

**Estudo da Imunogenicidade de antígenos de *Neisseria lactamica*:  
Utilização de Anticorpos Monoclonais**

Marta Santos Serafim Machado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Natal De Gaspari

São Paulo  
2008

## RESUMO

MACHADO, M. S. Estudo da Imunogenicidade de antígenos de *Neisseria lactamica*: Utilização de Anticorpos Monoclonais. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Evidências epidemiológica e imunológica sugerem que o desenvolvimento da imunidade natural contra doença meningocócica pode está associado com a reação cruzada de antígenos em comuns com *Neisseria meningitidis* e outras bactérias comensais, como *Neisseria lactamica*. O Objetivo deste trabalho foi de investigar a imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMV) de *N. lactamica*, com ou sem a presença de *Bordetella pertussis* (BP), utilizada como adjuvante. Proteínas de (OMV) de *N. meningitidis*, *N. lactamica* e outras espécies do gênero *Neisseria*, foram analisadas por SDS- PAGE, Dot-ELISA e Immunoblot. Grupos de camundongos neonatos da linhagem BALB/c foram imunizados pela via intranasal com auxílio de uma pipeta automática contendo um volume final de 5µl de solução contendo antígenos de *N. lactamica*. Estes animais receberam quatro doses de antígenos de *N. lactamica* pela via intranasal nos dias 3, 7, 9 e 12 depois do nascimento. No trigésimo quinto dia de nascimento os camundongos foram imunizados pela via intramuscular (i.m) com OMV de *N. lactamica* emulsificados com hidróxido de alumínio [AL(OH)3]. Os resultados de nossos estudos mostraram o predomínio de altos títulos de anticorpos dos isótipos IgG e IgM com alta e intermediária avidéz, depois das imunizações pela via (i.n) com *N. lactamica*. A análise do soro por immunoblot mostrou proteínas com reatividade cruzada entre as espécies do gênero *Neisseria* e os anticorpos monoclonais utilizados neste trabalho. Estes resultados sugerem que antígenos de *N. lactamica* e *N. meningitidis* em comum, possam ser importantes na imunidade natural contra doença meningocócica, e no desenvolvimento de vacina.

**Palavras chaves:** Anticorpos monoclonais, Vacinas, *Neisseria lactamica*, Vesículas de membrana externa(OMV)

## ABSTRACT

MACHADO, M. S . Study of Immunogenicity of *Neisseria lactamica* antigens: Use of Monoclonal Antibodies 2008. 119 f. Masters Thesis (Biotecnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Immunological and epidemiological evidences suggest that the development of natural immunity to meningococcal disease may be associated with crossreactive antigens together with *Neisseria meningitidis* and other commensal bacteria, like *Neisseria lactamica*. The present study aimed to investigate the immunogenicity of antigens of outer membrane vesicles (OMV) of *N. lactamica* with or without the presence of *Bordetella pertussis* (BP) used as an adjuvant. Proteins of (OMV) of *N. meningitidis*, *N. lactamica* and other species of the gender *Neisseria* were analyzed by SDS-PAGE, Dot-ELISA and Immunoblot. Groups of neonate BALB/c mice were immunized intranasally using an automatic pipette with a final volume of 5µl of solution containing antigens of *N. lactamica*. Four doses of antigens of *N. lactamica* were administered intranasally to these animals 3, 7, 9 and 12 days after birth. At the 35<sup>th</sup> day the animals were immunized intramuscularly with OMV of *N. lactamica* emulsified with aluminium hydroxide [AL(OH)<sub>3</sub>]. The results of our studies showed the predominance of high titers of antibodies of IgG and IgM isotopes with high and intermediate avidity after intranasal immunization with *N. lactamica*. Immunoblot analysis of serum showed cross-reactivity proteins between the species of the gender *Neisseria* and the monoclonal antibodies used in this study. These results suggest that antigens of *N. lactamica* and *N. meningitidis* in common may be important in natural immunity against meningococcal disease and in the development of vaccine.

**Key words:** Monoclonal antibodies, Vaccines, *Neisseria lactamica*, Outer Membrane Vesicles (OMV).

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Gênero *Neisseria*

O gênero *Neisseria* engloba bactérias definidas como diplococos gram-negativos, aeróbios e oxidase-positivos e frequentemente são isolados da superfície da mucosa de humanos e animais (MORSE et al., 1992). Apresentam a capacidade de fermentar açúcares, com exceção da sucrose, sendo esse um dos critérios de diferenciação entre as espécies, uma vez que *Neisseria lactamica* difere das demais, por ser a única a consumir lactose, além de maltose e glicose. (HOLLIS et al., 1969).

Dois membros deste gênero causam doenças em humanos: *N. meningitidis*, responsável por causar septicemia e meningite, e *Neisseria gonorrhoeae*, agente etiológico da gonorréia (CARTWRIGHT, 1987). *Neisseria lactamica* está próxima a ambas essas espécies, comportando-se como bactéria comensal, embora eventualmente, possa ser um patógeno oportunista (WILSON et al., 1976).

Todos os meningococos compartilham vários determinantes antigênicos, especialmente, com outras espécies de *Neisseria* como a *N. lactamica*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. flavescens*, *N. subflava*, *N. perflava*, *N. flava*, mas também, com espécies diferentes como *Escherichia coli* K1, K2 e K64 (KASPER et al., 1973), *Bacillus pumilis* (ROBBINS et al., 1972) e *Streptococcus faecalis* (GRIFFISS et al., 1977).

### 1.1.1 *Neisseria lactamica*

A taxa de portadores com *N. lactamica* é elevada em todo o mundo, trata-se de uma espécie comensal, não patogênica, colonizadora do trato respiratório, na região da nasofaringe humana. Não contém cápsula polissacarídea e apresenta características bioquímicas similares e determinantes antigênicos em comum com *N. meningitidis* (HOLLIS et al., 1969). A maioria dos isolados de *N. lactamica* apresenta reatividade cruzada com lipopolissacarídeo de imunotipo L 3,7,9 de *N. meningitidis*. Essa fração de LPS está associada com a virulência da cepa do meningococo, e sugere que esse possa ser o antígeno mais envolvido no desenvolvimento da imunidade natural contra a doença meningocócica. (BRAUN et al., 2004).

Crianças pequenas portadores de *N. lactamica* podem adquirir imunidade à *N. meningitidis* através de repetidas exposições aos antígenos de reatividade cruzada presentes nestes organismos (MORLEY e POLLARD, 2002). Como as *N. lactamica* são acapsuladas (GRIFFISS et al., 1987), esta imunidade pode ser ativa contra os componentes subcapsulares dos meningococos, dada à diversidade antigênica e genética das populações de meningococos (CAUGANT, 1998), a proteção ativa induzida por *N. lactamica* pode também apresentar proteção cruzada contra muitas cepas de meningococos. Esta ampla proteção pode, por exemplo, ser uma consequência da exposição a muitas cepas diferentes de *N. lactamica*, resultando em uma resposta imune contra muitas variantes dos diversos componentes das células de *N. meningitidis*. Alternativamente a exposição a uma única cepa de *N. lactamica* pode resultar numa imunidade aos componentes celulares que são altamente conservados dentro do gênero *Neisseria* (BENNETT et al., 2005).

Troncoso e colaboradores (2000) observaram a existência de antígenos comuns para espécies do gênero *Neisseria*, verificando o soro de camundongos imunizados contra Proteínas de Membrana Externa (OMPs) de cepas de *N. meningitidis* e *N. lactamica* e também de pacientes em recuperação de meningite meningocócica o que os levou a identificar os determinantes comuns para as duas cepas. Os principais determinantes encontrados foram proteínas de 55 kDa e 32 kDa, sendo mais tarde conhecidas como proteínas reguladas pelo ferro, e por isso, são consideradas como componentes em potencial para uma nova preparação de vacina para *N. meningitidis*.

Outras proteínas encontradas eram variáveis de acordo com o soro analisado, como a proteína de 65 kDa, visualizada no soro humano e no soro anti-*N. lactamica* de camundongos. O soro de camundongos imunizados com *N. meningitidis* reconheceu algumas proteínas como a de 37 kDa, identificado como proteína ligada a ferro (“ferric binding protein” – FbpA) e ainda duas proteínas de 83 e 15 KDa. Os resultados demonstraram a existência de várias outras proteínas de membrana em comum para as duas espécies, reforçando o fato de que a imunidade natural é parcialmente conferida por espécies comensais do gênero *Neisseria* (GOLDSCHNEIDER, 1969).

Em estudos, Oliver e colaboradores (2002) demonstraram que preparações vacinais feitas com vesículas de membrana externa de *N. lactamica* protegem contra a doença meningocócica em modelo murino. Embora tenha sido confirmada a proteção contra desafios com os meningococos, não foram observados anticorpos com atividades bactericidas. Segundo esses pesquisadores, títulos desses anticorpos não são bons

indicadores de proteção em modelos de infecção em camundongos. A faixa da atividade bactericida *in vitro* dos animais imunizados indica que outros mecanismos de proteção, como opsonofagocitose, possam estar envolvidos.

Em continuidade a esse estudo, Troncoso e colaboradores (2002) verificaram que apenas o soro de crianças convalescentes tinham uma reatividade preferencial com as proteínas de 55 e 65 kDa, sugerindo estes antígenos como de grande importância na indução do mecanismo de proteção para a doença meningocócica.

### **1.1.2 *Neisseria meningitidis***

A bactéria *N. meningitidis* é um colonizador eficiente da região da nasofaringe humana. A infecção é adquirida pelos indivíduos sadios por meio de aerossóis infectantes, provenientes das secreções respiratórias de portadores dos meningococos. (TZENG e STHEFENS 2000; DE VOE, 1982).

As bactérias do gênero *Neisseria* crescem bem em atmosfera de 5% de gás carbônico a 37° C, os meios de cultura contendo ágar sangue, triptose-soja, Müeller-Hinton e chocolate, constituem as condições ideais para o crescimento das cepas de *Neisseria*. Em meio sólido, as colônias são convexas, transparentes, não pigmentadas, não hemolíticas, e os diâmetros bacterianos variam de 1 a 5 milímetros (FREUDLUND, 1993).

Os meningococos desenvolveram um sofisticado mecanismo de escape do sistema imune para sobreviver às bactérias comensais do trato respiratório superior humano e ocasionalmente, invadir a circulação, dentre os quais podemos citar alguns componentes da membrana e da cápsula que estão envolvidos na adesão da bactéria à superfície dos tecidos, podendo também participar de mecanismos antifagocitários e de inibição ou inativação do complemento (VIDARSON et al., 2001). Os fatores de virulência melhor definido do meningococo, estão relacionados com a estrutura dos polissacárideos capsulares, das proteínas de membrana externa e dos lipoligossacárideos (LEE, 1987).

### **1.1.2.1 Cápsula polissacarídica**

*Neisseria meningitidis* apresenta externamente à parede celular, uma camada viscosa denominada cápsula que constitui uma forma de proteção da bactéria contra as condições externas desfavoráveis. Geralmente as cápsulas são de natureza polissacarídea homopolissacarídeas, composta por um único tipo de açúcar ou heteropolissacarídeas, composta por diferentes açúcares, embora também possam ser constituídas por polipeptídeos.

A cápsula está relacionada com a virulência da bactéria pois confere resistência à fagocitose, de modo que, em uma mesma espécie, as amostras capsuladas são mais virulentas que as não capsuladas. A cápsula polissacarídica propicia a entrada do microrganismo na circulação sanguínea, além de resistir à fagocitose mediada pelos neutrófilos, aumentando a sua virulência. As cepas bacterianas não-capsuladas são encontradas somente na nasofaringe de portadores assintomáticos, e não no sangue (LEE, 1987).

### **1.1.2.2 Vesículas de membrana externa(OMVs)**

Zollinger e colaboradores (1972) verificaram que em cultura, os meningococos apresentam alto grau de autólise e vesiculação da membrana celular, produzindo vesículas (ou “blebs”), denominando-as de complexo nativo. De acordo com Schuch (1994), é provável que durante o processo infeccioso, estruturas vesiculares da membrana externa sejam naturalmente formadas e liberadas para o meio circulante. Essas vesículas apresentam interesse imunogênico porque são constituídas de todos os componentes presentes na superfície da membrana externa da bactéria, isto é polissacarídeos, fosfolípidos, lipooligossacarídeos e principalmente proteínas (SANTOS, 2007)

### **1.1.2.3 Proteínas de membrana externa (OMPs).**

As OMPs de diferentes sorotipos de *N. meningitidis* foram separadas pela primeira vez por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida usando o sistema de

Laemmli (1970). Esses estudos sugerem que tais mecanismos devem ser um dos motivos pelos quais as proteínas da membrana externa de *N. meningitidis* são altamente imunogênicas e funcionam como potentes estimulantes de resposta imune humoral e celular a antígenos polissacarídicos quimicamente conjugados àquelas proteínas (DONNELLY et al, 1990).

#### **1.1.2.4 Lipopolissacarídeos (LPS)**

A estrutura da membrana externa é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPSs). Os lipopolissacarídeos estão localizados exclusivamente na camada externa da membrana, enquanto que os fosfolipídeos estão presentes quase completamente na camada interna.

Os glicolípides da membrana externa de bactérias que colonizam as superfícies das mucosas respiratórias apresentam uma cadeia polissacarídica de menor extensão que aquelas observadas em microrganismos da mucosa intestinal, sendo por isso denominados lipooligosacárides (LOS) e encontrados nos gêneros *Neisseria*, *Haemophilus* e *Bordetella* (GRIFFISS et al, 1984). O arranjo do LOS na superfície celular é importante por influenciar diretamente na exposição de proteínas de membrana externa (POOLMAN et al, 1985, SAUKKONEN et al, 1988).

O LPS é considerado o maior fator de virulência de microrganismos Gram negativos, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias e constituem a base para a classificação de *N. meningitidis* em imunotipos (TSAI et al, 1985, TSAI et al, 1987).

#### **1.1.2.5 Proteínas reguladas pelo ferro (IRP).**

O elemento ferro desempenha um importante papel no crescimento bacteriano e sua obtenção constitui um relevante fator de virulência. As espécies patogênicas do gênero *Neisseria* apresentam diferentes mecanismos de aquisição de ferro. Enquanto que os gonococos (*N. gonorrhoeae*) o fazem diretamente das moléculas transferrina e lactoferrina, os meningococos sintetizam um número adicional de membranas externas



de proteínas, em resposta a condições limitantes do elemento (BULLEN, 1981; DE VOE, 1982; MICKELSEN e COLS., 1982). Como a quantidade de ferro livre no ambiente extracelular humano é baixa, o elemento encontra-se associado às moléculas de transferrina no soro, e lactoferrina na superfície da mucosa. As estruturas da OMP do meningococo, provavelmente agem como receptores dessas moléculas (PETTERSSON e COLS., 1993).

#### **1.1.2.6 Pili**

Fímbrias ou pili são apêndices de superfície, filamentosos que apresentam um importante papel na aderência de diferentes bactérias à superfície das mucosas (STEPHENS et al, 1983).

A estrutura filamentosa protéica glicosilada da pili promove a adesão dos meningococos às células epiteliais e endoteliais humanas. Estes apêndices atravessam a cápsula polissacarídica e se ligam a receptores nas células nasofaríngeas, como por exemplo, no co-fator protéico ou CD46 (KALLSTROM et al, 1997, POLLARD e FRASCH, 2001). A presença de pili está frequentemente correlacionada com virulência, sendo necessária para a colonização e subsequente infecção do hospedeiro (STEPHENS et al, 1981, STEPHENS et al, 1983, MEYER et al, 1988)

#### **1.1.3 Classificação dos meningococos**

Tradicionalmente, as cepas foram caracterizadas pelo uso de anticorpos que reconhecem epítomos expostos na superfície da cápsula ou na membrana externa. Por essa técnica, são definidos 12 sorogrupos: A, B, C, H, I, K, L, W135, X, Y, Z e 29E. Cada sorogrupo é definido pelo seu polissacáride capsular. Estudos indicam que essa cápsula exerce importante papel na toxicidade e no poder imunogênico dos meningococos. Ainda são classificados em sorotipos, que são definidos por diferenças das proteínas de classe 2/3, tendo sido descritos mais de 20 deles. Além dos sorotipos as cepas de *N. meningitidis* podem ser classificadas em subtipos. Foram caracterizados mais de 20 subtipos identificados por antígenos de membrana externa de classe 1 (FRASCH et al, 1985), denominados pelo símbolo "P1" (proteína de classe1) seguido

de um número (P1.1, P1.2, P1.16,...), podendo uma mesma cepa expressar mais de um subtipo simultaneamente. Já os imunotipos são definidos a partir da estrutura dos seus oligossacárideos que compõem o LPS, dos quais são descritos atualmente 12 deles, L1 à L12 (MANDRELL e ZOLLINGER, 1977, SCHOLTEN et al., 1994).

A identificação descritiva de uma cepa de meningococo se faz pela seqüência: sorogrupo: sorotipo: subtipo. Um exemplo desta tipagem sorológica é a representação da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15, indicando sorogrupo B, sorotipo 4 e subtipo P1.15.. Neste caso também, uma mesma cepa pode expressar mais de um imunotipo (L) simultaneamente. Esta definição se dá pela presença de oligossacárideos que compõem o LPS.

No Brasil as epidemias do início do século XX tiveram maior participação do meningococo A. Durante os anos 1950/ 1960 predominava o meningococo C. Na década de 1970 o meningococo A alcançou uma prevalência de 60% ficando 33% para o C e 6% para o B. Em 1980-81 as taxas de meningococos A e C caíram para 15% enquanto o meningococo B alcançou a taxa de 60%, predominando até a década de 1990. Atualmente os fenótipos B:4:P1.15 e C:2b: P1.3, são predominantes no Brasil (REQUEJO, 2005).

## **1.2 Doença meningocócica**

A doença meningocócica é um problema de saúde pública no mundo todo. O risco de casos com ligação temporal e espacial, grandes epidemias, o potencial fatal da infecção invasiva, as complicações da doença e a possibilidade do desenvolvimento de seqüelas neurológicas permanentes, justificam a busca e a aplicação de medidas de controle para a população (DE GASPARI, 2000).

As meningites são causadas por uma variedade de microorganismos. Em saúde pública, duas etiologias são de especial importância: meningococo (*N. meningitidis*) e bacilo da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Todavia, para o seu correto acompanhamento, é fundamental que todas as meningites sejam investigadas e tratadas. Deve-se levar em consideração que outras etiologias podem ter importância maior em determinados momentos, pelo aumento do número de casos ou pelo aumento da letalidade (CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica, Estado de São Paulo, 2007).

(GEDDE-DAHL et al., 1983) 1- pacientes com bacteremia sem choque, 2- pacientes com bacteremia com choque, mas sem sepsis meningocócica fulminante (FMS), 3- pacientes com choque e meningite, e 4- pacientes com meningite somente. Esta classificação está correlacionada com a duração da doença antes da hospitalização, o sítio, a severidade e o padrão de ativação de mediadores, e prognóstico. Incidentalmente, outras infecções metastáticas compartimentalizadas, como artrites ou pericardites, podem ser desenvolvidas. Esta última pode ser causada principalmente pelo sorogrupo C (GEDDE-DAHL et al., BLASER et al., 1984; GIBBONS, 1997).

As diferenças entre FMS e meningite estão evidentes clínica e histopatologicamente. A maior diferença entre sepsis e meningite é que na meningite a resposta inflamatória está localizada em um compartimento extravascular destituído de zimogênios para o sistema complemento e de coagulação. Enquanto que a sepsis meningocócica é a mais devastadora forma de sepsis, com alta taxa de mortalidade, causando seqüelas pela inflamação endovascular e trombozes, a meningite meningocócica tem uma taxa relativamente baixa de mortalidade e seqüelas neurológicas comparada com outros tipos de meningites bacterianas (BARAFF, LEE, SCHRIGER. 1993; GOLD, 1983).

### **1.2.1 Aspectos clínicos**

A doença meningocócica manifesta-se, geralmente, por uma dessas formas clínicas principais: meningite meningocócica e meningococemia. A meningococemia, algumas vezes, não se propaga às meningites, devendo-se suspeitar da presença dessa forma nos casos de manifestações febris não diagnosticadas, especialmente, quando acompanhada de erupção cutânea (petequiral) e elevada leucocitose.

A infecção meningocócica pode ser limitada à nasofaringe, somente com sintomas locais ou assintomática, ou ainda pela forma septicêmica grave, caracterizada por início súbito, com calafrios, febre alta (39° C ou mais), dores pelo corpo, prostração e mal-estar, acompanhados de exantema petequiral e meningococemia.

As complicações geralmente são graves podendo deixar seqüelas. As mais freqüentes são necroses profundas com perda de substância de áreas externas, surdez

parcial ou completa, uni ou bilateral, miocardite, pericardite, e complicações da área neurológica (CVE, 2007).

Várias interações entre bactérias e as estruturas das células da superfície da mucosa estão envolvidas na aderência e invasão dos meningococos. Os meningococos aderem a mucosa nasofaríngea via interações entre as células epiteliais humanas e os pili bacterianos e proteínas de membrana externa (POLLARD e FRASCH, 2001). Há provavelmente inúmeros fatores que contribuem para a integridade da barreira mucosa e previne a colonização e invasão. A superfície da mucosa nasal possui cargas e hidrofobicidade que estão relacionadas com a adesão bacteriana, ou seja, mudanças desta carga podem resultar na adesão bacteriana, como ocorre com maior facilidade em fumantes que estão mais predispostos à doença na forma invasiva (POLLARD e FRASCH, 2001). Portadores de meningococos provavelmente também são atingidos pela competição da flora bacteriana, como com *N. lactamica*. Anticorpos anti-meningococos nas secreções nasofaríngeas provavelmente desempenham o maior papel na prevenção da colonização e invasão desta bactéria (POLLARD e FRASCH, 2001).

A defesa do hospedeiro depois da invasão meningocócica é determinada pelas respostas humoral e celular, pertencentes aos sistemas inato e adaptativo (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). Anticorpos específicos promovem proteção completa. Todavia, a defesa inicial é primariamente dependente de elementos da resposta inata que, fundamentalmente, possuem mecanismos mediados pela bacteriólise induzida pela ativação do sistema complemento e opsonofagocitose. (FIJEN et al, 1995, HIBBERD et al, 1999). Por outro lado, os meningococos em geral, apresentam diversas formas de escape do sistema imune, podendo-se citar o combate à Imunoglobulina A (IgA), através da secreção de uma protease capaz de clivar o anticorpo, além de estruturas que permitem a adesão do patógeno na mucosa e mimetismos imunológicos que impedem a produção de anticorpos, por apresentarem estruturas idênticas às do hospedeiro.

### **1.2.2 Diagnóstico e reconhecimento de pacientes de risco**

Os estágios iniciais da meningite meningocócica lembram a FMS, uma vez que os sintomas iniciais são determinados pela repentina entrada dos meningococos na corrente sanguínea. No entanto, geralmente o curso da doença é mais insidioso. As características de lesões hemorrágicas na pele aparecem somente entre 12 e 18 horas após os sintomas da doença, e 20% dos pacientes não desenvolvem lesões (BRANDTZAEG, DAHLE, HOIBY, 1983; RUBENSTEIN, ESTERLY, 1986). O diagnóstico bacteriológico em pacientes com FMS é possível com a coloração de Gram através de uma biópsia da lesão da pele ou LCR (PERIAPPURAM, TAYLOR, KEANE, 1995; VAN DEUREN et al., 1993). O rápido diagnóstico da FMS e o reconhecimento de pacientes de risco são cruciais para o início da terapia com antibióticos e terapia anti-choque

### **1.2.3 Epidemiologia**

Ocorrem casos esporádicos da doença meningocócica durante todo o ano, sendo mais frequentes nos meses frios. Em intervalos regulares, a doença aparece em ondas epidêmicas que podem durar de 2 a 5 anos. A distribuição geográfica da doença é universal, ocorrendo casos esporádicos tanto em zonas urbanas, como rurais. A aglomeração intradomiciliar favorece a transmissão. É primordialmente uma doença de crianças e adultos jovens, em contato com portadores. Em situações epidêmicas, a doença geralmente, atinge todos os grupos de maior idade. A primeira metade da década de 70 foi marcada por uma grande epidemia causada pelos meningococos dos sorogrupos A e C, com taxas de incidência que atingiram até 170/100.000 habitantes em determinadas cidades do país. A década de 80 iniciou-se com baixa incidência da doença, além do domínio do meningococo sorogrupo B (CVE, 2007).

Em 1988, a incidência de meningites na grande São Paulo, área do Estado de São Paulo, foi de cerca de 4 por 100.000 habitantes na grande São Paulo (DE GASPARI e ZOLLINGER, 2001). O surto foi causado pelas cepas do sorogrupo B em 1990 (SACCHI et al., 1998). Durante este período, os isolados de *N. meningitidis* foram caracterizados pela tipagem sorológica B:4P1.15 (HOBBSETAL.,1998).

Já na década de 90, caracterizou-se por uma diminuição proporcional da presença do sorogrupo B e aumento progressivo da doença causada pelo meningococo sorogrupo C.

Durante períodos não epidêmicos, a ausência de sintomas é estimada em cerca de 30% das crianças portadoras, e em 5 a 10% em adultos. Esse fato sugere que são requeridas condições particulares para se estabelecer a infecção. Alguns estudos indicam que fatores como virulência clonal, e aumento da susceptibilidade do hospedeiro, decorrente de infecções respiratórias, podem afetar o balanço entre o estado do portador e o desenvolvimento da doença (VRIES et al., 1996).

#### **1.2.4 Transmissão**

Para que a transmissão ocorra é fundamental contato íntimo com o portador ou o doente. O tempo de incubação pode variar de 2 a 10 dias, ou geralmente de 3 a 4 dias. O período de transmissibilidade persiste até que o meningococo desapareça das secreções da nasofaringe. Em geral, os meningococos sensíveis desaparecem da nasofaringe dentro de 24 horas depois de iniciado o tratamento específico [www.cve.saude.sp.gov.br](http://www.cve.saude.sp.gov.br). Entretanto, o estado de portador pode ser longo, sendo que outras pessoas podem albergar a cepa por muitos meses ou anos sem ficarem doentes (KRISTIANSEN et al, 1998) – são os chamados indivíduos portadores (YAZDANKHAH e CAUGANT, 2004).

#### **1.3 Resposta imune**

A presença de atividade bactericida no soro é um dos fatores que contribuem para evitar a disseminação da *N. meningitidis* no hospedeiro, protegendo-o contra doença meningocócica. Os anticorpos contra o meningococo são inicialmente transferidos via placentária e posteriormente, desenvolvidos ativamente através do contato com a própria *Neisseria*; como por exemplo as não tipáveis ou *Neisseria lactamica*, além de outros agentes etiológicos, como as enterobactérias, cujos antígenos são imunologicamente semelhantes aos do meningococo.

Em indivíduos normais, anticorpos específicos são continuamente produzidos no organismo pela presença das diferentes cepas de meningococos e *Neisseria lactamica* (JONES et al 1998). A presença de anticorpos IgG e IgM com atividade bactericida em resposta a colonização é provavelmente o fator mais importante na prevenção da doença invasiva. Anticorpos protetores são também produzidos por antígenos de reatividade cruzada em outras espécies de bactérias.

O corpo humano apresenta inúmeros mecanismos para evitar a invasão da mucosa e a colonização do invasor, como as cargas da superfície e a interação hidrofóbica das células da mucosa nasal do hospedeiro, que dificultam a adesão da bactéria. A defesa do hospedeiro depois da invasão meningocócica é determinada pela resposta humoral e celular, pertencente aos sistemas inato e adaptativo (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). Anticorpos específicos promovem proteção completa. Todavia, a defesa inicial é primariamente dependente de elementos da resposta inata, que fundamentalmente, possui mecanismos mediados pela bacteriolise induzida pela ativação do sistema complemento e opsonofagocitose. (FIJEN et al, 1995, HIBBERD et al, 1999)

O conhecimento da resposta imune é importante para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, o mecanismo de defesa contra a doença invasiva causada por *N. meningitidis* em humanos, ainda não está totalmente esclarecido. (FRANK et al., 1987).

### **1.3.1 Resposta humoral**

Os mecanismos de imunidade humoral incluem lise pelo complemento, fagocitose mediada por anticorpos e citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

Os anticorpos produzidos contra os meningococos são de diferentes classes de Ig e, portanto têm diferenças funcionais. A imunoglobulina IgG pode iniciar uma série de funções efetoras, como interação com componentes do sistema complemento com o C1q, além de apresentar importante papel no desenvolvimento da resposta imune celular como a citotoxicidade dependente de anticorpos. Os anticorpos da classe IgG em resposta a infecção, são predominantemente das subclasses IgG1 e IgG3, os da subclasse IgG2 aparece em crianças mais velhas, já os da subclasse IgG4 não são detectáveis (POLLARD e FRASCH, 2001). A imunoglobulina IgA não se liga ao C1q, mas bloqueia a atividade bactericida. Já o anticorpo IgM é extremamente potente na ativação do sistema complemento (VIDARSON et al., 2001). Anticorpos IgM possuem maior atividade bactericida do que os da classe IgG

(CRAVEN et al., 1982). Está claro que via alternativa do complemento que não depende de anticorpo, é crucial na proteção contra a doença meningocócica, mas ainda não está claro qual a importância da ativação da via alternativa do complemento na resistência à infecção causada pelo sorogrupo B, uma vez que a cápsula do ácido siálico e a sialilação do LPS do sorogrupo B, inibem a ativação da via alternativa do complemento *in vitro* (POLLARD e FRASCH, 2001).

### 1.3.2 Resposta imune celular

Tem sido descrito que linfócitos T isolados na fase aguda da doença meningocócica (DM) apresentam capacidade reduzida de proliferação, quando estimulados por mitógenos convencionais (GREENWOOD et al, 1979). Estudos em pacientes com meningite meningocócica relataram um percentual elevado de células CD4 com receptores do tipo  $\gamma\delta$  (CD4 $\gamma\delta$ ) e uma diminuição de linfócitos CD4 com receptores do tipo  $\alpha\beta$  (CD4 $\alpha\beta$ ). As células CD4 $\gamma\delta$ , quando estimuladas com concanavalina A produziram níveis elevados de citotoxinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) (RAZIUDOLIN et al, 1994). Estes achados são interessantes, visto que pouco se sabe sobre a função de mecanismos de ativação das células T- $\gamma\delta$ ), as quais são geralmente descritas como CD4- e CD8- .

As proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* são altamente mitogênicas para linfócitos B, em indivíduos normais não estimulam os linfócitos T (WETZLER et al, 1996). Estes autores demonstraram que as proteínas de classe 1 e de classe 3 estimulam especificamente a expressão de B7-2 em linfócitos B que são os principais receptores envolvidos na co-estimulação de linfócitos T por meio dos ligantes CTLA-4 e CD28. Uma vez estimulados, os linfócitos T produzem diversas citocinas incluindo IL-2 e IL-4, as quais irão induzir os linfócitos B a se transformarem em células secretoras de anticorpos.

O envolvimento de linfócitos T na resposta imune à *N. meningitidis* tem sido demonstrado por meio de estudos de proliferação celular de indivíduos imunizados. Indivíduos adultos, após terem sido imunizados com a vacina norueguesa para *N. meningitidis* apresentaram significativa resposta imune dos linfócitos T, quando estes foram estimulados “*in vitro*” com OMV ou com a proteína de classe 1 da cepa vacinal (B:15:P1.17,16). Com o uso da proteína de classe 3 da membrana externa de *N. meningitidis*, os resultados foram marcadamente inferiores (NAESS et al, 1998).



O reconhecimento da proteína de classe 1 da membrana externa de *N. meningitidis* por linfócitos T foi demonstrado ser restrito às moléculas de classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) (WIERTZ et al, 1991). Estudos utilizando peptídeos sintéticos representando toda a seqüência da proteína de classe 1 demonstraram que os epítomos T-imunodominantes estão localizados principalmente na região transmembrânica, sendo portanto, altamente conservados no gênero *Neisseria*. Todos os 45 peptídeos estudados foram reconhecidos por linfócitos T de um ou mais indivíduos, não sendo possível uma associação com o haplotipo do MHC e o reconhecimento de um peptídeo específico (WIERTZ et al, 1992).

As funções das células T-Helper (TH) maduras são baseadas nos tipos de citocinas produzidas (ADKINS, 2000). Células TH-1 secretam IFN-gama, IL-2 e TNF-alfa e beta e estão associadas com hipersensibilidade do tipo tardia. Células TH2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 em auxílio a respostas humorais (ADKINS et al, 2000, ADKINS et al, 2002). O isótipo de anticorpo produzido depende do fenótipo da célula TH. As citocinas dos linfócitos TH2 são responsáveis pelos “switches” dos anticorpos do isótipo IgM para o isótipo IgG e IgE (OGRA, 1996).

A resposta humoral para antígenos de mucosas é dependente das células CD4 e a frequência de respostas TH1 e TH2 após a imunização das mucosas pode determinar o nível e o isótipo de anticorpos na mucosa bem como circulantes. Por isso, o conhecimento do tipo de resposta induzida por um antígeno é uma potente ferramenta a ser utilizada na escolha de um antígeno candidato a uma vacina de mucosas (ÉLSON e DEUTZBAUGH, 1999).

### **1.3.3 Avidéz de anticorpos**

Devido a característica de maturação das células B, o ensaio de avidéz é muito útil para a diferenciação entre as respostas imunes primárias e secundárias. Testes de avidéz de IgG têm sido utilizados para o diagnóstico de infecções virais, para a discriminação entre infecções primárias e reinfecções ou reativações e ainda, para se estimar a eficácia ou falhas vacinais (NARITA et al., 1998, de SOUZA et al., 2004).

Usinger e Lucas (1999) compararam o índice de avidéz e a atividade de opsonização de anticorpos IgG2 produzidos em soros de camundongos imunizados contra *S. pneumoniae* dos sorotipos 6B e 23F, verificando que houve uma correlação inversa entre a magnitude da

resposta e a quantidade de anticorpos necessários para proteger os camundongos de uma bacteremia letal, causada pelo sorogrupo B, demonstrando que anticorpos de maior avidéz foram mais efetivos na destruição do pneumococo quando comparados com os de baixa avidéz.

A imunização com células íntegras de *B. pertussis* morta pelo calor ou a imunização com vacinas acelulares contendo *B. pertussis* detoxificada confere proteção em humanos e animais (VAN DEN BERG et al, 1999). Estudos demonstraram que os filamentos de hemaglutinina, as fimbrias ou a pertactina purificada de *B. pertussis* foram capazes de proteger camundongos contra um desafio com *B. pertussis*. Em humanos, as presenças de anti-FHA e anti-fimbria têm sido correlacionadas com a proteção contra infecção por este patógeno (VAN DEN BERG et al, 1999). Particularmente a *B. pertussis* aumenta a resposta celular, mas também, pode provocar a elevação da resposta humoral, induzindo a produção de anticorpos dos isótipos IgG e IgE (ÉLSON e DEUTZBAUGH, 1999).

#### **1.3.4 Mucosa nasal**

A nasofaringe é o sítio de colonização pelos meningococos e deve ser o sítio primário da invasão inicial para o desenvolvimento da infecção sistêmica (POLLARD e FRASCH, 2001).

A imunização nasal tem sido amplamente utilizada com vacinas contra *Streptococcus pneumoniae* e os vírus *Influenza A* e *B* em crianças e adultos (KUNO-SAKAI et al., 1994, BELSHE et al, 1998). Vários grupos de pesquisas dos Estados Unidos e Noruega, que há mais de 20 anos trabalham com vacinas para o meningococo do sorogrupo B administradas pela via parenteral, também estão investigando alternativas por meio da imunização intranasal, pois até o momento, não há uma vacina efetiva para *N. meningitidis B* (HANEBERG et al, 1998, BAKKE et al, 2001, KATIAL et al, 2002).

Vesículas de membrana externa (OMVs) administradas pela via intranasal possuem estruturas necessárias para indução tanto de resposta imune de mucosa como sistêmica e para desenvolvimento de memória imunológica. HANEBERG et al (1998), administrando uma vacina consistindo de OMVs de *N. meningitidis B* (B:15:P1.7) O papel desses anticorpos produzidos pela imunização intranasal, apesar da necessidade de maiores estudos, demonstram que, além de oferecer proteção, a via das mucosas tem sido também uma alternativa para impedir o efeito tóxico do LPS. COUTINHO (2002), utilizando preparações

antigênicas (Complexo Nativo de Membrana Externa - NOMC), com maior ou menor expressão de LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8 administradas pela via intranasal em modelo murino, verificou que essas preparações antigênicas foram bem toleradas pelos animais, induzindo a produção de anticorpos dos isótipos IgG e IgA em seus soros. Além disso, os anticorpos do isótipo IgG induzidos pela imunização intranasal apresentaram capacidade bactericida, o que vem ressaltar a importância da resposta imune de mucosas, para a produção de uma vacina contra o meningococo do sorogrupo B.

### **1.3.5 Imunidade em neonatos**

A sensibilidade de neonatos para as doenças infecciosas se deve parcialmente a falta de memória imunológica prévia e ao pequeno número de células presentes nos tecidos linfóides periféricos no início da vida (ADKINS et al, 2004). Até uma década atrás, os neonatos eram considerados imunodeficientes. Este conceito se devia à limitada produção de interleucina-2 (IL-2) e células T. No entanto, segundo ADKINS (2000 e 2002), com a descoberta das populações de células TH1/TH2, tornou-se claro que as respostas T-celulares em camundongos neonatos não eram deficientes, mas tendiam para a resposta TH2. A identificação de subclasses de células T de memória foi portanto, um grande avanço para que novos estudos fossem realizados com o intuito de modulação da resposta imune em neonatos (SALLUSTO et al, 1999; SALLUSTO et al, 2000).

Estas tentativas de se estabelecer as razões da baixa eficácia das crianças contra o meningococo B, sugerem que as crianças menores apresentam diferenças na maturação da afinidade dos anticorpos IgG e que a baixa avidéz destes anticorpos pode estar relacionada com a baixa eficácia nesta faixa etária.

### **1.3.6 Adjuvantes**

Adjuvantes são definidos como um grupo de componentes estruturalmente heterogêneos utilizados para se conseguir um aumento da resposta imune para um antígeno. Teoricamente, cada molécula ou substância capaz de favorecer os eventos imunológicos,

promovendo uma melhor resposta imune pode ser definida como um adjuvante (STORNI et al, 2005).

Nesse trabalho nós utilizamos *B. pertussis* (Bp) como adjuvante, que é um patógeno exclusivamente humano, altamente contagioso por meio de gotículas de saliva e aerossóis. Possui diversos fatores de virulência que incluem a toxina pertussis (TP), filamentos de hemaglutinina (FHA), hemolisinas, toxina termo-lábil, endotoxina (LPS), entre outros, que determinam a aderência ao epitélio ciliado do trato respiratório e as atividades biológicas que incluem leucocitose, mitogenicidade e efeitos adjuvantes.

O LPS de *B. pertussis* possui as mesmas propriedades do LPS de outros patógenos Gram negativos, que incluem pirogenicidade, toxicidade, indução de imunidade não-específica, produção de citocinas, e outras. (FRIEDMAN, 1988; PARTON, 1999). DE GASPARI (2000) com pesquisas com o anticorpo monoclonal 8C7Br1 do isótipo IgM, verificou que esse AcM reconheceu epítomos de *N. meningitidis* e reagiu de maneira cruzada com outros microrganismos Gram negativos, inclusive com a *B. pertussis*. O potencial uso em humanos verificado pela existência de vacinas efetivas utilizadas em crianças, a presença de antígenos de reatividade cruzada com o meningococo, a semelhança da via de contágio entre esses dois patógenos e as suas propriedades imunogênicas e adjuvantes demonstram que a *B. pertussis* é importante para o estudo de adjuvantes em vacinas de mucosas para *N. meningitidis*, em especial para uso em crianças.

#### **1.4 Vacinas para doença meningocócica**

Para a eficácia de novas preparações vacinais contra meningites, são necessários vários requisitos: a vacina deve oferecer proteção contra todos os grupos de meningococos patogênicos; ser efetiva para crianças menores de dois anos de idade; induzir proteção imune de longa duração; induzir respostas com altos títulos de anticorpos, além de apresentar segurança e boa tolerância (BRÖKER, 2003).

As vacinas contra *N. meningitidis* normalmente têm por base a reação imunogênica do hospedeiro ao polissacarídeo capsular dos meningococos, e portanto, é sorogrupo específico. As vacinas disponíveis comercialmente são contra o sorogrupo A, C (isoladas ou combinadas) e a tetravalente, contra os meningococos dos sorogrupos A, C, W135, Y (CVE, 2006).

Os principais sinais e sintomas clínicos da doença meningocócica foram descritos primeiramente por Vieusseaux em 1806, e o microrganismo causador desta doença foi identificado por Weichselbaum em 1887. A bactéria foi inicialmente chamada de *Diplococcus intracellularis* e posteriormente foi inserida no gênero *Neisseria* (FREDLUND, 1993).

Embora a maioria dos casos seja assintomática, em algumas situações o patógeno pode penetrar na circulação sangüínea, através da invasão das superfícies mucosas e infectar as meninges ocasionando a meningococemia. Este processo ocorre através da ligação da bactéria com células epiteliais não ciliadas, de onde é transportada até as camadas sub-epiteliais, englobada em vacúolos fagocíticos, alcançando a circulação sistêmica e resultando em graves infecções, muitas vezes, fatais (CARTWRIGHT, 1987; DE VOE, 1982).

Em jovens e adultos os sintomas e sinais específicos são mais comuns e se caracterizam como febre, dores de cabeça, vômito, fotofobia, confusão mental, sinais de rigidez cervical (sinal de Brudzinski) e rigidez toracolombar (CVE, 2006). A severidade da doença meningocócica está relacionada com o nível da endotoxina no plasma e no líquido cérebro espinal (líquor), o qual determina a intensidade da resposta pró-inflamatória do hospedeiro (OGRA et al, 1994, VAN DEUREN et al, 1995). O último estágio é caracterizado pela síndrome de Waterhouse-Frederichen e falência múltipla dos órgãos (MEYER e COLS., 1994; ROSENSTEIN e COLS., 2001).

Os mecanismos que produzem a sepsis e a meningite meningocócica envolvem a penetração da bactéria no epitélio do trato respiratório superior, danos às células endoteliais, invasão da barreira hemato-encefálica, atingindo o sistema nervoso central e iniciação da cascata inflamatória (BRANDTZAEG, 1992). A invasão da superfície da mucosa é uma característica de bactérias patogênicas. A adesão pode iniciar um processo de endocitose direta através do qual, os organismos são internalizados pelas células epiteliais não-ciliadas, freqüentemente em vesículas, de onde são transportados até a membrana da mucosa. Os pilis são as estruturas mais importantes da superfície do meningococo que iniciam a ligação da bactéria as células epiteliais da mucosa nasofaríngea (STEPHENS e FARLEY, 1991).

As cepas isoladas de pacientes com choque séptico meningocócico liberam mais endotoxinas do que as cepas isoladas de pacientes com meningococemia crônica benigna (PRINS et al. 1998). Baseados em eventos patofisiológicos, pacientes com doença meningocócica invasiva podem ser classificados dentro de quatro grupos,

#### **1.4.1 Vacinas baseadas na imunidade cruzada com cepas de *Neisseria***

Todos os meningococos compartilham vários determinantes antigênicos, especialmente com outras espécies de *Neisseria*, como *N. lactamica*. Podem-se destacar ainda outras espécies como *E. coli* K1, K2 e K64 (KASPER e COLS., 1973), *Bacillus pumilis* (ROBBINS e COLS., 1972) e *Streptococcus faecalis* e mais atualmente *Moraxella catarrhalis* (TRONCOSO e COLS., 2003; BRAUN e COLS., 2004). Estudos recentes demonstram que a proteção contra a doença meningocócica pode ser advinda dessas espécies, especialmente, a espécie *N. lactamica*.

Uma das linhas de investigação é baseada na busca de um antígeno universal para todas as cepas de meningococos, que eliminaria o problema do “switch capsular”, freqüente em vacinação utilizando vacinas para sorogrupos (ALONSO e COLS, 2003).

De Gaspari (2000) descreveu uma proteína de massa molecular atribuída ao peptídeo de 50kDa, presente na superfície bacteriana de *N. meningitidis*, com alta capacidade de proteção e capaz de induzir reatividade cruzada para diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos, além de *Neisseria gonorrhoeae*, *N. lactamica*, *H. influenzae* B, *E. coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella flexneri*, *Bordetella pertussis* e *Bacillus subtilis*. Através da produção de um anticorpo monoclonal originado de uma linhagem de células de hibridomas, produtor de um clone denominado 8C7Br1 e de anticorpos da classe IgM, foi capaz de reconhecer os peptídeos de 50, 65 e 60 kDa, através de análise de citometria de fluxo, sendo reativo com 98% das cepas de *N. meningitidis* B. Esses resultados, demonstram a importância do peptídeo de 50kDa como candidato em potencial para a composição de uma nova vacina.

#### **1.4.2 Uso de vacinas utilizando *N. lactamica***

*N. lactamica* é um organismo comensal intimamente relacionado à *N. meningitidis*, o agente causador da doença meningocócica. *N. lactamica* compartilha muitos antígenos comuns com *N. meningitidis*, mas não apresenta cápsula polissacarídica nem o antígeno de subtipo Por A. Estudos de portadores têm demonstrado que *N. lactamica* é encontrada na nasofaringe de crianças pequenas ao mesmo tempo em que o encontro de meningococos é raro. No entanto, a imunidade natural contra a doença meningocócica desenvolvida durante

este período e a presença de *Neisseria* comensal está implicada no desenvolvimento de imunidade. Recentes pesquisas têm estudado os antígenos que podem ser responsáveis pela indução de resposta de anticorpos de reatividade cruzada, os quais têm demonstrado que vacinas baseadas em *N. lactamica* podem proteger contra a doença meningocócica (GORRINGE et al., 2005).

Um recente estudo demonstrou que OMVs de *N. lactamica* também são efetivas na geração de resposta imune de reatividade cruzada em camundongos, quando administrados pela via intranasal (SARDINAS et al., 2005). Em adição, estas OMVs são efetivos adjuvantes intranasais, aumentando grandemente, a resposta de anticorpos quando foi co-administrado com antígenos de superfície da hepatite B.

Estudos com modelos animais embora não mimetizem com precisão a patogênese da doença em humanos, demonstram proteção contra isolados clínicos de diferentes linhagens clonais. *N. lactamica* tem uma vantagem adicional sobre *N. meningitidis* por ser um organismo seguro e não requer todo o aparato que é necessário para a cultura em larga escala de *N. meningitidis*. Desta forma, esta considerável experiência na manufatura de vacinas de OMV podendo ser diretamente aplicadas para uma vacina usando esta cepa comensal ao invés da patogênica.

### **1.4.3 Vacinas contra o meningococo do sorogrupo A**

É constituída de polissacarídeo capsular, purificado. O poder imunogênico e a duração da imunidade desta vacina têm relação com diversos fatores, entre os quais se destacam a idade da pessoa a ser imunizada e o número de doses aplicadas. Essa vacina apresenta eficácia em torno de 90%, observada em estudos realizados no Egito, em crianças de 6 a 15 anos (WAHDAN., et al 1973). Na Finlândia, nos anos de 1974-75 durante epidemia provocada pelo meningococo sorogurpo A, algumas crianças vacinadas contra o meningococo A, adquiriram a doença causada pelos sorogrupos B, C e Y( PELTOLA., et al, 1977).

Estudos desenvolvidos por Kayhty com a vacina anti-A, revelaram que em crianças com idade abaixo de 12 meses, uma resposta de anticorpos estatisticamente significativa foi mantida por um ano; nas de 12 a 17 meses de idade, por dois anos; na faixa etária de 18 a 23 meses houve um rápido declínio dos níveis de anticorpos, sendo mantidos por um pouco mais

de uma ano, e com o aumento da idade, decresceram gradativamente os níveis de anticorpos induzidos pela vacinação (REQUEJO, 2005).

#### **1.4.4 Vacina contra meningococo do sorogrupo C**

O meningococo C é constituído de polissacarídeo capsular purificado. A idade é um fator determinante na resposta imune ao polissacáride. Essa vacina não induz a formação de anticorpos em crianças com idade inferior a 2 anos. Nas crianças com mais de 3 meses de idade a resposta imune corresponde somente a 1/80 daquela obtida em adultos e, por volta dos 2 anos de idade as crianças alcançam uma média de anticorpos próxima a 1/10 daquela observada em adultos. Nas crianças com mais de 2 anos a resposta imune é mais prolongada, mas declina rapidamente após dois anos de observação, para menos de 25% do nível atingido inicialmente (REQUEJO, 2005).

#### **1.4.5 Vacina tetravalente contra meningococos dos sorogrupos A, C, Y e W135**

Aplicada em crianças de 2 a 12 anos, mostra boa resposta imunológica aos 4 sorogrupos. A resposta foi menor nas crianças abaixo de 2 anos, caindo rapidamente o título de anticorpos. Não há referência a estudos de campo utilizando-se a vacina contra W135 e o Y, devido à baixa incidência da meningite por esses sorogrupos. (CVE, 2007).

A vacinação tem sido efetiva no combate a surtos comunitários e epidemias em centros militares (ROSENSTEIN et al, 1998). De maneira similar, essa vacina é capaz de controlar grandes epidemias em países da África, situados no chamado “cinturão da meningite”, promovendo segurança adequada (VEEKEN et al, 1998).

#### **1.4.6 Vacinas atuais em desenvolvimento para o sorogrupo B**

Diversas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento uma vacina eficaz contra o sorogrupo B. O desafio está em encontrar uma preparação vacinal capaz de induzir a produção de anticorpos de reatividade cruzada e bactericidas para diferentes sorotipos e subtipos, além de produzir uma resposta satisfatória dentro da faixa de risco.



A vacina constituída pelo polissacarídeo capsular do meningococo B é pouco imunogênica em crianças e adultos. Uma das prováveis causas dessa tolerância imunológica pode ser a reação cruzada deste antígeno com o polissacarídeo contendo ácido siálico, substância que existe, naturalmente, nos tecidos corporais, impedindo assim, que o polissacarídeo capsular do meningococo B seja reconhecido como substância estranha e, conseqüentemente, não induzir à produção de anticorpos (CVE, 2006).

Estudos vêm sendo realizados com o intuito de se identificar novos antígenos baseados em proteínas conservadas, capazes de indução à produção de anticorpos de reatividade cruzada entre a diferentes cepas de *N. meningitidis* e que sejam imunogênicas em crianças menores de 2 anos de idade (MARTIN et al, 1997, DE GASPARI, 2000, SIEGRIST, 2001, COMANDUCCI et al, 2002). No entanto, existem poucos estudos utilizando modelo animal para demonstrar a importância da imunização neonatal contra patógenos de natureza bacteriana (RAYEVSKAYA et al, 2002, RODUIT et al, 2002, EISENBERG et al, 2003).

As pesquisas visando uma vacina contra o sorogrupo B têm se concentrado nas proteínas da membrana externa da *Neisseria meningitidis* B (FRASCH, 1988).

A vacina de OMV produzida pelo Instituto Finlay em Cuba (comercialmente chamada de VA-MENGOC-BC®) foi produzida da cepa B:4P1.19,15 com polissacarídeo do sorogrupo C e uma preparação de OMP de alto peso molecular e adsorvida com hidróxido de alumínio (SIERRA et al, 1991). A vacina foi designada em resposta a uma única cepa (B:4P1.19,15) epidêmica da doença meningocócica a qual houve uma grande eficácia de cerca de 95% num regime de duas doses administradas em programa de vacinação a jovens e crianças de 3 meses a 19 anos de idade no ano de 1988, a qual contribuiu para o rápido declínio da epidemia em Cuba (RODRIGUEZ et al, 1999). Subseqüentes estudos de eficácia da vacina foram realizados no Brasil (durante um surto epidêmico da doença meningocócica causada por vários sorogrupos B e C incluindo a cepa B:4P1.19,15 , e embora tenha ocorrido a proteção em cerca de 70% em crianças mais velhas , não houve proteção semelhante em crianças mais jovens (MILAGRES et al., 1994).

De acordo com De Gaspari e Zollinger (2001), uma vacina contra o meningococo B a ser produzida no Brasil, deveria conter a proteína de classe 5C, devido à sua expressão altamente significativa em cepas desse microrganismo isoladas neste país. A proteína de classe 5C é expressa pela cepa 44/76 *N. meningitidis* B e é incluída em uma vacina norueguesa contra o meningococo B, baseada em vesículas de membrana externa, demonstrando uma correlação linear entre os níveis de anticorpos bactericidas e os títulos de IgG contra a classe 5C (ROSENQVIST et al, 1993).

#### 1.4.7 Vacinas de vesículas de membrana externa

Os estudos mais recentes fazem uso das vesículas do complexo nativo como vacinas. Geralmente essas preparações vacinais são complexadas com um ou mais polissacarídeos capsulares, para melhorar sua solubilidade e imunogenicidade. Apesar dos bons resultados, essas composições apresentam grande variação fenotípica dos antígenos de membrana externa, sendo consideradas OMPs específicas (FRASCH, 1995).

Vacinas baseadas em OMVs, além de serem pouco imunogênicas em crianças menores de 12 meses induzem resposta sorosubtipo, ou seja, os anticorpos gerados conferem apenas proteção contra cepas homólogas (ZOLLINGER , 1997 e JÓDAR et al, 2002). As vacinas cubana e norueguesa mostraram resposta direcionada contra cepas heterólogas, com a produção de anticorpos bactericidas somente em indivíduos maiores de 10 anos de idade e adultos (TAPPERO et al, 1999).

Em acordo com os estudos de Oliver e colaboradores (2002), os anticorpos de atividade bactericida não foram observados seguindo-se a imunização com OMVs de *N. lactamica*, mas a proteção foi observada em um modelo de camundongos neonatos de bacteremia meningocócica.

Atualmente está sendo preparada em fase I de testes clínicos, uma vacina utilizando OMVs de *N. lactamica*. Estão sendo feitas avaliações da imunogenicidade em voluntários homens adultos, os quais irão determinar se as OMVs destes organismos possuem uma segurança similar ao perfil das vacinas de OMVs de meningococos, e se as respostas imune de reatividade cruzada observadas em camundongos serão observadas também em humanos (GORRINGE, 2005; FINNEY et al, 2007; LIU et al, 2008 ).

## 6 CONCLUSÃO

- A imunização pela via intranasal com OMV das cepas (954 e 767) utilizadas, foi capaz de sensibilizar as células do sistema imune, as quais foram rapidamente estimuladas quando os camundongos foram imunizados pela via intramuscular.
- Títulos expressivos de anticorpos de isótipos IgG e IgM, anti-*N. lactamica* foram detectados no soro de camundongos neonatos, após a imunização com antígenos de *N. lactamica* cepas 954 e 767.
- Os anticorpos IgG e IgM produzidos foram de intermediária e alta avidéz, mostrando assim, uma provável funcionalidade dos mesmos.
- Os anticorpos monoclonais 9B3, 1D8, PIE e WBE12-C10 apresentaram reatividade cruzada com antígenos presentes nas cepas de *N. meningitidis* e *N. lactamica* utilizadas neste estudo .
- Os antígenos de OMV de *N. lactamica* reconhecidos pelos anticorpos monoclonais produzidos, podem ser importantes para fazer parte de uma preparação vacinal para *N. meningitidis*, quando administrada pela via intranasal por induzir a produção de anticorpos de alta e intermediária avidéz
- O estudo de antígenos de membrana externa de *N. lactamica* utilizando anticorpos monoclonais pode ser importante na indução de anticorpos que irão conferir imunidade aos portadores e à doença meningocócica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ADKINS, B.; BU, Y.; CEPERO, E.; PEREZ, R.; Exclusive TH2 primary effector function in spleens but mixed TH1/TH2 function in lymph nodes of murine neonates. **J. Immunol.**, v. 164, p. 2347-2353, 2000.

ALONSO, J. A. N. La inmunización activa frente a *Neisseria meningitidis* serogrupo B. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 21, p. 513-519, 2003.

ANDRADE, J. R.; MARQUES, M. C.; DE SANTA ROSA, M. R. Nasal secretions of *Neisseria lactamica* carriers have an inhibitory effect on *Neisseria meningitidis* attachment to human oroepithelial cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 4, p. 453-57, 1986.

AYEVSKAYA, M.; KUSHNIR, N.; FRANKEL, F.R. Safety and immunogenicity in neonatal mice of a hyperattenuated *Listeria* vaccine directed against human immunodeficiency virus. **J. Virol.**, v. 76, p. 918-922, 2002.

BAKKE, H.; LIE, K.; HAUGEN, IL.; KORSVOLD, G. E.; HIBY, E. A.; NAESS, L. M. Meningococcal outer membrane vesicle vaccine given intranasally can induce immunological memory and booster responses without evidence of tolerance. **Infect Immun.**, v. 69, p. 5010-5015, 2001.

BASSINET, L.; FITTING, C.; HOUSSET, B.; CAVAILLON, J. M.; GUISO, N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin induces Interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5530-5533, 2004.

BELO, E. F.; FERRAZ, A. S.; COUTINHO, L. M.; OLIVEIRA, A. P.; CARMO, A. M.; TUNES, C. F.; FERREIRA, T.; ITO, A. Y.; MACHADO, M. S.; FRANCO, D.; GASPARI, E. N. Production of monoclonal antibodies against *Neisseria meningitidis* using popliteal lymph nodes and in vivo/in vitro immunization: prevalence study of new monoclonal antibodies in greater São Paulo, Brazil. **Hybridoma.**, v. 26, p.:302-310, 2007.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. 2006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>; <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

BENNETT, J. S., GRIFFITHS, D. T., MCCARTHY, N. D., SLEEMAN, K. L., JOLLEY, K. A., CROOK, D. W., MAIDENI, M. C. J. Genetic Diversity and Carriage Dynamics of *Neisseria lactamica* in Infants. **Infect. Immun.**, v.73, p. 2424-2432, 2005.

BRANDTZAEG, P.; HALSTENSEN, A.; KIERULF, P.; ESPEVIK, T.; WAAGE, A. Molecular mechanisms in the compartmentalized inflammatory response presenting as meningococcal meningitis or septic shock. **Microb. Pathog.**, v. 13, p. 423-431, 1992.

BRAUN, J. M., BEUTH, J., BLACKWELL, C. C., GIERSEN, S., HIGGINS, P. G., TZANAKAKI, G., UNVERHAU, H., WEIR, D. M. *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica* and *Moraxella catarrhalis* share cross-reactive carbohydrate antigens. **Vaccine.**, v. 22, p. 898-908, 2004.

BRÖKER, M. Development of new vaccines against meningococcal disease. **Arzneimittelforschung**, v. 53, p. 805-813, 2003.

CARTWRIGHT, K. A. V., J. M. STUART, D. M. JONES, AND N. D. NOAH. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. **Epidemiol infect.**, v. 99, p. 591-601, 1987.

CAUGANT, D. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. **APMIS.**, v. 106, p. 505-525, 1998.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Boletim Epidemiológico Paulista. Disponível em: [www.cve.saude.sp.gov.br](http://www.cve.saude.sp.gov.br). Acesso em: set. 2006.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Boletim Epidemiológico Paulista. Disponível em: [www.cve.saude.sp.gov.br](http://www.cve.saude.sp.gov.br). Acesso em: nov. 2007.

COUTINHO, L. M. C. **Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacáride da cepa epidêmica de B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis*: Imunização intranasal.** São Paulo, 115 f. (Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.

CRAVEN, D. E.; SHEN, K. T.; FRASCH, C. E. Natural bactericidal activity of human serum against *Neisseria meningitidis* isolates of different serogroups and serotypes. **Infect. Immun.**, v. 37, p. 132-137, 1982.

DE GASPARI, E. N & ZOLLINGER, W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. **J Infect. Dis.**, v. 5, p.143-53, 2001.

DE GASPARI, E. N. Detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid from suspicious cases of meningococcal meningitis using polymerases chain reaction and counterimmunoelectrophoresis. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 32, p. 97-103, 2000a.

DE GASPARI, E. N. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*; Study of the cross-reactivity with different bacterial genera. **Hybridoma.**, v. 19, p. 445-453, 2000b.

DE GASPARI, E. N.; RIBEIRO-FILHO, A. A.; BACCOCINI, C. N.; ZOLLINGER, W. D. The use of filter paper monoclonal antibodies in a Dot-blot test for typing *Neisseria meningitidis* B. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2889-2893, 1994.

DE VOE, I.W. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, v. 46, p. 162-190, 1982.

DE VRIES, F. P.; VAN DER ENDE, A.; VAN PUTTEN, J. P.; DANKERT, J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2998-3006, 1996.

DONNELLY, J. J.; DECK, R. R.; LIU, M. A. Immunogenicity of a *Haemophilus influenzae* polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein complex conjugate vaccine. **J. Immunol.**, v. 145, p. 3071-3079, 1990.

EISENBERG, J. C.; CZINN, S. J.; GARHART, C. A.; REDLINE, R.W.; BARTHOLOMAE, W. C.; GOTTWEIN, J. M.; Protective efficacy of anti-*Helicobacter pylori* immunity following systemic immunization of neonatal mice. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 1820-1827, 2003.

FINNEY, M.; VAUGHAN, T.; TAYLOR, S.; HUDSON, M. J.; PRATT, C.; WHEELER, J. X.; VIPOND, C.; FEAVERS, I.; JONES, C.; FINDLOW, J.; BORROW, R.; GORRINGE, A. Characterization of the key antigenic components and pre-clinical immune responses to a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* Outer Membrane Vesicles. **Hum Vaccin.** V. 5, p. 29-37, 2007.

FRANK, M. M. Complement in the pathophysiology of human disease. **N. Eng. J. Med.**, v. 316, p. 1525-1550, 1987.

FRASCH, C. E. Vaccines for prevention of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 134-138, 1989.

FRASCH, C. E.; VAN ALPHEN, L.; HOLST, J.; POOLMAN, J. T.; ROSENQVIST, E. Outer membrane vesicles vaccines for meningococcal disease. **Methods. Mol. Med.**, v. 66, p. 81-107, 2001.

FRASCH, C. E.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, p. 504-510, 1985.

FREDLUND H., SJOHOLM A.G., SELANDER B., HOLMSTROM E., OLCEN P., DANIELSSON D. Serum bactericidal activity and induction of chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes: complement activation pathway requirements in defense against *Neisseria meningitidis*. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.100, p.135-43, 1993.

FRIEDMAN, R.L.; The disease and new diagnostic methods. **Clin. Microb., Rev.** 1: 365-376, 1988.

GEDDE-DAHL, T. W.; HØIBY, E. A.; ESKERUD, J. R. Unbiased evidence on early treatment of suspected meningococcal disease. **Rev. Infect.**, v. 12, p. 359, 361-354, 1990.

GIBSON, B. W.; MELAUGH, W.; PHILLIPS, M.; APICELLA, A.; CAMPAGNARI, A.; GRIFFISS, J. M. Investigation of the structural heterogeneity of lipooligosaccharides from pathogenic *Haemophilus* and *Neisseria* species and of R-type lipopolysaccharides from *Salmonella typhimurim* by electrospray mass spectrometry. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2702-2712, 1993.

GOLD, R. I.; GOLDSCHNEIDER, M. L.; LEPOW, T. F.; DRAPER, AND M. RANDOLPH. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. **J. Infect.**, v.137, p.112-121, 1978.

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E.C.; ARTENSTEIN, M.S. Human Immunity to the meningococcus. I – The role of humoral antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 129, p. 1307-1326, 1969a.

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E.C.; ARTENSTEIN, M.S. Human Immunity to the meningococcus II – Development of natural immunity. **J. Exp. Med.**, v. 129, p. 1327-1348, 1969b.

GORRINGE, A. R. Can *Neisseria lactamica* antigens provide an effective vaccine to prevent meningococcal disease? **Expert Rev. Vaccines.**, v. 4, p. 373-379, 2005.

GORRINGE, A.; HALLIWELL, D.; MATHESON, M.; REDDIN, K.; FINNEY, M.; HUDSON, M. The development of a meningococcal vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. **Vaccine.**, v. 23, p. 2210-2213, 2005a.

GREENWOOD, B.M.; ODULOJU, A.J.; ADE-SERRANO, M. A. Cellular immunity in patients with meningococcal disease and in vaccinated subjects. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 38, p. 9-15, 1979.

GRIFFISS, J. M.; BRANDT, B. L.; BROUD, D. D.; GOROFF, D. K.; BAKER, C. J. Immune response of infants and children to disseminated infections with *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 150, p. 71-79, 1984.

GRIFFISS, J. M.; YAMASAKI, R.; ESTABROOK, M.; KIM, J. J.; Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. **Trans R Soc Trop Med** v. 85, p. 32-36, 1991.

HANEBERG, B.; DALSEG, R.; WEDEGE, E.; HOIBY, E. A.; HAUGEN, I. L.; OFTUNG, F. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1334-1341, 1998.

HOBBS, M. M.; SEILER, A.; ACHTMAN, M.; CANNON, J. G.; Microevolution within a clonal population of pathogenic bacteria: recombination, gene duplication and horizontal genetic exchange in the opa gene family of *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v. 12, p. 171-180, 1994.

HOLLIS, D. G.; WIGGINS, G.L.; WEAVER, R.E. *Neisseria lactamicus* sp., lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. **Appl. Microbiol.**, v. 17, p. 71-77, 1969.

HOLST, J.; FEIRING, B.; FUGLESANG, J. E. Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicles against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. **Vaccine.**, v. 21, p. 734-737, 2003.

JONES, G. R.; CHRISTODOULIDES, M.; BROOKS, J. L.; MILLER, A. R.; CARTWRIGHT, K. A.; HECKELS, J. E.; Dynamics of carriage of *Neisseria meningitidis* in a group of military recruits: subtype stability and specificity of the immune response following colonization. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 451-459, 1998.



KASPER, D. L.; WINKELHAKE, J. L.; BRANDT, B. L.; ARTENSTEIN, M.S. Antigenic specificity of bactericidal antibodies in antisera to *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 127, p. 378-387, 1973.

KASPER, D.L.; WINKELHAKE, J. L.; ZOLLINGER, W.D.; BRANDT, B. L.; ARTENSTEIN, M.S. Enteric bacteria cross-reactive with *Neisseria meningitidis* groups A and C and *Diplococcus pneumoniae* types I and II. **Infect. Immun.**, v. 5, p. 651-656, 1972.

KATIAL, R. K.; BRANDT, B. L.; MORAN, E. E.; MARKS, S.; AGNELLO, V.; ZOLLINGER, W. D. Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 702-707, 2002.

KOVARIK, J & SIEGRIST, C. A. Immunity in early life. **Immunology Today.**, v. 19, p. 150-152, 1988.

KRISTIANSSEN, B. E.; TVETEN, Y.; JENKINS, A. Which contacts of patients with meningococcal disease carry the pathogenic strain of *Neisseria meningitidis*? **A population based study.**, v. 5, p. 621-625, 1998.

KUNO-SAKAI, H.; KIMURA, M.; OHTA, K.; SHIMOJIMA, R.; OH Y, FUKUMI H. Developments in mucosal *influenza virus* vaccines. **Vaccine.**, v. 12: 1303-1308, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LIU, X.; WETZLER, L. M.; MASSARI, P. The PorB porin from commensal *Neisseria lactamica* induces Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice and is a potential immune adjuvant. **Vaccine.**, v. 26, p.786-796, 2008.

MANDRELL, R. E.; ZOLLINGER, W. D. Human immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural infection or vaccination. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1590-1598, 1989.

MARTIN, D.; CADIEUX, N.; HAMEL, J.; BRODEUR, B.R. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1173-1183,1997.

MEDZHITOV R & JANEWAY C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol. Rev.**, v. 173, p. 89-97, 2000.

MEYER, T. F.; POHMER, J.; VAN PUTTEN, J. P. Biology of the pathogenic *Neisseriae*. **Curr. Top. Microb. Immunol. Berlin.**, v. 192, p. 283-316, 1994.

MICHAELSEN, T. E.; AASE, A.; KOLBERG, J.; WEDGE, E.; ROSENQVIST, E. PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. **Vaccine.**, v. 19, p.1526-1533, 2001.

MILAGRES, L. G.; RAMOS, S. R.; SACHI, C. T.; MELLES, C. E. A.; VIERA, V. S. D.; SATO, H.; BRITO, G. S.; MORAES, J. C.; FRASCH, C. E. (1994). Immune response of brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: Comparison with efficacy. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4419 – 4424, 1994.

MORLEY, S. L.; POLLARD, A. J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? **Vaccine.**, v. 20, p. 666-687, 2001.

MORSE, S. A.; KNAPP, J. S. The genus *Neisseria*, p. 2495–2559. *In* A. Naess L.M.; Oftung F.; Aase A.; Wetzler L.M.; Sandin R.; Michaelsen, T.E. Human T-cell responses after vaccination with the Norwegian group B meningococcal outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, v. 21. p. 959-965, 1998.

NARITA, M.; MATSUZONO, Y.; TAKEKOSHI, Y.; YAMADA, S.; ITAKURA, O.; KUBOTA, M. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 799-803, 1998.

NIKLASSON, P. M.; LUNDBERGH, P.; STRANDELL, T. Prognostic factors in meningococcal disease. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 3, p. 17-25, 1971.

OGRA, P. L. Mucosal immunoprophylaxis: An introductory Overview. **Mucosal Vaccines.**, v.42, p. 3-13, 1996.

OGRA, P. L.; FADEN, H.; WELLIVER, R.C. Vaccination strategies for mucosal immune responses. **Clin. Microb.**, v. 14, p. 430-445, 2001.

OHGA, S.; AOKI, T.; OKAKA, K.; AKEDA, H.; FUJIOKA, K.; OSHIMA, A. et al. Cerebrospinal fluid concentrations of interleukin-1 $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  in bacterial meningitis. **Arch. Dis. Child.**, v. 70, p. 123-125, 1994.

OLIVER, K. J.; REDDIN, K. M.; BRACEGIRDLE, P.; HUDSON, M. J.; BORROW, R.; FEAVERS, I. M.; et al. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. **Infect. Immunol.**, v. 70, p. 3621-3626, 2002.

PAVLIAK, V.; FORTUNA-NEVIN, M.; MONTEIRO, M.; MASON, K.; ZHU, D. *Neisseria meningitidis* LOS conjugate vaccine against meningococcal disease. **14th International Pathogenic Neisseria Conference**, 2004.

PELCZAR, M. J.; PETTERSSON, A.; PRINZ, T.; UMAR, A.; VAN DER BIEZEN, J.; TOMMASSEN, J. Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 599-610, 1998.

PLESTED, J. S.; HARRIS, S. L.; WRIGHT, J. C. Highly conserved *Neisseria meningitidis* inner-core lipopolysaccharide epitope confers protection against experimental meningococcal bacteremia. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1223-1234, 2003.

POLLARD, A. J.; LEVIN, M. Production of low-avidity antibody by infants after infection with serogroup B meningococci. **Lancet.**, v. 356, p.2065-2066, 2000.

POLLARD, A.J. & FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **Vaccine.** v.19, p. 1327-1346, 2001.

POLLARD, A.J.; GALASSINI, R.; VAN DER VOORT, E. M.; BOOY, R.; LANGFORD, P.; NADEL, S. Humoral immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2441-2451, 1999.

POOLMAN, J. T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect. Agents. Dis.**, v. 4, p.13-28, 1995.

POOLMAN, J. T.; HOPMAN, C. T. P.; ZANEM, H. C. Problems in the definition of meningococcal serotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 19, p. 339-348, 1982.

POOLMAN, J. T.; WIENTJES, F. B.; HOPMAN, C. T. P, ZANEN HC. Influence of the length of lipopolysaccharide molecules on the surface exposure class 1 and 2 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* 2996 (B:2b:p1.2). In: Schoohnik GK. The pathogenic neisseriae. **Am Soc Microbiol.**, v.23, p. 562-570, 1985.

POOLMAN, J.; BERTHET, F. X. Alternative vaccine strategies to prevent serogroup B meningococcal diseases. **Vaccine.**, v. 20, p. 24-26, 2001.

RAZIUDDIN, S.; MIRNA, E. L.; AWAD, M.; TELMESANI, A. W.; Gamma delta T lymphocytes and proinflammatory cytokines in bacterial meningitis. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 93, p. 793-798, 1994.

ROBBINS, J. B.; MYEROWITZ, L.; WHISNANT, J. K.; ARGAMAN, M.; SCHNEERSON, R.; HANDZEL, Z. T.; GOTSCHLICH, E. C. Enteric bacteria cross-reactive with *Neisseria meningitidis* groups A and C and *Diplococcus pneumoniae* types I and 3. **Infect. Immun.**, v. 6, p. 651-656, 1972.

ROBBINS, J.B.; MYEROWITZ, L.; WHISNANT, J.K.; ARGAMAN, M.; SCHNEERSON, R.; HANDZEL, Z. T. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* 07:K1 (L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. **J. Immunol.**, v.110, p. 262-268, 1973.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E. A.; WEDEGE, E.; CAUGANT, D. A.; FROHOLM, L. O. A new variant of serosubtype P1.16 in *Neisseria meningitidis* from Norway, associated with increased resistance to bactericidal antibodies induced by a serogroup B outer membrane protein vaccine. **Microb. Pathog.**, v. 15, p.197-205, 1993a.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E. A.; WEDEGE, E.; KUSECEK, B.; ACHTMAN, M. The 5C protein of *Neisseria meningitidis* is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 1065-1073, 1993.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E.A.; WEDEGE, E.; BRYN, K.; KOLBERG, J.; KLEM, A. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4642-4652, 1995.

ROSENSTEIN, N. E.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; LEFKOWITZ, L.; CARTTER, M. L.; DANILA, R.; CIESLAK, P.; SHUTT, K. A.; POPOVIC, T.; SCHUCHAT, A.; HARRISON, L. H.; REINGOLD, A. L. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1894-1901, 1999.

ROSENSTEIN, N. E.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; POPOVIC, T.; HUGHES, J. M. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1378-1388, 2001.

SACCHI, C. T.; DE LEMOS, A. P.; CAMARGO, M. C.; WHITNEY, A. M.; MELLES, C. E.; SOLARI, C. A.; FRASCH, C. E.; MAYER, L. W. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype in São Paulo, Brazil, 1990 to 1996. **Rev. Inst. med. Trop.**, v. 40, p. 65-70, 1998.

SALLUSTO, F.; LANGENKAMP, A.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 251, p. 167-171, 2000.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature** ., v. 401, p. 708-712, 1999.

SANCHEZ, S.; TRONCOSO, G.; CRIADO, M. T.; FERREIRÓS, C. In vitro induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*. **Vaccine.**, v. 20, p. 2957-2963, 2002a.

SANTOS, S. **Cinética do cultivo em biorreator de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B.** São Paulo, 155 f. (Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 2007.

SARDINAS, G.; REDDIN, K.; PAJON, R.; GORRINGE, A. Outer membrana vesicles of *Neisseria lactamica* as a potential mucosal adjuvant. **Vaccine.**, v. 24; p.206-214, 2006.

SCHUCH, M.C.D. **Obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais para epítomos protéicos associados à membrana externa de *Neisseria meningitidis*.** 84 f. (Tese de Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

SIEGRIST, C. A. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine.**, v.19, p. 3331-3346, 2001.

SIERRA, G. V.; CAMPA, H. C.; VARCACEL, N. M.; et al. Vaccine against group B *Neisseria Meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. **NIPH Ann. Dis.**, v. 14, p. 195–210, 1991.

STEPHENS D. S.; MCGEE Z.A. Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. **J Infect Dis.**, v.143, p. 525-532, 1981.

STEPHENS, D. S.; FARLEY, M. M. Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. **Ver. Infect. Dis.**, v. 13, p. 22-33, 1991.

STEPHENS, D.S.; HOFFMAN, L.H.; MCGEE, Z.A.; Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. **J Infect Dis.**, v. 48, p. 369-376, 1983.

VAN DEUREN, M.; SANTMAN, F. W.; VAN DALEN, R.; SAUERWEIN, R. W.; SPAN, L. F.; VAN DER MEER, J. W. Plasma and whole blood exchange in meningococcal sepsis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 424-430, 1992.

VAUGHAN, T. E.; HUDSON, M. J.; SKIPP, P. J.; GORRINGE, A. R. Proteomic analysis of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* outer membrane vesicle vaccines. **14<sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference**, 2004.

VEEKEN, H.; RITMEIJER, K.; HAUSMAN, B. Priority during a meningitis epidemic: vaccination or treatment? **Bull WHO.**, v. 76, p. 135-141, 1998.

VERMONT, C. L.; VAN DIJKEN, H. H.; VAN LIMPT, C. J.; DE GROOT, R.; VAN ALPHEN, L.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G.P. Antibody avidity and immunoglobulin G isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 584-590, 2002.

VIDARSON, G.; POL, W. L.; VAN DER ELSE, J. M. H.; VILÉ, H.; JANSEN, M.; RUJIS, J.; MORTON, H. C.; BOEL, E.; DAHA, M. R.; CORTHESEY, B.; DER WINKEL, J. G. L. Activity of human IgG and IgA subclasses in immune defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B. **J. Immunol.**, v. 166, p. 6251-6252, 2001.

VIRJI, M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 466-470, 1996.

WETZLER, L. M.; HO, Y.; REISER, H. *Neisserial* porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 1151-1159, 1996.

WIERTZ, E.J.; VAN DEN BRINK, J. A.; SCHREUDER, G.M.; TERMIJTELEN, A.A.; HOOGERHOUT, P.; POOLMAN, J.T.; T cell recognition of *Neisseria meningitidis* class 1 outer membrane proteins. Identification of T cell epitopes with selected synthetic peptides and determination of HLA restriction elements. **J. Immunol.**, v. 147, p. 2012-2018, 1991.

YAZDANKHAH, S. P.; CAUGANT, D.A. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 821-832, 2004.

ZOLLINGER, W. D.; MORAN, E. E.; DEVI, S. J.; FRASCH, C. E. Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1053-1060, 1997.

STEPHENS, D.S.; WHITNEY, A.M.; ROTHBARD, J.; SCHOOLNI, K. Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 1539-1553, 1985.

STIEHM, E. R.; DAMROSCH, D. S. Factors in the prognosis of meningococcal infection. Review of 63 cases with emphasis on recognition and management of the severely ill patient. **J. Pediatr.**, v. 68, p. 457-467, 1966.

TAPPERO, J. W.; LAGOS, R.; BALLESTEROS, A. M.; PLIKAYTIS B.; WILLIAMS D, DYKES, J. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. **JAMA.**, v. 281, p. 1520-1527, 1999.

TRABULSI, L. R., et al. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRONCOSO, G.; SÁNCHEZ, S.; CRIADO, M.T.; FERREIRÓS, C.M. Analysis of *Neisseria lactamica* antigens putatively implicated in acquisition of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 34, p.9-15, 2002.

TSAI, C.M.; MOCCA, L.F.; FRASCH, C.E. Characterization of the antigenic components in eight lipooligosaccharide immunotypes of *Neisseria meningitidis*. In: Schoohnik GK. The pathogenic neisseriae. **Microbiol.**, v. 35, p. 556-561, 1985.

TSAI, C.M.; MOCCA, L.F.; FRASCH, C.E. Immunotype epitopes of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide types 1 through 8. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 1652-1656, 1987.

TSAI, S.Y.; TSAI, M. J.; KOPS, L. E.; MINGHETTI, P.P.; O'MALLEY, B. W. Transcription factors from oviduct and HeLa cells are similar. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 13055-13059, 1981.

TZENG, Y.L.; STEPHENS, D.S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microbes and Infection.**, v. 2, p. 687-700, 2000.

USINGER, W. R.; LUCAS, A. H. Avidity as a determinant of the protective efficacy of human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2366-2370, 1999.

VAN DEN BERG, B.M.; BEEKHUIZEN, H.; WILLEMS, R.J.L.; MOOI, F.R.; VAN FURTH, R. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. **Infect Immun.**, v. 67, p.1056-1062, 1999.

ZOLLINGER, W. D.; MANDRELL, R. E.; GRIFFSS, J. M.; ALTIERI, P.; BERMAN, S.  
Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein  
immunogenic in man. **J. Clin. Invest.**, v. 63, p. 836-848, 1979.