, no período de 1990 a 2014, no Brasil (Sinan 2015a).



**Figura 1-5:** Incidência de doença meningocócica por ano segundo o sorogrupo, no período de 2009 a 2014, no Brasil (Sinan 2015b).

## 1.7. VACINAS MENINGOCÓCICAS

Os primeiros testes de vacina contra a DM em seres humanos ocorreram no início do século XX (Sophian A. (1912) *apud* Morley e Pollard 2001). As primeiras vacinas eram compostas por suspensões bacterianas inativadas pelo calor e apresentavam eficácia variável e reações adversas graves, provavelmente devido ao elevado teor de endotoxina (Gates 1918). A maioria dos ensaios realizados com preparações contendo células inteiras falhou. Na década de 1930, dois grupos de pesquisa, formados por Ferry e colaboradores e Kuhn e colaboradores,

iniciaram a busca por uma endotoxina meningocócica com o objetivo de repetir o sucesso das vacinas de toxóides já existentes contra o tétano e a difteria. No entanto, Kuhn e colaboradores não foram capazes de provar a imunogenicidade e eficácia da preparação teste (Morley e Pollard 2001).

### **1.7.1. Vacinas polissacarídicas**

Durante a Segunda Guerra Mundial, ocorreram vários surtos de DM provocadas pelos sorogrupos A e C, o que levou às primeiras tentativas em produzir uma vacina polissacarídica purificada (Scherp e Rake 1935). Na década de 1960, Gotschlich e colaboradores conseguiram demonstrar a importância de anticorpos anti-polissacarídeos na resposta imunológica humana contra meningococos do sorogrupo A e C (Goldschneider et al. 1969a). Além disso, eles demonstraram que polissacarídeos produzidos com elevada pureza eram imunogênicos em adultos saudáveis (Goldschneider et al. 1969b). Vacinas polissacarídicas contra os sorogrupos A e C ainda são utilizadas em muitos países para controlar surtos e epidemias, tendo como alvo os grupos de alto risco. Existem muitas combinações de vacinas polissacarídicas usadas globalmente, incluindo vacinas bivalente (A e C), trivalente (A, C e W) e quadrivalente (A, C, Y e W) (Ali et al. 2014a).

As vacinas polissacarídicas, entretanto, são pouco imunogênicas em lactentes e crianças com menos de dois anos, que correspondem exatamente à faixa etária de maior incidência da doença (Gold et al. 1975). Além disso, a duração da imunidade induzida por estas vacinas é limitada e depende da idade. A fraca resposta imunológica induzida por estes e outros antígenos polissacarídeos se deve à natureza destes antígenos, que induzem respostas imunológicas independentes de células T, sem memória imunológica e de curta duração (MacLennan et al. 2000; MacLennan et al. 2001). Por estes problemas as vacinas polissacarídicas têm sido substituídas pelas vacinas conjugadas, que induzem resposta T dependente e geram memória imunológica.

### **1.7.2. Vacinas conjugadas**

Esta abordagem está baseada na experiência do uso de vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b, cuja rotina de vacinação reduziu drasticamente a incidência da doença causada por este microrganismo nos países que a incorporaram nos seus calendários de vacinação (Kelly et al. 2004). Essas vacinas glicoconjugadas, que hoje são disponíveis para os sorogrupos A, C, W-135 e Y são capazes de induzir títulos de anticorpos protetores em lactentes, crianças, adolescentes e adultos jovens. As vacinas conjugadas são associadas a uma

redução no número de portadores, diminuindo a circulação de *N. meningitidis* e tendo efeito importante na imunidade de rebanho (English et al. 2000; MacLennan et al. 2000). Existem várias vacinas conjugadas para meningococo C licenciadas, conjugadas com anatoxina tetânica, anatoxina diftérica ou CRM-197 (Ali et al. 2014a). No Brasil, a vacina meningocócica C conjugada foi introduzida no calendário de vacinação em 2010 e é indicada para crianças a partir de três meses até dois anos (Secretaria de Saúde de São Paulo 2012; PNI 2014).

Busca-se sempre a combinação de vacinas sem prejuízo da resposta a cada um de seus componentes, visando à diminuição do número de injeções em crianças e aumento do custo benefício das vacinações como um todo (Morley e Pollard 2001). Nesta estratégia foram licenciadas algumas vacinas combinadas contra o sorogrupo A, C, W-135 e Y, como a vacina conjugada com anatoxina diftérica, Menactra<sup>®</sup> da Sanofi Pasteur, e as vacinas conjugadas com CRM-197, Menveo<sup>®</sup> da Novartis e a Nemerix<sup>®</sup> da GlaxoSmithKline (GSK), e vacinas conjugadas contra o sorogrupo C e Y combinadas com Hib, Menhibrix<sup>®</sup> da GSK (Ali et al. 2014a).

#### **1.8. VACINAS MENINGOCÓCICAS PARA O SOROGRUPO B**

Assim como ocorre para os demais sorogrupos, a incidência dependente da idade de DM causada pelo sorogrupo B é inversamente relacionada à presença de anticorpos bactericidas (Goldschneider et al. 1969a). No entanto, como a cápsula do sorogrupo B é pouco imunogênica, devido a sua identidade com antígenos humanos, e os anticorpos gerados contra este polissacarídeo capsular apresentam baixa avidéz, é necessária outra abordagem no desenvolvimento de vacinas para este sorogrupo (Zollinger & Mandrell 1983; Chang et al. 2012). A conjugação covalente do polissacarídeo B a um carreador proteico também não é capaz de resolver estes problemas. Tendo em vista as dificuldades com vacinas polissacarídicas contra o meningococo B, várias estratégias alternativas vêm sendo desenvolvidas.

Na década de 1970, as tentativas iniciais para a produção de vacinas compostas por PME eram baseadas na retirada do LOS. Após a remoção deste, as PME eram então precipitadas e produziam agregados em suspensão de cloreto de sódio. No entanto, estas vacinas não foram capazes de induzir anticorpos bactericidas em adultos ou crianças. Esta falha foi atribuída à perda da estrutura terciária das proteínas durante o processo de precipitação (Morley e Pollard 2001). Jennings e colaboradores desenvolveram, na década de 80, um polissacarídeo, quimicamente modificado, conjugado à anatoxina tetânica, produzindo uma vacina conjugada e imunogênica em murinos (Jennings et al. 1986). Uma vacina similar, que utilizava como carreador a proteína PorB recombinante ao invés da anatoxina, mostrou-se imunogênica em primatas não humanos (Fusco et al. 1997). Ao contrário da doença provocada pelos sorogrupos



A e C, entretanto, o anticorpo bactericida contra o sorogrupo B provavelmente é dirigido contra antígenos não capsulares (Bartoloni et al. 1995).

### 1.8.1. Vacinas de VME

As VMEs são liberadas pelas bactérias Gram-negativas durante o crescimento e podem ser extraídas do meio de cultivo, com alto rendimento, através do uso de detergentes. Essas vesículas são altamente imunogênicas, pois contêm múltiplos antígenos de membrana externa (Andrews e Pollard 2014). As primeiras vacinas de VME desenvolvidas continham as vesículas na sua conformação nativa. Estas vacinas são imunogênicas, embora muitas vezes apresentem uma imunogenicidade fraca na primeira infância. Duas vacinas baseadas em vesículas foram desenvolvidas na década de 1980 em resposta a surtos da doença em Cuba e na Noruega (Sierra et al. 1991; Boslego et al. 1995).

Em Cuba, a vacina produzida pelo Instituto Finlay, com o nome comercial de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, foi concebida como resposta a uma única cepa, B:4:P1.19,15, que causava a DM epidêmica na época, juntamente com o polissacarídeo capsular de meningococo sorogrupo C, derivado da cepa C11 (Sierra et al. 1991). Estudos de eficácia posteriores demonstraram que esta vacina conferia uma proteção de cerca de 70% em crianças acima de quatro anos de idade. No entanto, para crianças mais novas a eficácia foi muito mais baixa ou ausente (Milagres et al. 1994; Rodriguez et al. 1999).

A vacina produzida pelo NIPH (Instituto de Saúde Pública Norueguês), a MenBvac<sup>®</sup>, também foi baseada em um único clone epidêmico, o B:15:P1.7,16. A eficácia desta vacina foi estimada em 57% para um esquema de duas doses (Boslego et al. 1995). Em 1991, na Nova Zelândia, teve início um surto provocado por um clone de meningococo B, cuja PorA era heteróloga das cepas vacinais cubanas e norueguesas. Por esse motivo, foi necessário o desenvolvimento de uma nova vacina de VME, a MeNZB<sup>™</sup>, que foi utilizada de 2004 a 2008 para controlar a epidemia (Holst et al. 2013).

As vacinas baseadas em VMEs, que conservam as PME na sua conformação natural, são capazes de gerar anticorpos bactericidas. Apesar da resposta de anticorpos ser direcionada contra uma grande variedade de proteínas de membrana externa, o antígeno proeminente em vacinas de VME parece ser a PorA, o que levaria a uma imunidade específica principalmente para sorosubtipo (Morley e Pollard 2001). Estudos de imunogenicidade e reatogenicidade, que compararam a VA-MENGOCOC-BC<sup>®</sup> e a MenBvac<sup>®</sup>, concluíram que embora ambas vacinas sejam capazes de induzir uma boa resposta imunológica contra cepas homólogas, isso não ocorre para as cepas heterólogas de meningococo B, o que sugere que a eficácia delas esteja restrita ao clone epidêmico (Holst et al. 2013).

Alguns grupos tentam ampliar a cobertura das vacinas de VME utilizando tecnologia de DNA recombinante para produzir VMEs que expressem múltiplos antígenos PorA, a fim de criar vacinas de VMEs polivalentes. Embora estas vacinas de VMEs polivalentes possam ser uma melhoria quando comparadas às vacinas monovalentes, as abordagens com base em uma única proteína podem não fornecer uma cobertura ampla e podem ser mais suscetíveis à mudança de epidemiologia (Dull e McIntosh 2012).

### **1.8.2. Vacinas recombinantes**

Análises da sequência genômica completa do sorogupo B foram capazes de identificar proteínas meningocócicas relativamente conservadas, que eram capazes de induzir anticorpos bactericidas no soro (Pizza et al. 2000). Através deste processo, conhecido como vacinologia reversa, duas vacinas foram desenvolvidas, com diferentes abordagens, uma pela Novartis e outra pela Pfizer.

Para compor a vacina da Novartis, foram selecionados cinco antígenos. Estes antígenos foram produzidos como três proteínas recombinantes, NadA e duas proteínas de fusão, que contém a proteína de ligação à heparina e a fHbp. Visando ao aumento da imunogenicidade, estas proteínas foram combinadas com VME de uma cepa epidêmica da Nova Zelândia compondo, desta maneira, uma vacina contra o sorogupo B (Bexsero<sup>®</sup> da Novartis) (Snape et al. 2010). Esta vacina foi licenciada na Europa em janeiro de 2013 para uso em indivíduos a partir de dois meses de idade. No Brasil, o seu uso foi aprovado pela Agência de Vigilância Sanitária em janeiro de 2015.

A Pfizer está desenvolvendo uma vacina contendo duas variantes de fHbp recombinantes, cujo gene codificante é altamente conservado. A vacina atualmente encontra-se em estudo clínico de fase II. Foi observado a ocorrência de efeitos adversos ligados à aplicação da vacina em lactentes. Por este motivo, a população alvo desta vacina deve ser os adolescentes (Martinon-Torres et al. 2014).

## **1.9. ANTICORPOS BACTERICIDAS E ANTÍGENOS ALVOS**

Uma vacina meningocócica eficaz deve ser capaz de manter níveis funcionais de anticorpos circulantes. A proteção a longo prazo, após imunização, depende de três mecanismos: memória da resposta imunológica, persistência de anticorpos funcionais e imunidade de rebanho. A imunidade de rebanho consiste em reduzir o número de portadores de *N. meningitidis* na nasofaringe, protegendo indiretamente os indivíduos não vacinados. Em um indivíduo saudável, são necessários de dois a sete dias para montar uma defesa contra um dado antígeno, reconhecido por anticorpos e células T. Até que isso ocorra, o hospedeiro vai utilizar

a resposta imunológica inata para combater a infecção. Quando se trata de uma infecção meningocócica invasiva, não há tempo hábil para que essa defesa seja montada, já que o período de incubação da DM é de 3 a 4 dias. Além disso, a proteção resultante de anticorpos produzidos por células B de memória muitas vezes também não é suficiente, pois demora cerca de 5 dias, o que indica que a manutenção de anticorpos funcionais circulantes contra o meningococo é necessário para a proteção à doença. Sendo assim, quando o assunto é a proteção a longo prazo das vacinas, o correlato de proteção mais apropriado não parece ser a capacidade de gerar memória e sim a presença de anticorpos circulantes funcionais no momento da exposição ao patógeno (Erlich e Congeni 2012).

A presença de anticorpos capazes de induzir a morte da bactéria mediada pelo complemento foi correlacionada com a resistência à meningite meningocócica. Por isso, uma das etapas para se conseguir a aprovação regulatória das atuais vacinas meningocócicas tem sido a demonstração da capacidade destas em induzir anticorpos com atividade bactericida, avaliada através do ensaio bactericida do soro (EBS). Entretanto, ao se estudar uma vacina composta por uma mistura de diferentes antígenos proteicos, no mínimo três variações devem ser consideradas já que podem interferir diretamente na avaliação da mesma. A primeira é que o indivíduo vacinado pode desenvolver anticorpos contra todos ou somente alguns dos antígenos vacinais. A segunda variação possível é que os anticorpos gerados por esse indivíduo podem ou não serem bactericidas. E, por último, nas condições experimentais do EBS, a bactéria alvo pode expressar um ou mais antígenos diferentes dos componentes vacinais (Giuliani et al. 2010). Desta forma, a avaliação de uma vacina de multicomponentes contra o meningococo, reflete o efeito cumulativo de todos os anticorpos presentes frente à população alvo utilizada no ensaio. Se o interesse no novo produto é identificar qual o papel de cada componente na resposta imunológica induzida, a avaliação apenas da formulação final do imunógeno em soros de vacinados, não permite medir, através do EBS, a contribuição de cada um dos antígenos na resposta protetora.

Já se sabe que anticorpos para meningococos, gerados naturalmente, podem ser específicos para antígenos capsulares ou não-capsulares (Amir et al. 2005). O proteoma da membrana externa e da VME do meningococo é complexo e contém mais de 200 proteínas, das quais a proteína PorA é o antígeno imunodominante na geração de ABS (Williams et al. 2014). A proteína PorA apresenta uma grande variação estrutural entre as cepas, e esta grande diversidade é apontada como responsável pela resposta sorosubtipo específica das vacinas de VME (Pettersson et al. 2006).

Weynants e colaboradores demonstraram em camundongos que apesar da resposta bactericida induzida pelas vacinas de VME serem preferencialmente contra a PorA, outros

antígenos de membrana tem efeito sinérgico sobre a resposta protetora. O efeito sinérgico entre os antígenos depende da expressão destes na membrana, sendo significativa a contribuição dos anticorpos induzidos por eles. Por isso, quando pelo menos dois antígenos de membrana são alvos destes anticorpos, a atividade bactericida mediada por complemento ocorre de forma mais eficiente. Os componentes da membrana que, em concentração adequada, contribuem neste efeito sinérgico são as proteínas menores da membrana externa e o LOS (Giuliani et al. 2010).

O LOS é apontado, em conjunto com a PorA, como o principal alvo de anticorpos bactericidas. Estes anticorpos, direcionados para o LOS, podem também atuar aumentando a atividade bactericida de anticorpos anti-proteínas (Zollinger et al. 2010). Pinto e colaboradores estudaram o LOS em uma vacina e observaram que o mesmo pode ser responsável pela resposta cruzada, não somente entre diferentes cepas de meningococo B, mas ainda entre diferentes sorogrupos (C, W, X e Y), desde que estes compartilhem o mesmo tipo de LOS presente na vacina (Pinto et al. 2013).

#### **1.10. DESENVOLVIMENTO DA VACINA MENINGOCÓCICA B EM BIO-MANGUINHOS**

Utilizando a estratégia de busca de antígenos sub-capsulares que possam induzir proteção contra a DM causada pelo sorogrupo B, desde o final da década de 1990, Bio-Manguinhos está desenvolvendo uma vacina brasileira contra este microrganismo. O desenvolvimento desta vacina segue o conceito “tailor made” em que o produto é desenvolvido para um quadro epidemiológico específico. Ela é composta de antígenos de duas cepas de maior prevalência no Brasil. A primeira delas é a cepa B:4,7:P1.19,15P5.5,7:L1,3,7,8, conhecida como N44/89, e a segunda B:4:P1.7,1P5.5,7:L3,7, conhecida como N603/95 (Lemos et al. 2006; Barroso et al. 2009).

As VMEs das duas cepas são obtidas e purificadas em condições de deficiência de ferro, mimetizando a condição que o microrganismo enfrentaria no organismo humano. Além destes antígenos, foi incluído na preparação o LOS detoxificado (dLOS) da primeira cepa prevalente, N44/89, que possui os imunotipos L1, 3, 7, 8. Este antígeno foi introduzido com o objetivo de aumentar a cobertura vacinal uma vez que esta molécula tem expressão em cepas com diferentes sorosubtipos e mesmo em diferentes sorogrupos.

Foram testadas três vacinas durante o estudo clínico de fase I, com diferentes concentrações de VME por dose: 12,5µg, 25µg e 50µg. A concentração de dLOS nas formulações foi sempre o equivalente à metade da dose de VME. O uso destas vacinas em adultos, demonstrou a segurança das mesmas, o que definiu sua utilização em crianças para avaliação de imunogenicidade. Entre 2012 e 2014 as três concentrações de vacinas foram

testadas em crianças de 4 a 11 anos, em esquema vacinal de três doses com reforço após 6 a 12 meses, para avaliação de imunogenicidade e segurança.

As vacinas teste se mostraram seguras e imunogênicas para as cepas vacinais e duas cepas B heterólogas pelo ensaio EBS. Os títulos protetores foram significativamente maiores para a 1ª cepa vacinal B:4,7, P1,19,15 do que para a segunda cepa B:4,7, P1,7,1, com resposta reforço apenas para a 1ª cepa. Embora tenham sido observados títulos protetores para as cepas heterólogas testadas, os títulos foram muito inferiores àqueles obtidos para as cepas vacinais. Não se observou resposta reforço para as cepas heterólogas. A dose reforço se mostrou importante na manutenção dos títulos protetores para todas as cepas testadas.

Apesar da vacina desenvolvida atender à situação epidemiológica da DM causada pelo sorogrupo B no país, algumas questões levantadas pelos resultados do estudo de fase II/III precisam ser melhor estudadas. Nas diferentes formulações testadas, embora a concentração final de VMEs fosse variável, a razão entre as VMEs das cepas vacinais foi sempre de 1:1. Além disso, é importante destacar que ambas VMEs utilizadas nas preparações teste foram obtidas por processos produtivos idênticos e padronizados. Com os resultados da resposta em crianças, fez-se necessária a avaliação da participação de cada um dos antígenos vacinais na resposta imunológica induzida pela preparação experimental. O presente estudo tem o objetivo de fazer esta avaliação para uma futura perspectiva de melhoria de formulação ou mesmo de combinação destes antígenos com outras vacinas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem o objetivo de ampliar a avaliação do uso da vacina meningocócica B, produzida em Bio-Manguinhos, verificando o papel de cada antígeno vacinal na resposta bactericida induzida em camundongos, após três doses, com intervalo de 15 dias entre elas.

#### **2.1.1. Objetivos específicos**

- Avaliar a participação das vesículas de membrana externa das cepas vacinais de *N.meningitidis* sorogrupo B na resposta imunológica induzida pela vacina experimental em termos de atividade bactericida dos anticorpos induzidos.
- Avaliar o potencial do LOS detoxificado na resposta induzida pela vacina com relação a sua participação na atividade bactericida dos anticorpos induzidos.
- Avaliar a atividade pirogênica de diferentes formulações afim de verificar a possibilidade de otimização da vacina meningocócica B brasileira.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. MICRORGANISMO**

As duas linhagens de *N. meningitidis* sorogrupo B prevalentes no Brasil, N44/89 (B:4,7:P1.19,15:P5.5,7:L1,3,7,8) e N603/95 (B:4:P1.7,1P5.5,7:L3,7), foram isoladas de materiais clínicos e cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bacteriologia, SP, Brasil. Estas cepas foram liofilizadas em ampolas e conservadas a -20 °C e foram utilizadas para dar origem ao lote mãe e ao lote de trabalho (Anexo 2).

#### **3.2. SOLUÇÕES**

##### **3.2.1. Solução de Greaves**

Para o preparo da solução de Greaves, foi acrescentado em água destilada, 50 g/L de glutamato de sódio 5% monohidratado. A solução resultante foi aquecida a 40 °C e após o aquecimento, foi acrescentado 50 g/L de albumina bovina 5%. Com o auxílio de um agitador magnético, a solução foi homogeneizada. Após realizar o ajuste do pH da solução para 7,2 com NaOH 1 M, o volume da mesma foi completado com água destilada, descontando-se o volume do glicerol. A solução foi então filtrada em membrana de 0,22 µm de porosidade e, ao final, foi acrescentado 10% glicerol estéril (Borrow e Carlone 2001).

##### **3.2.2. Solução de Hanks**

Para preparo da solução de Hanks utilizada no trabalho, os componentes, enumerados de 1 a 9 no quadro 3.1, foram acrescentados em água deionizada. A solução foi homogeneizada, utilizando agitador magnético, por quatro horas. Em paralelo, o vermelho de fenol foi dissolvido em água deionizada, a solução foi filtrada em papel xarope e acrescentada aos demais componentes. O pH foi então ajustado para 7,5, com solução de NaOH 5 N, e a heparina foi acrescentada. A solução resultante foi homogeneizada, teve o seu volume ajustado e foi filtrada com membrana de 0,22 µm de porosidade (Borrow e Carlone 2001).

**Quadro 3-1:** Reagentes que compõem a solução de Hanks.

	COMPONENTES	MARCA	CONCENTRAÇÃO
1	NaCl	Merck	8,0 g/L
2	KCl	Merck	0,4 g/L
3	CaCl 2H <sub>2</sub> O	Merck	0,53 g/L
4	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Merck	0,1 g/L
5	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	Vetec	0,1 g/L
6	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	0,028 g/L
7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma	0,06 g/L
8	Glicose	Merck	1,0 g/L
9	BSA	Sigma	1,0 g/L
10	Vermelho de Fenol	Sigma	0,010 g/L
11	Heparina Sódica	Hepamax-S 5.000 UI/mL	256 µl/L (Heparina-5000 UI/mL)
12	H <sub>2</sub> O(Destilada)		

### 3.3. PREPARO DAS CULTURAS ESTOQUES

#### 3.3.1. Lote semente-mãe

As ampolas provenientes do Instituto Adolfo Lutz foram hidratadas com 1 mL de TSB (caldo triptona de soja, do inglês “Tryptic Soy Broth”) e incubadas a 37 °C por quatro horas. A suspensão hidratada foi semeada com o auxílio de alça de Drigalski, em ágar Müeller Hinton (AMH) contendo 1% de soro fetal bovino e incubada a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por 16 horas. Decorrido o tempo de cultivo, o crescimento bacteriano proveniente de cada duas placas foi ressuscitado com 1 mL de TSB e transferido para garrafas Roux contendo AMH com 1% de soro fetal bovino e pérolas de vidro. Após a incubação das garrafas Roux a 37 °C, por 16 horas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, foi adicionado 10 mL de solução de Greaves e o crescimento foi ressuscitado através de movimentos rotatórios na superfície do ágar com auxílio das pérolas de vidro. O conteúdo das garrafas foi homogeneizado e distribuído em criotubos, em alíquotas de 1 mL, que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -70 °C. O controle de pureza do lote foi realizado através de coloração de Gram e semeadura por esgotamento em meio ágar nutriente.



### 3.3.2. Lote trabalho

O lote de trabalho foi produzido através da semeadura de 150  $\mu\text{L}$  do lote mãe em placas de ágar Columbia, enriquecido com 10% de sangue de cavalo desfibrinado e estéril. As placas foram incubadas a 37 °C durante 16-18 horas em atmosfera úmida e enriquecida com  $\text{CO}_2$  (5%). Após o tempo de cultivo, as células foram ressuspensas com solução de Greaves. A suspensão obtida foi distribuída em alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  em criotubos, congelada em nitrogênio líquido e estocada em freezer -70 °C. O lote obtido foi controlado quanto à pureza através de coloração de Gram e estriamento por esgotamento em ágar nutriente.

### 3.4. PREPARO DAS VACINAS EXPERIMENTAIS

A obtenção dos antígenos vacinais, VMEs e dLOS, teve início com a semeadura de um criotubo do lote de trabalho das cepas N44/89 e N603/95 em três garrafas de Roux contendo TSB de origem não animal, que foram mantidas a 37 °C por um período de 16 a 18 horas em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, as células foram ressuspensas e mantidas em 3 Erlenmeyers contendo 500 mL de meio Catlin modificado (Fu et al. 1995), 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+3}$  (solução de sulfato férrico) e  $\text{pH} = 7,2$ , onde foram mantidas por um período de 16 a 18 horas. Após este período, utilizou-se 50 mL deste cultivo para realizar um inóculo em 12 Erlenmeyers contendo 450mL de meio Catlin, com  $\text{pH} = 7,2$  e 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+3}$ , que foi mantido a 37 °C, em atmosfera enriquecida com  $\text{CO}_2$  (5%), por 16 a 18 horas. Após essas etapas, foram obtidos 6 litros de cultivo, que foram inoculados em biorreator (Biostat UD100, Sartorius), com capacidade total de 150 litros.

#### 3.4.1. Obtenção das Vesículas de Membrana Externa

As VMEs foram obtidas a partir do cultivo das cepas N44/89 e N603/95 em Biorreator (Biostat UD100, Sartorius), com volume útil de 100 litros, com meio de Catlin modificado, 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{pH} 7,0$  (controlado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{NaOH}$ ), durante 12 horas, com aeração superficial, a 37 °C, empregando-se 42  $\mu\text{M}$  de EDDHA (Ácido etileno-di-amino-di-hidroxi fenil acético /Sigma) como quelante de ferro. O cultivo foi inativado, a 56 °C por 30 minutos, e a obtenção de VMEs foi estabelecida no sobrenadante do caldo fermentado separado da biomassa bacteriana em centrífuga de fluxo contínuo (LAPX 404 SGP-31C, Alfalaval). O material obtido foi concentrado por ultrafiltração, utilizando cassete de ultrafiltração para Centrasette de 100 kDa (OS100C05, Pall Corporation), processado para retirada de debris celulares por centrifugação a 24.000 rpm. O produto resultante foi submetido a uma ultracentrifugação a 29.000 rpm para obtenção da vesícula não purificada. Após ressuspender

a VME não purificada com água, por meio de ultrassom, realizou-se uma etapa de clarificação, por centrifugação a 12.000 rpm. O sobrenadante foi, por duas vezes consecutivas, tratado com tampão (40 mM Tris + 4 mM de EDTA + 2% desoxicolato de sódio) para extração parcial da endotoxina e submetido a uma ultracentrifugação a 29.000 rpm. O precipitado foi ressuspensionado com água contendo sacarose 3% e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, sendo mantido em temperatura de -20 °C até a formulação da vacina experimental (Jessouroun et al. 2004). A quantidade de vesícula presente na vacina foi determinada de acordo com a concentração de proteína, dosada segundo Markwell et al. (1978).

### **3.4.2. Obtenção do dLOS**

O dLOS foi obtido da biomassa bacteriana proveniente do cultivo da cepa N44/89 em biorreator (Biostat UD100, Sartorius), com volume útil de 100 litros, com meio de Catlin modificado (Fu et al. 1995) e solução de sulfato férrico, garantindo a concentração de 20 µM de Fe<sup>+3</sup>, com aeração submersa e pH 7,0 (controlado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e NaOH), durante 8 horas a 37 °C. A biomassa foi inativada, a 56 °C durante 30 minutos, e a obtenção do LOS foi estabelecida no concentrado do caldo fermentado separado do sobrenadante em centrífuga de fluxo contínuo (LAPX 404 SGP-31C, AlfaLaval). A biomassa bacteriana concentrada foi tratada com 20 g/L do detergente catiônico Cetavlon<sup>®</sup> (brometo de hexadecil trimetilamônio quaternário), para descomplexar o LOS. O LOS bruto foi purificado empregando-se a precipitação alcoólica fracionada, desproteinização com fenol e purificação por cromatografia de exclusão, em Sephacryl S-300HR (GE), utilizando como fase móvel tampão TED (TRIS 20 Mm, EDTA 5 mM, Na-DOC 0,5%, NaN<sub>3</sub> 0,02%, pH 8,5), modificado a partir de Fernandes (2005). Após precipitação e liofilização, a massa de LOS tóxico foi submetida a 60 °C durante 2,5 horas, para detoxificação com NaOH 0,2 M. Após este processo, o pH foi ajustado para 7,0 com a adição de uma solução de ácido clorídrico 0,1 M. Foi adicionado etanol absoluto ao dLOS a fim de promover a sua precipitação, e, após um repouso de 48 horas a -20 °C, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm, para lavagem do dLOS precipitado. Após ressuspender este precipitado com o mínimo possível de água, o mesmo foi liofilizado (modificado de Jessouroun et al. 2004). A quantidade de dLOS foi determinada pelo método descrito por Waravdekar e Saslaw (1959). O dLOS foi diluído para uma concentração pré-determinada e o concentrado antigênico foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, sendo mantido em temperatura de 2 a 8 °C até a formulação da vacina experimental.

### 3.4.3. Formulação das vacinas experimentais

Seis vacinas experimentais foram formuladas (quadro 3.2). Para tal, foram utilizadas a vacina meningocócica B, seus componentes combinados e em separado, em presença do adjuvante hidróxido de alumínio (HA) e a vacina completa B combinada à vacina meningocócica C conjugada produzida em Bio-Manguinhos (Silveira et al. 2007). As preparações usadas para imunização dos camundongos foram líquidas, contendo cada dose 0,2 mL.

**Quadro 3-2:** Vacinas formuladas para o estudo.

GRUPO	CONTEÚDO	FORMULAÇÃO
1	Vacina meningocócica B completa	2,5µg de VME N44/89 + 2,5µg de VME N603/95 + 2,5µg de LOS detoxificada + 0,1mg de hidróxido de alumínio por dose
2	Vacina meningocócica B + Concentrado antigênico da Vacina meningocócica C conjugada	2,5µg de VME N44/89 + 2,5µg de VME N603/95 + 2,5µg de LOS detoxificada + 1,0µg de polissacarídeo C conjugado + 0,1mg de hidróxido de alumínio por dose
3	VME N44/89	2,5µg de VME N44/89 + 0,1mg de hidróxido de alumínio por dose
4	VME N603/95	2,5µg de VME N603/95 + 0,1mg de hidróxido de alumínio por dose
5	VME N44/89 + VME N603/95	2,5µg de VME N44/89 + 2,5µg de VME N603/95 + 0,1mg de hidróxido de alumínio por dose
6	dLOS	2,5µg de LOS detoxificado + 0,1mg de hidróxido de alumínio por dose

### 3.5. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Camundongos suíços, de ambos os sexos, pesando de 12 a 17g, foram imunizados por via intramuscular, em esquema de três doses com intervalo de 15 dias entre elas. Foram realizadas quatro coletas sanguíneas através do plexo orbital: T0 (antes da primeira imunização), T15 (antes da segunda dose), T30 (antes da terceira dose) e T45 (15 dias após a última imunização). Após a sangria o soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm durante dez minutos, e armazenado a - 20 °C.

Ao todo, foram imunizados 180 camundongos suíços que foram divididos em seis grupos, com 30 animais. Cada grupo foi subdividido em seis caixas, onde cada caixa representava o pool de soro de cinco animais. Para este trabalho foram utilizadas amostras aleatórias de cinco das seis caixas de cada um dos grupos acima descritos.

Os testes em camundongos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/ Fiocruz), sob documento LW65/14 (validade 01/12/2018).

### **3.6. ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA**

O ensaio que avalia a atividade bactericida dos anticorpos do soro em presença de complemento tem como princípio ser o correlato de proteção *in vitro* contra a DM. Os anticorpos que foram obtidos a partir dos camundongos vacinados com diferentes preparações tiveram a atividade bactericida avaliada. Esta avaliação ocorreu antes e após a soroneutralização dos soros com os antígenos, cuja participação na indução da resposta imunológica está em questão.

#### **3.6.1. Inativação da bactéria**

Neste trabalho, as cepas N44/89 e N603/95, usadas para obtenção dos antígenos vacinais, foram utilizadas como cepas alvo. Estas cepas de meningococos foram semeadas em placas, utilizando a técnica de esgotamento, em ágar Columbia enriquecido com sangue de cavalo, e incubada a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 16 horas. Realizou-se então o repique para uma nova placa de ágar Columbia enriquecida com sangue, que foi incubada por quatro horas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. O cultivo foi ressuspendido com Hanks e a suspensão foi ajustada para que a D.O. a 600nm ficasse próxima a 1,0, sendo depois distribuída em volumes constantes de 400 µL em diversos criotubos. A suspensão bacteriana foi incubada a 56 °C durante 45 minutos e em seguida foi mantida estocada a 4 °C até o seu uso (Borrow e Carlone 2001).

#### **3.6.2. Fonte de complemento**

A fonte de complemento foi obtida a partir do soro de doadores de sangue do Hemorio, previamente submetidos a um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo). A coleta de amostra de doadores de sangue foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hemorio, sob o protocolo n° 118/07. Como nenhuma das fontes de complemento disponíveis levava a uma redução da população bacteriana padrão menor ou igual a 15%, foi selecionada a fonte que causava a menor lise. Os anticorpos presentes nesta fonte de complemento foram removidos

através de uma etapa de incubação a 20 °C durante 30 minutos com a cepa alvo previamente inativada, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por três minutos (Santos et al. 2001). Com isso, esperava-se uma redução significativa da lise bacteriana, anteriormente provocada por esta fonte de complemento. Para obter o complemento inativado, o complemento natural foi incubado a 56 °C durante 30 minutos, sendo em seguida submetido à centrifugação a 10.000 rpm por três minutos.

### **3.6.3. Ensaio bactericida do soro**

As cepas alvo de meningococo foram semeadas, utilizando a técnica de esgotamento, em placas de ágar Columbia enriquecido com sangue, e incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 16 horas. Realizou-se então o repique, de aproximadamente 10-20 colônias isoladas, para uma nova placa de ágar Columbia enriquecida com sangue, que foi incubada por quatro horas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. Antes de serem submetidos ao ensaio bactericida, os soros dos camundongos tiveram o seu sistema complemento inativado. Para isso, eles foram previamente diluídos com Hanks, com um fator de diluição mínimo de 1:2, e incubados a 56 °C por 30 minutos. A atividade bactericida dos anticorpos, em presença de 25% de complemento, foi avaliada em diluições seriadas (fator 2) do soro de animais vacinados, em placa de poliestireno de 96 poços (Corning® Costar®) frente a uma população de meningococo alvo contendo entre 1,3 a 1,7x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia, cujo cultivo foi ressuspensionado com Hanks. Após incubação de uma hora a 37 °C, as suspensões bacterianas expostas a diferentes concentrações de anticorpos foram semeadas pela técnica da gota pendente e seu crescimento foi comparado à suspensão padrão, não submetida à ação de anticorpos. O título do soro foi definido pela recíproca da diluição capaz de eliminar 50% ou mais das unidades formadoras de colônia presentes no poço controle (Borrow e Carlone 2001). Nos casos em que o título não pôde ser determinado na diluição mínima (1:4) do teste, assumiu-se para fins de análise, que o título do mesmo era de (1:2).

### **3.7. ENSAIO BACTERICIDA COMPETITIVO COM OS ANTÍGENOS VACINAIS**

A especificidade de resposta no ensaio bactericida para os antígenos vacinais foi determinada através do ensaio bactericida competitivo, baseado em um teste de soroneutralização, desenvolvido no laboratório e baseado no método descrito por Giuliani et al. (2010). Este teste consiste na neutralização de anticorpos do soro através da formação do complexo antígeno/anticorpo.

### **3.7.1. Padronização do ensaio para VME N603/95**

Para estabelecer a concentração de VME purificada a ser utilizada no teste de soroneutralização foi utilizado um soro padrão de animais imunizados com a vacina B completa, em um esquema de 3 doses. As vesículas tiveram o seu conteúdo proteico total quantificado e, baseado nesta dosagem, diferentes concentrações das vesículas foram testadas (450 µg/mL, 725 µg/mL, 1000 µg/mL, 2250 µg/mL e 4500 µg/mL), a fim de determinar qual a concentração mínima capaz de atingir a máxima redução dos títulos bactericidas, frente a cepa produtora da VME. A concentração mínima avaliada de 450 µg/mL foi definida com base nos experimentos de Giuliani et al. (2010). A fim de controlar se as condições (temperatura, tempo de incubação e número de centrifugações) escolhidas para a soroneutralização estavam adequadas, utilizou-se como controle positivo para a padronização, a soroneutralização com igual volume com a cepa alvo inativada, com D.O. a 600nm igual a 1,0.

### **3.7.2. Padronização do ensaio para VME N44/89**

Após estabelecida a padronização do ensaio para VME de N603/95 foi necessário estabelecer a concentração de VME de N44/89 purificada a ser utilizada no ensaio de soroneutralização. Um soro padrão de animais imunizados com a vacina B completa, em um esquema de 3 doses, foi utilizado para esta etapa. Com base nos resultados obtidos na padronização com VME de N603/95, diferentes concentrações de VME de N44/89 purificadas foram testadas (450 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL e 2000 µg/mL), a fim de determinar qual a concentração mínima capaz de atingir a máxima redução dos títulos bactericidas, frente a cepa N44/89. A fim de controlar se as condições (temperatura, tempo de incubação e número de centrifugações) escolhidas para a soroneutralização estavam adequadas, utilizou-se um controle positivo para a padronização, através da soroneutralização com igual volume com a cepa alvo inativada, com D.O. a 600nm igual a 1,0.

### **3.7.3. Padronização do ensaio para dLOS**

Para estabelecer a concentração de dLOS a ser utilizada no ensaio de soroneutralização foi utilizado um soro padrão de animais imunizados com a vacina B completa, em um esquema de 3 doses. Diferentes concentrações de dLOS foram testadas (100 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL), a fim de determinar qual a concentração mínima capaz de atingir a máxima redução dos títulos bactericidas, frente as duas cepas vacinais. Frente a cepa N44/89, foi testada ainda a concentração de 1500 µg/mL de dLOS. A fim de controlar se as condições (temperatura, tempo de incubação e número de centrifugações) escolhidas para a soroneutralização estavam adequadas, utilizou-se um controle positivo para a padronização,

através da soroneutralização com igual volume com a cepa alvo inativada, com D.O. a 600nm igual a 1,0.

#### **3.7.4. Combinação de antígenos**

Para observar um possível efeito de sinergismo entre os antígenos vacinais na resposta imunológica induzida pelas formulações teste, realizou-se o teste de soroneutralização utilizando-se a combinação dos antígenos, ou seja, VME de N603/95 combinada ao dLOS e VME de N44/89 também combinada ao dLOS. Essas combinações foram testadas frente as cepas N603/95 e N44/89, respectivamente, a fim de avaliar se haveria diferença, quanto ao ensaio bactericida competitivo, no uso desses antígenos em separado ou em conjunto. As concentrações utilizadas de cada antígeno foram as mesmas previamente estabelecidas para uso individual dos respectivos antígenos e cepas alvo.

#### **3.7.5. Ensaio Bactericida Competitivo**

Para realizar este ensaio, amostras de soros de camundongos de todos os grupos foram selecionadas ao acaso e submetidas ao ensaio bactericida competitivo. Em todos os grupos, houveram amostras que foram submetidas ao ensaio bactericida competitivo, com as VMEs purificadas, o dLOS e a combinação de cada VME com dLOS. Os soros não diluídos foram misturados, em uma razão de volume de 1:1, aos antígenos vacinais, nas concentrações estabelecidas para o teste de soroneutralização. Essa mistura foi incubada a 37 °C por 16 horas e, posteriormente foi submetida a duas etapas de centrifugações a 10.000 rpm, durante três minutos, sendo os respectivos sobrenadantes separados ao fim de cada etapa. Os soros de animais imunizados e sobrenadantes da soroneutralização foram submetidos ao EBS convencional para determinação de especificidade dos anticorpos induzidos pelas preparações teste. A redução do título bactericida foi considerada significativa, indicando que o antígeno participa da indução de proteção, quando houve uma redução maior ou igual a dois  $\log_2$  no título.

### **3.8. TESTE DE PIROGÊNIOS**

A fim de avaliar a possibilidade de futuras modificações nas proporções dos antígenos para otimização da vacina meningocócica B brasileira, utilizou-se o teste de pirogênios. Este teste foi realizado visto que os antígenos que compõem esta vacina apresentam alto potencial pirogênio, e qualquer mudança nas suas concentrações precisa ser avaliada antes de um possível uso em humanos. Foram analisadas três diferentes formulações, nas quais a concentração da VME de N603/95 foi alterada em relação a VME N44/89, como apresentado no quadro 3.3.

Através deste teste é possível verificar a ausência de endotoxinas e exotoxinas em formulações de vacina, por inoculação *in vivo*. O teste de pirogênios é baseado na avaliação do aumento de temperatura (individual e coletivo) dos coelhos, através de aferição por via retal após injeção intravenosa da solução estéril em análise. Este ensaio foi realizado pelo Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA), como descrito na Farmacopeia Brasileira V, tendo sido aprovado pelo CEUA, sob documento LW65/14, com validade em 01/12/2018 (ANVISA 2010).

**Quadro 3-3:** Vacinas meningocócicas B e as variações nas concentrações de seus componentes.

VACINA	RAZÃO [N603]/ [N44]	FORMULAÇÃO
1	1	25µg de vesícula N44/89, 25 µg de vesícula N603/95 e 25 µg de dLOS por dose
2	2,33	18,75µg de vesícula N44/89, 43,75µg de vesícula N603/95 e 25 µg de dLOS por dose
3	3	25µg de vesícula N44/89, 75 µg de vesícula N603/95 e 25 µg de dLOS por dose

A temperatura corporal de cada coelho foi aferida duas vezes, antes da inoculação, com intervalo de 30 minutos entre cada leitura, para cálculo da média da temperatura controle dos animais. As vacinas meningocócicas testadas foram diluídas 2000 vezes em relação à dose humana. Esta diluição foi escolhida com base na avaliação realizada no laboratório, previamente, da vacina cubana VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, com uso licenciado para humanos, cuja diluição necessária para aprovação neste ensaio foi de 4000 vezes em relação à dose humana. Cada formulação foi inoculada, através da veia marginal da orelha, em três coelhos, que tiveram a temperatura registrada a cada 30 minutos, até completar 3 horas.

O produto cumpriria com os requisitos do teste de pirogênios se nenhum dos três coelhos apresentasse aumento individual da temperatura igual ou superior a 0,5° C, em relação às suas respectivas temperaturas controle. Caso algum coelho apresentasse aumento da temperatura igual ou superior a 0,5° C, o teste deveria ser repetido utilizando outros cinco animais. O produto seria, então, considerado livre de componentes pirogênios quando no máximo três dos oito coelhos apresentassem aumentos individuais de temperatura iguais ou superiores a 0,5° C, e se a soma dos aumentos individuais de todos os coelhos não excedesse a 3,3° C (ANVISA 2010).



### **3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A avaliação estatística dos dados obtidos, para cada uma das cepas, com as seis formulações foi analisada por um teste não paramétrico, o teste de Wilcoxon pareado, considerando um intervalo de confiança de 95%. Este teste também foi utilizado a fim de realizar uma comparação entre as duas cepas, com os dados obtidos dentro de um mesmo grupo. As medianas dos títulos bactericidas foram calculadas a fim de avaliar a soroconversão e analisar o bactericida competitivo. Essas análises foram realizadas em conjunto com o professor Dr. Sérgio Alves da Silva, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), utilizando o programa *R*, versão 3.1.3 (Team 2015).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A prevalência dos sorogrupos de meningococos, assim como a incidência de DM, embora muito variáveis entre as diferentes regiões do planeta, ainda representam um problema importante na saúde pública global. A recente disponibilização de vacinas tetravalentes conjugadas, como Menactra<sup>®</sup> e Menveo<sup>®</sup> para os sorogrupos A, C, W-135 e Y, e da vacina Bexsero<sup>®</sup>, contra o sorogrupo B, trouxeram novas perspectivas de controle da DM no mundo (Ali et al. 2014b). Entretanto, a busca por uma vacina com cobertura universal para o sorogrupo B continua. Para alcançar tal objetivo, é essencial uma melhor compreensão acerca de como cada antígeno bacteriano participa da indução de anticorpos bactericidas.

### **4.1. RESULTADOS DE ATIVIDADE BACTERICIDA EM SOROS DE ANIMAIS QUE RECEBERAM AS DIFERENTES FORMULAÇÕES TESTE**

A atividade bactericida dos anticorpos tem um papel central na infecção meningocócica através da sua ligação às estruturas de superfície da célula bacteriana e da contribuição do sistema complemento na eliminação do patógeno. Assim, as vacinas contra o meningococo tem o objetivo de induzir, em vacinados, anticorpos com alta atividade bactericida. O ensaio “in vitro” que avalia a resposta a estas vacinas e tenta reproduzir este fenômeno de forma controlada é o ensaio bactericida do soro (Pollard e Frasch 2001).

#### **4.1.1. Obtenção da fonte de complemento**

A fonte de complemento para o ensaio bactericida é selecionada entre doadores humanos voluntários, que não apresentem anticorpos contra a cepa que será utilizada como alvo no ensaio (Granoff 2009). O uso de complemento humano no teste é aceito quando a atividade lítica deste componente natural é menor ou igual a 15% da população bacteriana teste (Martin et al. 2005). Entre os doadores voluntários, oriundos de seleção realizada em parceria com o Hemorio, não haviam fontes de complemento que obedecessem aos critérios de lise para a cepa N44/89.

Pela literatura, entre os adultos jovens, 60 a 80% terão ABS para meningococos detectáveis, fato definitivo para a prevalência da DM em crianças menores de cinco anos de idade, que não apresentam ABS (Stephens 2009). Apesar da DM ser mais frequente em crianças, o estado de portador é mais comum em adultos jovens (Read 2014).

Aproximadamente 10% da população é portadora do meningococo, e essa taxa aumenta entre os indivíduos com faixa etária entre 15 e 24 anos, onde se observa um pico de 23% (Yazdankhah e Caugant 2004; Christensen et al. 2010). Portanto, devido ao reduzido número de adultos não imunes ao meningococo e à alta taxa de portadores na população, é grande a dificuldade de seleção de indivíduos adultos aptos a serem doadores de complemento.

Para os sorogrupos A, C, W135 e Y, em função da dificuldade da seleção de doadores, a utilização de complemento de coelhos recém natos foi avaliada e recomendada (Santos et al. 2001). Para o sorogrupo B, entretanto, a literatura recomenda a utilização de complemento humano, mesmo para a avaliação de soros de camundongos (Zollinger e Mandrell 1983; Vermont e Van Den Dobbelseen 2002; Pinto et al. 2013). Utilizou-se então o procedimento de redução dos anticorpos presentes nas fontes de complemento pela soroneutralização na presença da cepa alvo inativada (Santos et al. 2001). O protocolo para uso da fonte de complemento após a soroneutralização foi padronizado para a cepa N603/95 e adotado para as duas cepas alvo.

Para padronizar este procedimento foram utilizados dois soros controles, cujos títulos bactericidas eram previamente conhecidos. Esses controles foram submetidos ao ensaio bactericida para a cepa N603/95, onde comparou-se os títulos bactericidas obtidos utilizando-se o complemento natural com e sem a etapa de soroneutralização. A faixa de variação aceitável para o ensaio bactericida é de um  $\log_2$  para mais ou para menos. Como pode ser observado na tabela 4-1, a etapa adicional da soroneutralização, não provocou alteração no título bactericida esperado, demonstrando não ter impacto no processo “in vitro”.

**Tabela 4-1:** Comparação, frente as cepas vacinais N44/89 e N603/95, dos títulos bactericidas obtidos, para duas amostras controle, utilizando as fontes de complemento com e sem a etapa de soroneutralização.

Título Bactericida	Cepa alvo			
	N603/95		N44/89	
	Controle 1	Controle 2	Controle 1	Controle 2
Esperado	64	16	2048	512
Fonte de complemento sem soroneutralização	64 (12%)	16 (12%)	32768 (36%)	4096 (36%)
Fonte de complemento com soroneutralização	32 (0%)	8 (0%)	1024 (10%)	512 (10%)

( ) Percentual de lise em relação a população bacteriana teste.

Com base nestes achados, os dois controles foram submetidos ao ensaio bactericida tendo a cepa N44/89 como alvo, onde novamente foram comparados os títulos bactericidas obtidos com o uso do complemento natural antes e após a etapa de soroneutralização. Na tabela 4-1, também é possível observar que o procedimento adotado foi eficiente em reduzir significativamente a lise provocada pelo complemento sem a etapa de soroneutralização, mantendo-a dentro dos critérios para uso no ensaio bactericida. Com isso, foi demonstrado que os anticorpos específicos para a cepa alvo presentes na fonte de complemento foram removidos de forma eficaz, garantindo assim um dos pré-requisitos do teste.

#### **4.1.2. Avaliação do ensaio bactericida do soro**

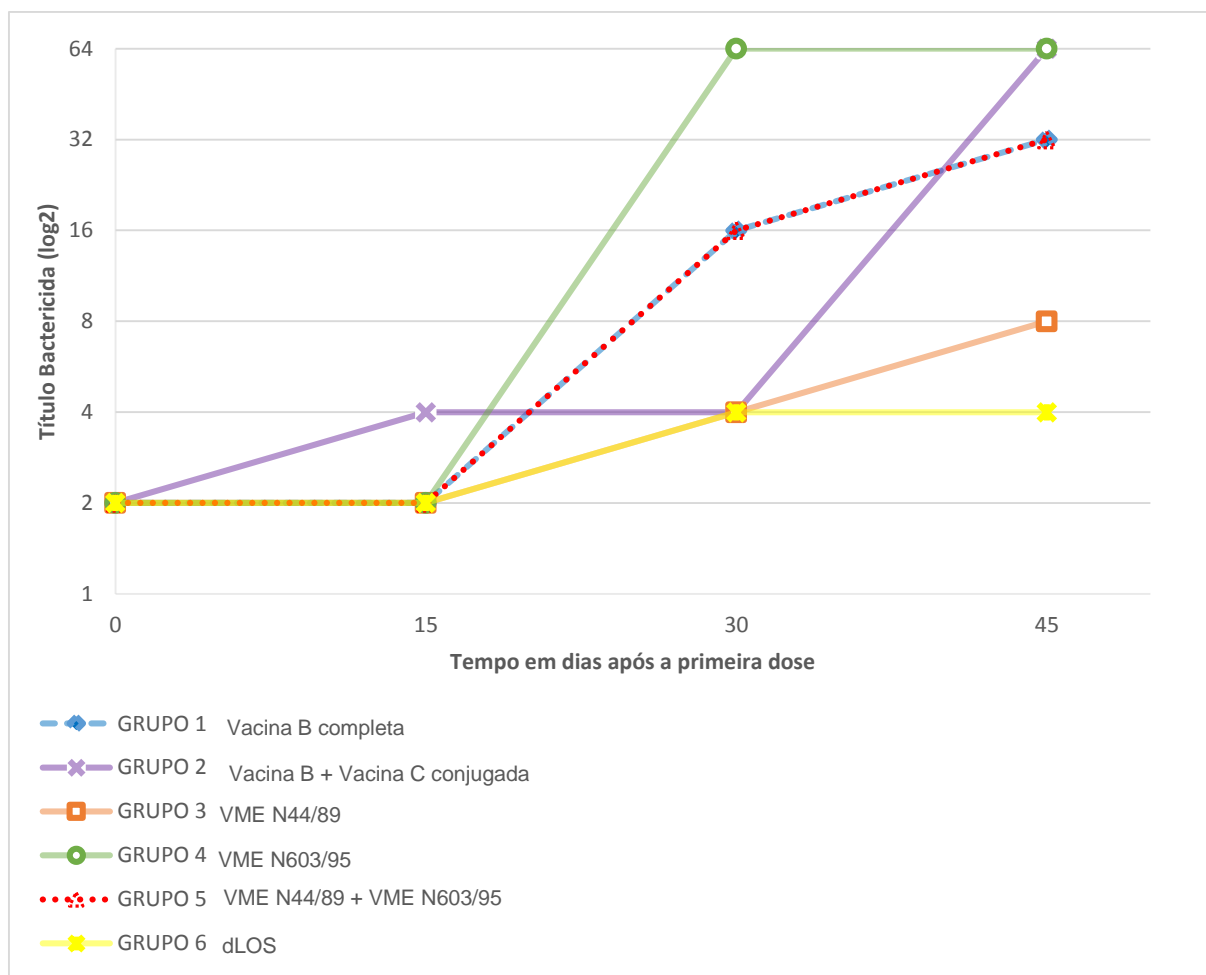
Para o ensaio bactericida, considera-se que ocorreu a soroconversão quando o título bactericida após imunização apresenta um aumento igual ou maior a quatro vezes o título do soro pré-imune (Frasch et al. 2009). No ensaio bactericida do soro, realizado antes da soroneutralização, foi possível observar que todas as preparações vacinais testadas induziram soroconversão para as cepas N603/95 e N44/89, ao término do esquema de três doses (Figuras 4-1 e 4-2). A única exceção foi o grupo 6, ou seja, o grupo imunizado apenas com o dLOS, onde não ocorreu soroconversão.

Não foi possível observar, com as duas cepas utilizadas, diferença significativa (N44/89:  $p = 0,102$ ; N603/95:  $p = 0,2531$ ) entre o Grupo 1, que recebeu apenas a vacina meningocócica B, e o Grupo 2, que continha também a vacina meningocócica C conjugada, sugerindo que a combinação das duas vacinas não interfere na resposta imunológica induzida para a vacina meningocócica B, objeto deste estudo. Este achado é promissor, visto que tornaria possível o uso futuro das duas vacinas combinadas, desde que também não ocorra interferência na resposta induzida para a vacina meningocócica C. Desta forma, seria seguida uma tendência mundial, em que se busca uma redução no número de injeções em crianças (Morley e Pollard 2001)

O Grupo 1 também não mostrou diferenças estatísticas significativas (N44/89:  $p = 0,6232$ ; N603/95:  $p = 0,3972$ ), para as cepas N44/89 e N603/95, em relação ao grupo 5, que não continha o dLOS na sua formulação. Esse dado sugere que a adição desta molécula não contribui para o melhor desempenho da vacina, para as cepas vacinais, corroborando o resultado demonstrado por Jessouroun et al. (2004).

Para a cepa alvo N44/89, os títulos de atividade bactericida induzidos pela vacina no Grupo 1 foram equivalentes ( $p = 0,0813$ ) aos induzidos pela formulação do Grupo 3, imunizados apenas com vesículas de N44/89. Da mesma forma, os títulos para a cepa N603/95 induzidos pela vacina no Grupo 1 foram equivalentes ( $p = 0,1837$ ) aos induzidos pelo grupo 4, que recebeu a formulação contendo apenas VME de N603/95. Assim, a análise estatística

adotada indica que, o uso de vesículas das duas cepas na vacina B completa, aparentemente, não induziu melhor desempenho para as cepas vacinais do que o observado para as formulações monovalentes.

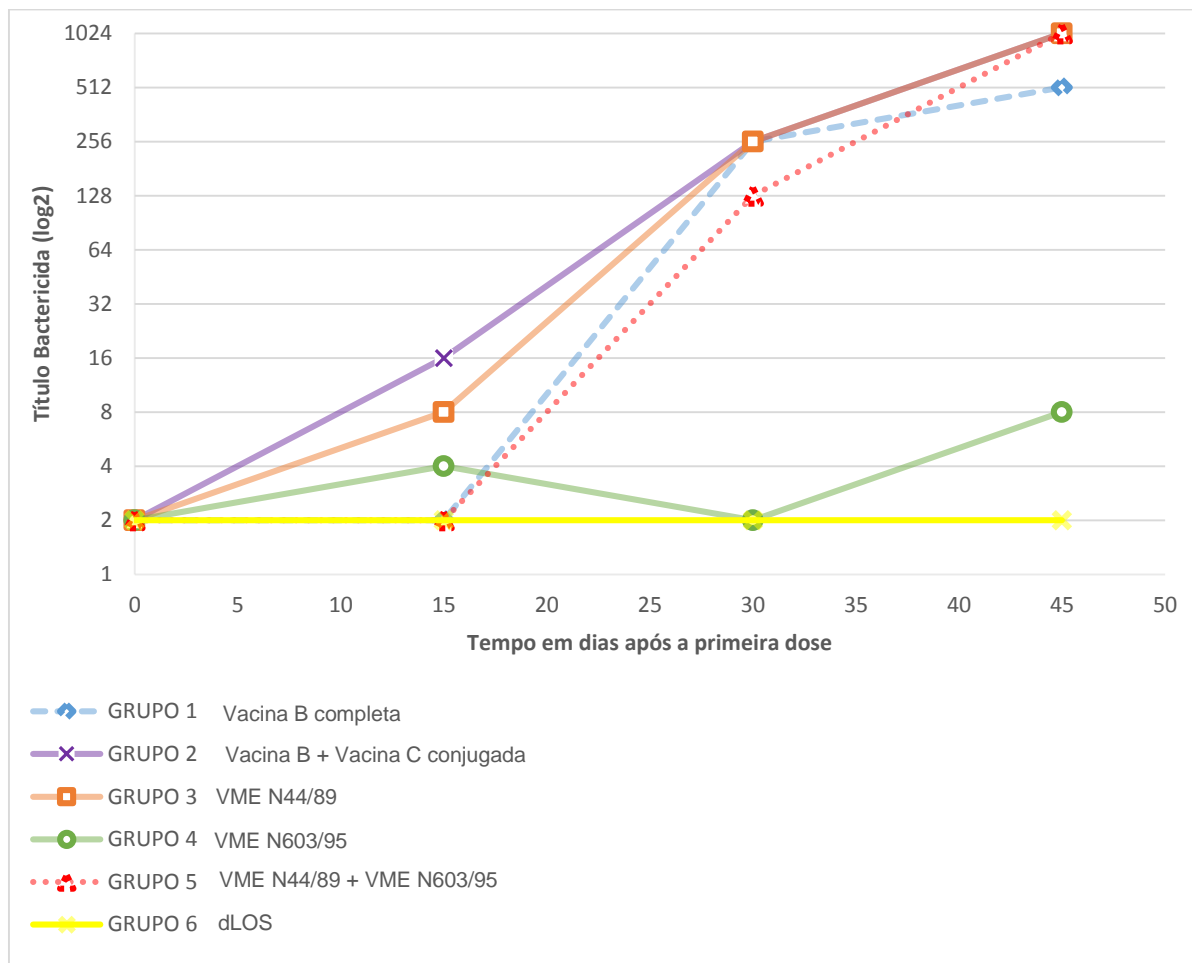


**Figura 4-1:** Mediana dos títulos bactericidas para a cepa N603/95, obtidos a partir de camundongos imunizados com as seis vacinas experimentais, nos tempos T0 (pré-imunização), T15 (antes da segunda dose), T30 (antes da terceira dose) e T45 (15 dias após a terceira dose).

Os soros dos animais que receberam formulações compostas por apenas uma das vesículas, quando testados com a outra cepa, mostraram soroconversão maior ou igual a quatro vezes os títulos pré imunes. Embora estes títulos sejam bem inferiores aos obtidos com as cepas homólogas, é um título considerado protetor, o que indica que as VMEs induzem reatividade cruzada.

A reatividade cruzada relacionada às VMEs já foi descrita na literatura. Os estudos com a vacina de VME da Nova Zelândia, por exemplo, demonstraram a presença de reatividade cruzada entre cepas heterólogas à vacinal, inclusive para outros sorogrupos (40-60% dos vacinados) (Arnold et al. 2011). Esses resultados foram determinantes para a inclusão de VMEs

da cepa prevalente na Nova Zelândia na vacina Bexsero<sup>®</sup>, cujos resultados em animais foram otimizados após a inclusão deste antígeno na formulação final (Findlow et al. 2010).



**Figura 4-2:** Mediana dos títulos bactericidas para a cepa N44/89, obtidos a partir de camundongos imunizados com as seis vacinas experimentais, nos tempos T0 (pré-imunização), T15 (antes da segunda dose), T30 (antes da terceira dose) e T45 (15 dias após a terceira dose).

A limitação do uso das vacinas de VMEs, entretanto, principalmente em crianças abaixo de dois anos, está na proteção preferencialmente gerada, que é sorosubtipo específica, tendo como foco principal a PorA. No entanto, o observado em vários estudos clínicos com estas vacinas é que a resposta funcional induzida não depende apenas da PorA, mas é resultante da presença desta proteína, de epítomos conservados de diferentes proteínas (fHbp, NadA, PorB, OpcA, OMP 85) e de outros antígenos presentes na membrana externa da bactéria, como o LOS (Rosenqvist et al. 1995; Wedege et al. 1998; Tappero et al. 1999; Holst et al. 2009; Donnelly et al. 2010; Holst et al. 2013). Portanto, a reatividade cruzada induzida pelas VMEs observada neste estudo, pode ser induzida pelos epítomos conservados de algumas PMEs e/ou pelo LOS.

Na tabela 4-2 é possível observar as medianas dos títulos obtidos para a cepa N44/89 e para a cepa N603/95, para todos os grupos vacinais, nos diferentes tempos avaliados. De maneira geral, nota-se um aumento do título bactericida a medida em que cada nova dose de vacina vai sendo administrada. Houve diferença nos títulos bactericidas entre as duas cepas, nos diferentes grupos. Esta diferença se mostrou estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para todos os grupos, exceto para o grupo 6, onde o *p valor* foi de 0,27.

É possível observar ainda, que os títulos obtidos para a cepa N44/89, em geral, foram maiores que os apresentados para a cepa N603/95. A mediana dos títulos bactericidas do grupo 1, por exemplo, que foi imunizado com a vacina meningocócica B completa, foi 512, no T45, para a cepa N44/89, enquanto para N603/95, neste mesmo grupo o título foi 32. No grupo 2, imunizado com a vacina B combinada a vacina C conjugada, a mediana dos títulos obtidos para N44/89, após esquema completo, foi de 1024, enquanto para N603/95 foi de 64. Para o grupo 3, onde os camundongos foram vacinados apenas com a VME de N44/89, a mediana dos títulos bactericidas obtidos no T45, foi 1024 para N44/89 e 8 para N603/95. Já no grupo 5, que recebeu a formulação contendo apenas as duas VMEs, por exemplo, observa-se que enquanto a mediana dos títulos para N44/89 ao final do esquema de três doses chega a 1024, a mediana dos títulos para N603/95 atinge o valor de 32. Observa-se, portanto, uma diferença entre as medianas dos títulos bactericidas entre as duas cepas, para a mesma formulação, de 4, 4, 7 e 5  $\log_2$ , respectivamente. Portanto, os resultados obtidos indicam que os antígenos da cepa N44/89 foram capazes de induzir títulos de anticorpos mais elevados que os da cepa N603/95.

A diferença de resposta para as duas cepas vacinais, observada em camundongos, foi vista também no estudo clínico de fase II, realizado com crianças de 4 a 11 anos, após 3 doses de primo vacinação (dados ainda não publicados). Embora as duas VMEs das cepas vacinais tenham sido obtidas empregando-se os mesmos métodos de cultivo e purificação podem existir entre elas, diferenças de expressão das PME e da endotoxina, o que pode ser fundamental para a resposta bactericida.

As vacinas contra o sorogrupo B, objeto deste estudo, têm sido baseadas, desde a década de 80 do século passado, em antígenos subcapsulares em função da baixa imunogenicidade do polissacarídeo capsular, que limita o seu uso como componente vacinal. As vacinas de VMEs, que reúnem vários destes antígenos não capsulares, principalmente as PME e o LOS, como é o caso da vacina meningocócica B brasileira, se destacaram ao longo dos últimos anos (Bjune et al. 1991; Sierra et al. 1991; Galloway et al. 2009).

**Tabela 4-2:** Mediana dos títulos bactericidas obtidos para os grupos do estudo, nos tempos T0 (antes da primeira imunização), T15 (antes da segunda dose), T30 (antes da terceira dose) e T45 (15 dias após a última imunização), para as duas cepas vacinais, N44/89 e N603/95.

GRUPO	Cepa alvo	Títulos bactericidas obtidos				<i>p valor*</i>
		T0	T15	T30	T45	
1	N44/89	2	2 (2-2)	256 (256-256)	512 (512-1024)	0,00576
	N603/95	2	2 (2-2)	16 (4-32)	32 (32-128)	
2	N44/89	2	16 (2-256)	256 (64-1024)	1024 (512-2048)	0,00089
	N603/95	2	4 (2-4)	4 (2-32)	64 (64-128)	
3	N44/89	2	8 (8-16)	256 (64-512)	1024 (1024-2048)	0,00072
	N603/95	2	2 (2-4)	4 (2-32)	8 (4-32)	
4	N44/89	2	4 (2-4)	2 (2-2)	8 (2-16)	0,00806
	N603/95	2	2 (2-2)	64 (32-128)	64 (32-256)	
5	N44/89	2	2 (2-16)	128 (64-1024)	1024 (512-2048)	0,00384
	N603/95	2	2 (2-2)	16 (4-16)	32 (8-128)	
6	N44/89	2	2 (2-4)	2 (2-4)	2 (2-64)	0,27
	N603/95	2	2 (2-8)	4 (2-16)	4 (2-16)	

\*p-valor obtido quando foram comparados os títulos obtidos para N44/89 e N603/95.

( ) Faixa de variação do título bactericida das 5 caixas (contendo cada caixa o pool de soro de 5 camundongos) para as diferentes formulações testadas.

Grupo 1 – Vacina B (2,5µg de VME de N44/89 + 2,5µg de VME de N603/95 + 2,5 µg de dLOS)/ dose

Grupo 2 – Vacina B e C conjugada combinadas

Grupo 3 – Vacina composta de 2,5µg de VME de N44/89/dose

Grupo 4 - Vacina composta de 2,5µg de VME de N603/95/dose

Grupo 5 – Vacina composta de (2,5µg de VME de N44/89 + 2,5µg de VME de N603/95)/ dose

Grupo 6 - 25µg de dLOS/dose

Neste trabalho, buscou-se avaliar a participação das VMEs e do dLOS das cepas brasileiras de meningococo sorogrupo B, na resposta imunológica induzida pela vacina experimental em termos de atividade bactericida dos anticorpos induzidos. Pelos resultados apresentados no ensaio bactericida, com os soros dos animais vacinados frente às cepas N44/89 e N603/95, pode-se concluir que o dLOS, por si só, não foi capaz de induzir resposta protetora, mesmo para a cepa produtora deste antígeno, a N44/89. Na tentativa de avaliar a especificidade



dos anticorpos aos componentes vacinais, utilizou-se o ensaio bactericida competitivo que inclui o procedimento de soroneutralização do soro dos animais vacinados em presença dos diferentes antígenos das preparações teste.

#### **4.2. RESULTADOS DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO SORO DOS ANIMMAIS IMUNIZADOS APÓS INIBIÇÃO COMPETITIVA COM DIFERENTES COMPONENTES VACINAIS.**

Alguns autores têm utilizado a estratégia do uso do teste de atividade bactericida após inibição competitiva frente a diferentes componentes das vacinas teste para avaliar a participação de cada um deles na indução de proteção destas preparações experimentais (Giuliani et al. 2010, Pinto et al. 2013).

##### **4.2.1. Padronização do ensaio de soroneutralização**

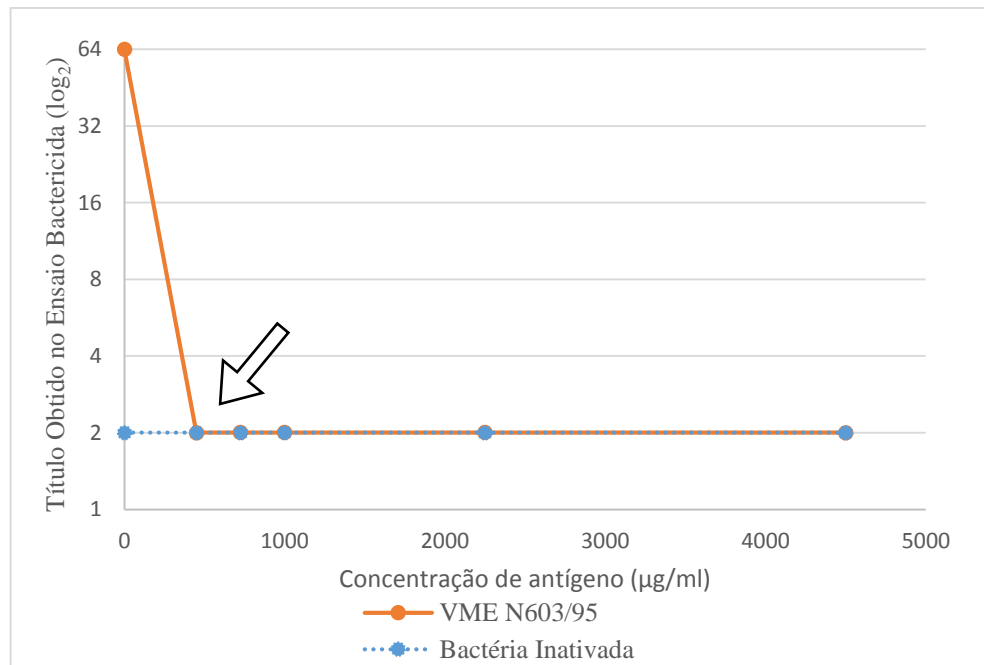
Para padronizar o ensaio de soroneutralização empregou-se como controle positivo a bactéria alvo inativada frente a um soro padrão, assumindo-se como condição de teste aquela capaz de levar à redução total dos títulos obtidos pela imunização. O soro padrão foi obtido do ensaio de potência em camundongos da vacina B brasileira, utilizada no ensaio de fase II em crianças de 4 a 11 anos de idade. Pelo princípio do ensaio, todos os anticorpos induzidos pela vacina seriam capazes de reconhecer os componentes antigênicos na biomassa bacteriana, em caso de exposição ao microorganismo. Para realizar a soroneutralização foram utilizados os antígenos vacinais (VME e dLOS) empregados na formulação da vacina B brasileira utilizada no estudo clínico de fase II.

Para a vesícula de N603/95, a concentração de 450 µg/mL foi suficiente para que os títulos bactericidas se iguallassem ao padrão de redução pré-estabelecido (figura 4-3).

A padronização da soroneutralização com a VME de N44/89 foi realizada a partir da concentração anteriormente definida para a VME de N603/95. Como a concentração de 450 µg/mL de VME de N44/89 não foi suficiente para neutralizar todos os anticorpos induzidos para esta cepa, avaliou-se a soroneutralização em uma faixa de concentração de 450 a 2000 µg/mL. Na figura 4-4 é possível observar que a concentração de 1500 µg/mL foi a mínima suficiente para que ocorresse a máxima redução dos títulos bactericidas. Foi observada a necessidade de utilização de pelo menos três vezes a concentração de proteínas de VME de N44/89 (1500 µg/mL) em relação à concentração utilizada para N603/95 (450 µg/mL).

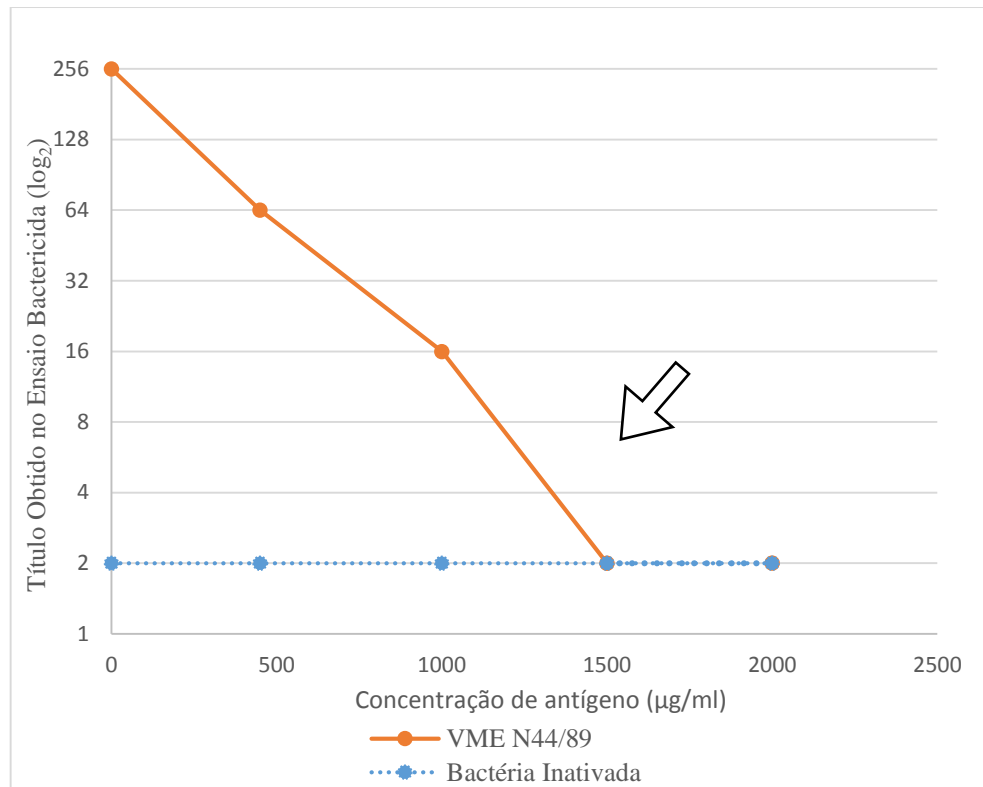
Esses resultados indicam que as VMEs da cepa N44/89 foram capazes de induzir, no mínimo, três vezes mais anticorpos do que a VME da cepa N603/95, corroborando o que já havia sido encontrado no ensaio bactericida, onde os títulos obtidos para a cepa N44/89 foram superiores aos obtidos para a cepa N603/95. Esses resultados indicam que a cepa N44/89

apresenta maior imunogenicidade do que a cepa N603/95. Para compreender melhor essa diferença observada na resposta induzida por essas duas VMEs, seriam necessários estudos complementares que avaliassem as diferenças estruturais entre as duas vesículas.

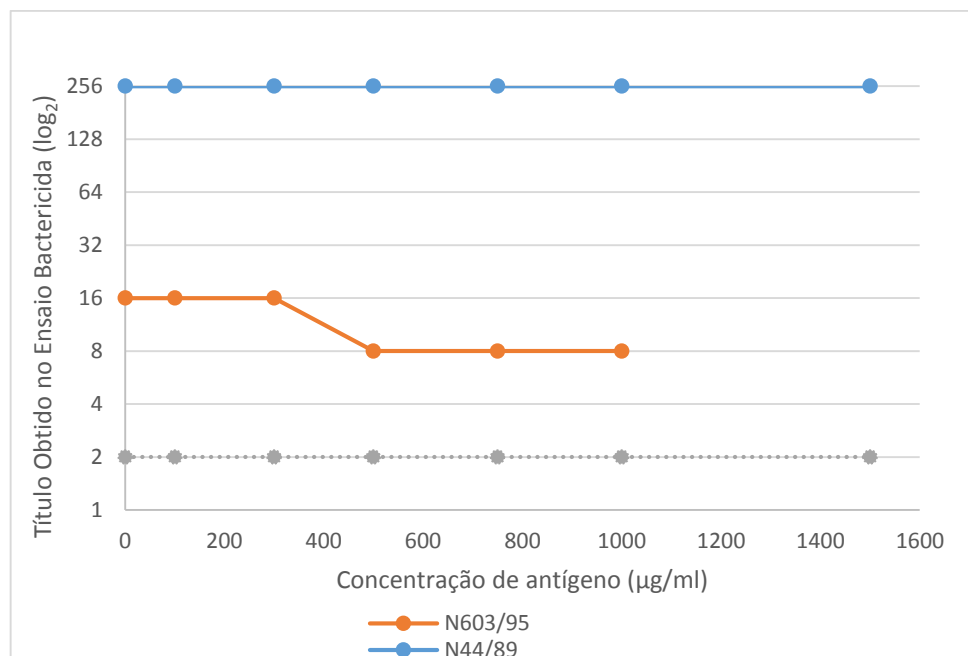


**Figura 4-3:** Relação entre a redução no título obtido no ensaio bactericida e a concentração de antígeno VME de N603/95 utilizada para a soroneutralização. A seta indica a concentração de VME de N603/95 escolhida para uso no ensaio bactericida competitivo. A soroneutralização com a bactéria inativada, com  $D.O_{600nm} = 1,0$ , foi capaz de levar a uma redução total dos títulos bactericidas.

Na figura 4-5 pode ser observado que na padronização da soroneutralização com o dLOS, avaliada na faixa de concentração de 100 a 1500 µg/mL, o padrão de redução de títulos obtidos com a bactéria inativada não foi reproduzido, para as cepas N603/95 e N44/89. Não foi possível testar concentrações de dLOS maiores que 1500 µg/mL, devido a quantidade de antígeno disponível, caracterizando, portanto, uma limitação técnica. Como não houve queda nos títulos bactericidas iniciais após a soroneutralização com o dLOS, nas diferentes concentrações avaliadas, empregou-se para o dLOS o uso de uma concentração equivalente ao das VMEs de N603/95 e de N44/89. Com isso, foram utilizadas as concentrações de 450 µg/mL quando a cepa alvo do bactericida era a N603/95, e de 1500 µg/mL, quando a cepa alvo era a N44/89.



**Figura 4-4:** Relação entre a redução no título obtido no ensaio bactericida e a concentração de antígeno VME de N44/89 utilizado para a soroneutralização. A seta indica a concentração de VME de N44/89 escolhida para uso no ensaio bactericida competitivo. A soroneutralização com a bactéria inativada, com  $D.O_{600nm} = 1,0$ , foi capaz de levar a uma redução total dos títulos bactericidas.



**Figura 4-5:** Relação entre a redução no título obtido no ensaio bactericida e a concentração de antígeno dLOS. Em laranja, observa-se a variação do título bactericida com diferentes concentrações de dLOS, frente à cepa alvo N603/95. Em azul, observa-se esta variação frente à cepa alvo N44/89. A soroneutralização com a bactéria inativada, com  $D.O_{600nm} = 1,0$ , foi capaz de levar a uma redução total dos títulos bactericidas.

#### 4.2.2. Avaliação do ensaio bactericida competitivo

Após a soroneutralização com diferentes componentes vacinais, o soro obtido foi testado em ensaio bactericida frente às cepas N44/89 e N603/95, realizando-se assim o ensaio bactericida competitivo. Denomina-se ensaio bactericida competitivo pelo fato de que os anticorpos específicos para um antígeno se ligam a ele neste procedimento, tornando-se, assim, indisponíveis para induzir a lise na bactéria alvo. Desta forma, os títulos bactericidas detectados no ensaio competitivo são inferiores aos obtidos antes da soroneutralização. As concentrações de antígenos empregadas nos ensaios de soroneutralização foram as definidas, frente a um soro padrão, como capazes de reduzir os títulos de forma comparável ao título obtido após soroneutralização com as cepas vacinais inativadas.

Amostras de soro dos camundongos, referentes ao tempo de coleta T45, imunizados com os seis grupos de vacinas foram soroneutralizados com os antígenos vacinais. Após a realização do ensaio bactericida competitivo, comparou-se a mediana dos títulos obtidos após a soroneutralização com a mediana dos títulos de referência, correspondentes aos obtidos, previamente, para o T45. Quando a diferença entre a mediana do título bactericida após soroneutralização e a mediana do título de referência eram maiores ou igual a dois  $\log_2$ , foi considerado que houve redução significativa do título bactericida. Na tabela 4-3 é possível observar os dados obtidos no ensaio bactericida competitivo com os diferentes antígenos da vacina, empregando a cepa N44/89 como alvo.

O soro dos animais vacinados com a vacina B completa (Grupo 1), vacina B e C combinadas (Grupos 2), vacina de VME de N44/89 (Grupo 3), vacina de VME de N603/95 (Grupo 4) e vacina contendo as duas vesículas (Grupo 5), quando testados com a cepa N44/89 como alvo, apresentaram redução significativa do título bactericida ( $\geq 2 \log_2$ ) quando soroneutralizadas com a VME de N44/89. O fato do grupo 4, imunizado apenas com a VME de N603/95, ter apresentado redução de título considerada significativa, confirma a reatividade cruzada entre as duas cepas vacinais, que já havia sido observada na análise da atividade bactericida induzida pelas vacinas. O grupo 6, que recebeu apenas dLOS como imunógeno, não apresentou título protetor antes da soroneutralização e, por isso, não foi possível observar se existe a redução deste após este procedimento com a VME de N44/89.

Os animais imunizados com as vacinas dos Grupos 2, 3, 4 e 5, cujos soros foram neutralizados com dLOS (1500  $\mu\text{g/mL}$ ), apresentaram redução elevada nos títulos originais. Os grupos 3, 4 e 5, que não foram imunizados com dLOS, apresentaram queda semelhante ao grupo 2, cuja vacina continha a adição deste antígeno, sugerindo que o LOS residual, presente nas VMEs participa da indução de anticorpos específicos com atividade bactericida. O fato do

grupo 4, que recebeu a vacina que continha apenas VME de N603/95, ter apresentado anticorpos específicos para o dLOS de N44/89 já era esperado, visto que esta cepa é capaz de produzir LOS dos imunotipos L1, L3, L7 e L8, dos quais a cepa N603/95 também produz os imunotipos L3 e L7 (ANEXO 2). Já foi descrito na literatura que os imunotipos de LOS L3 e L7 são capazes de induzir anticorpos bactericidas, que podem estar envolvidos na reatividade cruzada entre diferentes cepas (Pinto et al. 2013). Neste trabalho, os dados sugerem que o LOS está envolvido na reatividade cruzada observada para o grupo 4, no ensaio bactericida e na soroneutralização com a VME de N44/89. Contrariamente ao esperado, não foi observada queda semelhante no Grupo 1, sendo este o grupo imunizado com a vacina B completa. Considerando a variabilidade do método, estes resultados precisam ser confirmados, entretanto, devido ao pouco soro disponível não foi possível repetir o ensaio. Novamente, não foi observada redução de títulos para o grupo 6, após a soroneutralização, já que este grupo não apresentou títulos protetores após o esquema completo de imunização.

**Tabela 4-3:** Mediana dos títulos bactericidas para a cepa N44/89, obtida a partir do soro dos camundongos imunizados com as seis diferentes formulações testadas, antes e após soroneutralização com os antígenos vacinais.

GRUPO	T45 ANTES DA SORONEUTRALIZAÇÃO	Mediana do título bactericida do soro			
		T45 APÓS SORONEUTRALIZAÇÃO			
		VME N603/95 (450 µg/mL)	dLOS (1500 µg/mL)	VME N44/89 (1500 µg/mL)	VME N44/89 (1500 µg/mL) + dLOS (1500 µg/mL)
<b>1</b>	512	512 (0)	256 (1)	32 (4)	4 (7)
<b>2</b>	1024	256 (2)	128 (3)	8 (7)	2 (9)
<b>3</b>	1024	512 (1)	128 (3)	16 (6)	2 (9)
<b>4</b>	8	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)
<b>5</b>	1024	256 (2)	128 (3)	2 (9)	2 (9)
<b>6</b>	2	2 (0)	2 (0)	2 (0)	2 (0)

Grupo 1 – Vacina B (2,5µg de VME de N44/89 + 2,5µg de VME de N603/95 + 2,5 µg de dLOS)/ dose

Grupo 2 – Vacina B e C conjugada combinadas

Grupo 3 – Vacina composta de 2,5µg de VME de N44/89/dose

Grupo 4 - Vacina composta de 2,5µg de VME de N603/95/dose

Grupo 5 – Vacina composta de (2,5µg de VME de N44/89 + 2,5µg de VME de N603/95)/ dose

Grupo 6 - 25µg de dLOS/dose

Todas as preparações teste foram formuladas em presença de 0,1mg/dose de Hidróxido de Alumínio. Concentrações na dose de 0,2 ml

( ) Diferença, expressa em  $\log_2$ , entre a mediana do título obtido após soroneutralização com um dado antígeno e o título de referência, antes da soroneutralização.

Para os animais imunizados com as vacinas dos grupos 1, 2 e 3 a associação do dLOS à VME de N44/89 aumentou a redução da queda dos títulos, quando comparada a queda observada após soroneutralização com esses antígenos separadamente, indicando que ambos os

antígenos contribuem para a indução de títulos bactericidas protetores. Entretanto, como a queda total de títulos observada para os dois antígenos combinados não foi representada pelo somatório da queda induzida pelos outros dois antígenos em separado, é provável que esses antígenos atuem de forma sinérgica. A atuação sinérgica dos antígenos no grupo 3, ressalta a importância do papel do LOS residual para a resposta protetora. No grupo 5, que recebeu a preparação composta apenas pelas duas vesículas, este fenômeno não pôde ser observado, já que a soroneutralização com a VME de N44/89 já foi suficiente para redução total do título bactericida.

Para realizar o ensaio bactericida competitivo, empregando-se como cepa alvo a N603/95, foi realizado o mesmo o procedimento de soroneutralização descrito para N44/89. No entanto, quando foram utilizados na etapa da soroneutralização a VME de N603/95, o dLOS ou esses componentes combinados, foi empregada a concentração de 450 µg/mL de cada antígeno, de acordo com a padronização realizada.

Na tabela 4-4 é possível observar os dados obtidos no ensaio bactericida competitivo após a realização do procedimento de soroneutralização com os diferentes antígenos da vacina empregando-se a cepa N603/95 como alvo.

A soroneutralização com a VME de N603/95, nos ensaios em que a N44/89 foi empregada como cepa alvo, provocou redução elevada nos títulos originais dos grupos 2, 4 e 5, que continham VME de N603/95 em sua formulação, confirmando a reatividade cruzada dos anticorpos induzidos pela VME de N603/95 para a cepa N44/89. Mais uma vez, não foi possível observar uma resposta para o grupo vacinado apenas com dLOS (Grupo 6). Também não foi observada queda nos títulos do Grupo 1, cuja vacina também continha VME de N603/95, após soroneutralização com VME de N603/95. Apesar deste resultado não ser o esperado, e provavelmente estar relacionado a variabilidade do método, o volume disponível de soro deste grupo era pequeno e não foi possível repetir o ensaio para confirmar os resultados.

Já foi destacado que, de forma geral, os títulos bactericidas para a cepa N603/95 foram inferiores aos títulos para N44/89 em todo o estudo. Isso diminuiu a amplitude da diferença entre os títulos bactericidas antes e após o processo de soroneutralização. Os títulos baixos para N603/95 diminuíram a sensibilidade de análise de especificidade de anticorpos gerados por este antígeno e sua contribuição potencial na proteção. Estes resultados reforçam a importância de avaliar as concentrações e as proporções dos antígenos na vacina, assim como avaliar a expressão de componentes da membrana externa que atuem de forma sinérgica na resposta induzida.

**Tabela 4-4:** Mediana do título bactericida para a cepa N603/89, obtida a partir do soro dos camundongos imunizados com as seis diferentes formulações testadas, antes e após soroneutralização com os antígenos vacinais.

GRUPO	T45 ANTES DA SORONEUTRALIZAÇÃO	Mediana do título bactericida do soro			
		T45 APÓS SORONEUTRALIZAÇÃO			
		VME N44/89 (1500 µg/mL)	dLOS (450 µg/mL)	VME N603/95 (450 µg/mL)	VME N603/95 (450 µg/mL) + dLOS (450 µg/mL)
1	32	16 (1)	64* (1)	8 (2)	2 (4)
2	96	36 (1,4)	96 (0)	8 (3,5)	4 (4,5)
3	8	4 (1)	8 (0)	8 (0)	2 (2)
4	96	32 (1,6)	48 (1)	4 (4,6)	2 (5,6)
5	32	16 (1)	32 (0)	6 (2,6)	2 (4)
6	4	2 (1)	8* (1)	2 (1)	2 (1)

Grupo 1 – Vacina B (2,5µg de VME de N44/89 + 2,5µg de VME de N603/95 + 2,5 µg de dLOS)/ dose

Grupo 2 – Vacina B e C conjugada combinadas

Grupo 3 – Vacina composta de 2,5µg de VME de N44/89/dose

Grupo 4 - Vacina composta de 2,5µg de VME de N603/95/dose

Grupo 5 – Vacina composta de (2,5µg de VME de N44/89 + 2,5µg de VME de N603/95)/ dose

Grupo 6 - 25µg de dLOS/dose

Todas as preparações teste foram formuladas em presença de 0,1mg/dose de Hidróxido de Alumínio.

Concentrações na dose de 0,2 ml

( ) Diferença, expressa em  $\log_2$ , entre a mediana do título obtido após soroneutralização com um dado antígeno e o título de referência, antes da soroneutralização

Apesar dos títulos induzidos pelas preparações teste para esta cepa terem sido bem inferiores aos induzidos para N44/89, como já dito anteriormente, observa-se tendência dos mesmos fenômenos observados para N44/89. Embora sem significância estatística, a tendência de queda nos títulos obtidos na soroneutralização com VME de N44/89, quando o bactericida foi realizado com a cepa N603/95 como alvo, reforça a hipótese de reatividade cruzada entre as cepas vacinais. Os grupos 1, 2, 4 e 5 soroneutralizados com VME de N603/95 apresentam queda significativa de títulos ( $\geq 2 \log_2$ ). Com a adição do dLOS no procedimento de soroneutralização, a queda do título é acentuada nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5. Essa maior redução dos títulos, que indica uma resposta específica contra a endotoxina de N44/89 quando combinada à VME de N603/95, é compatível com os dados encontrados na literatura, que indicam que o LOS pode atuar de forma sinérgica com outros antígenos e também é capaz de contribuir com a resposta protetora contra cepas heterólogas vacinais mesmo de imunotipos diferentes (Pinto et al. 2013). A dimensão desta resposta cruzada, porém, pode estar relacionada à concentração de cada componente vacinal ou a proporção de cada um deles na formulação completa.

Weynants, em 2007, demonstrou que as VMEs obtidas de cepas nativas de meningococo induzem resposta bactericida preferencialmente contra PorA. Para avaliar se outras proteínas de membrana externa também eram capazes de induzir proteção, eles criaram uma cepa de

meningococo, geneticamente modificada para superexpressar diferentes proteínas de membrana externa. Para que não houvesse a interferência da proteína PorA, a sua expressão foi suprimida. Os resultados obtidos por eles sugeriam que além das proteínas testadas não se comportarem da mesma maneira, o efeito sinérgico de vários componentes da membrana externa e sua modulação na expressão pode ter um efeito importante na resposta cruzada entre diferentes cepas de meningococos (Weynants et al. 2007). Outros autores também têm estudado o papel de vários componentes da membrana externa do meningococo na resposta bactericida observada (Gorringe e Pajon 2012).

Neste trabalho, foi demonstrado que as VMEs e o LOS contribuem para a indução de títulos bactericidas protetores. Entretanto, com as metodologias utilizadas, não foi possível confirmar a real contribuição do dLOS adicionado para a resposta protetora, visto que ele parece desempenhar o mesmo papel que o LOS residual. Para tentar esclarecer esta contribuição, será necessário estudar outros componentes da resposta imunológica induzida pela vacina, que são importantes na definição dos isotipos de anticorpos induzidos, bem como na especificidade destes anticorpos. Portanto, o presente trabalho sugere uma participação efetiva dos componentes vacinais na resposta imunológica induzida pela vacina brasileira, por meio de uma atuação sinérgica entre esses componentes.

#### **4.3. AVALIAÇÃO DO TESTE DE PIROGÊNIOS EM COELHOS**

Alguns autores têm observado que a concentração ou expressão de potenciais alvos vacinais proteicos em vacinas contra o meningococo B está relacionado aos títulos bactericidas induzidos pelas vacinas teste (Donnelly et al. 2010; Giuliani et al. 2010; Pettersson et al. 2006; Weynants et al. 2007). Os dados da soroneutralização indicaram que os antígenos da cepa N44/89 foram capazes de induzir, no mínimo, três vezes mais anticorpos do que os antígenos da cepa N603/95 e por isso, sugerimos que as proporções de antígenos da vacina teste fossem revistos, na perspectiva de novas combinações induzirem respostas bactericidas para N603/95 equivalentes às observadas para a VME de N44/89. Por isso, optou-se por avaliar três diferentes formulações, com concentrações de VMEs distintas. Na vacina 3, a concentração de VME de N603/95 foi triplicada em relação à VME de N44/89. A vacina 2 foi feita com uma razão intermediária entre a VME de N603/95 e a VME de N44/89. Já a vacina 1 continha a vacina meningocócica B de referência, cujas VMEs apresentavam a mesma concentração.

No entanto, considerando que as VMEs são antígenos com alto potencial pirogênico, devido a sua constituição, fez-se necessário verificar, antes mesmo da avaliação da imunogenicidade das novas preparações em camundongos, se esta mudança de proporções seria uma alternativa possível em uma vacina humana. A Organização Mundial de Saúde (OMS)



preconiza limites rígidos de teor de pirogênios em imunobiológicos, incluindo as vacinas (Melandri et al. 2011). A fim de verificar a faixa de possível modificação das proporções de antígenos nas vacinas testes, avaliamos o aumento da temperatura individual dos coelhos após a imunização, como preconiza o teste. Na tabela 4-5 é possível observar que nenhum dos coelhos apresentou variação de temperatura igual ou superior a 0,5 °C, cumprindo assim com os requisitos do teste de pirogênios.

**Tabela 4-5:** Temperatura individual de cada coelho, submetido ao teste de pirogênios, a fim de avaliar a pirogenicidade dos componentes presentes nas três formulações de vacina testadas.

Temperatura	Vacina 1			Vacina 2			Vacina 3		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Mínima	38,70	38,90	38,85	39,10	39,05	39,20	39,20	39,25	39,30
Máxima	38,95	39,10	38,95	39,25	39,25	39,45	39,30	39,35	39,50
Média	38,83	38,99	38,88	39,18	39,16	39,31	39,24	39,31	39,40
Inicial	38,80	38,85	38,75	39,20	39,10	39,15	39,25	39,30	39,30
Variação	0,15	0,25	0,20	0,05	0,15	0,30	0,05	0,05	0,20

C1 – Coelho 1; C2 – Coelho 2; C3 – Coelho 3.

Vacina 1 – 25µg de vesícula N44/89, 25 µg de vesícula N603/95 e 25 µg de dLOS por dose.

Vacina 2 – 18,75µg de vesícula N44/89, 43,75µg de vesícula N603/95 e 25 µg de dLOS por dose.

Vacina 3 – 25µg de vesícula N44/89, 75 µg de vesícula N603/95 e 25 µg de dLOS por dose.

Estes resultados indicam, portanto, que existe a perspectiva de avaliar, em camundongos, a imunogenicidade das novas vacinas testes, contendo diferentes proporções dos antígenos. Assim, espera-se verificar se diferentes concentrações da VME de N603/95 serão capazes de induzir respostas bactericidas equivalentes às observadas para a VME de N44/89. Além disso, será possível avaliar se o sinergismo observado entre as VMEs e o LOS será mantido nestas novas formulações. Desta forma, será melhor compreendida a atuação dos componentes vacinais na resposta bactericida induzida.

## 5. CONCLUSÃO

- › Os resultados das VMEs de N44/89 e de N603/95 e o LOS sugerem que esses componentes possuem um papel no desempenho da vacina, parecendo contribuir para a indução de anticorpos bactericidas, capazes de induzir um título protetor.
- › A indução de resposta protetora da vacina meningocócica B brasileira está relacionada à combinação de antígenos, indicando um efeito sinérgico entre eles;
- › A utilização do ensaio bactericida competitivo permitiu ampliar a avaliação da especificidade dos anticorpos induzidos pela vacina B brasileira, entretanto estudos complementares, utilizando outras abordagens metodológicas, serão necessários a fim de definir a real contribuição do LOS adicionado.
- › As vacinas de VMEs possuem algumas limitações, e, talvez, uma nova alternativa para sua otimização seja reavaliar a concentração dos antígenos usados, e a proporção entre eles, para a formulação.
- › Como potencial otimização da vacina meningocócica B brasileira, algumas formulações contendo diferentes concentrações e proporções de antígenos, foram testadas e aprovadas quanto ao potencial pirogênico.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abio A, Neal KR, Beck CR. **An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years.** *Pathog Glob Heal.* . 2013;107:373–80. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392681>

Ali A, Jafri RZ, Messonnier N, Tevi-Benissan C, Durrheim D, Eskola J, et al. **Global practices of meningococcal vaccine use and impact on invasive disease.** *Pathog Glob Heal.* . 2014a;108:11–20. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24548156>

Ali A, Jafri RZ, Messonnier N, Tevi-Benissan C, Durrheim D, Eskola J, et al. **Global practices of meningococcal vaccine use and impact on invasive disease.** *Pathog Glob Heal.* . 2014b;108:11–20. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24548156>

Amir J, Louie L, Granoff DM. **Naturally-acquired immunity to Neisseria meningitidis group A.** *Vaccine* . 2005;23:977–83. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620470>

Andrews SM, Pollard AJ. **A vaccine against serogroup B Neisseria meningitidis: dealing with uncertainty.** *Lancet Infect Dis* . 2014;14:426–34. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24679664>

ANVISA. Farmacopeia Brasileira. ed. 5a. 2010.

Arnold R, Galloway Y, McNicholas A, O’Hallahan J. **Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand.** *Vaccine.* 2011;29(40):7100–6.

Barroso DE, Carvalho DM, Casagrande ST, Rebelo MC, Soares V, Zahner V, et al. **Microbiological epidemiological history of meningococcal disease in Rio de Janeiro, Brazil.** *Braz. J. Infect. Dis.* 2009;

Bartoloni A, Norelli F, Ceccarini C, Rappuoli R, Costantino P. **Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM197 via adipic acid dihydrazide.** *Vaccine* . 1995;13:463–70. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543714>

Beddek AJ, Li MS, Kroll JS, Jordan TW, Martin DR. **Evidence for capsule switching between carried and disease-causing Neisseria meningitidis strains.** *Infect. Immun.* 2009;77(7):2989–94.

Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, et al. **Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway.** *Lancet.* 1991.

Borg J, Christie D, Coen PG, Booy R, Viner RM. **Outcomes of meningococcal disease in adolescence: prospective, matched-cohort study.** *Pediatrics* . 2009;123:e502–9. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254985>

- Borrow R, Carlone GM. **Serogroup B and C serum bactericidal assays.** *Methods Mol. Med.* 2001;66:289–304.
- Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, et al. **Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile.** *Chilean National Committee for Meningococcal Disease. Vaccine .* 1995;13:821–9. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7483804>
- Bröker M, Bukovski S, Culic D, Jacobsson S, Koliou M, Kuusi M, et al. **Meningococcal serogroup Y emergence in Europe: High importance in some European regions in 2012.** *Hum. Vaccines Immunother.* 2014. p. 1725–8.
- Bundle DR, Jennings HJ, Kenny CP. **Studies on the group-specific polysaccharide of Neisseria meningitidis serogroup X and an improved procedure for its isolation.** *J Biol Chem .* 1974;249:4797–801. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4211095>
- Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. **The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica.** *Epidemiol Infect .* 1987;99:591–601. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3123263>
- CDC. **Meningitis .** Estados Unidos da América; 2013. Recuperado de: <http://www.cdc.gov/meningitis/index.html>
- Chang Q, Tzeng YL, Stephens DS. **Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention.** *Clin Epidemiol .* 2012;4:237–45. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071402>
- Chaudhuri A, Martinez-Martin P, Martin PM, Kennedy PG, Andrew Seaton R, Portegies P, et al. **EFNS guideline on the management of community-acquired bacterial meningitis: report of an EFNS Task Force on acute bacterial meningitis in older children and adults.** *Eur J Neurol .* 2008;15:649–59. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18582342>
- Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. **Meningococcal carriage by age: A systematic review and meta-analysis.** *Lancet Infect. Dis.* 2010;10(12):853–61.
- Claus H, Borrow R, Achtman M, Morelli G, Kantelberg C, Longworth E, et al. **Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci.** *Mol Microbiol .* 2004;51:227–39. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651624>
- Cohn AC, MacNeil JR, Harrison LH, Hatcher C, Theodore J, Schmidt M, et al. **Changes in Neisseria meningitidis disease epidemiology in the United States, 1998-2007: implications for prevention of meningococcal disease.** *Clin Infect Dis .* 2010;50:184–91. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20001736>
- Coureur M, Join-Lambert O, Lécuyer H, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X. **Mechanism of meningeal invasion by Neisseria meningitidis.** *Virulence .* 2012;3:164–72. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366962>
- Coureur M, Join-Lambert O, Lécuyer H, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X. **Pathogenesis of meningococemia.** *Cold Spring Harb Perspect Med .* 2013;3. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732856>
- Donnelly J, Medini D, Boccadifuoco G, Biolchi A, Ward J, Frasch C, et al. **Qualitative and quantitative assessment of meningococcal antigens to evaluate the potential strain coverage of protein-based vaccines.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(45):19490–5.

Doulet N, Donnadieu E, Laran-Chich MP, Niedergang F, Nassif X, Couraud PO, et al. **Neisseria meningitidis infection of human endothelial cells interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial docking structures.** *J Cell Biol* . 2006;173:627–37. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16717131>

Dull PM, McIntosh ED. **Meningococcal vaccine development--from glycoconjugates against MenACWY to proteins against MenB--potential for broad protection against meningococcal disease.** *Vaccine* . 2012;30 Suppl 2:B18–25. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22607895>

English M, MacLennan JM, Bowen-Morris JM, Deeks J, Boardman M, Brown K, et al. **A randomised, double-blind, controlled trial of the immunogenicity and tolerability of a meningococcal group C conjugate vaccine in young British infants.** *Vaccine* . 2000;19:1232–8. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137262>

Erlich KS, Congeni BL. **Importance of circulating antibodies in protection against meningococcal disease.** *Hum. Vaccines Immunother.* 2012. p. 1029–35.

European Centre for Disease Prevention and Control. **Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe 2012** . Stockholm: ECDC; 2015. Recuperado de: <http://www.worldcat.org/title/surveillance-of-invasive-bacterial-diseases-in-europe-20082009/oclc/759934800>

Fernandes RP. **Isolamento, Purificação e Caracterização parcial do Lipooligossacarídeo de Neisseria meningitidis do sorogrupo B, cepa N44/89, como componente vacinal.** Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

Figuroa J, Andreoni J, Densen P. **Complement deficiency states and meningococcal disease.** *Immunol Res* . 1993;12:295–311. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288947>

Figuroa JE, Densen P. **Infectious diseases associated with complement deficiencies.** *Clin Microbiol Rev* . 1991;4:359–95. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1889047>

Findlow J, Borrow R, Snape MD, Dawson T, Holland A, John TM, et al. **Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant Meningococcal serogroup B vaccine with and without outer membrane vesicles, administered in infancy.** *Clin. Infect. Dis.* 2010.

Flexner S, Jobling JW. **An analysis of four hundred cases of epidemic meningitis treated with the anti-meningitis serum.** *J Exp Med* . 1908;10:690–733. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867159>

Frasch CE, Borrow R, Donnelly J. **Bactericidal antibody is the immunologic surrogate of protection against meningococcal disease.** *Vaccine.* 2009;27(SUPPL. 2).

Fu J, Bailey FJ, King JJ, Parker CB, Robinett RS, Kolodin DG, et al. **Recent advances in the large scale fermentation of Neisseria meningitidis group B for the production of an outer membrane protein complex.** *Biotechnol. (N Y)* . 1995;13:170–4. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634759>

Fusco PC, Michon F, Tai JY, Blake MS. **Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates.** *J Infect Dis* . 1997;175:364–72. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203657>

- Galloway Y, Stehr-Green P, McNicholas A, O'Hallahan J. **Use of an observational cohort study to estimate the effectiveness of the New Zealand group B meningococcal vaccine in children aged under 5 years.** *Int J Epidemiol* . 2009;38(2):413–8. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988650>
- Garrido-Esteba M, León-Gómez I, Herruzo R, Cano R. **Changes in meningococcal C epidemiology and vaccine effectiveness after vaccine introduction and schedule modification.** *Vaccine*. 2014;32(22):2604–9.
- Gates FL. **A report on antimeningitis vaccination and observations on agglutinins in the blood of chronic meningococcus carriers.** *J Exp Med* . 1918;28:449–74. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19868270>
- Giuliani MM, Biolchi A, Serruto D, Ferlicca F, Vienken K, Oster P, et al. **Measuring antigen-specific bactericidal responses to a multicomponent vaccine against serogroup B meningococcus.** *Vaccine* . 2010;28:5023–30. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493284>
- Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Draper TL, Gotschlich EC. **Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants.** *J Clin Invest* . 1975;56:1536–47. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1202084>
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. **Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies.** *J Exp Med* . 1969a;129:1307–26. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4977280>
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. **Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity.** *J Exp Med* . 1969b;129:1327–48. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4977281>
- Gorringer AR, Pajon R. **Bexsero: A multicomponent vaccine for prevention of meningococcal disease.** *Hum. Vaccines Immunother*. 2012. p. 174–83.
- Granoff DM. **Relative importance of complement-mediated bactericidal and opsonic activity for protection against meningococcal disease.** *Vaccine*. 2009;
- Greenwood B. **Editorial: 100 years of epidemic meningitis in West Africa - has anything changed?** *Trop Med Int Heal* . 2006;11:773–80. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16771997>
- Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. **Global epidemiology of meningococcal disease.** *Vaccine* . 2009;27 Suppl 2:B51–63. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477562>
- Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, et al. **Description and nomenclature of Neisseria meningitidis capsule locus.** *Emerg Infect Dis* . 2013;19:566–73. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628376>
- He Z, Zhu Y, Jiang H. **Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by phosphoinositide3-kinase-Akt pathway in fibroblasts during acute lung injury.** *J Recept Signal Transduct Res* . 2009;29:119–25. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519177>
- Hedari CP, Khinkarly RW, Dbaibo GS. **Meningococcal serogroups A, C, W-135, and Y tetanus toxoid conjugate vaccine: a new conjugate vaccine against invasive meningococcal disease.** *Infect Drug Resist* . 2014;7:85–99. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729718>

Hill DJ, Griffiths NJ, Borodina E, Virji M. **Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease.** Clin Sci . 2010;118:547–64. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132098>

Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O’Hallahan J, et al. **Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*.** Vaccine. 2009;27(SUPPL. 2).

Holst J, Oster P, Arnold R, Tatley M V, Næss LM, Aaberge IS, et al. **Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future.** Hum Vaccin Immunother . 2013;9:1241–53. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23857274>

Jafri RZ, Ali A, Messonnier NE, Tevi-Benissan C, Durrheim D, Eskola J, et al. **Global epidemiology of invasive meningococcal disease.** Popul. Health Metr. . 2013;11(1):17. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3848799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Jennings HJ, Roy R, Gamian A. **Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice by using an N-propionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine.** J Immunol . 1986;137:1708–13. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3091688>

Jessouroun E, Da Silveira IFB, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch L, et al. **Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock.** Vaccine. 2004;22(20):2617–25.

Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. ***Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines.** Immunology . 2004;113:163–74. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15379976>

Koutangni T, Boubacar Mainassara H, Mueller JE. **Incidence, carriage and case-carrier ratios for meningococcal meningitis in the African meningitis belt: a systematic review and meta-analysis.** PLoS One . 2015;10:e0116725. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658307>

Lemos AP, Brandão AP, Gorla MC, Paiva M V, Simonsen V, Melles CE. **Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001.** J Med Microbiol. 2006;55:751–7. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687595>

Lewis LA, Ram S. **Meningococcal disease and the complement system.** Virulence . 2014;5:98–126. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24104403>

Liu TY, Gotschlich EC, Dunne FT, Jonssen EK. **Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharide.** J Biol Chem . 1971a;246:4703–12. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4327325>

Liu TY, Gotschlich EC, Jonssen EK, Wysocki JR. **Studies on the meningococcal polysaccharides. I. Composition and chemical properties of the group A polysaccharide.** J Biol Chem . 1971b;246:2849–58. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4995120>

- MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Lake D, Elie C, Carlone G, et al. **Immunologic memory 5 years after meningococcal A/C conjugate vaccination in infancy.** *J Infect Dis* . 2001;183:97–104. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087205>
- MacLennan JM, Shackley F, Heath PT, Deeks JJ, Flamank C, Herbert M, et al. **Safety, immunogenicity, and induction of immunologic memory by a serogroup C meningococcal conjugate vaccine in infants: A randomized controlled trial.** *JAMA* . 2000;283:2795–801. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10838647>
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. **A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples.** *Anal Biochem* . 1978;87:206–10. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/98070>
- Martin D, McCallum L, Glennie A, Ruijne N, Blatchford P, O'Hallahan J, et al. **Validation of the serum bactericidal assay for measurement of functional antibodies against group B meningococci associated with vaccine trials.** *Vaccine*. 2005. p. 2218–21.
- Martinon-Torres F, Gimenez-Sanchez F, Bernaola-Iturbe E, Diez-Domingo J, Jiang Q, Perez JL. **A randomized, phase 1/2 trial of the safety, tolerability, and immunogenicity of bivalent rLP2086 meningococcal B vaccine in healthy infants.** *Vaccine* . 2014;32:5206–11. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077420>
- Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM. Cutting edge: **Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent.** *J Immunol* . 2002;168:1533–7. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823477>
- Matsunami T, Kolmer JA. **The relation of the meningococcal activity of the blood to resistance to virulent meningococci.** *J. Immunol*. 1918a;3:201–12.
- Matsunami T, Kolmer JA. **The influence of active normal serum (complement) upon meningococci.** *J. Immunol*. 1918b;3:177–200.
- Melandri VCR, Faria GC, Caldeira C, Presgrave OA. **Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à vigilância sanitária.** *Univ. Ciências da Saúde*. 2011.
- Merz AJ, So M. **Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes.** *Annu Rev Cell Dev Biol* . 2000;16:423–57. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031243>
- Milagres LG, Ramos SR, Sacchi CT, Melles CE, Vieira VS, Sato H, et al. **Immune response of Brazilian children to a Neisseria meningitidis serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy.** *Infect Immun* . 1994;62:4419–24. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927704>
- De Moraes JC, Barata RB. **[Meningococcal disease in São Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics].** *Cad Saude Publica* . 2005;21:1458–71. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158152>
- Morley SL, Pollard AJ. **Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon?** *Vaccine* . 2001;20:666–87. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738731>
- Nassif X, Pujol C, Morand P, Eugène E. **Interactions of pathogenic Neisseria with host cells. Is it possible to assemble the puzzle?** *Mol Microbiol* . 1999;32:1124–32. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383754>
- Orr HJ, Gray SJ, Macdonald M, Stuart JM. **Saliva and meningococcal transmission.** *Emerg Infect Dis* . 2003;9:1314–5. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609470>



- Pettersson A, Kortekaas J, Weynants VE, Voet P, Poolman JT, Bos MP, et al. **Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* lactoferrin-binding proteins LbpA and LbpB.** *Vaccine* . 2006;24:3545–57. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517031>
- Pinto VB, Burden R, Wagner A, Moran EE, Lee CH. **The development of an experimental multiple serogroups vaccine for *Neisseria meningitidis*.** *PLoS One* . 2013;8:e79304. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24244473>
- Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. **Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing.** *Science*. 2000;287(5459):1816–20.
- PNI. **Sistema de Informações do Programa Nacional de Imunizações.** Ministério da Saúde; 2014. Recuperado de: <http://pni.datasus.gov.br/>
- Pollard AJ. **Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy.** *Pediatr Infect Dis J* . 2004;23:S274–9. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15597069>
- Pollard AJ, Frasch C. **Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*.** *Vaccine*. 2001;19(11-12):1327–46.
- Proft T, Baker EN. **Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease.** *Cell Mol Life Sci* . 2009;66:613–35. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18953686>
- Racloz VN, Luiz SJ. **The elusive meningococcal meningitis serogroup: a systematic review of serogroup B epidemiology.** *BMC Infect Dis* . 2010;10:175. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565757>
- Raetz CR, Whitfield C. **Lipopolysaccharide endotoxins.** *Annu Rev Biochem* . 2002;71:635–700. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045108>
- Read RC. ***Neisseria meningitidis*; clones, carriage, and disease.** *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(5):391–5.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. **Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis.** *Nat Immunol* . 2010;11:785–97. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720586>
- Rodriguez AP, Dickinson F, Baly A, Martinez R. **The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* . 1999;94:433–40. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10445998>
- Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, et al. **Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine.** *Infect. Immun.* 1995;63(12):4642–52.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. **Meningococcal disease.** *N Engl J Med* . 2001;344:1378–88. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11333996>
- Rouphael NG, Stephens DS. ***Neisseria meningitidis*: Biology, microbiology, and epidemiology.** *Methods Mol. Biol.* 2012. p. 1–20.
- Sadarangani M, Pollard AJ. **Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story.** *Lancet Infect Dis* . 2010;10:112–24. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113980>

- Sáez-Llorens X, McCracken GH. **Bacterial meningitis in children.** Lancet . 2003;361:2139–48. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826449>
- Sáfadi MA, Cintra OA. **Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention.** Neurol Res . 2010;32:263–71. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406604>
- Sáfadi MA, McIntosh ED. **Epidemiology and prevention of meningococcal disease: a critical appraisal of vaccine policies.** Expert Rev Vaccines . 2011;10:1717–30. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085175>
- Santos GF, Deck RR, Donnelly J, Blackwelder W, Granoff DM. **Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers.** Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001.
- Scherp HW, Rake G. **Studies on meningococcus infection: viii. The type i specific substance.** J Exp Med . 1935;61:753–69. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870389>
- Secretaria de Saúde de São Paulo. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 1 ed. São Paulo: CVE; 2012.
- Serruto D, Adu-Bobie J, Scarselli M, Veggi D, Pizza M, Rappuoli R, et al. **Neisseria meningitidis App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity.** Mol Microbiol . 2003;48:323–34. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675794>
- Sierra G V, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. **Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba.** NIPH Ann . 1991;14:110–95. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1812432>
- Silveira IAFB, Bastos RC, Neto MS, Laranjeira AP, Assis EF, Fernandes SAR, et al. **Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid.** Vaccine. 2007;25(41):7261–70.
- Sjölander H, Eriksson J, Maudsdotter L, Aro H, Jonsson AB. **Meningococcal outer membrane protein NhhA is essential for colonization and disease by preventing phagocytosis and complement attack.** Infect Immun . 2008;76:5412–20. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794285>
- Snape MD, Dawson T, Oster P, Evans A, John TM, Ohene-Kena B, et al. **Immunogenicity of two investigational serogroup B meningococcal vaccines in the first year of life: a randomized comparative trial.** Pediatr Infect Dis J . 2010;29:e71–9. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844462>
- Solis-Cohen M, Heist GD, Solis-Cohen S. **A study of the virulence of meningococci for man and of human susceptibility to meningococcal infection.** J. Immunol. . 1922;7:1–33.
- Stephens DS. **Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis.** Vaccine . 2009;27 Suppl 2:B71–7. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477055>
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. **Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis.** Lancet . 2007;369:2196–210. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604802>
- Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, et al. **Capsule switching of Neisseria meningitidis.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997;94(1):271–6.

Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. **Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile.** *JAMA*. 1999.

Team RDC. **R: A language and environment for statistical computing.** Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015. Recuperado de: <http://www.r-project.org/>

Vermont C, Van Den Dobbelsteen G. **Neisseria meningitidis serogroup B: Laboratory correlates of protection.** *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2002. p. 89–96.

Waravdekar VS, Saslaw LD. **A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-deoxy sugars with the use of the malonaldehyde-thiobarbituric acid reaction.** *J Biol Chem* . 1959;234:1945–50. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13672993>

Wedeg E, Høiby EA, Rosenqvist E, Bjune G. **Immune responses against major outer membrane antigens of Neisseria meningitidis in vaccinees and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial.** *Infect. Immun.* 1998;66(7):3223–31.

Weynants VE, Feron CM, Goraj KK, Bos MP, Denoël PA, Verlant VG, et al. **Additive and synergistic bactericidal activity of antibodies directed against minor outer membrane proteins of Neisseria meningitidis.** *Infect. Immun.* 2007;75(11):5434–42.

Williams JN, Weynants V, Poolman JT, Heckels JE, Christodoulides M. **Immuno-proteomic analysis of human immune responses to experimental Neisseria meningitidis outer membrane vesicle vaccines identifies potential cross-reactive antigens.** *Vaccine* . 2014;32:1280–6. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486354>

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

Yogev R, Tan T. **Meningococcal disease: The advances and challenges of meningococcal disease prevention.** *Hum. Vaccin.* 2011. p. 828–37.

Zollinger WD, Donets MA, Schmiel DH, Pinto VB, Labrie JE, Moran EE, et al. **Design and evaluation in mice of a broadly protective meningococcal group B native outer membrane vesicle vaccine.** *Vaccine* . 2010;28:5057–67. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653107>

Zollinger WD, Mandrell RE. **Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide.** *Infect Immun* . 1983;40:257–64. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6403466>

Zughaier SM, Tzeng YL, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS. **Neisseria meningitidis lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway.** *Infect Immun* . 2004;72:371–80. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688118>

## 7. ANEXOS

ANEXO 1:



### FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - BIOMANGUINHOS

#### Projeto de Desenvolvimento de uma Vacina Contra Meningite Meningocócica Sorogrupos B e C

#### Termo de consentimento para triagem preliminar de doadores

A Fundação Oswaldo Cruz vem trabalhando no desenvolvimento de vacinas brasileiras contra meningite meningocócica há vários anos. A segurança destas vacinas foi avaliada em adultos e não causaram nenhum problema aos voluntários. Em função dos resultados de segurança em adultos, as mesmas vacinas serão testadas em crianças de 4 a 11 anos para avaliação de sua capacidade protetora contra uma doença principalmente importante nesta faixa etária. Serão necessários alguns testes de laboratório em que se utilizam alguns componentes presentes no sangue humano. Precisamos selecionar doadores destes componentes em indivíduos que não tenham resposta contra a bactéria que causa a doença para a qual a vacina está sendo desenvolvida. Este teste é o único disponível para avaliação de proteção da vacina. Como esta doença ocorre principalmente em crianças a maioria dos adultos são normalmente protegidos contra ela. Na população adulta apenas 3% não é protegido e conseqüentemente os componentes do seu sangue podem ser utilizados no teste de laboratório que avalia o poder protetor da nova vacina. Para isto, temos que avaliar uma amostra pequena de sangue (10 mL) de muitos indivíduos para acharmos os doadores destes componentes. Se você não estiver protegido poderemos empregar os componentes do seu sangue para avaliar as respostas das crianças durante o teste da vacina. Neste caso, entraremos em contato com você para saber se poderá doar uma bolsa de seu sangue para este fim. Esta bolsa então deverá ser coletada por aférese.

Os riscos da coleta dos 10 mL para esta triagem inicial são os mesmos que temos ao tirar sangue para qualquer exame de sangue. No máximo pode ocorrer um pequeno hematoma e/ou ardência no local da introdução da agulha. Poderá ocorrer fraqueza ou desmaio passageiro e sem maiores conseqüências, comuns, em algumas pessoas, em qualquer procedimento médico decorrente de ansiedade inclusive pela utilização de seringa.

O sangue coletado será utilizado exclusivamente na realização de ensaios laboratoriais e o nome do indivíduo doador de sangue será mantido em sigilo e o material coletado será exclusivamente utilizado nesta pesquisa. Os resultados dos testes realizados serão encaminhados ao voluntário.

Estou doando espontaneamente o volume de sangue necessário e sinto-me satisfatoriamente esclarecido com relação aos riscos de coleta e uso do sangue para a pesquisa.

Local e data : \_\_\_\_\_

Ass. do Doador: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável: Dra. Ellen Jessouroum - Telefone: 3882 - 9345

## ANEXO 2:



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
 COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
 Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP.  
 Fone: (011) 3068-2800 - Fax: (011) 3085-3505



**Características e Informações epidemiológicas das cepas brasileiras vacinais:**

**N.44/89 - IAL 2443**

Local de Isolamento: São Paulo  
 Ano de Isolamento: 1989  
 Origem: Líquor  
 Sorogrupos: B  
 Sorotipo: 4,7  
 Sorosubtipo: P1.19,15  
 P5:P5.5,7  
 Imunotipo: L1,3,7,8  
 Tipo de VR da PorB: 4,D,7,14a (número de acesso no GenBank U92924)  
 Tipo de VR de PorA: P1.19,15 (número de acesso no GenBank U92924)  
 MEE: ET-5 complex  
 MLST: ST-33

**N.603/95 - IAL 2448**

Local de Isolamento: Rio de Janeiro  
 Ano de Isolamento: 1995  
 Origem: Líquor  
 Sorogrupos: B  
 Sorotipo: 4,7  
 Sorosubtipo: P1.7,1  
 P5:P5.5,7  
 Imunotipo: L3,7  
 Tipo de VR da PorA: P1.7-1,1  
 MLST: ST-639

São Paulo, 21 de Maio de 2007

Seção de Bacteriologia  
 Setor de Bactérias Plogênicas e Toxigênicas

*Maria Cecília O. Gomes*  
 Maria Cecília O. Gomes  
 Pesquisadora Científica (CRF 6720)  
 Seção de Bacteriologia Instituto Adolfo Lutz